

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

Rezumatul tezei de doctorat

***IMPLICAȚIILE STRESULUI OXIDATIV ÎN
DIABETUL ZAHARAT DE TIP 2 COMPLICAT CU
NEFROPATIE DIABETICĂ***

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Adriana MUREȘAN

Doctorand:

Daniela Mariana MATEI

**CLUJ-NAPOCA
2010**

CUPRINS

Prefață	2
Cuprins	4
CAPITOLUL I. CONSIDERAȚII TEORETICE	6
1. Introducere	6
1.1. Stresul oxidativ . Definiție	8
1.1.1. Speciile reactive ale oxigenului (SRO).....	9
1.1.2. Efectele speciilor reactive ale oxigenului asupra macromoleculelor organice.....	10
1.2. Rolul stresului oxidativ în nefropatia diabetică din diabetul zaharat de tip 2	12
1.2.1. Surse mitocondriale de generare a speciilor reactive ale oxigenului.....	13
1.2.2. Surse citoplasmice de generare a speciilor reactive ale oxigenului.....	15
1.2.2.1. Creșterea activității căii sorbitol.....	15
1.2.2.2. Formarea produșilor finali de glicare avansată (AGEs).....	16
1.2.2.3. NAD(P)H oxidaza.....	18
1.2.2.4. Xantin oxidaza.....	21
1.2.2.5. Decuplarea NOS (oxid nitric sintetaza).....	21
1.2.2.6. Generarea de SRO pe calea enzimatică a metabolismului acidului arahidonic/linoleic.....	22
1.2.2.7. Activarea protein kinazei C.....	22
1.2.3. Căile de transmitere a semnalelor activate de SRO în nefropatia diabetică.....	23
1.2.4. Activarea factorilor de transcripție de către SRO.....	25
1.2.4.1. Factorul nuclear de transcripție kB.....	25
1.2.4.2. Factorul transformator de creștere beta.....	27
1.2.4.3. Rolul angiotensinei II în dezvoltarea nefropatiei diabetice.....	29
1.2.5. Rolul stresului oxidativ în inducerea leziunilor funcționale și morfopatologice din nefropatia diabetică.....	31
1.2.5.1. Implicațiile SRO în producerea hiperfiltrării glomerulare.....	31
1.2.5.2. Rolul SRO în producerea excreției urinare de albumină.....	33
1.2.5.3. Stresul oxidativ și insuficiența renală cronică.....	34
1.2.6. Rolul SRO în remodelarea matricei extracelulare glomerulare.....	36
1.2.7. Inflamația- implicațiile ei în patogeneza nefropatiei diabetice.....	39
1.2.7.1. Interleukina 1.....	40
1.2.7.2. Interleukina 6.....	40
1.2.7.3. Interleukina 18.....	41
1.2.7.4. Factorul de necroză tumorală alfa.....	41
1.2.7.5. Proteina C reactivă.....	43
1.2.8. Concluzii.....	44
CAPITOLUL II. CERCETAREA PERSONALĂ	47
2.1. Obiectivele cercetării	48
2.2. Ipotezele cercetării	49
2.3. Material și metodă	50
2.3.1. Criterii de includere.....	50
2.3.2. Criterii de excludere.....	50
2.3.3. Loturile de studiu.....	51
2.3.4. Metode de determinare ale parametrilor biochimici studiați.....	54
2.4. Analiza statistică	64
2.5. Rezultate	65
2.5.1. Rezultate lot 1(diabet zaharat tip 2 cu normoalbuminurie).....	65

2.5.2. Rezultate lot 2 (diabet zaharat tip 2 cu microalbuminurie).....	78
2.5.3. Rezultate lot 3 (diabet zaharat tip 2 cu macroalbuminurie).....	91
2.5.4. Rezultate lot 4 (diabet zaharat tip 2 cu insuficiență renală cronică).....	104
2.5.5. Evoluția parametrilor la loturile experimentale raportat la lotul martor.....	117
2.5.6. Corelații.....	136
2.6. Discuții	140
2.7. Concluzii	158
2.7.1. Concluzii lot 1 (diabet zaharat tip 2 cu normoalbuminurie).....	158
2.7.2. Concluzii lot 2 (diabet zaharat tip 2 cu microalbuminurie).....	158
2.7.3. Concluzii lot 3 (diabet zaharat tip 2 cu macroalbuminurie).....	158
2.7.4. Concluzii lot 4 (diabet zaharat tip 2 cu insuficiență renală cronică).....	159
2.7.5. Concluzii generale.....	159
2.8. Bibliografie	161

Cuvinte cheie: diabet zaharat tip 2, nefropatie diabetică, stres oxidativ, malondialdehida, ceruloplasmina, proteina C reactivă, excreția urinară de albumină

CAPITOLUL I- CONSIDERAȚII TEORETICE

Introducere

Este astăzi larg acceptată ideea că principala cauză a tuturor complicațiilor diabetului o constituie creșterea concentrației sanguine a glucozei. Hiperglicemia are ca rezultat generarea de specii reactive ale oxigenului (SRO), ducând în final la apariția stresului oxidativ în țesuturi. În absența unui răspuns antioxidant compensator corespunzător se creează un dezechilibru, ce determină activarea căilor intracelulare stres-dependente. Atât în tipul 1 de diabet zaharat, cât și în tipul 2, complicațiile diabetice interesează endoteliul vascular, nervii și rinichii. Nefropatia diabetică este complicația microvasculară cea mai severă a diabetului, una din cauzele ce conduce la stadiul final al bolii renale, cu necesitate de terapie de substituție renală.

Un element comun observat în toate țesuturile afectate de diabet, inclusiv în rinichi, este prezența unui stres oxidativ crescut. S-a sugerat că stresul oxidativ, consecința hiperglicemiei, ar deține un rol de importanță critică în patogeneza complicațiilor diabetului. La nivel molecular hiperglicemia și proteinele alterate de către nivelul sanguin ridicat al glucozei sunt principalii factori implicați în producerea nefropatiei diabetice. Intensificarea formării speciilor reactive ale oxigenului de către nivelul crescut al glucozei mediază activarea lanțului transportor de electroni mitocondrial, ceea ce reprezintă un eveniment precoce în apariția complicațiilor diabetului. O varietate de factori de creștere și citokine sunt induși pe calea de transducție a semnalelor, implicând protein kinaza C, protein kinaze mitogen activate și transcripția factorului nuclear NF- kB.

Nefropatia diabetică constituie cel mai frecvent diagnostic printre pacienții intrați în programele de epurare extrarenală din SUA și majoritatea țărilor europene. Ea complică aproximativ 20% din cazurile de diabet non insulinodependent. Întrucât prevalența diabetului la nivel mondial este în creștere, din ce în ce mai multe persoane vor experimenta

complicațiile diabetului, dacă nu vor apărea terapii noi și mult mai eficiente, iar măsurile preventive nu vor deveni disponibile.

Având în vedere tendința crescândă a prevalenței diabetului zaharat de tip 2 și a complicațiilor sale microvasculare, la rate aproape epidemice și creșterea numărului dovezilor legate de implicațiile SRO în patogeneza nefropatiei diabetice, abordarea acestei teme de cercetare este deplin justificată.

CAPITOLUL II - CERCETAREA PERSONALĂ

Obiective

Obiectivul principal al acestui studiului a fost evaluarea stresului oxidativ la pacienții cu diabet zaharat tip 2, complicat cu nefropatie diabetică, ca potențial factor patogenetic ce stă la baza evoluției nefropatiei diabetice, de la stadiile inițiale spre cel de insuficiență renală cronică. Nivelul stresului oxidativ a fost stabilit prin dozarea malondialdehidei și a proteinelor carbonilate, cât și a ceruloplasminei și a acidului uric, compuși cu caracter antioxidant.

Obiectivele secundare au fost reprezentate de evidențierea unui proces inflamator subclinic, stabilirea corelației dintre nivelul stresului oxidativ și a inflamației subclinice (proteina C reactivă), ca element mediator al procesului inflamator, stabilirea corelației dintre excreția urinară de albumină și concentrația proteinei C reactive, respectiv a ceruloplasminei. Evaluarea corelației dintre nivelul hemoglobinei glicozilate A_{1c} și a malondiladehidei l-a constituit un alt obiectiv secundar.

Material și metodă

Studiul s-a efectuat pe patru loturi de pacienți cu diabet zaharat tip 2 complicat nefropatie diabetică internați la Spitalului Clinic Municipal „Dr. Gavril Curteanu” Oradea, în perioada 2006- 2009. În studiu au fost incluși 195 pacienți cu diabet zaharat tip 2, complicat cu nefropatie diabetică și 25 de subiecți sănătoși, fără diabet zaharat, ca lot martor.

Selectarea pacienților s-a făcut aleator, în ordinea internării lor, pe baza antecedentelor de diabet zaharat tip 2 și confirmarea excreției urinare de albumină, cu sau fără elemente de retenție azotată. Diagnosticul de nefropatie diabetică s-a confirmat pe baza datelor clinice (durata evoluției diabetului zaharat de tip 2) și paraclinice: examen sumar de urină cu sediment, excreția urinară de albumină/24 ore, rata filtrării glomerulare (calculată pe baza formulei MDRD – Modification of Diet in Renal Disease, cu patru variabile: creatinemie, vârstă, sex, rasă), existența retinopatiei diabetice, ecografia abdominală, controlul necorespunzător al glicemiei, hipertensiunea arterială, elementele de retenție azotată (creatinină, uree, acid uric).

Lotul 1 a cuprins 47 de pacienți cu diabet zaharat tip 2 și normoalbuminurie (excreția urinară de albumină/24 ore sub 30 mg/24 ore, valoarea medie de $16,41 \pm 7,27$ mg/24 ore). Lotul 2 a cuprins 54 pacienți cu diabet zaharat tip 2 și microalbuminurie (excreția urinară de albumină cuprinsă între 30 și 300 mg/24 ore, cu o valoare medie de $142,02 \pm 65,33$ mg/24 ore). Lotul 3 a inclus 49 de pacienți cu diabet zaharat tip 2 și macroalbuminurie (excreția urinară de albumină peste 300 mg/24 ore, cu o valoare medie de $546,19 \pm 205,67$ mg/24 ore), dar cu funcție renală conservată (fără insuficiență renală cronică - rata de filtrare glomerulară, calculată conform formulei MDRD a fost $RFG > 60$ mL/min/1,73m²). În lotul 4 am selectat

45 de pacienți cu diabet zaharat tip 2 și insuficiență renală cronică (RFG < 60 mL/min/1,73m²). În lotul martor au fost cuprinși 25 de subiecți .

La toți subiecții incluși în studiu au fost evaluați următorii parametri biochimici: glicemia, hemoglobina glicozilată A_{1c}, colesterolul total, trigliceridele, urea, creatinina, acidul uric, excreția urinară de albumină/24 ore (microalbuminuria/24 ore), rata de filtrare glomerulară, viteza de sedimentare a hematiilor, hemograma completă, proteina C reactivă, malondialdehida, proteinele carbonilate, ceruloplasmina și examenul sumar de urină cu sediment.

Probele de sânge au fost recoltate dimineața, după 8-12 ore de repaus alimentar, din care au fost dozați parametri biochimici menționați. Hemoglobina glicozilată A_{1c} s-a deeterminat printr-o metodă cromatografic-colorimetrică (Biogamma), proteina C reactivă prin metoda Turbilatex (Al Instruments KFT), malondialdehida printr-o metodă colorimetrică cu acid tiobarbituric, proteinele carbonilate prin metoda spectrofotometrică cu 2,4-dinitrofenilhidrazină, iar ceruloplasmina printr-o metodă colorimetrică cu parafenilendiamină. Trei probe de urină au fost colectate de la subiecți, de unde s-a determinat excreția urinară de albumină și s-a calculat media. Excreția urinară de albumină s-a dozat prin metoda Micro-Albumin ELISA (DRG Diagnostics).

Rezultate

Această cercetare a relevat prezența stresului oxidativ la pacienții cu diabet zaharat tip 2 complicat cu nefropatie diabetică, asociat cu un proces inflamator, încă din stadiile inițiale ale nefropatiei. Apărarea antioxidantă, evaluată prin determinarea nivelurilor ceruloplasminei și ale acidului uric, nu a reușit să prevină producerea de specii reactive ale oxigenului, ceea ce a avut ca rezultat apariția stresului oxidativ.

În acest studiu s-au obținut valori semnificativ crescute ale malondialdehidei la loturile de pacienți cu diabet zaharat tip 2, complicat cu nefropatie diabetică comparativ cu lotul martor. De asemenea s-au înregistrat creșteri semnificative între loturile experimentale. Valorile malondialdehidei au fost aproape triple la lotul cu nefropatie diabetică și insuficiență renală cronică, raportat la lotul martor. Cel mai înalt nivel al malondialdehidei în cadrul acestui grup ar putea fi explicat prin asocierea mai multor factori generatori de stres oxidativ. În primul rând acești pacienți au avut cea mai înaintată vârstă, cea mai îndelungată evoluție a diabetului zaharat. De asemenea în acest grup valorile hemoglobinei glicozilate A_{1c} au fost cele mai înalte, ceea ce traduce faptul că diabetul acestor pacienți a fost mai puțin echilibrat, chiar dacă valorile glicemiei nu au fost cele mai ridicate. Nivelul stresului oxidativ, obiectivat prin dozarea malondialdehidei s-a corelat într-o măsură mai mare cu nivelul hemoglobinei glicozilate A_{1c} ($r = 0,56$, $p < 0,001$), decât cu cel al glicemiei ($r = 0,40$, $p < 0,001$).

Un alt factor generator de stres oxidativ este inflamația. În toate stadiile nefropatiei diabetice s-a evidențiat un proces inflamator, care s-a accentuat progresiv, de la stadiile incipiente spre cel final de insuficiență renală cronică. Proteina C reactivă a crescut de aproape trei ori de la lotul 1 (diabet zaharat tip 2 și normoalbuminurie) până la pacienții lotului cu insuficiență renală cronică (lotul 4).

O altă sursă de creștere a lipoperoxidării este hipertrigliceridemia prezentă la pacienții cu diabet zaharat tip 2. În acest studiu s-au evidențiat valori semnificativ mărite ale trigliceridelor la subiecții diabetici, raportat la martori. Nivelul stresului oxidativ s-a corelat pozitiv și semnificativ cu cel al trigliceridelor (între malondialdehidă și trigliceride, indicele de corelație Pearson a fost $r = 0,29$, $p < 0,001$), dar nesemnificativ cu cel al colesterolului (între malondialdehidă și colesterolemie, $r = 0,13$, $p = 0,06$).

Toate aceste date vin să confirme existența indubitabilă a stresului oxidativ în diabetul zaharat de tip 2. Nivelul stresului oxidativ în diabetul complicat cu nefropatie diabetică este mai ridicat comparativ cu diabetul fără această complicație. Stresul oxidativ ar putea să fie elementul patogenetic care mediază apariția complicațiilor diabetice, inclusiv a nefropatiei.

Și în cazul proteinelor carbonilate s-au obținut valori semnificative statistic mărite la loturile experimentale comparativ cu lotul martor ($p > 0,001$). Aceeași creștere semnificativă s-a observat de la un lot la altul, odată cu agravarea nefropatiei diabetice. Alături de creșterea malondialdehidei, mărirea concentrației proteinelor carbonilate atestă prezența stresului oxidativ în nefropatia diabetică din cadrul diabetului zaharat de tip 2. Gravitatea leziunilor se corelează în sens pozitiv cu valorile celor doi parametri.

Concentrațiile mult crescute ale malondialdehidei și proteinelor carbonilate la pacienții cu diabet zaharat tip 2 și nefropatie, demonstrează foarte clar prezența stresului oxidativ. Severitatea leziunilor se corelează în sens pozitiv cu creșterea acestor doi parametri. Stresul oxidativ poate fi o cale comună care face legătura între diverse mecanisme patogenetice ale complicațiilor din diabetul zaharat.

Apărarea antioxidantă a fost evaluată prin dozarea ceruloplasminei și a acidului uric. În acest studiu s-au obținut valori relativ apropiate ale ceruloplasminei la loturile experimentale. Față de lotul martor, ceruloplasmina a fost mai redusă la loturile cu normoalbuminurie, microalbuminurie și macroalbuminurie și ușor crescută (dar fără semnificație statistică) în cazul lotului cu insuficiență renală. Creșterea concentrației serice a ceruloplasminei a fost paralelă cu evoluția stadială a nefropatiei diabetice. De asemenea s-a evidențiat o corelație pozitivă și semnificativă statistic între nivelul seric al ceruloplasminei și excreția urinară de albumină ($r = 0,42$, $p < 0,001$), nivelul ceruloplasminei a evoluat crescător de la lotul cu normoalbuminurie spre cel cu insuficiență renală, unde s-a înregistrat o valoare apropiată cu cea a lotului martor.

Nivelurile progresiv ascendente ale ceruloplasminei de la etapele inițiale ale nefropatiei spre stadiul cu alterarea capacității funcționale renale, ar putea fi explicate prin evoluția paralelă a capacității antioxidante și a inflamației cu gradul de intensitate al stresului oxidativ. Un rezultat similar a fost obținut și în cazul acestui studiu, ceruloplasmina fiind mai mare decât cea a lotului martor doar pentru lotul cu insuficiență renală cronică. La acest lot s-au înregistrat cele mai înalte valori ale stresului oxidativ și ale inflamației (PCR), ceea ce ar putea explica creșterea ceruloplasminei ca un mecanism compensator antioxidant dar și ca un marker inflamator.

Acidul uric este un compus antioxidant datorită capacității sale de a epura speciile reactive ale oxigenului și de a lega metalele tranzitionale. Valorile acidului uric au fost net superioare la loturile experimentale comparativ cu lotul martor. Concentrația sa a fost aproape dublă, raportat la lotul martor, la lotul cu cea mai mare retenție azotată - lotul cu insuficiență renală cronică. Cu toate acestea la acest lot s-au determinat cele mai mari valori ale malondialdehidei și proteinelor carbonilate, deci cel mai intens stres oxidativ. Deși creșterea acidului uric a fost semnificativă, aceasta nu a fost urmată de o reducere a stresului oxidativ. Mecanismele prooxidante le depășesc pe cele antioxidante, ceea ce determină dezvoltarea stresului oxidativ.

Cercetarea a evidențiat și un proces inflamator subclinic, cu evoluție progresiv ascendentă. Proteina C reactivă a crescut semnificativ la loturile luate în studiu față de lotul martor, evoluția fiind ascendentă dinspre lotul cu normoalbuminurie spre cel cu insuficiență renală. Proteina C reactivă a prezentat cea mai înaltă valoare la lotul cu insuficiență renală. Acest fapt ar putea fi explicat prin mai multe mecanisme. În primul rând în acest lot media vârstei a fost cea mai ridicată și antecedentele de diabet tip 2 cele mai îndelungate. Între PCR și vârsta pacienților s-a determinat o corelație pozitivă ($r = 0,18$, $p = 0,01$). În ceea ce privește durata evoluției diabetului și concentrația proteinei C reactive, corelația a fost și mai înaltă, $r =$

0,31, $p < 0,001$. Controlul glicemic inadecvat ar putea fi un alt factor determinant al creșterii nivelului proteinei C reactive, între hemoglobina glicozilată A_{1c} și markerul inflamator, corelația a fost semnificativă statistic și pozitivă.

Între concentrația proteinei C reactive și excreția urinară de albumină s-a stabilit o corelație semnificativ pozitivă ($r = 0,49$, $p < 0,001$). De asemenea între malondialdehidă și proteina C reactivă pe de o parte și respectiv proteinele carbonilate și proteina C reactivă pe de altă parte, există corelații ($r = 0,37$, $p < 0,001$, respectiv $r = 0,21$, $p < 0,001$) semnificative statistic. Elementele stresului oxidativ și markerul inflamator proteina C reactivă ar putea avea fi corelate și interdependente. Stresul oxidativ ar putea media pe calea factorilor de transcripție exprimarea genelor pentru proteinele inflamatorii, inclusiv a proteinei C reactive.

Cercetarea a evidențiat o corelație pozitivă și semnificativă statistic între stresul oxidativ, măsurat prin nivelul malondialdehidei și concentrația hemoglobinei glicozilate A_{1c} , ca element de monitorizare al eficienței controlului glicemic. Corelația a fost pozitivă atât între malondialdehidă și glicemie, cât mai ales între malondialdehidă și hemoglobina glicozilată A_{1c} , ceea ce relevă că un control inadecvat al glicemiei poate să fie sursa generării de specii reactive ale oxigenului.

Concluzii generale

1. În diabetul zaharat de tip 2 complicat cu nefropatie există stres oxidativ, reflectat prin creșterea malondialdehidei și a proteinelor carbonilate. Valorile acestor doi parametri au crescut pe măsura progresiei nefropatiei diabetice, de la stadiile inițiale cu normoalbuminurie spre cele terminale cu proteinurie francă și insuficiență renală cronică. Stresul oxidativ ar putea să fie elementul de conexiune dintre hiperglicemia cronică și această complicație microvasculară.
2. Ceruloplasmina, element antioxidant, dar și proinflamator, a înregistrat o evoluție ascendentă, de la stadiile timpurii ale nefropatiei spre cele avansate, dar valorile ei nu au fost mai mari decât cele ale lotului martor, exceptând ultimul lot experimental, unde, a depășit valorile martorilor. Deși ceruloplasmina este un element bivalent, creșterea ei de-a lungul evoluției diabetului poate fi interpretată ca o consecință a persistenței și agravării procesului inflamator în diabetul zaharat de tip 2 complicat cu nefropatie. Capacitatea antioxidantă a ceruloplasminei a fost depășită de intensitatea stresului oxidativ, creșterea ei ar putea fi rezultatul stimulării sintezei proteinelor fază acută datorită stresului oxidativ.
3. Acidul uric, un alt factor cu valențe antioxidante, a crescut de la stadiul cu normoalbuminurie spre cel terminal. Creșterea sa nu a putut „neutraliza” tendința continuă ascendentă a stresului oxidativ.
4. Proteina C reactivă, marker al inflamației subclinice, a evoluat progresiv crescător de la stadiul inițial al nefropatiei spre cel final. Creșterea ei a fost semnificativă comparativ cu lotul martor, dar și între loturi. Această mărire reflectă prezența inflamației în nefropatia diabetică din diabetul zaharat de tip 2.
5. Între malondialdehidă și hemoglobina glicozilată A_{1c} , corelația a fost pozitivă și semnificativă statistic; între cei doi parametri a existat un paralelism. Având în vedere că, că durata și nivelul hiperglicemiei se corelează atât cu nivelul hemoglobinei glicozilate, cât și cu cel al stresului oxidativ, malondialdehidă ar putea fi un element care să dea informații asupra calității echilibrului glicemic.
6. Proteina C reactivă s-a corelat pozitiv și semnificativ statistic cu rata excreției urinare de albumină. Această corelație poate fi rezultatul aterosclerozei preexistente nefropatiei diabetice. Pe de altă parte creșterea reactanților de fază acută poate altera

direct funcția glomerulară și astfel să fie implicată cauzal în dezvoltarea microalbuminuriei.

7. Ceruloplasmina a prezentat o corelație semnificativă și pozitivă cu excreția urinară de albumină.
8. Stresul oxidativ este un potențial factor care mediază procesul inflamator în diabetul zaharat tip 2, complicat cu nefropatie.
9. În urma acestor date se poate concluziona că asocierea unor preparate antioxidante și antiinflamatorii în tratamentul nefropatiei diabetice, încă din stadiile ei inițiale, ar putea reduce riscul agravării nefropatiei și ar opri evoluția ei din etapele inițiale în care agresiunea oxidativă este mai redusă spre cele finale, cu o mare încărcătură oxidativă și inflamatorie. Eficiența acestor terapii va putea fi relevată doar de cercetările ulterioare în acest domeniu.

Bibliografie

1. Harrison TR. Principiile Medicinii Interne, Editura Teora, București, 2003. Ediția a II a. vol.2, p. 2265-2285
2. Rosebloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care*. 1999; 22:345-354
3. Kahan SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003; 46:3-19
4. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenetic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:816-823
5. Dejica D. Stresul oxidativ în bolile interne. Casa Cărții de Știință. Cluj- Napoca, 2000; p. 84, 213- 215, 480-483
6. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression : differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Int J Mol Med*. 1999; 4: 223-230
7. Williams MD, Nadler JL. Inflammatory mechanisms of diabetic complications. *Curr Diab Rep*. 2007; 7: 242 –248
8. Navarro- Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 433-442
9. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper M. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008; 57:1446- 1454
10. Yang Y, Ha H, Lee HB. Role of reactive oxygen species in TGF β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (Abstract). *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18(suppl 4): 300
11. Gherasim L, *Medicină Internă. Bolile aparatului renal*. Editura Medicală. București. vol. IV. 2002; 361- 390
12. Gherasim L. *Medicină Internă. Bolile cardiovasculare, metabolice*. Editura Medicală. București. vol. II. 1996; 1167-1220
13. Hi Bahl Lee, Mi-Ra Yu, Yanqiang Y, Zongpei J, Hunjoo Ha. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: S241-S245
14. Cortes P, Mogensen CE. *The diabetic kidney*. Humana Press. 2006; 3 - 17, 25-30
15. McCord JM . Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*. 1993; 26: 351-357

16. Tache S. în Dejica D. Stresul oxidativ în bolile interne. Casa Cărții de Știință. Cluj-Napoca. 2000; 77-80, 85-89
17. Burtă L, Burtă O, Micle L, Micle O, Mureșan M, Mureșan I, Dorofteiu M. Stresul oxidativ în bolile medico- chirurgicale. Editura Universității din Oradea. Oradea. 2003; 5-18, 25-33
18. De Zwart L, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. *Free Radi Biol Med.* 1999; 26: 202-206
19. Heilig CW, Concepcion LA, Riser BL, Freytag SO, Zhu M, Cortes P. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1802- 1814
20. Coward RJ, Welsh GI, Yang J, et al. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action , *Diabetes.* 2005; 54: 3095- 3102
21. Vasavada N, Agarwal R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy, advances in chronic kidney disease. 2005; 12(2), 146-154
22. Kabat A, Ponicke K, Salameh A, Mohr FW, Dhein S. Effect of a beta 2- adrenoceptor stimulation on hyperglycemia- induced endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308: 564- 573
23. Hipkiss AR. Does chronic glycolysis accelerate aging? Could this explain how dietary restriction works ?. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067: 361-368
24. Matei D, Zaha D, Prună C, Mureșan M, Micle L, Micle O, Popa A, Mureșan A. Correlation between the concentration of glycosylated hemoglobin and oxidative stress in diabetes mellitus type 2. *Fiziologia Physiology.* 2007; 2(54): 16-21
25. Matei D, Moldovan C, Mureșan M, Micle O, Micle L, Burta O, Pirte A, Mureșan A. Oxidative stress in diabetes mellitus type 2 complicated with nephropathy. *Studia Universitatis Vasile Goldiș.* 2009; 19(2): 229-234
26. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxid production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature.* 2000; 404: 787- 790
27. Turrens JF, Boveries A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980; 191: 421-427

CURRICULUM VITAE

1. Nume și prenume: MATEI DANIELA MARIANA

2. Data și locul nașterii: 08.06.1969, Oradea, România

3. Starea civilă: căsătorită, 1 copil

4. Adresa: Oradea, str. Calea Aradului, nr. 48, Bl. D3, Sc. B, Ap.15

5. Telefon/ adresa e mail: 0748323312, danielacernau@yahoo.com

6. Studii:

2005- Doctorand Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, Cluj Napoca

2004 - 2005 Masterat Psihopedagogie, Universitatea din Oradea

1989 - 1995 Facultatea de Medicină din cadrul Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, Cluj Napoca

1983 - 1987 Liceul Sanitar, Oradea

7. Activitatea profesională

2008 Șef de lucrări Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, disciplina Fiziologie

2008 Medic specialist Medicină de Laborator

2004 - 2008 Medic rezident Medicină de Laborator

2003 - 2008 Asistent universitar Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, disciplina Fiziologie

1999 - 2003 Preparador universitar Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, disciplina Fiziologie

1999 Medic specialist Medicină Generală

1996- 1999 Medic rezident Medicină Generală

8. Cursuri postuniversitare

2008 Mecanismul de producere al coagulării și a stresului oxidativ, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea

2001- 2002 Curs postuniversitar Limba Engleză, Universitatea din Oradea, Facultatea de Filologie

2001 Actualități în diabetologie, nutriție, boli metabolice, Facultatea de Medicină și Farmacie Oradea

2001 Cours de formation post-universitaire dans le domaine des sciences de la vie, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea

2001 Managementul clinic în Diabetul Zaharat, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea

2000 - 2001 Curs postuniversitar Limba Engleză, Universitatea din Oradea, Facultatea de Filologie

2000 Cours de formation post-universitaire dans le domaine des sciences de la vie, Facultatea de Medicină și Farmacie, Oradea

9. Participări la conferințe:

1. A XXIV a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice, 2010, Oradea, Băile Felix
2. A XXIII a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice, 2009, Craiova
3. Zilele Medicale Orădene , Facultatea de Medicină și Farmacie Oradea, 2009, Oradea
4. A VII a Conferință Națională a Societății Române de Fiziopatologie, 2009, Oradea
5. Zilele Medicale Orădene, Facultatea de Medicină și Farmacie Oradea, 2008, Oradea
6. Conferința „ Diagnostic și terapie în Sindromul Down”, 2008, Oradea
7. The 10th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, 2008, Cluj Napoca
8. Joint Meeting of The Slovak Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies, 2007, Bratislava, Slovak Republic
9. A XXI a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice, 2006, Oradea, Băile Felix

10. Activitatea științifică

1. **Matei D**, Moldovan C, Mureșan M, Micle O, Micle L, Burtă O, Mureșan A. C reactive protein in diabetes mellitus type 2 complicated with diabetic nephropathy, *Fiziologia/ Physiology*, 2010, Supplement, ISSN 1223-2076, The 24th National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences , 2010, Oradea, Băile Felix
2. Rusu A, Oros R, **Matei D**. Fat embolism, unpredictable complication during the evolution of an polytraumatism with multiple fractures of the long bones, *Fiziologia/ Physiology*, 2010, Supplement, ISSN 1223-2076, The 24th National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences , 2010, Oradea, Băile Felix
3. Oros R, Roșu B, Volsitz P, Rusu A, **Matei D**. Aspects of the skull fracture that sustain the death by active hit, The 7th Annual meeting of Balkan Academy of Forensic Sciences, 2010, Tirana, Albania
4. Oros R, Roșu B, Volsitz P, Rusu A, **Matei D**. The importance of the research on the spot in the establishment of death diagnosis, The 7th Annual meeting of Balkan Academy of Forensic Sciences, 2010, Tirana, Albania
5. **Matei D**, Blood Exploratory Tests – Îndrumător lucrări practice de Fiziologie – format electronic, 2009, Biblioteca Facultății de Medicină și Farmacie, Oradea
6. **Matei D**, Moldovan C, Mureșan M, Micle O, Micle L, Burtă O, Pirte A, Mureșan A. Oxidative stress in diabetes mellitus type 2 complicated with nephropathy, *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, 19(2), 2009, p. 229- 234
7. Magyar I, Todor M, Szilagy L, Zaha D, **Matei D**, Tirb Pop A. Benzodiazepinele în tratamentul de urgență al convulsiilor și status epilepticus la copii, *Jurnal de Medicină de Urgență și Salvări în situații speciale*, supliment nr.1, 2009
8. Micle L, Micle O, Mureșan M, **Matei D**, Dorofteiu M. Oxidative/Antioxidant status in healthy adults and children, The 10th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, Cluj – Napoca, ISSN 1223- 2076 , 2008, 18, 2(54), pg. 44
9. **Matei D**, Moldovan C, Mureșan M, Micle L, Micle O, Burtă O, Mureșan A. Oxidative stress in Diabetic Nephropathy from diabetes melitus type 2, The 10th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, Cluj – Napoca, ISSN 1223- 2076 , 2008, 18, 2(54), pg. 43
10. **Matei D** , Zaha D, Prună C, Mureșan M, Micle L, Micle O, Popa A, Mureșan A. Correlation between the concentration of glycosylated hemoglobin and oxidative stress in diabetes mellitus type 2, *Physiology*, 17, 2(54), ISSN 1223-2076, 2007, p. 16-21

11. Micle L, Mureșan M, Micle O, Maghiar F, **Matei D**, Cheregi C, Marta M, Neagoe C, Pop M, Dorofteiu M. Reactive oxygen species in arterial pulmonary hypertension, Joint Meeting of the Slovak Physiological Society, The Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies, Acta Physiologica, Bratislava, 2007, vol. 191, suppl 658, p. 49
12. Micle O, Micle L, Mureșan M, Dorofteiu M, **Matei D**. Oxidative stress and antioxidant supplementation in soccer players, Joint Meeting of the Slovak Physiological Society, The Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies, Acta Physiologica, Bratislava, 2007 vol. 191, suppl 658, p. 46
13. Oros R, **Matei D**, Vâlceanu N. Coroborarea datelor de laborator cu aspectele macroscopice ale necropsiei în decesele survenite prin hipotermie, a XXI-a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice, 2006, Oradea
14. Cismaș- Pruteanu P, Marazan O, **Matei D**, Dan R. Răspunsuri presionale la testul de efort izometric tip Handgrip, la subiecți cu hipertensiune arterială izolată de consultație”, a XXI -a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice, 2006, Oradea
15. Cismaș- Pruteanu P, **Matei D**, Dan R. Verificarea autenticității automăsurării presiunii arteriale la domiciliul pacienților: un studiu observațional prospectiv, a XXI -a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice, 2006, Oradea,
16. Cismaș- Pruteanu P, **Matei D**, Negrean R, Lucaciu M. Fiziologie generală și celulară, Editura Universității din Oradea , ISBN : 973-613-336-2, 2003, reeditată 2005, 2006, 2007

11. Limbi străine cunoscute

Limba engleză - nivel avansat (curs postuniversitar)

Limba franceză - nivel avansat

12. Membră în societăți științifice

Membru Departamentul Cercuri Științifice Studentești din cadrul Centrului de Cercetări în Medicină de Înaltă Performanță din cadrul Facultății de Medicină și Farmacie, Oradea, din 2009

Membru al Societății Europene de Științe Fiziologice (FEPS) din 2008

Membru al Societății Internaționale de Științe Fiziologice (IUPS) din 2008

Membru al Societății Române de Științe Fiziologice din 2005

Secretar filiala Oradea a Societății Române de Științe Fiziologice din 2005

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
IULIU HAȚIEGANU CLUJ-NAPOCA
FACULTY OF MEDICINE**

Abstract of doctoral thesis

***IMPLICATIONS OF OXIDATIVE STRESS IN DIABETES
MELLITUS TYPE 2 COMPLICATED WITH DIABETIC
NEPHROPATHY***

Scientific coordinator:

Prof. Univ. Dr. Adriana MUREȘAN

PhD candidate:

Daniela Mariana MATEI

**CLUJ-NAPOCA
2010**

CONTENTS

Preface	2
Contents	4
CHAPTER I. THEORETICAL CONSIDERATIONS	6
1. Introduction	6
1.1. Oxidative stress. Definition	8
1.1.2. Reactive oxygen species (ROS).....	9
1.1.2. Effects of reactive oxygen species on organic macromolecules.....	10
1.2. The role of oxidative stress in diabetic nephropathy from diabetes mellitus type 2	12
1.2.1. Mitochondrial sources of generation of reactive oxygen species.....	13
1.2.2. Cytoplasm sources of generation of reactive oxygen species.....	15
1.2.2.1. Increase of activity of the sorbitol pathway	15
1.2.2.2. Formation of advanced glycation end products (AGEs).....	16
1.2.2.3. NAD(P)H oxidase.....	18
1.2.2.4. Xantin oxidase.....	21
1.2.2.5. Uncoupling of NOS (oxide nitric synthetase).....	21
1.2.2.8. Generation of ROS by the enzymatic pathway of arachidonic/linoleic acid metabolism.....	22
1.2.2.9. Activation of protein kinase C.....	22
1.2.3. Signaling pathways activated by ROS in diabetic nephropathy.....	23
1.2.4. Activation of transcription factors by ROS.....	25
1.2.4.1. Nuclear transcription factor kB.....	25
1.2.4.2. Transforming growth factor beta.....	27
1.2.4.3. The role of angiotensin II in development of diabetic nephropathy.....	29
1.2.5. The role of oxidative stress in inducing functional and morphological lesions from diabetic nephropathy.....	31
1.2.5.1. Implications of ROS in the production of glomerular hyperfiltration.....	31
1.2.5.2. The role of ROS in the excretion of urinary albumin.....	33
1.2.5.3. Oxidative stress and chronic renal failure.....	34
1.2.6. The role of ROS in the remodeling of the glomerular extracellular matrix.....	36
1.2.7. Inflammation – its implications in the pathogenesis of diabetic nephropathy.....	39
1.2.7.1. Interleukin 1.....	40
1.2.7.2. Interleukin 6.....	40
1.2.7.3. Interleukin 18.....	41
1.2.7.4. Tumor necrosis factor alpha.....	41
1.2.7.5. C Reactive Protein.....	43
1.2.8. Conclusions.....	44
CHAPTER II. PERSONAL RESEARCH	47
2.1. Objectives of research	48
2.2. Hypotheses of research	49
2.3. Material and method	50
2.3.1. Inclusion criteria.....	50
2.3.2. Exclusion criteria.....	50
2.3.3. Groups of study	51
2.3.4. Methods for determining the studied biochemical parameters.....	54
2.4. Statistical analysis	64
2.5. Results	65
2.5.1. Results of group 1 (diabetes mellitus type 2 with normoalbuminuria).....	65

2.5.2. Results of group 2 (diabetes mellitus type 2 with microalbuminuria).....	78
2.5.3. Results of group 3 (diabetes mellitus type 2 with macroalbuminuria).....	91
2.5.4. Results of group 4 (diabetes mellitus type 2 with chronic renal failure).....	104
2.5.5. Evolution of the parameters in the experimental groups related to the control group.....	117
2.5.6. Correlations.....	136
2.6. Discussion	140
2.7. Conclusions	158
2.7.1. Conclusions of group 1 (diabetes mellitus type 2 with normoalbuminuria).....	158
2.7.2. Conclusions of group 2 (diabetes mellitus type 2 with microalbuminuria).....	158
2.7.3. Conclusions of group 3 (diabetes mellitus type 2 with macroalbuminuria).....	158
2.7.4. Conclusions of group 4 (diabetes mellitus type 2 with chronic renal failure).....	159
2.7.5. General conclusions	159
2.8. References	161

Key words: diabetes mellitus type 2, diabetic nephropathy, oxidative stress, malondyaldehyde, ceruloplasmin, C reactive protein, urinary albumin excretion

CHAPTER I – THEORETICAL CONSIDERATIONS

Introduction

Today it is widely accepted the idea that the cause of all the complications from diabetes is represented by the increased concentration of glucose in the blood. Hyperglycemia has as a result the generation of reactive oxygen species (ROS), finally leading to the apparition of oxidative stress in tissues. In the absence of a compensatory antioxidant response an instability is created, which determines the activation of stress dependent intracellular pathways. Both in type 1 and 2 diabetes mellitus, the diabetic complications involve the vascular endothelium, nerves and kidneys. Diabetic nephropathy is the the most severe microvascular complication of diabetes mellitus, one of the leading causes of end stage renal disease, with necessity of renal substitution therapies.

A common element noted in all tissues affected by diabetes, including kidneys, is the presence of an increased oxidative stress. It has been suggested that oxidatice stress, the consequence of hyperglycemia, could have a critical role in the pathogenesis of the complications of diabetes mellitus. At the molecular level, hyperglycemia and the alterations in proteins caused by the high concentration of glucose are the main factors involved in the generation of diabetic nephropathy. The intensification of the formation of ROS by the high levels of glucose mediates the activation of the respiratory electron transporting chain from mitochondria, which represents a precoceous event in the apparition of the complications of diabetes mellitus. A variety of growth factors and cytokins are induced on the signal transduction pathway, implying protein kinase C, mytogen activated protein kinase and transcription of nuclear factor NF-kB.

Diabetic nephropathy is the most frequent diagnosis among patients entering programmes of extrarenal filtration from the USA and the majority of European countries. It complicates 20% of non insulin dependent cases of diabetes. Taking in consideration that the

prevalence of diabetes mellitus type 2 in the world is higher and higher, more and more persons will experience the complications of diabetes unless new and more effective therapies appear and preventing measures are available.

Taking into account the increasing tendency in the prevalence of diabetes mellitus type 2 and its microvascular complications, at rates resembling an epidemic, and increasing evidence of involving oxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy, the approach of this topic is completely justified.

CHAPTER II – PERSONAL RESEARCH

Objectives

The main objective of this study was the evaluation of oxidative stress in patients with diabetes mellitus type 2, complicated with diabetic nephropathy, as a potential pathogenic factor underlying the evolution of diabetic nephropathy, from its initial stages to that of chronic renal failure. The level of oxidative stress was established by measurement of malondialdehyde and carbonilated proteins and also of ceruloplasmin and uric acid, compounds with antioxidant character.

The secondary objectives were represented by the demonstration of a subclinic inflammatory process, the establishment of the correlation between the level of oxidative stress and of subclinical inflammation (C reactive protein), as the mediating element of the inflammatory process; the evaluation of the correlation between the urinary excretion of albumin and the concentration of C reactive protein, in comparison with ceruloplasmin. The evaluation of the correlation between the concentrations of glycosylated hemoglobin A_{1C} and malondialdehyde was another secondary objective.

Material and method

The study was carried on four groups of patients with diabetes mellitus type 2 complicated with diabetic nephropathy admitted at the “Dr. Gavril Curteanu” hospital from Oradea, during the period of 2006 –2009.

In this study were included 195 patients with diabetes mellitus type 2 complicated with diabetic nephropathy and 25 healthy subjects, without diabetes mellitus, as a control group. The selection of patients was done randomly, in the order of their admission, based on the history of diabetes mellitus type 2 and confirmation of the urinary albumin excretion, with or without the elements of nitrogen retention. The diagnosis of diabetic nephropathy was confirmed based on clinical (the duration of evolution of diabetes mellitus type 2) and paraclinical data: examination of urine with urinary sediment analysis, urinary albumin excretion/24 hours, rate of glomerular filtration (calculated with the MDRD (Modified Diet in Renal Disease) formula, with four variables: creatinemia, sex, race and age), existence of diabetic retinopathy, abdominal ecography, uncorresponding control of glycemia, arterial hypertension, nitrogenous retention elements (creatinine, urea, uric acid).

Group one included 47 patients with diabetes mellitus type 2 and normoalbuminuria (urinary excretion of albumin/24 hours lower than 30mg/24 hours, the mean value being 16.41 ± 7.27 mg/24 ore). The second group had 54 patients with diabetes mellitus type 2 and microalbuminuria (urinary albumin excretion between 30 and 300mg/24 hours, with a mean

value of 142.02 ± 65.33 mg/24 hours). In the third group were admitted 49 patients with diabetes mellitus type 2 and macroalbuminuria (urinary excretion of albumin higher than 300mg/24 hours, the mean value being 546.19 ± 205.67 mg/24 ore), but with preserved renal function (without chronic renal failure - glomerular filtration rate calculated according to the MDRD formula $GFR > 60$ mL/min/1.73m²). In group four were selected 45 patients with diabetes mellitus type 2 and chronic renal failure ($GFR < 60$ mL/min/1.73m²). In the control group were included 25 subjects.

For all the subjects included in this study were evaluated the following biochemical parameters: glycemia, glycosylated hemoglobin A_{1c}, cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, uric acid, urinary albumin excretion/24 hours, glomerular filtration rate, erythrocyte sedimentation rate, complete blood count, C reactive protein, malondialdehyde, carbonilated proteins, ceruloplasmin and examination of urine with urinary sediment analysis.

Blood samples were collected in the morning, after 8-12 hours of fasting, from where the mentioned biochemical parameters were determined. Glycosylated hemoglobin was measured by a chromatographic-colorimetric method (Biogamma), C reactive protein by the Turbilatex (Al Instruments KFT) method, malondialdehyde by a colorimetric method with tiobarbituric acid, carbonilated proteins by a spectrofotometric method with 2,4-dinitrophenilhydrazin and ceruloplasmin by a colorimetric method with paraphenilendiamine. Three samples of urine were collected from the subjects, from where the urinary albumin excretion was determined and the mean value calculated. Urinary albumin excretion was measured by the Micro-Albumin ELISA (DRG Diagnostics) method.

Results

This research revealed the presence of oxidative stress in patients with diabetes mellitus type 2 complicated with nephropathy, associated with an inflammatory process, since the initial phases of nephropathy. The antioxidant defence, evaluated by the determination of the levels of ceruloplasmin and uric acid, could not succeed in preventing the production of reactive oxygen species that resulted in the occurrence oxidative stress.

In this study were obtained significant increased values of malondialdehyde in groups of patients with diabetes mellitus type 2 complicated with diabetic nephropathy compared with the control group. Also, significant increases between the experimental groups were registered. The values of malondialdehyde were almost triple in the group with diabetic nephropathy and chronic renal failure, related to the control group. The highest level of malondialdehyde in this group might be explained by association of several oxidative stress inducing factors. First of all these patients were the oldest, with the most prolonged duration of diabetes mellitus. Also, in this group, the concentrations of glycosylated hemoglobin A_{1c} were the greatest, which reveals the fact that the glucose levels of these patients were less balanced, even if the values of glycemia were not the highest. The level of oxidative stress, objectified by the measurement of malondialdehyde was correlated to a greater extent with the level of glycosylated hemoglobin A_{1c} ($r = 0.56$, $p < 0.001$), than that of glycemia ($r = 0.40$, $p < 0.001$).

An other factor of stress generation is inflammation. In all stages of diabetic nephropathy an inflammatory process was identified that has aggravated progressively, from the initial stages to the final one of chronic renal failure. C reactive protein increased almost three times more from the first group (diabetes mellitus with normoalbuminuria) until the patients of the group with chronic renal failure (group 4).

An extra source of increase of lipoperoxidation is hypertriglyceridemia present in patients with diabetes mellitus type 2. In this study were obtained significant increased values of triglycerides in diabetic subjects, related to the control group. The level of oxidative stress was correlated positively and significantly with that of triglycerides (between the malondialdehyde and triglycerides, Pearson correlation coefficient was $r = 0.29$, $p < 0.001$), but statistically insignificant with that of cholesterol (between the malondialdehyde and cholesterol $r = 0.13$, $p = 0.06$).

All these data confirm the existence of oxidative stress in diabetes mellitus type 2. The degree of oxidative stress in diabetes mellitus complicated with nephropathy is higher compared with the diabetes without this complication. Oxidative stress could be the pathogenetic element that mediates the appearance of diabetic complications, including nephropathy.

In the case of carbonilated proteins, statistically significant increased values were obtained in the experimental groups comparatively with the control group ($p > 0.001$). The same significant increase has been noted from one group to another, together with the aggravation of diabetic nephropathy. Besides the rising of malondialdehyde, the increase of carbonilated proteins certifies the presence of oxidative stress in diabetic nephropathy. The severity of lesions correlates positively with the concentrations of the two parameters.

The high increased concentrations of malondialdehyde and carbonilated proteins in patients with diabetes mellitus type 2 and nephropathy, demonstrates very clearly the existence of oxidative stress and the severity of lesions correlates positively with the increase of these two parameters. Oxidative stress might be a common pathway that makes the connection between the diverse pathogenetic mechanisms of the complications of diabetes mellitus.

The antioxidant defence was evaluated by dosing ceruloplasmin and uric acid. In this study were obtained relatively close values of ceruloplasmin in all the experimental groups. Compared with the control group, ceruloplasmin was more reduced in groups with normoalbuminuria, microalbuminuria and macroalbuminuria and a little increased (but without a statistical significance) in case of the group with renal failure. The rising of the serum concentration of ceruloplasmin was parallel to the stage evolution of diabetic nephropathy. It was also noted a positive and statistically significant correlation between the serum level of ceruloplasmin and urinary albumin excretion ($r = 0.42$, $p < 0.001$), the concentration of ceruloplasmin evolved in a rising fashion from the group with normoalbuminuria towards the group with renal failure, where it has been observed a value close to that of the control group.

The progressive increasing levels of ceruloplasmin from the initial stages of nephropathy to those stages with alterations in renal functional capacity could be explained by the parallel evolution of the antioxidant capacity, and inflammation with the degree of intensity of oxidative stress. A similar result was also obtained in case of this research, ceruloplasmin values being higher than those of the control group only for the group with chronic renal failure. In this group was registered the highest values of oxidative stress and inflammation (C reactive protein); this could explain the increase of ceruloplasmin as a compensatory antioxidant mechanism, but also as an inflammatory marker.

Uric acid is an antioxidant compound due to its capacity to filtrate the reactive oxygen species and to bind transitional metals. The values of uric acid were net superior at the experimental groups compared with the control group. Its concentration was almost double related to the control group, the group with the highest nitrogenous retention - the group with chronic renal failure. Nevertheless, in this group the greatest values of malondialdehyde and carbonilated proteins have been determined, making it the group with the most intense oxidative stress. Even if the increase of uric acid was significant, this was not followed by a

reduction of oxidative stress. The prooxidant mechanisms overcome the antioxidant ones, which favors the development of oxidative stress.

The research revealed a subclinical inflammatory process too, with an ascending progressive development. C reactive protein increased significantly in experimental groups versus the control group, the evolution being ascending from the group with normoalbuminuria towards that with renal failure. C reactive protein presented the highest concentrations in the group with renal failure. This fact could be explained by several mechanisms. First, in this group, the mean age was the greatest and the history of diabetes mellitus the most prolonged. Between C reactive protein and the age of patients it has been established a positive correlation ($r = 0.18$, $p = 0.01$). Regarding the duration of diabetes mellitus evolution and the concentration of C reactive protein, the correlation was even higher, $r = 0.31$, $p < 0.001$. The inadequate glycemic control might be another determinant factor in the increased level of C reactive protein; between the glycosylated hemoglobin A_{1c} and the concentration of the inflammatory marker, the correlation was positive and significant.

Urinary albumin excretion and C reactive protein were positive and significantly correlated ($r = 0.49$, $p < 0.001$). Also between malondialdehyde and C reactive protein on one hand and carbonilated proteins and C reactive protein on the other, there are statistically significant correlations ($r = 0.37$, $p < 0.001$, respectively $r = 0.21$, $p < 0.001$). The elements of oxidative stress and inflammatory marker C reactive protein might be correlated and interdependent. Oxidative stress could mediate the pathway of the transcription factors for the expression of genes for inflammatory proteins, including C reactive protein.

The research revealed a positive and statistically significant correlation between the oxidative stress, measured by the level of malondialdehyde and the concentration of glycosylated hemoglobin A_{1c} , as a monitoring element of the effectiveness of glycemic control. The correlation was positive both between malondialdehyde and glycemia and more between malondialdehyde and glycosylated hemoglobin A_{1c} , which reveals that an inadequated control of glycemia might be the source of the generation of reactive oxygen species.

General conclusions

1. In diabetes mellitus type 2 complicated with nephropathy there is oxidative stress, revealed by an increase of malondialdehyde and carbonilated proteins. The values of these two parameters increased as long as the diabetic nephropathy progressed from its initial stages with normoalbuminuria to the terminal stages with proteinuria and chronic renal failure. Oxidative stress might be the connection element between chronic hyperglycemia and this microvascular complication.
2. Ceruloplasmin, an antioxidant substance, but also proinflammatory, had an ascending evolution, from the initial stages of diabetic nephropathy to those advanced, but its values were not higher than those of the control group, excepting the fourth experimental group, where it exceeded the control group values. Even if ceruloplasmin is a bivalent compound, its increase along with the evolution of diabetic nephropathy can be interpreted as a consequence of a persistency and aggravation of the inflammatory process in diabetes mellitus type 2 complicated with nephropathy. The antioxidant capacity of ceruloplasmin was overcome by the intensity of the oxidative stress, its increase could be the result of stimulation of the synthesis of acute phase proteins due to oxidative stress.

3. Uric acid, another factor with antioxidant valency, increased from the initial stage with normoalbuminuria to the terminal stage. Its increase could not “neutralize” the continuous ascending tendency of oxidative stress.
4. C reactive protein, a marker of subclinical inflammation, evolved progressively, increasing from the initial to the final stages of nephropathy. Its increase was significant compared with the control group, but also between groups. This rising reflects the presence of inflammation in diabetic nephropathy from diabetes mellitus type 2.
5. Between malondialdehyde and glycosylated hemoglobin A_{1c} the correlation was positive and significant statistically; between these two parameters a parallelism existed. Taking into account that the duration of diabetes and the level of hyperglycemia correlates both with the level of glycosylated hemoglobin and that of oxidative stress, malondialdehyde might be an element that could give information about the quality of glycemic control.
6. C reactive protein correlated positively and significantly with the rate of urinary albumin excretion. This correlation can be the result of the preexistent atherosclerosis in diabetic nephropathy. On the other hand the increase of acute phase reactants can alter directly the glomerular function and so be causally involved in the development of microalbuminuria.
7. Ceruloplasmin presented a positive and significant correlation with the urinary albumin excretion.
8. Oxidative stress is a potential factor that mediates the inflammatory process in diabetes mellitus type 2, complicated with nephropathy.
9. As a result of these data one can conclude that an association of some antioxidant and antiinflammatory drugs in the treatment of diabetic nephropathy, even from its initial phases, might reduce the risk of aggravation of nephropathy and might stop its evolution from its initial stages, where the oxidative stress is more reduced towards the final stages, with a great oxidative and inflammatory component. The effectiveness of these therapies will be possible to be evaluated only by future research in this field.

References

1. Harrison TR. *Principiile Mediciniei Interne*, Editura Teora, București, 2003. Ediția a II a. vol.2, p. 2265-2285
2. Rosebloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care*. 1999; 22:345-354
3. Kahan SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003; 46:3-19
4. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenetic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:816-823
5. Dejica D. *Stresul oxidativ în bolile interne*. Casa Cărții de Știință. Cluj- Napoca, 2000; p. 84, 213- 215, 480-483
6. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression : differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Int J Mol Med*. 1999; 4: 223-230
7. Williams MD, Nadler JL. Inflammatory mechanisms of diabetic complications. *Curr Diab Rep*. 2007; 7: 242 –248

8. Navarro- Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 433-442
9. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper M. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes.* 2008; 57:1446- 1454
10. Yang Y, Ha H, Lee HB. Role of reactive oxygen species in TGF β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (Abstract). *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18(suppl 4): 300
11. Gherasim L, *Medicină Internă. Bolile aparatului renal.* Editura Medicală. București. vol. IV. 2002; 361- 390
12. Gherasim L. *Medicină Internă. Bolile cardiovasculare, metabolice.* Editura Medicală. București. vol. II. 1996; 1167-1220
13. Hi Bahl Lee, Mi-Ra Yu, Yanqiang Y, Zongpei J, Hunjoo Ha. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: S241-S245
14. Cortes P, Mogensen CE. *The diabetic kidney.* Humana Press. 2006; 3 - 17, 25-30
15. McCord JM . Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* 1993; 26: 351-357
16. Tache S. în Dejica D. *Stresul oxidativ în bolile interne.* Casa Cărții de Știință. Cluj-Napoca. 2000; 77-80, 85-89
17. Burtă L, Burtă O, Micle L, Micle O, Mureșan M, Mureșan I, Dorofteiu M. *Stresul oxidativ în bolile medico- chirurgicale.* Editura Universității din Oradea. Oradea. 2003; 5-18, 25-33
18. De Zwart L, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. *Free Radi Biol Med.* 1999; 26: 202-206
19. Heilig CW, Concepcion LA, Riser BL, Freytag SO, Zhu M, Cortes P. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1802- 1814
20. Coward RJ, Welsh GI, Yang J, et al. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action , *Diabetes.* 2005; 54: 3095- 3102
21. Vasavada N, Agarwal R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy, advances in chronic kidney disease. 2005; 12(2), 146-154
22. Kabat A, Ponicke K, Salameh A, Mohr FW, Dhein S. Effect of a beta 2- adrenoceptor stimulation on hyperglycemia- induced endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308: 564- 573
23. Hipkiss AR. Does chronic glycolysis accelerate aging? Could this explain how dietary restriction works ?. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067: 361-368
24. Matei D, Zaha D, Prună C, Mureșan M, Micle L, Micle O, Popa A, Mureșan A. Correlation between the concentration of glycosylated hemoglobin and oxidative stress in diabetes mellitus type 2. *Fiziologia Physiology.* 2007; 2(54): 16-21
25. Matei D, Moldovan C, Mureșan M, Micle O, Micle L, Burta O, Pirte A, Mureșan A. Oxidative stress in diabetes mellitus type 2 complicated with nephropathy. *Studia Universitatis Vasile Goldiș.* 2009; 19(2): 229-234
26. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxid production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature.* 2000; 404: 787- 790
27. Turrens JF, Boveries A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980; 191: 421-427

CURRICULUM VITAE

1. Surname and name: MATEI DANIELA MARIANA

2. Date and place of birth : June 8, 1969, Oradea, Romania

3. Marital status: married, one child

4. Address: Oradea, str. Calea Aradului, nr. 48, Bl. D3, Sc. B, Ap.15

5. Cell phone/E mail address: +40748323312, danielacernau@yahoo.com

6. Education:

2005- PhD candidate at the University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu, Cluj Napoca

2004 - 2005 Degree of Master in Psychopedagogy, University of Oradea

1989 - 1995 Faculty of Medicine from the University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu , Cluj Napoca

1983 - 1987 High School of Nursing, Oradea

7. Professional activity:

2008 Senior lecturer, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Physiology Department

2008 Medical Laboratory specialist

2004 - 2008 Medical Laboratory resident

2003 - 2008 Professor`s Assistant University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Physiology Department

1999 - 2003 Junior Assistant, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, Physiology Department

1999 Specialist in General Medicine

1996- 1999 Resident in General Medicine

8. Participation in postgraduate courses:

2008 Mechanism of coagulation and oxidative stress, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea

2001- 2002 Postgraduate course in English language, University of Oradea, Faculty of Philology

2001 Actualities in diabetology, nutrition, metabolic diseases, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea

2001 Cours de formation post-universitaire dans le domaine des sciences de la vie, Faculty of Medicine and Pharmacy Oradea

2001 Clinical management of Diabetes Mellitus, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea

2000 - 2001 Postgraduate course in English language, University of Oradea, Faculty of Philology

2000 Cours de formation post-universitaire dans le domaine des sciences de la vie, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea

9. Participation at the scientific conferences:

1. The XXIVth National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences, 2010, Oradea, Băile Felix
2. The XXIIIrd National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences, 2009, Craiova
3. Oradea Medical Days , Faculty of Medicine and Pharmacy Oradea, 2009, Oradea
4. The VIIth National Conference of the Romanian Society of Pathophysiology, 2009, Oradea
5. Oradea Medical Days, Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea, 2008, Oradea
6. Conference „ Diagnosis and therapy in Down Syndrom”, 2008, Oradea
7. The 10th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, 2008, Cluj Napoca
8. Joint Meeting of The Slovak Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies, 2007, Bratislava, Slovak Republic
9. The XXIst National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences, 2006, Oradea, Băile Felix

10. Scientific activity:

1. **Matei D**, Moldovan C, Mureșan M, Micle O, Micle L, Burtă O, Mureșan A. C reactive protein in diabetes mellitus type 2 complicated with diabetic nephropathy, *Fiziologia/ Physiology*, 2010, Supplement, ISSN 1223-2076, The 24th National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences , 2010, Oradea, Băile Felix
2. Rusu A, Oros R, **Matei D**. Fat embolism, unpredictable complication during the evolution of an polytraumatism with multiple fractures of the long bones, *Fiziologia/ Physiology*, 2010, Supplement, ISSN 1223-2076, The 24th National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences , 2010, Oradea, Băile Felix
3. Oros R, Roșu B, Volsitz P, Rusu A, **Matei D**. Aspects of the skull fracture that sustain the death by active hit, The 7th Annual meeting of Balkan Academy of Forensic Sciences, 2010, Tirana, Albania
4. Oros R, Roșu B, Volsitz P, Rusu A, **Matei D**. The importance of the research on the spot in the establishment of death diagnosis, The 7th Annual meeting of Balkan Academy of Forensic Sciences, 2010, Tirana, Albania
5. **Matei D**, Blood Exploratory Tests – Laboratory manual of Physiology – on electronic support, 2009, Library of the Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea
6. **Matei D**, Moldovan C, Mureșan M, Micle O, Micle L, Burtă O, Pirte A, Mureșan A. Oxidative stress in diabetes mellitus type 2 complicated with nephropathy, *Studia Universitatis Vasile Goldis*, 19(2) , 2009, p. 229- 234
7. Magyar I, Todor M, Szilagy L, Zaha D, **Matei D**, Tirb Pop A. Benzodiazepinele în tratamentul de urgență al convulsiilor și status epilepticus la copii, *Jurnal de Medicină de Urgență și Salvări în situații speciale*, supliment nr.1, 2009
8. Micle L, Micle O, Mureșan M, **Matei D**, Dorofteiu M. Oxidative/Antioxidant status in healthy adults and children, The 10th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, Cluj – Napoca, ISSN 1223- 2076 , 2008, 18, 2(54), pg. 44
9. **Matei D**, Moldovan C, Mureșan M, Micle L, Micle O, Burtă O, Mureșan A. Oxidative stress in Diabetic Nephropathy from diabetes melitus type 2, The 10th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, Cluj – Napoca, ISSN 1223- 2076 , 2008, 18, 2(54), pg. 43
10. **Matei D** , Zaha D, Prună C, Mureșan M, Micle L, Micle O, Popa A, Mureșan A. Correlation between the concentration of glycosylated hemoglobin and oxidative stress in diabetes mellitus type 2, *Physiology*, 17, 2(54), ISSN 1223-2076, 2007, p. 16-21

11. Micle L, Mureșan M, Micle O, Maghiar F, **Matei D**, Cheregi C, Marta M, Neagoe C, Pop M, Dorofteiu M. Reactive oxygen species in arterial pulmonary hypertension, Joint Meeting of the Slovak Physiological Society, The Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies, Acta Physiologica, Bratislava, 2007, vol. 191, suppl 658, p. 49
12. Micle O, Micle L, Mureșan M, Dorofteiu M, **Matei D**. Oxidative stress and antioxidant supplementation in soccer players, Joint Meeting of the Slovak Physiological Society, The Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies, Acta Physiologica, Bratislava, 2007, vol. 191, suppl 658, p. 46
13. Oros R, **Matei D**, Vâlceanu N. Coroborarea datelor de laborator cu aspectele macroscopice ale necropsiei în decesele survenite prin hipotermie, the XXIst National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences, 2006, Oradea
14. Cismaș- Pruteanu P, Marazan O, **Matei D**, Dan R. Răspunsuri presionale la testul de efort izometric tip Handgrip, la subiecți cu hipertensiune arterială izolată de consultație, the XXIst National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences 2006, Oradea
15. Cismaș- Pruteanu P, **Matei D**, Dan R. Verificarea autenticității automăsurării presiunii arteriale la domiciliul pacienților: un studiu observațional prospectiv, the XXIst National Conference of the Romanian Society of Physiological Sciences, 2006, Oradea,
16. Cismaș- Pruteanu P, **Matei D**, Negrean R, Lucaciu M. Fiziologie generală și celulară, Editura Universității din Oradea , ISBN : 973-613-336-2, 2003, republished 2005, 2006, 2007

11. Foreign languages

English language - advanced level (postgraduate course)

French language - advanced level

12. Member in scientific societies

Member in the Student`s Debating Societies Department from the Center for High Performance Medical Research of the Faculty of Medicine and Pharmacy, Oradea since 2009

Member of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) since 2008

Member of International Union of Physiological Sciences (IUPS) since 2008

Member of the Romanian Society of Physiological Sciences since 2005

Secretary of the Oradea`s subsidiary of the Romanian Society of Physiological Sciences since 2005