
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Speciile reactive ale oxigenului și azotului în mecanismele patogenetice ale diabetului zaharat

Doctorand **Cosmina-Ioana, Bondor**

Conducător de doctorat **Adriana, Mureșan**



Cuprins

LISTA DE PUBLICAȚII	5
Cuprins	7
Abrevieri utilizate în text	11
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
Capitolul 1. Balanța oxidanți/antioxidanți în organism	17
1.1. Considerații generale	17
1.1.1. Procesele de oxido/reducere	17
1.1.2. Radicalii liberi	17
1.2. Stresul oxinitrozativ	19
1.2.1. Speciile reactive ale oxigenului	19
1.2.2. Speciile reactive ale azotului	20
1.2.3. Stresul oxinitrozativ	21
1.3. Antioxidanți	23
1.4. Balanța oxidanți/antioxidanți în organism și mecanismele de reglare	23
Capitolul 2. Stresul oxinitrozativ la pacienții cu diabet zaharat de tip 2	25
2.1. Considerații generale	25
2.2. Hiperglicemia și stresul oxinitrozativ	25
2.2.1. Hiperglicemia acută	25
2.2.2. Hiperglicemia cronică	26
2.3. Sursele de specii reactive ale oxigenului și de specii reactive ale azotului în diabetul zaharat de tip 2	26
2.4. Bazele moleculare ale diabetului zaharat de tip 2	28
2.5. Mecanismele patogenetice din diabetul zaharat de tip 2	29
2.5.1. Calea polioli	29
2.5.2. Glicarea	30
2.5.3. Calea izoformelor proteinkinazei C	31

2.5.4. Calea hexozaminei	31
2.6. Apărarea antioxidantă în diabetul zaharat de tip 2	31
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	33
1. Ipoteza de lucru/obiective	35
2. Metodologie generală	36
2.1. Loturi	36
2.1.1. Cercetări experimentale	37
2.1.2. Cercetările clinice	38
2.2. Metodă	38
2.2.1. Metode biochimice	39
2.2.2. Evaluarea patologică	40
2.2.3. Analiza statistică	40
2.2.4. Analiza matematică	40
3. Studiul 1. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina în diabetul experimental	41
3.1. Introducere	41
3.2. Obiective	42
3.3. Material și metodă	42
3.4. Rezultate	42
3.5. Discuții	51
3.6. Concluzii	52
4. Studiul 2. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina la pacienții cu diabet zaharat de tip 2	53
4.1. Introducere	53
4.2. Obiective	54
4.3. Material și metodă	54
4.4. Rezultate	54
4.5. Discuții	63
4.6. Concluzii	64
5. Studiul 3. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina la pacienții cu nefropatie diabetică incipientă	65
5.1. Introducere	65
5.2. Obiective	65
5.3. Material și metodă	66
5.4. Rezultate	66
5.5. Discuții	69
5.6. Concluzii	70
6. Studiul 4. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina la pacienții cu neuropatie diabetică	71
6.1. Introducere	71
6.2. Obiective	71
6.3. Material și metodă	71
6.4. Rezultate	72
6.5. Discuții	75
6.6. Concluzii	76
7. Studiul 5. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina la pacienții cu retinopatie diabetică	77
7.1. Introducere	77
7.2. Obiective	78
7.3. Material și metodă	78
7.4. Rezultate	78
7.5. Discuții	81
7.6. Concluzii	82
8. Studiul 6. Ierarhizarea factorilor de risc pentru boala renală cronică la pacienți cu diabet zaharat de tip 2	83
8.1. Introducere	83
8.2. Obiective	84

8.3. Material și metodă	84
8.4. Rezultate	87
8.5. Discuții	92
8.6. Concluzii	93
9. Studiul 7. Problema multicolarității: metoda TOPSIS versus Analiza Componentelor Principale în cazul pacienților cu diabet zaharat de tip 2	95
9.1. Introducere	95
9.2. Obiective	95
9.3. Material și metodă	96
9.4. Rezultate	97
9.5. Discuții	99
9.6. Concluzii	100
10. Studiul 8. Criterii corelate în modele decizionale: aplicarea recurentă a metodei TOPSIS	101
10.1. Introducere	101
10.2. Obiective	101
10.3. Material și metodă	101
10.4. Rezultate	102
10.5. Discuții	105
10.6. Concluzii	106
11. Studiul 9. OXIDIABASE – Software pentru aprecierea riscului de complicații în diabetul zaharat de tip 2 bazat pe scorul de echilibru al balanței oxidanți/antioxidanți	107
11.1. Introducere	107
11.2. Obiective	107
11.3. Material și metodă	107
11.4. Rezultate	107
11.5. Discuții	109
11.6. Concluzii	110
12. Concluzii generale	111
13. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	113
Referințe	115

Cuvinte cheie: diabetul zaharat de tip 2, diabetul experimental, nefropatia diabetică, retinopatia diabetică, neuropatia diabetică, balanța oxidanți/antioxidanți, adiponectina, metoda TOPSIS, metoda VIKOR, multicolaritate

Introducere

Lucrarea de doctorat „Speciile reactive ale oxigenului și azotului în mecanismele patogenetice ale diabetului zaharat”, se înscrie în trei domenii ale cunoașterii: matematică, informatică medicală și medicină.

Ipoteza de lucru/obiective

Cercetarea de față și-a propus să caute alternative la metodele actuale de analiză a datelor medicale și a ales un domeniu medical de o preocupare majoră a sănătății în țările dezvoltate, datorită aspectelor socio-economice pe care le implică, diabetul zaharat (DZ) fiind o afecțiune cu prevalența aproape 8% [1]. Calitatea vieții pacientului cu diabet este afectată de complicațiile care îl însoțesc, printre care și neuropatia diabetică, nefropatia diabetică și retinopatia diabetică. Aceste complicații sunt datorate hiperglicemiei acute și cronice specifice DZ. Izoformele proteinkinazei C, NADPH oxidaza și metabolismul mitocondrial par să joace un rol în generarea speciilor reactive ale oxigenului și azotului [2] în diabet. Speciile reactive ale oxigenului și azotului activează semnalul de transducție în cascadă și factorii de transcripție, care conduc la stimularea expresiei genelor și proteinelor implicate în complicațiile DZ [3].

În această lucrare s-a realizat un studiu experimental, un studiu clinic și un studiu matematic pentru evidențierea și cuantificarea relației dintre indicatorii balanței O/AO și adiponectină în diabetul experimental, la pacienții cu DZ2, nefropatie diabetică, neuropatie diabetică, respectiv retinopatie diabetică. De asemenea, lucrarea mai cuprinde și aplicarea unor metode matematice pentru ierarhizarea factorilor de risc ai nefropatiei diabetice,

pentru rezolvarea problemei multicolarității dintre variabilele independente în regresia liniară și în probleme decizionale multicriteriale, realizarea unei aplicații informatice pentru culegerea datelor și pentru evaluarea riscului complicațiilor la pacienții cu DZ2 pe baza unui scor de echilibru al indicatorilor balanței O/AO.

Metodologie generală

1. Cercetări experimentale

Studiul 1 a fost realizat pe șobolani rasa Wistar în vârstă de 3 luni obținuți de la biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj în anul 2011. Experimentul s-a desfășurat în Laboratorul experimental al Disciplinei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj. S-au administrat suplimente lipide timp de trei săptămâni, după care s-a provocat diabetul prin administrarea de streptozotocină, șobolanii au fost ținuți sub observație timp de încă 10 săptămâni, după care au fost sacrificați. Lotul experimental a fost comparat cu un lot martor de aceeași vârstă. Prin administrarea de suplimente lipide și provocarea diabetului cu streptozotocină s-a obținut un model echivalent cu DZ2, așa cum a fost descris anterior [4-5].

2. Cercetările clinice

În studiile 2-9 au fost incluși pacienți consecutivi din ambulatorul Clinicii de Nefrologie "Mihai Manasia" Cluj veniți la un control de rutină al bolii nefropatice pentru descoperirea și evaluarea în stadiu incipient a acesteia. Studiul s-a desfășurat în lunile iunie și iulie 2011, iar pentru studiul 4 studiul a continuat și în luna august 2011. Pentru studiul 6 au fost incluși în studiu pacienții care au avut date complete la toți indicatorii.

Criteriile de includere au fost: pacienți diagnosticați cu DZ2, cu vechimea bolii de cel puțin 2 ani, aflați în evidența Centrului de diabet, boli de nutriție și metabolism. Pacienții care au îndeplinit criteriile de includere au fost informați asupra studiului. Au fost încadrați numai pacienții care și-au dat consimțământul în scris.

Au fost excluși din studiu pacienții cu boli renale nondiabetice, pacienții cu nefropatie diabetică în stadiu KDOQI 4-5, cu hipertensiune necontrolată (tensiunea arterială sistolică (TAS) >150 mmHg și tensiunea arterială diastolică (TAD) >95 mmHg) și cu boli inflamatorii/infecțioase acute.

Cercetările au fost aprobate de Comisia de Etică a universității.

3. Metodă

Au fost efectuate/înregistrate la animale: greutatea inițială și finală, glicemia o dată la trei zile, indicatorii serici: colesterolul, HDL-colesterolul, trigliceridele, creatinina serică, adiponectina [6], malondialdehidă (MDA) [7], proteinele carbonilate (PC) [8], oxidul nitric (NO) [9] și glutathionul redus (GSH) [10], indicatorii urinari: creatinina urinară, albumina urinară, indicatorii tisulari (rinichi): MDA, PC, NO și GSH; diureza/24h.

Au fost efectuate / înregistrate la pacienții incluși: vârsta, vechimea DZ2, tensiunea arterială, indicatori antropometrici: circumferința abdominală (CA), greutatea, înălțimea, s-au consemnat antecedentele personale: retinopatie diabetică, neuropatie diabetică, etc, indicatorii serici: neenzimatici: glicemia determinată à jeun, colesterolul, HDL-colesterolul, trigliceridele), creatinina serică, proteina C reactivă, adiponectina [11], MDA și indicatori enzimatici: catalaza (CAT) [12], superoxid dismutaza (SOD) [13], hemoglobina glicozilată (HbA1c), indicatori urinari: creatinina urinară, albumina urinară, tratamentul urmat.

S-au calculat indicatori indirecti la animale: raportul albumină urinară / creatinină urinară (AU/CU), glicemia medie (media glicemiilor înregistrate); indicatori indirecti la pacienți: AU/CU (mg/g) din urina colectată dimineața, rata de filtrare glomerulară (RFG) a fost estimată în concordanță cu formula MDRD [14].

Analizele de laborator au fost efectuate în Laboratorul de Imunologie al Spitalului Județean de Urgență, Cluj și în Laboratorul pentru studiul stresului oxidativ de la Disciplina de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj.

Analiza statistică

Au fost aplicate următoarele metode statistice [15]: testul Shapiro-Wilk, testul T Student pentru variații egale sau neegale, testul Mann-Whitney U, coeficientul de corelație Pearson și Spearman, regresie liniară multivariată, metoda stepwise sau enter, curbele ROC. Nivelul de semnificație ales a fost 0,05. Datele au fost evaluate utilizând aplicația SPSS 15.0., Statistica 8.0. și Microsoft Excel.

Analiza matematică

Metoda VIKOR a fost dezvoltată pentru a rezolva o problemă de decizie multicriterială în sisteme complexe [16-17].

Metoda TOPSIS determină soluția cu cea mai mică distanță de soluția ideală și cea mai mare distanță de soluția negativ-ideală [18-19].

Conceptul analizei componentelor principale (PCA) a fost introdus de Pearson [20] și, apoi, dezvoltat de Hotelling [21]. PCA extrage factori necorelați (componente principale) dintr-un set de variabile cantitative corelate. Fiecare componentă este o combinație liniară a variabilelor originale.

Studiul 1. Indicatorii balanței O/AO și adiponectina în diabetul experimental

Obiectivele acestui studiu au fost: cuantificarea indicatorilor serici și tisulari ai balanței O/AO în diabetul experimental, relației indicatorilor balanței O/AO cu gravitatea bolii renale: nefropatia diabetică incipientă experimentală, relației dintre adiponectina plasmatică și indicatorii balanței O/AO.

Rezultate: Atât MDA prelevată din ser $8,24 \pm 1,73$ nmol/ml cât și MDA prelevată din rinichi $0,46 \pm 0,16$ nmol/mg prot a fost semnificativ mai mare la lotul experimental decât la lotul martor $6,71 \pm 0,77$ nmol/ml, respectiv $0,30 \pm 0,08$ nmol/mg prot, $p=0,05$ respectiv $p=0,03$. PC serice au fost semnificativ mai mici la lotul experimental $1,37 \pm 0,45$ nmol/ml decât la lotul martor $1,97 \pm 0,52$ nmol/ml, $p=0,04$. NO seric a fost semnificativ mai mare la lotul experimental $37,06 \pm 16,30$ nmol/ml decât la lotul martor $20,18 \pm 17,54$ nmol/ml, $p=0,02$. Adiponectina a fost semnificativ mai mare la lotul experimental $21,43 \pm 12,02$ nmol/ml decât la lotul martor $12,92 \pm 5,05$ nmol/ml, $p=0,04$.

MDA serică a fost corelată cu AU/CU $r=0,71$, $p=0,004$. NO seric a fost corelat semnificativ cu adiponectina $r=0,69$, $p=0,006$. Adiponectina a fost corelată direct cu un nivel crescut de stres oxinitrozativ la nivelul țesutului renal (MDA tisular $r=0,53$, $p=0,05$ și NO tisular $r=0,77$, $p=0,001$). MDA tisulară a fost corelată semnificativ cu albumina urinară/24h $r=0,59$, $p=0,03$. Creșterea diurezei a fost corelată cu un nivel crescut de MDA la nivelul țesutului renal $r=0,62$, $p=0,02$ și cu GSH tisular crescut $r=0,56$, $p=0,04$. Adiponectina scăzută s-a corelat semnificativ cu diureza scăzută $r=0,82$, $p<0,001$.

În regresie liniară multivariată MDA serică a depins de AU/CU $p=0,004$, MDA tisulară de diureză $p=0,01$ și trigliceride $p=0,02$; PC serice de HDL-colesterol $p=0,04$; PC tisulare de NO seric $p<0,001$, MDA tisular $p<0,001$, GSH tisular $p<0,001$, NO tisular $p<0,001$, adiponectina $p=0,001$ și TG $p=0,04$; GSH seric de diureza $p=0,04$; GSH tisular de creatinina serică $p=0,009$ și de trigliceride $p=0,003$; NO seric de adiponectină $p=0,02$; NO tisular de adiponectină $p<0,001$, de PC tisular $p=0,01$ și de GSH tisular $p=0,006$.

Studiul 2. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina la pacienții cu diabet zaharat de tip 2

Obiectivul acestui studiu a fost evidențierea și cuantificarea relației dintre indicatorii balanței O/AO și adiponectină la pacienți cu DZ2.

Rezultate: Lotul studiat a cuprins 64 de pacienți cu DZ2. 60,9% au fost de gen masculin. Media de vârstă a fost $65,61 \pm 11,13$ ani. Vechimea DZ2 a fost $11,06 \pm 6,97$ ani. Pacienții au fost obezi în proporție de 59,4%, supraponderali în proporție de 25%. Media glicemiei a jeuné a fost $148,10 \pm 39,32$ mg/dl. Media HbA1c a fost $7,96 \pm 1,71\%$.

Un nivel ridicat de HbA1c a fost corelat cu MDA $r=0,40$, $p=0,001$, SOD $r=-0,50$, $p<0,001$ și CAT $r=-0,25$, $p=0,04$. MDA crescută s-a corelat cu un nivel scăzut al adiponectinei $r=-0,28$, $p=0,03$. Adiponectina a fost corelată semnificativ direct cu un nivel crescut al microalbuminuriei AU/CU $r=0,55$, $p<0,001$. Folosind curba ROC a rezultat un prag (cut-off) pentru adiponectină de $8,9 \mu\text{g/ml}$. În grupul cu adiponectina $>8,9 \mu\text{g/ml}$ mare AU/CU $18,47$ ($5,06-44,10$) mg/g a fost semnificativ mai mare decât la grupul cu adiponectina $\leq 8,9 \mu\text{g/ml}$ $96,88$ ($18,11-784,62$) mg/g $p=0,02$, MDA $4,13 \pm 1,55$ a fost semnificativ mai mică decât la grupul cu adiponectina $\leq 8,9 \mu\text{g/ml}$ $2,92 \pm 0,79$ $p=0,005$.

Adiponectina $10,80 \pm 8,75 \mu\text{g/ml}$ pacienților cu $\text{MDA} \leq \text{mediana MDA} = 3,87$ nmol/ml diferă în mod semnificativ de adiponectina $6,12 \pm 5,72 \mu\text{g/ml}$ pacienților cu $\text{MDA} > 3,87$ nmol/ml, $p=0,01$.

În regresia liniară multiplă MDA a depins de HbA1c $p=0,003$, de adiponectină $p=0,01$ și de TAS $p=0,047$; SOD a depins de HbA1c $p=0,02$, glicemie $p<0,001$ și TAS $p=0,01$; CAT nu a depins semnificativ de nici una dintre variabile independente.

Studiu 3. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina la pacienții cu nefropatie diabetică incipientă

Obiectivul acestui studiu a fost de a urmări asocierea dintre adiponectină și indicatorii balanței O/AO la pacienții cu nefropatie diabetică incipientă.

Rezultate: În studiu au fost incluși 27 de pacienți cu DZ2 cu microalbuminurie sau macroalbuminurie (AU/CU>30mg/g) și 37 de pacienți cu DZ2 normoalbuminurici (AU/CU≤30mg/g). MDA, CAT și SOD nu au fost diferite semnificativ între cele două loturi studiate. Adiponectina a fost semnificativ mai mare la lotul de pacienți cu microalbuminurie 6,16 (5,13-13,48) μg/ml față de lotul de pacienți normoalbuminurici 4,82 (2,55-8,32) μg/ml. În lotul cu microalbuminurie au fost 33,3% pacienți cu MDA>3,87 nmol/ml, față de 59,5% în lotul de pacienți normoalbuminurici p=0,04. MDA s-a corelat semnificativ cu adiponectina r=-0,56, p=0,003. La lotul de microalbuminurici adiponectina crescută s-a corelat semnificativ cu AU/CU crescută r=0,71, p<0,001 și cu RFG scăzută r=-0,44, p=0,03. Nu a existat corelație între adiponectină și AU/CU, RFG sau MDA la lotul de normoalbuminurici. În regresie multiplă, AU/CU la lotul de microalbuminurici a depins de HDL-colesterol p=0,02 și de adiponectină p<0,001.

Studiul 4. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina la pacienții cu neuropatie diabetică

În acest studiu ne-am propus să evaluăm relația dintre adiponectina plasmatică și stresul oxidativ la pacienții cu DZ2 și neuropatie diabetică.

Rezultate: Au fost incluși în studiu 26 de pacienți cu DZ2 și neuropatie diabetică, respectiv 48 de pacienți cu DZ2 fără neuropatie diabetică. La lotul cu neuropatie, adiponectina a fost semnificativ corelată cu: MDA r=-0,42, p=0,03; cu CAT r=0,56, p=0,009, cu HDL-colesterol r=0,53, p=0,005; cu HbA1c r = -0,54, p = 0,005. MDA a fost semnificativ corelată cu: vârsta r=-0,46, p=0,02; HbA1c r=-0,54, p=0,005; circumferința abdominală r=-0,39, p=0,05. SOD a fost semnificativ corelată cu: glicemia (r=-0,84, p<0,001). În regresia liniară multiplă, la lotul cu neuropatie, adiponectina a depins de MDA (p=0,004), de HbA1c (p<0,001), de HDL-colesterol (p=0,002) și de IMC (p=0,002). În regresia liniară multiplă, la lotul fără neuropatie, adiponectina s-a asociat semnificativ cu AU/CU (p<0,001), cu HDL-colesterolul (p<0,001), cu IMC (indice de masă corporală) (p=0,009) și cu proteina C reactivă (p=0,001). Nu au fost diferențe semnificative ale nivelului de adiponectină sau al indicatorilor balanței O/AO între lotul cu neuropatie și lotul fără neuropatie diabetică.

Studiul 5. Indicatorii balanței oxidanți/antioxidanți și adiponectina la pacienții cu retinopatie diabetică

În acest studiu ne-am propus să evaluăm corelația dintre indicatorii balanței O/AO și adiponectină la pacienții cu retinopatie diabetică.

Rezultate: Am inclus în studiu 17 pacienți cu DZ2 și retinopatie diabetică, respectiv 47 de pacienți cu DZ2 fără retinopatie diabetică. Nu au fost diferențe semnificative ale nivelului de adiponectină sau al indicatorilor balanței O/AO între lotul cu retinopatie și lotul fără retinopatie diabetică. MDA a fost corelată cu vechimea DZ2 r=0,54, p=0,02 la lotul cu retinopatie. SOD a fost semnificativ corelat cu nivelul HbA1c r=-0,70, p=0,02, dar și cu glicemia r=-0,85, p<0,001, cu colesterolul r=0,59, p=0,01 și trigliceridele r=0,51, p=0,04. Nu au fost corelații semnificative între adiponectină și indicatorii balanței O/AO la pacienții cu retinopatie diabetică.

Studiul 6. Ierarhizarea factorilor de risc pentru boala renală cronică la pacienți cu diabet zaharat de tip 2

Obiectivele studiului nostru au fost de a oferi o altă abordare pentru analiza factorilor de risc ai CKD (scăderea RFG și/sau creșterea AU/CU) cu metoda VIKOR și TOPSIS și compararea rezultatelor cu analiza riscului relativ.

Rezultate: În studiu au fost incluși 53 de pacienți cu DZ2. În primul paragraf au fost prezentate criteriile (4 criterii) și alternativele (18 factori de risc) pentru metoda de decizie multicriterială; în al doilea paragraf ierarhia dată prin coeficienții de proximitate ca rezultat al aplicării metodei TOPSIS; în al treilea paragraf ierarhia ca rezultat al aplicării metodei VIKOR. În al cincilea paragraf riscul relativ pentru fiecare factor în parte pe cele două criterii; în ultimul paragraf corelația dintre ierarhiile date de cele două metode și riscul relativ. Toate ierarhiile au indicat adiponectina pe primul loc. Toate ierarhiile, mai puțin cea dată de RR pentru RFG, au indicat MDA pe ultimul loc.

Primii patru factori din ierarhia TOPSIS au fost identici cu primii patru factori din ierarhia VIKOR și cu primii patru factori dați de RR pentru AU/CU, în aceeași ordine. De asemenea, ultimii patru factori ai ierarhiei TOPSIS au fost clasăți pe ultimele locuri ale ierarhiei date de RR, fie pentru AU/CU, fie pentru RFG. Ultimii trei factori ai ierarhiei VIKOR au fost clasăți pe ultimele locuri ale ierarhiei date de RR, fie pentru AU/CU, fie pentru RFG.

A existat corelație semnificativă între ierarhia TOPSIS și RR pentru AU/CU $r=0,74$, $p=0,001$, între ierarhia TOPSIS și RR pentru RFG $r=0,54$, $p=0,03$, între ierarhia VIKOR și RR pentru AU/CU $r=0,50$, $p=0,04$, între ierarhia TOPSIS și RR pentru RFG a fost $r=0,50$, $p=0,04$, între ierarhia VIKOR și ierarhia TOPSIS $r=0,74$, $p=0,001$. Nu a fost corelație semnificativă între ierarhia RR pentru AU/CU și ierarhia RR pentru RFG $r=0,11$, $p=0,67$.

Studiul 7. Problema multicolinearității: metoda TOPSIS versus Analiza Componentelor Principale în cazul pacienților cu diabet zaharat de tip 2

Problema multicolinearității apare în analiza datelor medicale, atunci când se dorește precizarea apariției unei boli pe baza mai multor variabile independente (prin regresie multivariată liniară sau logistică), în cazul în care variabilele independente sunt coliniare. Scopul studiului nostru a fost de a aplica metoda TOPSIS pentru a rezolva problema multicolinearității în cazul datelor provenite din domeniul medical. Obiectivul secundar a fost de a compara metoda TOPSIS cu PCA.

În cazul nostru boala a fost hiperglicemia ($HbA1c > 6,5\%$), iar variabilele independente au fost: vârsta, vechime DZ2, IMC, CA, TG, colesterol, HDL-colesterol, MDA, CAT și SOD. MDA, CAT și SOD au fost corelate.

Scopul a fost de a extrage o nouă variabilă - o combinație liniară din MDA, CAT și SOD, care să aibă cea mai mare proporție din variație. Noua variabilă ar trebui să fie bine corelată cu variabilele inițiale și să fie aproximativ la fel sau mai bine corelată cu variabila dependentă HbA1c.

Rezultate: În studiu au fost incluși 64 de pacienți. Ca să rezolvăm problema mai întâi am aplicat metoda TOPSIS. Coeficientul de corelație Pearson dintre rezultatul metodei TOPSIS și HbA1c a fost $r=-0,48$, $p<0,001$.

Apoi am aplicat PCA pentru extragerea componentei principale din date. Coeficientul de corelație Pearson dintre rezultatul PCA și HbA1c a fost $r=-0,53$, $p<0,001$. Ca să comparăm metodele am calculat coeficientul de corelație Pearson dintre indexul relativ de proximitate, componenta principală și variabila inițială, apoi am utilizat curba ROC. Aria de sub curba ROC (AUC) pentru rezultatul metodei TOPSIS a fost 0,69, $p=0,046$. AUC pentru rezultatul metodei PCA a fost 0,71, $p=0,03$. AUC pentru MDA a fost 0,31, $p=0,04$. AUC pentru MDA a fost foarte mică, deoarece MDA a fost un criteriu de minim. Am evaluat pentru MDA $1-0,31=0,69$. AUC pentru CAT a fost 0,53, $p=0,74$. AUC pentru SOD a fost 0,70, $p=0,03$. Factorul extras de PCA a fost considerat combinația standard. Aria CAT a fost diferită semnificativ de restul ariilor, în rest nu au fost diferențe statistice între ariile AUC.

Studiul 8. Criterii corelate în modele decizionale: aplicarea recurentă a metodei TOPSIS

Scopul studiului a fost de a explora efectul multicolinearității criteriilor în cazul unei probleme de decizie multicriterială rezolvată cu metoda TOPSIS și de a găsi o soluție pentru problema multicolinearității.

În studiu au fost incluși 64 de pacienți. Pentru acest studiu am utilizat 8 parametri ca să alcătuim o clasificare a pacienților după gravitatea DZ2 și a efectelor sale. Am considerat criteriile de apreciere a gravității DZ2: MDA, SOD, CAT, HbA1c, AU/CU, RFG, TAS și TAD. Criteriile au fost criterii de maxim, afară de SOD, CAT și RFG. Metoda TOPSIS poate fi aplicată în acest caz pentru clasificarea pacienților similar cu [22, 23, 24]. Rezultatul metodei TOPSIS a fost notat cu In_i , $i = \overline{1,64}$. Coeficienții de corelație Pearson au fost $r(In,C_1)=0,47$, $r(In,C_2)=-0,08$, $r(In,C_3)=-0,31$, $r(In,C_4)=0,39$, $r(In,C_5)=-0,76$, $r(In,C_6)=0,51$, $r(In,C_7)=0,27$ și $r(In,C_8)=0,09$.

Rezultate: A fost formulată și demonstrată următoarea *propoziție*: Dacă C_j , $j = \overline{1,m}$ criterii, unde C_k , $k = \overline{1,p}$ sunt independente cu w_k , $k = \overline{1,p}$ ponderi; C'_l , $l = \overline{1,s}$ sunt perechi de criterii perfect coliniare, w'_l , $l = \overline{1,s}$ ponderea lor, $p+s=m$, atunci rezultatul metodei TOPSIS In_i , $i = \overline{1,n}$ este același rezultat ca al modelului cu C_k , $k = \overline{1,p}$ criterii unde ponderile w_k , $k = \overline{1,p}$, și C'_l , $l = \overline{1,\frac{s}{2}}$ (unul dintre fiecare pereche de criterii perfect coliniare) cu ponderile $w_l = \sqrt{1+b_l^2}$, $l = \overline{1,\frac{s}{2}}$, unde b_l , $l = \overline{1,\frac{s}{2}}$ sunt coeficienții dreptei de regresie.

Soluția multicolinearității: A fost propus un algoritm nou pe baza aplicării recurente a metodei TOPSIS pentru rezolvarea problemei multicolinearității dintre criterii.

Rezultatele aplicării algoritmului: algoritmul aplicat a rezolvat problema multicolinearității în 6 iterații obținând trei criterii noi independente.

Studiul 9. OXIDIABASE – Software pentru aprecierea riscului de complicații în diabetul zaharat de tip 2 bazat pe scorul de echilibru al balanței oxidanți/antioxidanți

Obiectivul acestui studiu a fost de a alcătui un scor bazat pe indicatorii balanței O/AO, cum ar fi MDA, SOD și CAT pentru predicția indicatorilor funcției renale (AU/CU) la pacienții cu DZ2. Și de a crea un software pentru o bază de date pentru evaluarea riscului complicațiilor la pacienții cu DZ2.

Rezultate: În studiu au fost incluși 64 de pacienți. A fost aplicată metoda TOPSIS pentru trei criterii MDA, CAT și SOD și cu 64 de alternative. A fost propus un algoritm nou pentru obținerea scorului bazat pe indicatorii balanței O/AO. Regresia liniară multivariată cu HbA1c ca variabilă dependentă a condus la un model de predicție semnificativ, HbA1c a fost în relație cu OSCORE $p=0,03$. Regresia liniară multivariată cu TAS ca variabilă dependentă a pus în evidență o relație între TAS și OSCORE $p=0,005$. Pentru calculul riscului unor complicații ale DZ2 am utilizat regresia logistică. Am luat ca valoare prag pentru AU/CU 30 mg/g. Pentru OSCORE am avut următorul rezultat OR=0,96 (95%IC 0,93-0,99, $p=0,02$) și pentru RFG OR=0,98 (95%IC 0,96-0,99, $p=0,01$). Ecuația probabilității pentru riscul ca un pacient să aibă AU/CU>30mg/g a fost implementată într-o bază de date denumită Oxidiabase, atât pentru culegerea datelor, cât și calculul riscului microalbuminuriei.

Concluzii generale

1. SRO s-au asociat cu DZ experimental și cu stadiul incipient al nefropatiei, MDA serică și tisulară renală a fost crescută, PC serice scăzute;
2. SRN în ser și tisular renale au fost crescute în DZ experimental în stadiile incipiente ale nefropatiei și au fost corelate cu adiponectina crescută
3. Stresul oxinitozativ pare să fie un intermediar în mecanismul ce leagă adiponectina de boala nefropatică incipientă, în diabetul experimental.
4. La pacienții cu DZ2 valori mari ale HbA1c au fost corelate cu MDA crescută, cu SOD și CAT scăzute;
5. La pacienții cu DZ2 și adiponectina $\leq 8,9 \mu\text{g/ml}$ valorile MDA și AU/CU au fost semnificativ mai scăzute decât la pacienții cu DZ2 și cu adiponectina $> 8,9 \mu\text{g/ml}$;
6. HDL-colesterolul pare să fie un antioxidant puternic corelat atât cu adiponectina cât și cu indicatorii balanței O/AO și cu parametrii funcției renale atât în diabetul experimental cât și în DZ2;

7. La pacienții cu nefropatie diabetică adiponectina a fost crescută la pacienții cu nefropatie diabetică și s-a corelat negativ cu MDA, iar corelația a fost mai pronunțată;
8. La pacienții cu neuropatie diabetică, adiponectina scăzută se corelează cu MDA crescută și cu CAT scăzute;
9. La pacienții cu retinopatia diabetică adiponectina nu se asociază cu indicatorii balanței O/AO;
10. Metodele MCDM TOPSIS și VIKOR pot fi utilizate pentru ierarhizarea factorilor de risc în cazul unor afecțiuni multicriteriale;
11. Multicolaritatea se poate rezolva prin aplicarea recurentă a metodei TOPSIS după algoritmul propus, fiind rezolvată în mod similar cu PCA și având avantajul că se poate aplica pe eșantioane mici;
12. Cu ajutorul metodei TOPSIS se poate calcula un scor al homeostaziei redox.

Referințe selective

- [1] McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;108(8):652-659.
- [2] Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S241-245.
- [3] Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S241-245.
- [4] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2000;49:1390-1394.
- [5] Rovin BH, Song H, Hebert LA, Nadasdy T, Nadasdy G, Birmingham DJ, et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int.* 2005;68:1825-1833.
- [6] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:79-83.
- [7] Conti M, Morand PC, Levillain P, Lemonnier A. Improved fluorometric determination of malondialdehyde. *Clin Chem.* 1991;37:1273-1275.
- [8] Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth enzymol.* 1994;233:357-363.
- [9] Titherage MA. The enzymatic measurement of nitrate and nitrite. In: Titherage MA, editor. *Methods in molecular biology, Volumul 100. Nitric oxide protocols.* Humana Press: Totowa;1998. p:83-91.
- [10] Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Meth Enzymol.* 1994;233:380-384.
- [11] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:79-83.
- [12] Pippenger CE, Browne RW, Armstrong D. Regulatory antioxidant enzymes. In vol.: *Methods in Molecular Biology, vol.108: Free Radicals and Antioxidant Protocols* D.Armstrong (ed.). Humana Press Inc, Totowa, NJ, 1993 p.299-311.
- [13] Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assay. *Methods Enzymol.* 1984;105:93-104.
- [14] Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GJ. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:828-830.
- [15] Rosner BA. *Fundamentals of Biostatistics. Volumul I și II. 4th ed.* Thomson Brooks/Cole: Duxbury SUA; 1995.
- [16] Opricovic S, Tzengb GH. Compromise solution by MCDM methods: A comparative analysis of VIKOR and TOPSIS. *EJOR.* 2004;156:445-455.
- [17] Opricovic S, Tzeng GH. Multicriteria planning of postearthquake sustainable reconstruction. *Computer-Aided Civil and Infrastructure Engineering.* 2002;17:211-220.
- [18] Hwang CL, Yoon K. *Multiple Attribute Decision Making.* New-York: Springer Verlag, Berlin-Heidelberg; 1981.
- [19] Yoon K. A reconciliation among discrete compromise solutions. *JORS.* 1987;38(3):272-86.
- [20] Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophy.* 1901;2:559-572.
- [21] Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J Edu Psych.* 1933;24:417-441.
- [22] Bondor CI, Marin M, Renoult E, Kessler M, Țigan Ș. Hierarchy of risk factors for post kidney transplant diabetes mellitus. *Appl Med Inf.* 2006;18(1, 2):25-30.
- [23] Gherman M, Moldoveanu M, Țigan Ș. Hierarchy of risk factor in bronchial asthma *Appl Med Inf.* 2004;14(1-2):35-37.
- [24] Bondor CI, Matei D, Mureșan A. OXIDIABASE – Software for Risk Assessment of Complications in Type 2 Diabetes Mellitus based on Oxidative Stress Score obtain by Topsis Method. *Proceeding of the International Conferences on Risk Management, Assessment and Mitigation: București 2010:*374-379.

ABSTRACT PHD THESIS

Reactive oxygen and nitrogen species in the pathogenetic mechanisms of diabetes

PhD candidate **Cosmina-Ioana, Bondor**

Scientific coordinator **Adriana, Mureșan**



Contents

Publication List	5
Abbreviations	11
Introduction	13
CURRENT STATUS OF KNOWLEDGE	15
Chapter 1. Oxidant / Antioxidant Balance in the Body	17
1.1. General Considerations	17
1.1.1. The Oxidation / Reduction Process	17
1.1.2. Free Radicals	17
1.2. Oxinitrosative Stress	19
1.2.1. Reactive Oxygen Species	19
1.2.2. Reactive Nitrogen Species	20
1.2.3. Oxinitrosative Stress	21
1.3. Antioxidants	23
1.4. Oxidant / Antioxidant Balance in the Body and Control Mechanisms	23
Chapter 2. Nitrosative Stress in Patients with Type 2 Diabetes	25
2.1. General Considerations	25
2.2. Hyperglycemia and Oxinitrosative Stress	25
2.2.1. Acute Hyperglycemia	25
2.2.2. Chronic Hyperglycemia	26
2.3. Sources of Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Type 2 Diabetes	26
2.4. Molecular Basis of Type 2 Diabetes	28
2.5. Pathogenetic Mechanisms of Type 2 Diabetes	29

2.5.1. Polyol Pathway	29
2.5.2. Glycation	30
2.5.3. Protein Kinase C Isoforms Pathway	31
2.5.4. Hexosamines Pathway	31
2.6. Antioxidant Defense in Diabetes Mellitus Type 2	31
PERSONAL CONTRIBUTION	33
1. Hypothesis / Objectives	35
2. General Methodology	36
2.1. Samples	36
2.1.1. Experimental Research	37
2.1.2. Clinical Research	38
2.2. Methods	38
2.2.1. Biochemical Methods	39
2.2.2. Pathological Evaluation	40
2.2.3. Statistical Analysis	40
2.2.4. Mathematical Analysis	40
3. Study 1. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Experimental Diabetes	41
3.1. Introduction	41
3.2. Objectives	42
3.3. Materials and Methods	42
3.4. Results	42
3.5. Discussions	51
3.6. Conclusions	52
4. Study 2. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Patients with Type 2 Diabetes	53
4.1. Introduction	53
4.2. Objectives	54
4.3. Materials and Methods	54
4.4. Results	54
4.5. Discussions	63
4.6. Conclusions	64
5. Study 3. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Patients with Early Diabetic Nephropathy	65
5.1. Introduction	65
5.2. Objectives	65
5.3. Materials and Methods	66
5.4. Results	66
5.5. Discussions	69
5.6. Conclusions	70
6. Study 4. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Patients with Diabetic Neuropathy	71
6.1. Introduction	71
6.2. Objectives	71
6.3. Materials and Methods	71
6.4. Results	72
6.5. Discussions	75
6.6. Conclusions	76
7. Study 5. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Patients with Diabetic Retinopathy	77
7.1. Introduction	77
7.2. Objectives	78
7.3. Materials and Methods	78
7.4. Results	78
7.5. Discussions	81
7.6. Conclusions	82
8. Study 6. Hierarchy of Risk Factors for Chronic Kidney Disease in Patients with Type 2 Diabetes	83

8.1. Introduction	83
8.2. Objectives	84
8.3. Materials and Methods	84
8.4. Results	87
8.5. Discussions	92
8.6. Conclusions	93
9. Study 7. Multicollinearity Problem: TOPSIS Method versus Principal Components Analysis in Patients with Type 2 Diabetes	95
9.1. Introduction	95
9.2. Objectives	95
9.3. Materials and Methods	96
9.4. Results	97
9.5. Discussions	99
9.6. Conclusions	100
10. Study 8. Related Criteria in Decision Models: Recurrent Application of TOPSIS Method	101
10.1. Introduction	101
10.2. Objectives	101
10.3. Materials and Methods	101
10.4. Results	102
10.5. Discussions	105
10.6. Conclusions	106
11. Study 9. OXIDIABASE – Software for Assessing the Risk of Complications of Type 2 Diabetes in Based on Oxidant / Antioxidant Balance Score	107
11.1. Introduction	107
11.2. Objectives	107
11.3. Materials and Methods	107
11.4. Results	107
11.5. Discussions	109
11.6. Conclusions	110
12. General Conclusions	111
13. Originality and Innovative Contributions of the Thesis	113
References	115

Keywords: diabetes mellitus type 2, experimental diabetes, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, diabetic neuropathy, oxidant / antioxidant balance, adiponectin, TOPSIS method, VIKOR method, multicollinearity

Introduction

PhD thesis "Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pathogenetic Mechanisms of Diabetes" falls into three areas of knowledge: mathematics, computer science and medicine.

Hypothesis / Objectives

This research aims to seek alternatives to current analysis methods of medical data in a medical field that is a major health concern in developed countries due to socio-economic issues involved, for a disease with great prevalence (about 8 % of population) [1]. Quality of life for patients with diabetes (DM) is affected by its complications, including diabetic neuropathy, diabetic nephropathy and diabetic retinopathy. These complications are due to acute and chronic hyperglycemia specific to DM. Protein kinase C isoforms, NADPH oxidase and mitochondrial metabolism appear to play a role in the generation of reactive oxygen and nitrogen species [2] in DM. Reactive oxygen and nitrogen species activate signal transduction cascade and transcription factors, leading to gene and proteins expression [3].

This PHD thesis include an experimental study, a clinical study and a mathematical study to highlight and quantify the relationship between indicators of the oxidants/antioxidants (O/AO) balance and adiponectin in experimental diabetes and in patients with T2DM, diabetic nephropathy, diabetic neuropathy, diabetic retinopathy, also include the application of mathematical methods to rank risk factors of diabetic nephropathy, to solve the

problem of multicollinearity of the independent variables in linear regression and in multi-criteria decision problems, include an implementation of a database for risk assessment in patients with T2DM complications based on a score of balance O/AO indicators.

General Methodology

1. Experimental Research

Study 1 was conducted on Wistar rats aged 3 months obtained from University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj Biobase in 2011. The experiment took place in the Experimental Laboratory of the Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj. Lipid supplements were administered for three weeks, after which diabetes was provoked with the administration of streptozotocin; rats were kept under observation for up to 10 weeks, after which they were sacrificed. The experimental group was compared with a control group of the same age. With supplemental fat administrated and provoked diabetes with streptozotocin was obtained a T2DM equivalent model as previously described [4-5].

2. Clinical Research

In 2-9 studies were included consecutive patients from the outpatient of the Nephrology Clinic "Mihai Manasia" Cluj, come to a routine control for early detection of nephropathy disease. The study was conducted in June and July 2011 and for Study 4 in June - August 2011. In the study 6 were included patients with complete data for all indicators.

Inclusion criteria were: patients diagnosed with T2DM (recorded at the Diabetes Center, nutritional and metabolic diseases) for at least two years. Patients who met the inclusion criteria were informed of the study. Were included only patients who gave their written consent.

From the study were excluded patients with non-diabetic renal disease, patients with diabetic nephropathy with KDOQI stage 4-5, with uncontrolled hypertension (systolic blood pressure (SBP) > 150 mmHg and diastolic blood pressure (DBP) > 95 mmHg) and inflammatory diseases / acute infection.

The research was approved by the Ethics Committee of the University.

3. Methods

For animals were performed / recorded: initial and final weight, blood glucose / every three days, serum indicators: cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, serum creatinine, adiponectin [6], malondialdehyde (MDA) [7], protein carbonyl (PC) [8], nitric oxide (NO) [9] and reduced glutathione (GSH) [10], urinary indicators: urinary creatinine, urinary albumin, tissue indicators (kidney): MDA, PC, NO and GSH; diuresis/24h.

For the included patients were performed / recorded: age, length of T2DM, blood pressure, anthropometric indicators: abdominal circumference (AC), weight, height; were recorded personal history of: diabetic retinopathy, diabetic neuropathy, acute myocardial infarction, chronic heart failure, chronic obstructive arterial disease of the lower limbs, stroke, metabolic syndrome X, serum indicators: non-enzymatic: fasting blood glucose determined, cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides), serum creatinine, C-reactive protein, adiponectin [11], MDA and enzyme: catalase (CAT) [12], superoxide dismutase (SOD) [13], glycosylated hemoglobin (HbA1c), urinary indicators: urinary creatinine, urinary albumin, followed by treatment.

For animals were calculated indirect indicators: urinary albumin / creatinine urine ratio (AU / CU), average blood sugar; indirect indicators for patients: AU / CU (mg / g) from urine collected in the morning, glomerular filtration rate (GFR) was estimated according to MDRD formula [14].

Laboratory analyses were performed at the Immunology Laboratory of County Emergency Hospital, Cluj and at the Laboratory for the Oxidative Stress Study of the Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj.

Statistical Analysis

Were applied the following statistical methods [15]: Shapiro-Wilk test, Student t test for equal or unequal variations, Mann-Whitney U test, Pearson and Spearman correlation coefficient, multivariate linear regression, stepwise or enter method, the ROC curves. The significance level chosen was 0.05. Data were evaluated using SPSS 15.0., Statistica 8.0. and Microsoft Excel.

Mathematical Analysis

Vikor method was developed to solve a multi-criteria decision in complex systems [16-17].

TOPSIS method determines the solution with the smallest distance from the ideal solution and the farthest distance from the negative-ideal solution [18-19].

The concept of principal component analysis (PCA) was introduced by Pearson [20] and then developed by Hotelling [21]. PCA extract uncorrelated factors (principal components) of a set of correlated quantitative variables. Each component is a linear combination of the original variables.

Study 1. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Experimental Diabetes

The objectives of this study were to quantify serum and tissue O/AO balance indicators in experimental diabetes, the relationship between O/AO balance indicators and the gravity of experimental diabetic nephropathy, the relationship between plasma adiponectin and O/AO balance indicators.

Results: Serum MDA 8.24 ± 1.73 nmol/ml and kidneys MDA 0.46 ± 0.16 nmol/mg prot was significantly higher in the experimental group than in the control group 6.71 ± 0.77 nmol/ml, respectively 0.30 ± 0.08 nmol/mg prot, $p = 0.05$ $p = 0.03$. Serum PC were significantly lower in the experimental group 1.37 ± 0.45 nmol/ml than in the control group 1.97 ± 0.52 nmol/ml, $p = 0.04$. Serum NO was significantly higher in the experimental group 37.06 ± 16.30 nmol/ml than in the control group 20.18 ± 17.54 nmol/ml, $p = 0.02$. Adiponectin was significantly higher in the experimental group 21.43 ± 12.02 nmol/ml than in the control group 12.92 ± 5.05 nmol / ml, $p = 0.04$.

Serum MDA was correlated with AU/CU $r = 0.71$, $p = 0.004$. Serum NO was significantly correlated with adiponectin $r = 0.69$, $p = 0.006$. Adiponectin was correlated directly with increased nitrosative stress in kidney tissue (tissue MDA $r = 0.53$, $p = 0.05$ and tissue NO $r = 0.77$, $p = 0.001$). Tissue MDA was significantly correlated with urinary albumin/24h $r = 0.59$, $p = 0.03$. Increased urine output was correlated with increased levels of MDA in renal tissue $r = 0.62$, $p = 0.02$ and $r = 0.56$ increased tissue GSH, $p = 0.04$. Decreased adiponectin significantly correlated with low diuresis $r = 0.82$, $p < 0.001$.

Serum MDA in multivariate linear regression depended on AU/CU $p = 0.004$, tissue MDA on diuresis $p = 0.01$ and triglyceride $p = 0.02$, PC serum on HDL-cholesterol $p = 0.04$, PC tissue on NO serum $p < 0.001$, tissue MDA $p < 0.001$, GSH tissue $p < 0.001$, NO tissue $p < 0.001$, adiponectin $p = 0.001$ and TG $p = 0.04$, serum GSH on diuresis $p = 0.04$; tissue GSH on serum creatinine $p = 0.009$ and triglycerides $p = 0.003$, serum NO on adiponectin $p = 0.02$, tissue NO on adiponectin $p < 0.001$, tissue PC $p = 0.01$ and tissue GSH $p = 0.006$.

Study 2. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Patients with Type 2 Diabetes

The objective of this study was to highlight and quantify the relationship between indicators of the O / AO balance and adiponectin in patients with T2DM.

Results: The study group included 64 patients with T2DM. Male were 60.9%. Mean age was 65.61 ± 11.13 years. Duration of T2DM was 11.06 ± 6.97 years. The patients were obese in a proportion of 59.4%, 25% with overweight. Average fasting blood glucose was 148.10 ± 39.32 mg / dl. Average HbA1c was $7.96 \pm 1.71\%$.

High levels of HbA1c was correlated with MDA $r = 0.40$, $p = 0.001$, SOD $r = -0.50$, $p < 0.001$ and CAT $r = -0.25$, $p = 0.04$. Increased MDA was correlated with low levels of adiponectin $r = -0.28$, $p = 0.03$. Adiponectin was significantly correlated directly with increased levels of AU/CU $r = 0.55$, $p < 0.001$. Using the ROC curve we found a threshold (cut-off) for adiponectin of $8.9 \mu\text{g/ml}$. In group with adiponectin $> 8.9 \mu\text{g/ml}$ AU/CU was $18.47 (5.06-44.10)$ mg/g, significantly higher than the group with adiponectin $\leq 8.9 \mu\text{g/ml}$ were AU/CU was $96.88 (18.11-784.62)$ mg/g, $p=0.02$. In group with adiponectin $> 8.9 \mu\text{g/ml}$ MDA was 4.13 ± 1.55 nmol/ml, significantly higher than the group with adiponectin $\leq 8.9 \mu\text{g/ml}$ were MDA was $2.92 \pm 0,79$ nmol/ml, $p = 0.005$.

We divide patients according to the median value of MDA = 3.87 nmol/ml. Adiponectin ($10.80 \pm 8.75 \mu\text{g/ml}$) in patients with MDA \leq median value differ significantly from adiponectin ($6.12 \pm 5.72 \mu\text{g/ml}$) in patients with MDA $>$ median value, $p = 0.01$.

MDA in multiple linear regression depended on HbA1c $p = 0.003$, systolic arterial blood pressure $p = 0.01$ and adiponectin $p = 0.047$; SOD depended on HbA1c $p = 0.02$, glucose $p < 0.001$ and systolic arterial blood pressure $p = 0.01$, CAT was not significantly dependent on any variables.

Study 3. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Patients with Early Diabetic Nephropathy

The objective of this study was to investigate the association between adiponectin and O/AO balance indicators in patients with incipient diabetic nephropathy.

Results: We include in study 27 patients with T2DM and microalbuminuria or macroalbuminuria (AU/CU > 30 mg/g) and 37 patients with T2DM and normoalbuminuria (AU/CU ≤ 30 mg/g). MDA, CAT and SOD were significantly different between studied groups. Adiponectin was significantly higher in the group of patients with microalbuminuria 6.16 (5.13-13.48) μg/ml compared to the group with normoalbuminuria 4.82 (2.55-8.32) μg/ml. In group with microalbuminuria were 33.3% patients with MDA > 3.87 nmol/ml, compared to 59.5% of patients in normoalbuminuria group p = 0.04. MDA was significantly correlated with adiponectin r = -0.56, p = 0.003. In microalbuminuria group increased adiponectin significantly correlated with increased AU/CU r = 0.71, p < 0.001 and low GFR r = -0.44, p = 0.03. There was no correlation between adiponectin and AU/CU, GFR or MDA in normoalbuminuria group. In multiple regression, AU/CU in microalbuminuria group depended on HDL-cholesterol p = 0.02 and adiponectin p < 0.001.

Study 4. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Patients with Diabetic Neuropathy

In this study we aimed to evaluate the relationship between plasma adiponectin and oxidative stress in patients with T2DM and diabetic neuropathy.

Results: There were included in the study 26 patients with T2DM and diabetic neuropathy and 48 patients with T2DM without diabetic neuropathy. In the group with neuropathy adiponectin was significantly correlated with: MDA r = -0.42, p = 0.03, CAT r = 0.56, p = 0.009, HDL-cholesterol r = 0.53, p = 0.005 and HbA1c r = -0.54, p = 0.005. MDA was significantly correlated with: age r = -0.46, p = 0.02; HbA1c r = -0.54, p = 0.005, abdominal circumferences r = -0.39, p = 0.05. SOD was significantly related to: blood glucose levels (r = -0.84, p < 0.001). In multiple linear regression, adiponectin, in the group with neuropathy, depended on MDA (p = 0.004), HbA1c (p < 0.001), HDL-cholesterol (p = 0.002) and BMI (p = 0.002). In multiple linear regression, adiponectin, in the group without neuropathy, was significantly associated with AU/CU (p < 0.001) with HDL-cholesterol (p < 0.001) with BMI (p = 0.009) and CRP (p = 0.001). There were no significant differences in the level of adiponectin and parameters of the O/AO between the group with and without diabetic neuropathy.

Study 5. Oxidant / Antioxidant Balance Indicators and Adiponectin in Patients with Diabetic Retinopathy

In this study we aimed to evaluate the correlation between the O/AO balance indicators and adiponectin in patients with diabetic retinopathy.

Results: We included 17 patients with T2DM and diabetic retinopathy and 47 patients with T2DM without diabetic retinopathy. There were no significant differences in adiponectin levels or O/AO balance indicators between the group with and without diabetic retinopathy. In the group with retinopathy, MDA was correlated with duration of T2DM r = 0.54, p = 0.02. SOD was significantly correlated with the level of HbA1c r = -0.70, p = 0.02, glucose r = -0.85, p < 0.001, cholesterol r = 0.59, p = 0.01 and triglyceride r = 0.51, p = 0.04. There were no significant correlations between adiponectin and O/AO balance indicators in patients with diabetic retinopathy.

Study 6. Hierarchy of Risk Factors for Chronic Kidney Disease in Patients with Type 2 Diabetes

The objectives of our study were to provide a different approach of the risk factors analysis for chronic kidney disease (low value for GFR and/or high value for AU/CU) using Vikor and TOPSIS method and comparing the results with the analysis of relative risk.

Results: In this study were included 53 patients with T2DM. We consider 4 criteria and 18 alternatives (risk factors) for the multi-criteria decision method. Applying the TOPSIS method we compute the proximity coefficients and the hierarchy of risk factors. Applying the Vikor method we compute and found the risk factors hierarchy. We compute the relative risk for each criterion, for each risk factor. We compute the correlation between the hierarchies gave by the two methods and by the relative risk. All hierarchies were showing adiponectin in the first place and MDA in the last place.

TOPSIS ranked first four factors identical to the first four factors of Vikor hierarchy and with the first four factors gave by RR on the AU/CU criterion, in the same order. Also, the last four factors of TOPSIS hierarchy were placed in the last places in the RR hierarchy for both AU/CU and GFR. The last three factors of Vikor hierarchy were in last places in the RR hierarchy for both AU/CU and GFR.

There was significant correlation between TOPSIS and RR hierarchy for AU/CU criterion $r = 0.74$, $p = 0.001$, between TOPSIS hierarchy and RR for GFR criterion $r = 0.54$, $p = 0.03$, between Vikor hierarchy and RR for AU/CU criterion $r = 0.50$, $p = 0.04$, between TOPSIS hierarchy and RR for GFR criterion $r = 0.50$, $p = 0.04$, between Vikor hierarchy and TOPSIS hierarchy $r = 0.74$, $p = 0.001$. There was no significant correlation between RR hierarchy for AU/CU criterion and RR hierarchy for GFR criterion $r = 0.11$, $p = 0.67$.

Study 7. Multicollinearity Problem: TOPSIS Method versus Principal Components Analysis in Patients with Type 2 Diabetes

Multicollinearity problem arises in the analysis of medical data when we want to predict the onset of a disease based on several independent variables (multivariate linear or logistic regression), if the independent variables are collinear. The aim of our study was to apply the TOPSIS method to solve the multicollinearity problem with data from the medical field. The secondary objective was to compare the TOPSIS method with PCA.

In our case the disease was hyperglycemia ($HbA1c > 6.5\%$) and the independent variables were: age, duration of T2DM, BMI, abdominal circumferences, triglyceride, cholesterol, HDL-cholesterol, MDA, CAT and SOD. MDA and SOD were correlated.

The aim was to extract a new variable - a linear combination of MDA and SOD, which have the highest proportion of variation. The new variable should be well correlated with the original variables and are about the same or better correlated with HbA1c, the dependent variable.

Results: In this study we included 64 patients. To solve the problem, first we applied TOPSIS method. Pearson correlation coefficient of TOPSIS method result and HbA1c was $r = -0.48$, $p < 0.001$.

Then we applied PCA to extract principal component from the data. Pearson correlation coefficient between PCA result and HbA1c was $r = -0.53$, $p < 0.001$. To compare the methods we compute the Pearson correlation coefficient between the relative proximity index (TOPSIS method results), the main and initial variable, then we used the ROC curve. The area under the ROC curve (AUC) for the outcome of TOPSIS method was 0.69, $p = 0.046$. AUC for PCA method was 0.71, $p = 0.03$. AUC for MDA was 0.31, $p = 0.04$. AUC for MDA was very small, because MDA was a minimum criterion. We evaluated the MDA as $1 - 0.31 = 0.69$. For CAT, AUC was 0.53, $p = 0.74$. SOD AUC was 0.70, $p = 0.03$. PCA extracted factor was considered the standard combination. Area CAT was significantly different from the rest areas. No other comparisons were revealed statistical differences between the ROC curves.

Study 8. Related Criteria in Decision Models: Recurrent Application of TOPSIS Method

The aim of the study was to explore the effect of criteria multicollinearity in a multiple criteria decision making problems, and to find a solution to multicollinearity.

In study we included 64 patients. For this study we used eight parameters to make up a hierarchy of patients according to severity of T2DM and its complications. We considered the criteria for assessing the gravity of T2DM: MDA, SOD, CAT, HbA1c, AU/CU, GFR, SBP and DBP in this order. The criteria were maximum criteria except of SOD, CAT and GFR, which were minimum criteria. TOPSIS method can be applied to found a patient hierarchy for a gravity of a disease [22, 23, 24]. TOPSIS method result was noted with In_i , $i = \overline{1,64}$. Pearson correlation coefficients were $r(In, C_1) = 0.47$, $r(In, C_2) = -0.08$, $r(In, C_3) = -0.31$, $r(In, C_4) = 0,39$, $r(In, C_5) = -0.76$, $r(In, C_6) = 0.51$, $r(In, C_7) = 0.27$ and $r(In, C_8) = 0.09$, where C_1, \dots, C_8 were the criteria.

Results: It was formulated and proved the following proposition: If C_j , $j = \overline{1,m}$ criteria where C_k , $k = \overline{1,p}$ are independent with w_k , $k = \overline{1,p}$ weight, C'_l , $l = \overline{1,s}$ are perfectly collinear pairs of criteria, their weight w'_l , $l = \overline{1,s}$, $p + s = m$, then the TOPSIS method result In_i , $i = \overline{1,n}$ is the same result as the model with C_k , $k = \overline{1,p}$ criteria where the weights w_k , $k = \overline{1,p}$, and C'_l , $l = \overline{1,\frac{s}{2}}$ (one of each pair of perfectly collinear criteria) with weights $w_l = \sqrt{1+b_l^2}$, $l = \overline{1,\frac{s}{2}}$, where b_l , $l = \overline{1,\frac{s}{2}}$ are the regression coefficients.

Multicollinearity solution: a new algorithm based on recurrent application of TOPSIS method for solving the problem of multicollinearity of criteria was proposed.

Results of algorithm implementation: We applied the algorithm to solve our example. The algorithm had six iterations. It gave three new uncorrelated criteria.

Study 9. OXIDIABASE – Software for Assessing the Risk of Complications of Type 2 Diabetes in Based on Oxidant / Antioxidant Balance Score

The objective of this study was to compile a score based on the O/AO balance indicators, such as MDA, SOD and CAT to predict renal function indicators (AU/CU) in patients with T2DM and create database software for assessing risk of complications in patients with T2DM.

Results: We included in the study 64 patients. TOPSIS method was applied to three criteria MDA, CAT and SOD and 64 alternatives. It was proposed a new algorithm for obtaining indicators score based on the O/AO balance indicators. Multivariate linear regression with HbA1c as the dependent variable resulted in a significant prediction model, HbA1c was in a relationship with OSCORE $p = 0.03$. Multivariate linear regression with systolic blood pressure as the dependent variable revealed a relationship between OSCORE and systolic blood pressure $p = 0.005$. To calculate the risk of complications of T2DM we used logistic regression. We took the threshold for AU/CU= 30 mg/g. We had the following result for OSCORE OR = 0.96 (95% CI from 0.93 to 0.99, $p = 0.02$) and for GFR OR = 0.98 (95% CI from 0.96 to 0.99, $p = 0.01$). The probability equation for the risk that a patient have AU/CU> 30mg/g was implemented in a database called Oxidiabase which contain both data collection and risk calculation for microalbuminuria.

General conclusions

1. Reactive oxygen species have been associated with experimental diabetes and early-stage nephropathy, renal tissue and serum MDA was increased, serum PC was decreased;
2. Reactive nitrogen species in serum and kidney tissue were high in experimental DZ in early stages of experimental diabetic nephropathy and adiponectin were correlated with increased NO;

3. Oxinitrosative stress seems to be an intermediate mechanism linking adiponectin and incipient nephropathy disease, in experimental diabetes.
4. T2DM patients with high levels of HbA1c were correlated with increased MDA and decreased SOD and CAT;
5. In patients with T2DM and adiponectin $\leq 8.9 \mu\text{g/ml}$ MDA values and AU/CU were significantly lower than in patients with T2DM and adiponectin $> 8.9 \mu\text{g/ml}$;
6. HDL cholesterol seems to be a powerful antioxidant correlated with both adiponectin, O/AO balance indicators and renal function parameters in experimental diabetes respectively, in T2DM;
7. Adiponectin in patients with diabetic nephropathy was increased and negatively correlated with MDA;
8. In patients with diabetic neuropathy, low adiponectin was correlated with increased MDA and decreased CAT;
9. Adiponectin in patients with diabetic retinopathy is not associated with O/AO balance indicators;
10. TOPSIS and Vikor methods can be used to rank risk factors for certain diseases in the case of multicriterial disease;
11. Multicolinearity can be solved by recurrent application of the TOPSIS method as in the proposed algorithm, the results are similar with PCA. This method had the advantage that it can be applied to small samples;
12. With TOPSIS method we can calculate a score of redox homeostasis.

Selective References

- [1] McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;108(8):652-659.
- [2] Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S241-245.
- [3] Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S241-245.
- [4] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2000;49:1390-1394.
- [5] Rovin BH, Song H, Hebert LA, Nadasdy T, Nadasdy G, Birmingham DJ, et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int.* 2005;68:1825-1833.
- [6] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:79-83.
- [7] Conti M, Morand PC, Levillain P, Lemonnier A. Improved fluorometric determination of malondialdehyde. *Clin Chem.* 1991;37:1273-1275.
- [8] Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth enzymol.* 1994;233:357-363.
- [9] Titherage MA. The enzymatic measurement of nitrate and nitrite. In: Titherage MA, editor. *Methods in molecular biology, Volumul 100. Nitric oxide protocols.* Humana Press: Totowa;1998. p:83-91.
- [10] Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Meth Enzymol.* 1994;233:380-384.
- [11] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:79-83.
- [12] Pippenger CE, Browne RW, Armstrong D. Regulatory antioxidant enzymes. In vol.: *Methods in Molecular Biology, vol.108: Free Radicals and Antioxidant Protocols* D.Armstrong (ed.). Humana Press Inc, Totowa ,NJ,1993 p.299-311.
- [13] Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assay. *Methods Enzymol.* 1984;105:93-104.
- [14] Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GJ. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:828-830.
- [15] Rosner BA. *Fundamentals of Biostatistics. Volumul I și II.* 4th ed. Thomson Brooks/Cole: Duxbury SUA; 1995.
- [16] Opricovic S, Tzengb GH. Compromise solution by MCDM methods: A comparative analysis of VIKOR and TOPSIS. *EJOR.* 2004;156:445-455.
- [17] Opricovic S, Tzeng GH. Multicriteria planning of postearthquake sustainable reconstruction. *Computer-Aided Civil and Infrastructure Engineering.* 2002;17:211-220.
- [18] Hwang CL, Yoon K. *Multiple Attribute Decision Making.* New-York: Springer Verlag, Berlin-Heidelberg; 1981.
- [19] Yoon K. A reconciliation among discrete compromise solutions. *JORS.* 1987;38(3):272-86.
- [20] Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophy.* 1901;2:559-572.
- [21] Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J Edu Psych.* 1933;24:417-441.
- [22] Bondor CI, Marin M, Renoult E, Kessler M, Ţigan Ş. Hierarchy of risk factors for post kidney transplant diabetes mellitus. *Appl Med Inf.* 2006;18(1, 2):25-30.
- [23] Gherman M, Moldoveanu M, Ţigan Ş. Hierarchy of risk factor in bronchial asthma *Appl Med Inf.* 2004;14(1-2):35-37.
- [24] Bondor CI, Matei D, Mureşan A. OXIDIABASE – Software for Risk Assessment of Complications in Type 2 Diabetes Mellitus based on Oxidative Stress Score obtain by Topsis Method. *Proceeding of the International Conferences on Risk Management, Assessment and Mitigation: Bucureşti 2010:374-379.*