



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE
DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**



**TEZĂ DE DOCTORAT
-REZUMAT-
ROLUL NEUROPROTECTOR AL
ACIDULUI THIOCTIC ȘI AL
COMPLEXULUI VITAMINIC B IN
NEUROPATIA DIABETICĂ**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. MARIA IANCĂU**

**STUDENT-DOCTORAND:
PĂUN A. ANDREEA (ROTARU)**

**CRAIOVA
2020**

Cuvinte cheie: Neuropatia diabetică, Acid thioctic, complex vitaminic B

CUPRINS

CUPRINS	2
1. INTRODUCERE.....	2
2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	3
3. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	3
3.1. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE.....	3
3.2. METODOLOGIA CERCETĂRII	4
3.2.1. Abordarea temei.....	4
3.2.2 Material și Metodă	4
3.2.2.1.1. Inducerea diabetului zaharat.....	4
3.2.2.1.2. Loturile experimentale.	4
3.2.2.1.3. Evaluarea biomarkerilor funcționali ai neuropatiei diabetice.....	5
3.2.2.1.4. Evaluarea biomarkerilor structurali ai neuropatiei diabetice.....	5
3.2.2.2. Designul și tipul studiului clinic.....	5
3.2.2.3 Prelucrarea statistică a datelor.....	5
3.3. REZULTATE	6
3.3.1. Studiul experimental	6
3.3.1.1. Parametrii caracteristici urmăriți.....	6
3.3.2. Studiul clinic	7
5. DISCUȚII ȘI CONCLUZII.....	8
6. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	9

1. INTRODUCERE

Tema prezentului studiu s-a desprins din cerințele practicii medicale în domeniul bolilor de nutriție și metabolice, având în vedere ponderea considerabilă a diabetului zaharat și a complicațiilor sale în patologie și a creșterii acesteia în următoarele decenii.

Complicația cea mai frecventă a bolii diabetice s-a dovedit a fi neuropatia (aproximativ 50% dintre pacienți cu diabet zaharat, dezvoltă pe parcursul afecțiunii, lezarea sistemului nervos periferic).

Aceasta este motivația eforturilor de cercetare pentru a elucidă aspecte ale fiziopatologiei neuropatiei diabetice, astfel din înțelegerea mecanismelor de producere conturând noi abordări în prevenirea acestei complicații și în tratarea ei, favorizând instalarea unui status benefic în viața diabeticului.

Schemele actuale terapeutice nu reușesc să asigure un control eficient al acestei complicații diabetice complexe, de aceea ne-am orientat studiul nostru asupra tratamentului, testând efectele administrării combinate a unor elemente cunoscute ca fiind benefice în terapia neuropatiei, dar nefiind evidențiate

eventualele potențări ale aplicării simultane a lor, aspect studiat de noi atât experimental cât și clinic.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În capitolul 2.1 am structurat 3 subcapitole: definirea, diagnosticarea și clasificarea neuropatiilor diabetice, aspecte epidemiologice și caracteristicile clinice. Toate aceste aspecte fiind susținute de bibliografia citată.

În capitolul 2.2 au fost etalate noțiuni clasice și recente despre procesele alterate la nivelul pericarionului și prelungirilor axonale, precum și afectarea semnalizării prin insulină, factorii de risc pentru neuropatia diabetică dureroasă și mecanisme de producere ale acesteia.

Capitolul 2.3 abordează terapia neuropatiei diabetice - terapie de primă linie (antidepresive triciclice și inhibitori selectivi ai recaptării serotoninei și noradrenalinei), terapie de linie secundară și cea de linia a 3-a.

3. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

3.1. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE

Obiectivul principal al acestei teze a fost de a evalua rolul neuroprotector al acidului thioctic și al complexului vitaminic B în neuropatia diabetică, administrate simultan.

Analizate în mod singular, fiecare dintre cele două terapii și-a probat capacitatea neuroprotectivă în neuropatia diabetică, așa cum se poate observa în diverse studii experimentale sau observaționale, însă până la ora actuală nu a fost analizat efectul utilizării concomitente a acestora. Prin urmare, ne-am propus în această lucrare să realizăm atât un studiu experimental, utilizând un model animal de neuropatie diabetică, cât și un studiu clinic, în care am examinat efectul utilizării concomitente a acidului thioctic (alfa lipoic) și al complexului vitaminic B în neuropatia diabetică, pentru a evidenția o eventuală potențare reciprocă a acestora.

Contribuția personală din această lucrare este reprezentată pe de o parte de studiul experimental pe un model animal de neuropatie diabetică, iar pe de altă parte de un studiu clinic, observațional-descriptiv, efectuat pe un lot reprezentativ de pacienți cu diabet zaharat.

Pentru concretizarea obiectivului principal prin studiul experimental, am avut în vedere sub coordonarea directă a mentorului și a membrilor comisiei de îndrumare, următoarele obiective secundare:

- crearea unei baze de date complete, cu toate modelele de neuropatie diabetică la animalele de experiență;
- alcătuirea unui lot de animale, la care se va induce diabetul zaharat și selecționarea unui lot control;
- extinderea cunoștințelor histopatologice și morfometrice, care intervin în patogenia neuropatiei diabetice și aprofundarea mecanismelor acesteia;
- identificarea unor noi biomarkeri pentru neuropatie la animalele de experiență, la care s-a indus diabetul zaharat;

- identificarea și definirea parametrilor morfologici care caracterizează sistemul nervos periferic, cu scopul realizării unor corelații cu patogenia neuropatiei diabetice;
- testarea efectului combinat al acidului alfa tioctic și al complexului vitaminic B în neuropatia diabetică;
- evaluarea electrofiziologică a animalelor incluse în studiu;
- evidențierea efectelor terapiilor testate prin ameliorarea sau modificarea nefavorabilă a parametrilor electrofiziologici urmăriți.

De asemenea, pentru realizarea obiectivului principal prin intermediul studiului clinic, sub coordonarea directă a mentorului și a membrilor comisiei de îndrumare, am avut în vedere următoarele obiective secundare:

- alcătuirea unei baze de date cu pacienți diagnosticați cu diabet zaharat care prezintă neuropatie diabetică;
- conturarea caracteristicilor clinice pentru pacienții incluși în studiu;
- alcătuirea unor loturi de pacienți care să fie tratați cu acid tioctic, fie complex vitaminic B, sau cu terapie combinată, dar și un lot control, care nu va fi supus acestor terapii;
- identificarea unor posibile ținte prognostice și terapeutice având în vedere alterările structurale și funcționale induse de diabetul zaharat și la nivelul sistemului nervos periferic.

3.2. METODOLOGIA CERCETĂRII

3.2.1. Abordarea temei

În acest subcapitol am expus abordarea asumată în procesul de investigație, în care am descris orientarea și justificarea teoretică a temei de cercetare aleasă.

3.2.2 Material și Metodă

3.2.2.1.1. Inducerea diabetului zaharat.

Studiul l-am efectuat în biobaza Universității de Medicină și Farmacie din Craiova. Am solicitat și am obținut avizul Comisiei de Etică și Deontologie Universitară și Științifică din cadrul UMF Craiova.

Pentru studiul neuropatiei diabetice am indus diabet zaharat la șoareci C57BL/6 prin injectarea intraperitoneală a unei doze de 150 mg/kg corp de streptozotocină (STZ).

3.2.2.1.2. Loturile experimentale.

Experimentele s-au efectuat pe 30 de șoareci C57BL/6, masculi și femele, cu vârsta cuprinsă între 8 și 10 săptămâni, cu o greutate cuprinsă între 21 și 28 grame.

Animalele au fost împărțite, aleator, în cinci loturi distincte, astfel:

1. Lotul Sham (prescurtat în continuare SHAM). La acest lot de animale s-a injectat doar NaCl 0,9%, fără a se injecta streptozotocină, deci fără a se produce diabet zaharat.
2. Lotul Control (prescurtat în continuare CONTROL). La acest lot de animale s-a injectat streptozotocină, 150 mg/kg greutate corporală,

intraperitoneal, o singură administrare, la 8-10 săptămâni de viață.
Lotului nu i s-a aplicat deloc terapie.

3. Lotul cu doza terapeutică de acid alfa tioctic (prescurtat în continuare A). La acest lot de animale, după inducerea diabetului zaharat s-a aplicat protocolul terapeutic prin administrarea intraperitoneală a 100 mg / kg greutate corporală de acid alfa tioctic.
4. Lotul cu doza terapeutică de complex vitaminic B (prescurtat în continuare B). La acest lot de animale, după inducerea diabetului zaharat s-a aplicat protocolul terapeutic prin administrarea intraperitoneală a unui complex vitaminic B, astfel: tiaminclorhidroclorid-B1 100 mg / kg greutate corporală și piridoxinhidroclorid-B6 50 mg / kg greutate corporală.
5. Lotul cu doza terapeutică de acid alfa tioctic și complex vitaminic B (prescurtat în continuare A+B). La acest loc de animale, după inducerea diabetului zaharat s-a aplicat protocolul terapeutic, atât prin administrarea intraperitoneală a acidului alfa tioctic dar și a complexului vitaminic B.

3.2.2.1.3. Evaluarea biomarkerilor funcționali ai neuropatiei diabetice.

Biomarkerii funcționali induși de neuropatia diabetică au fost analizați prin monitorizarea electrofiziologică, respectiv prin înregistrarea potențialului de acțiune motor compus (CMAP - compound motor action potential).

3.2.2.1.4. Evaluarea biomarkerilor structurali ai neuropatiei diabetice.

Pentru evaluarea biomarkerilor structurali ai neuropatiei diabetice am analizat, din punct de vedere histologic, nervul sciatic, atât la șoarecii cu diabet zaharat cât și la șoarecii fără această maladie.

3.2.2.2. Designul și tipul studiului clinic.

Un alt obiectiv al acestui studiu a fost de a evalua terapiile clasice, reprezentate de controlul glicemic adecvat și de schimbarea stilului de viață versus terapiile clasice combinate cu terapiile noi antioxidante în neuropatia diabetică.

În acest sens am realizat un studiu observațional, prospectiv, desfășurat între octombrie 2017 și decembrie 2019, în care am inclus 188 de pacienți cu neuropatie diabetică.

3.2.2.3 Prelucrarea statistică a datelor.

Pentru analiza datelor am folosit programul Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) și programul de analiză statistică Graph Pad Prism (versiunea 6 sau mai nouă, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Pentru a compara mediile diferitelor loturi studiate, după caz, am utilizat următoarele metode statistice: testul T student, testul ANOVA și coeficientul de corelație Pearson. În toate cazurile în care am calculat valoarea $P < 0.05$, am considerat că există o diferență statistic semnificativă între mediile comparate din diversele grupuri.

3.3. REZULTATE

(De precizat că numerotarea figurilor din rezumat corespunde numerotării figurilor din teză)

3.3.1. Studiul experimental

3.3.1.1. Parametrii caracteristici urmăriți

Valorile glicemice obținute înainte de administrarea streptozotocinei pentru inducerea diabetului zaharat, dar și în săptămânile ulterioare au fost redată grafic în Figura 3.3. Observăm că protocolul de inducere a diabetului zaharat, utilizat în studiul nostru, s-a caracterizat de creșterea marcată a nivelului plasmatic al glucozei în jur de aprox. 600 mg/dl, această valoare menținându-se la acest nivel pe întreg parcursul studiului nostru. În momentul includerii în studiu, animalele au prezentat următoarea greutate: grupul sham $23,53 \pm 1,16$ g, grupul control $25,35 \pm 2,35$ g, grupul tratat cu acid alfa tioctic $26,15 \pm 1,49$ g, grupul tratat cu complex vitaminic B $25,53 \pm 2,06$ g și grupul tratat atât cu acid alfa tioctic dar și cu complex vitaminic B $25,03 \pm 2,07$ g. Aceste date sunt redată în Figura 3.4.

Evoluția nivelurilor glucozei serice la șoarecii incluși în studiu

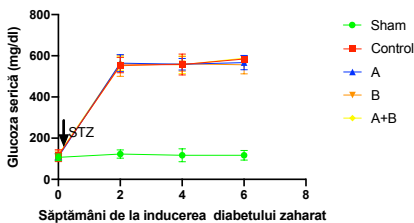


Figura 3.3 . Evoluția glicemiilor la șoarecii incluși în studiu în funcție de protocolul terapeutic administrat. Se observă niveluri glicemice constante la grupul sham, care nu a fost tratat prin administrarea de STZ și niveluri glicemice constante la celelalte grupuri la care s-a administrat STZ, cu menținerea glicemiei în jur de 600 mg /dl.

Greutatea inițială a animalelor incluse în studiu

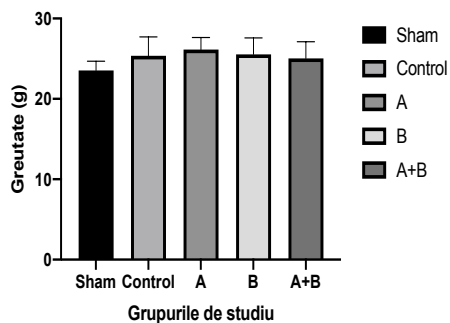


Figura 3.4. Greutatea inițială a animalelor incluse în studiu în funcție de diversele protocele terapeutice.

Din punct de vedere electrofiziologic, noi am analizat mai mulți parametri ai potențialului de acțiune motor compus (CMAP). Aceștia au fost:

- Amplitudinea CMAP (mV)
- Latența CMAP la debut (ms)
- Latența CMAP la vârf (ms)
- Aria CMAP (mVxms)
- Durata CMAP (ms)

Cu privire la amplitudinea CMAP am observat că la includerea în studiu a existat o variație a amplitudinii inițiale în absența administrării de STZ, existând variații între diferitele grupuri de animale, așa cum se poate vedea în Figura 3.8. Din acest motiv noi am analizat statistic variația procentuală a amplitudinii CMAP (Figura 3.9).

Amplitudinea CMAP la înrolarea animalelor în studiu

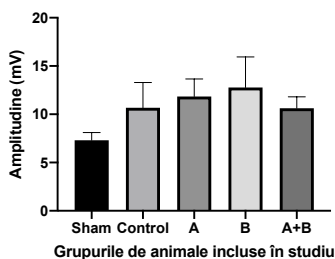


Figura 3.8. Amplitudinea CMAP la includerea animalelor în studiu. Se observă o variație între diferitele grupuri de animale.

Evoluția procentuală a amplitudinii CMAP în funcție de durata DZ

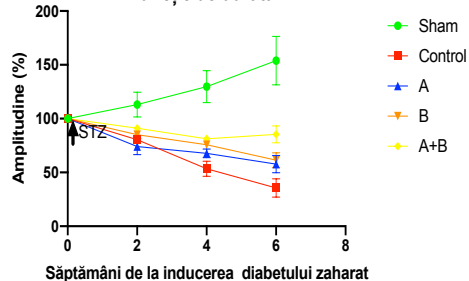


Figura 3.9. Evoluția comparativă a amplitudinii CMAP în funcție de durata diabetului zaharat.

Pentru a evidenția evoluția potențialului de acțiune motor compus (CMAP) la șoarecii fără diabet zaharat (grupul sham) sau în prezența diabetului zaharat (însă în absența oricărei terapii), am exemplificat în Figura 3.29 atât amplitudinea CMAP cât și electroneuromiografia la includerea în studiu și în săptămânile 2, 4 și 6 de la includere. Am analizat (Figura 3.40) imaginile microscopice și am constatat că în loturile de animale cu diabet zaharat a scăzut densitatea optică integrată a mielinei (control= 76 ± 38 , A= 93 ± 45 , B= 84 ± 37 , A+B= 103 ± 49), comparativ cu lotul de animale fără diabet (sham= 187 ± 49). De menționat că tratamentul cu acid alfa lipoic și/sau complex vitaminic B a încetinit acest proces.

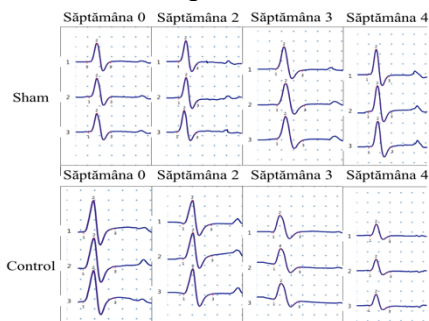


Figura 3.29. Evoluția CMAP la grupul sham (fără diabet zaharat) și la grupul control (cu diabet zaharat). Se evidențiază o scădere semnificativă a amplitudinii și o creștere a latenței în grupul cu diabet zaharat (control).

3.3.2. Studiul clinic

Scopul studiului nostru a fost de a evalua terapiile clasice reprezentate de controlul glicemic adecvat și de schimbarea stilului de viață versus terapiile clasice, combinate cu terapiile noi antioxidante în neuropatia diabetică.

În funcție de scorul MNSI la un an de la includerea în studiu, fiecare pacient a fost inclus în grupul „responders” dacă MNSI a scăzut sub 7 sau în grupul „non-responders” dacă MNSI nu a scăzut sub 7. În funcție de acest criteriu 34.04% (n=64) dintre pacienți au fost „responders” la terapia clasică, în timp ce 16.49% (n=31) dintre pacienți au fost „non-responderi” la terapie

Densitatea optică integrată a mielinei din structura nervului sciatic pentru animalele incluse în studiu

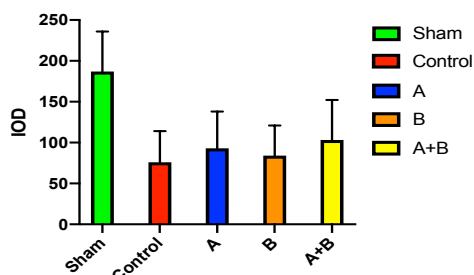


Figura 3.40.

clasică. Pe de altă parte, un număr mai mare de pacienți au fost „responders” la terapia combinată (n=73, 38.83%) și doar 21.51% (n=20) nu au fost „responders” la terapia combinată (p=0.101, OR=0.56, 95% CI 0.2967 - 1.106 și reciproca OR=1,76, 95% CI 0.9206 - 3.370). Aceste date sunt ilustrate în Figura 3.41.

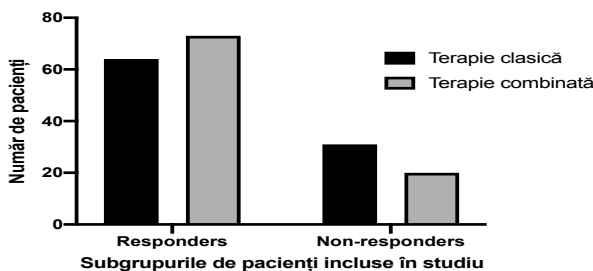


Figura 3.41. Distribuția cazurilor în funcție de terapie aplicată.

5. DISCUȚII ȘI CONCLUZII

În urma efectuării studiului experimental am concluzionat :

- 1) Protocolul de inducere a diabetului zaharat utilizat în studiul nostru s-a caracterizat de creșterea marcată a nivelului plasmatic al glucozei în jur de aprox. 600 mg/dl, această valoare menținându-se la același nivel pe întreg parcursul studiului nostru.
- 2) În toate loturile de animale la care s-a indus diabet zaharat, s-a produs o scădere marcată a greutateii corporale și acest lucru nu a fost influențat de niciun protocol terapeutic utilizat.
- 3) Din punct de vedere electrofiziologic, în absența diabetului zaharat, amplitudinea CMAP crește odată cu vârsta (la 6 săptămâni de la includerea în studiu înregistrându-se o creștere procentuală de aproximativ 50 %), în timp ce în prezența diabetului zaharat, amplitudinea CMAP scade considerabil (la lotul de control, la 6 săptămâni de la includerea în studiu înregistrându-se o scădere procentuală de aproximativ 40%). Tratatamentul cu acid alfa thioctic și complex vitaminic B a scăzut rata acestui proces la animalele cu diabet zaharat (o scădere de numai 10-20%).
- 4) Latența CMAP până la debutul răspunsului crește semnificativ în grupul de animale cu diabet zaharat (o creștere de aproximativ 0,6 ms la 6 săptămâni de la inducere), pentru care nu s-a aplicat niciun protocol terapeutic, în timp ce la grupurile de animale fără diabet zaharat (sham) sau cu diabet zaharat dar care au primit terapii cu acid thioctic și/sau complex -vitaminic B, s-a înregistrat o creștere mai puțin exprimată a acestui parametru la 6 săptămâni de la inducerea diabetului zaharat (aproximativ 0,2-0,3 ms).
- 5) Cu privire la durata CAMP, s-a constatat o creștere a acesteia la animalele fără diabet zaharat (în medie 0,8 ms), în timp ce la animalele cu diabet zaharat s-a înregistrat o scădere, scădere atenuată de protocoalele terapeutice cu acid thioctic și complex vitaminic B aplicate (0,4 ms comparativ cu 0,2 ms).

- 6) Între greutatea animalelor incluse în studiu și amplitudinea CMAP, se observă o corelație pozitivă între acești parametri, cu cât crește greutatea animalelor în aceeași măsură crește și amplitudinea CMAP ($R=0,8247$, intervalul de încredere 95% $0,6608-0,9136$, $P=0.0001$).
- 7) Din punct de vedere al analizei histopatologice am constatat că în loturile de animale cu diabet zaharat a scăzut densitatea optică integrată a mielinei (control= 76 ± 38 , A= 93 ± 45 , B= 84 ± 37 , A+B= 103 ± 49), comparativ cu lotul de animale fără diabet (sham= 187 ± 49).

În urma efectuării studiului clinic am concluzionat :

- 1) Există o creștere a răspunsului la terapia combinată după un an de tratament și aceasta a fost asociată cu durată mică a neuropatiei diabetice, tratamentul cu insulină, hemoglobina glicată scăzută, absența dislipidemiei sau a bolii cardiovasculare asociate. Astfel, terapia combinată reprezintă o alternativă pentru reducerea efectelor secundare și pentru creșterea eficienței.
- 2) Terapia combinată cu acid tioctic și complexul vitaminic B are efect mai mare de stopare a degenerării axonale în neuropatia diabetică față de terapia numai cu acid tioctic sau numai cu complex vitaminic B.

Drept concluzie finală putem afirma că terapia combinată cu acid tioctic și complex vitaminic B reprezintă o variantă eficientă, fără riscuri semnificative, care poate fi utilizată în practica medicală curentă. Astfel, obiectivul principal al studiului a fost îndeplinit, și prin atingerea obiectivelor secundare care au concurat la acesta. Aspectele abordate în studiul nostru au un semnificativ caracter de originalitate, cu aplicabilitate în practica medicală de profil.

6. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1]. Iqbal Z, Azmi S, Yadav R, Ferdousi M, Kumar M, Cuthbertson DJ, Lim J, Malik RA, Alam U. Diabetic Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy. *Clin Ther.* 2018 Jun; 40(6):828-849.
- [2]. Dewanjee S, Das S, Das AK, Bhattacharjee N, Dihingia A, Dua TK, Kalita J, Manna P. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. *Eur J Pharmacol.* 2018 Aug 15;833:472-523.
- [3]. Boulton AJM, Vileikyte L. Painful Diabetic Neuropathy in Clinical Practice. Springer-Verlag London Limited, 2011, 1-81.
- [4]. Consensus statement: Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. American Diabetes Association American Academy of Neurology. *Diabetes Care.* 1988 Jul-Aug; 11(7):592-597.
- [5]. Boulton AJM, Gries FA, Jervell JA. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabet Med.* 1998; 15: 508-514.
- [6]. Said G. Neuropathies diabétiques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Neurologie, 17-109-A-10, 2009.
- [7]. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Sosenko JM, Ziegler D. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2017 Jan;40(1):136-154.
- [8]. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2017, 1-48.
- [9]. Thibault V, Belanger M, LeBlanc E, et al. Factors that could explain the increasing prevalence of type 2 diabetes among adults in a Canadian province: a critical review and analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 2016; 8:71.
- [10]. Young MJ, Boulton AJ, MacLeod AF, et al. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia.* 1993; 36:150-154.
- [11]. Albers JW, Pop-Busui R. Diabetic neuropathy: mechanisms, emerging treatments, and subtypes. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014; 14:473.