

**UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA  
ȘCOALA DOCTORALĂ BIOLOGIE INTEGRATIVĂ  
ȘCOALA DOCTORALĂ FIZICĂ**



**METODE BIOFIZICE ȘI CITOLOGICE DE  
*SCREENING* ÎN STĂRI FIZIOLOGICE ȘI  
PATOLOGICE**

**DOCTORAND:**

**ȘTEFAN-CLAUDIU MIRESCU**

***REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

**ÎNDRUMĂTORI ȘTIINȚIFICI:**

**PROF. UNIV. DR. CORNELIU TARBA**

**PROF. UNIV. DR. LEONTIN DAVID**

**CLUJ-NAPOCA**

**2017**

# CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

## LISTĂ DE ABREVIERI

### Mulțumiri

#### Partea I – Considerații teoretice

- I.1. Sistemul excitoconductor cardiac
- I.2. Electrocardiograma
- I.3. Variabilitatea frecvenței cardiace
- I.4. Diabetul zaharat și complicațiile sale neuropatice
- I.5. Fumatul
- I.6. Citologia orală în diabetul zaharat

#### Partea a II-a – Contribuții personale

- II.1. Introducere
- II.2. Studii privind variabilitatea frecvenței cardiace
  - II.2.1. Comparatie între electrocardiogramă și fotoplețismogramă ca metode pentru înregistrarea intervalelor folosite pentru analiza variabilității frecvenței cardiace
  - II.2.2. Studiul parametrilor nonlineari de variabilitate a frecvenței cardiace pe un lot de pacienți cu infarct miocardic acut recent
  - II.2.3. Provocări privind măsurarea variabilității frecvenței cardiace în cabinetul medicului de familie
  - II.2.4. Efectele acute ale fumatului de țigară convențională asupra echilibrului simpato-vagal, măsurate prin intermediul variabilității frecvenței cardiace
  - II.2.5. Efectele acute ale fumatului de țigară electronică asupra echilibrului simpato-vagal, măsurate prin intermediul variabilității frecvenței cardiace
  - II.2.6. Variabilitatea frecvenței cardiace la diabetici: reprezentări grafice și descriptori statistici
- II.3. Valoarea citologiei orale în diagnosticul modificărilor mucoasei bucale în diabetul zaharat

## DISCUȚII FINALE

## CONCLUZII FINALE

## INDEXUL IMAGINILOR

## BIBLIOGRAFIE

**Cuvinte cheie:** metode de *screening*, variabilitatea frecvenței cardiace, citologie orală, fumat, diabet zaharat, infarct miocardic acut.

## LISTĂ DE ABREVIERI

2D-PPG	Derivata a doua a fotopletismogramei
ADC	Convertor analogic-digital
ApEn	Entropia aproximativă
APT-Drăgan	Colorația albastru policrom tanin Drăgan
ASR	Aritmia sinusală respiratorie
CorDen	Dimensiunea corelației
DF $\alpha 1$	<i>Detrended fluctuations <math>\alpha 1</math></i>
DF $\alpha 2$	<i>Detrended fluctuations <math>\alpha 2</math></i>
DZ	Diabet zaharat
ECG	Electrocardiogramă
FiA	Fibrilație atrială
HE	Colorația hematoxilină-eozină
HF	Puterea spectrală la frecvență înaltă
IDE	<i>Integrated development environment</i>
IMA	Infarct miocardic acut
Index SDNN	Media deviațiilor standard ale mediilor intervalelor în segmente de 5 minute
LF	Puterea spectrală la frecvență scăzută
LF/HF	Raportul puterilor spectrale
Media HR	Media frecvențelor bătăilor cardiace momentane
Media NN (RR)	Media tuturor intervalelor dintre bătăile cardiace succesive
NDA	Neuropatie diabetică autonomă
NN50	Numărul de bătăi cardiace succesive între care există o diferență mai mare de 50 ms
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
pNN50	Procentul de bătăi cardiace succesive între care există o diferență mai mare de 50 ms
PPG	Fotopletismogramă
RMSSD	Rădăcina pătrată a mediei de suma pătratelor diferențelor dintre intervale adiacente
SampEn	Entropia eşantionului
SD 1	Deviația standard 1 a diagramei Poincaré
SD 2	Deviația standard 2 a diagramei Poincaré
SDANN	Deviația standard a mediilor intervalelor calculate pe toate segmentele de câte 5 minute din întreaga înregistrare
SDHR	Deviația standard a bătăilor cardiace succesive
SDNN (SDRR)	Deviația standard a tuturor intervalelor dintre bătăile cardiace succesive
SEC	Sistemul excitoconductor nodal al inimii
VFC	Variabilitatea frecvenței cardiace
(HRV	<i>Heart Rate Variability</i> )

## Mulțumiri

Mulțumirile mele deosebite se îndreaptă către îndrumătorii mei, Prof. univ. dr. Corneliu Tarba (Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea *Babeș-Bolyai* Cluj-Napoca) și Prof. univ. dr. Leontin David (Facultatea de Fizică, Universitatea *Babeș-Bolyai* Cluj-Napoca) pentru coordonarea oferită în cursul studiilor mele doctorale.

Întreaga mea gratitudine d-nei Conf. univ. dr. Corina-Luminița Roșioru (Departamentul de Biologie Moleculară și Biotehnologie, Universitatea *Babeș-Bolyai* Cluj-Napoca), pentru ajutorul inegalabil oferit pe parcursul ultimilor 11 ani, încă dinainte de intrarea pe băncile facultății. Sprijinul dânzei a stimulat și a făcut posibilă preocuparea mea atât pentru cercetare, cât și pentru activitatea didactică, ocupații pe care le consider dintre cele mai împlinitoare. Sfaturile constructive primite din partea dânzei m-au ajutat mereu să mă autodepășesc în toate domeniile academice și să finalizez prezenta lucrare.

Îi mulțumesc d-nei Conf. univ. dr. Alina Șovrea (Catedra de Histologie, Departamentul de Științe Morfologice, Universitatea de Medicină și Farmacie *Iuliu Hațieganu*, Cluj-Napoca) pentru sprijinul oferit în cadrul studiilor de citologie și pentru îndrumarea deosebită în ceea ce privește redactarea de articole științifice.

Mulțumesc colegilor și îndrumătorilor mei de la secțiile de Anatomie Patologică ale spitalelor în care mi-am efectuat stagiile de rezidențiat (Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj, Spitalul Municipal Cluj, Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii Cluj, Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie *Octavian Fodor* Cluj-Napoca, Institutul Oncologic *Nicolae Chiricuță* Cluj-Napoca) pentru sprijinul și îndrumarea oferite pe parcursul ultimilor ani.

Deosebita mea recunoștință colegilor din Colectivul de Fiziologie Animală al Facultății de Biologie și Geologie: Șef lucr. dr. Camelia Lang, drd. Camelia Munteanu și bibliotecar Bianca Moldovan.

Le mulțumesc studenților mei, de la care am avut mereu de învățat. De asemenea, mulțumiri nenumărate se îndreaptă înspre toți pacienții și voluntarii care au făcut posibilă realizarea studiilor de față.

Le mulțumesc familiei, prietenilor și tuturor celor care au crezut în mine și față de care îmi exprim nemăsurata recunoștință.

## Studii privind variabilitatea frecvenței cardiace

### Comparație între electrocardiogramă și fotopletismogramă ca metode pentru înregistrarea intervalelor folosite pentru analiza variabilității frecvenței cardiace

#### Introducere

Teoretic, orice metodă care permite înregistrarea intervalelor dintre bătăile cardiace succesive (în milisecunde) este potrivită pentru studii de variabilitate a frecvenței cardiace (VFC). Practic însă, fiecare dintre aceste metode prezintă avantaje și dezavantaje, atât pentru examinator, cât și pentru subiectul evaluat.

**Scopul studiului** a fost acela de a compara parametrii VFC obținuți prin cele două metode, pe înregistrări electrocardiografice și fotopletismografice simultane.

#### Materiale și metode

Fiind un studiu pilot, acesta a inclus un număr de 10 participanți cu vârsta de 22-25 ani (6 de sex feminin). Pentru înregistrarea semnalelor, s-au folosit două dispozitive:

- Un fotopletismograf analogic pe bază de lumină în spectrul infraroșu;
- Un electrocardiograf monoderivație (D I) care are la bază un amplificator operațional de tip AD620 și un filtru *low-pass* de 30 Hz.

Ambele dispozitive au fost conectate simultan la intrarea de microfon a plăcii de sunet a unui calculator personal, care a funcționat pe post de convertor analogic-digital (ADC). Conectarea a fost făcută prin intermediul unei mufe jack duble, fiecare dispozitiv fiind conectat la un canal al intrării analogice.

Dispozitivele de înregistrare au fost pornite simultan, pentru un interval de 10 minute, iar traseele de pe cele două canale (fotopletismografic, respectiv electrocardiografic) au fost interpretate separat.

#### Rezultate

Cea mai mare dificultate tehnică întâmpinată a fost prezența artefactelor la unele dintre înregistrările fotopletismografice. Acestea au fost datorate mișcărilor voluntare sau involuntare ale subiecților, determinând inflexiuni aberante pe traseul fotopletismografic, de amplitudine mult mai mare decât restul traseului, care depășesc pragul de detectare a bătăilor cardiace, interferând cu detectarea corectă a acestora.

Atunci când există un număr redus de artefacte (datorate bătăilor cardiace ectopice sau mișcării subiectului), acestea pot fi înlăturate, fără ca valorile parametrilor să aibă de suferit, însă în unele situații, bătăile artefactuate au depășit numeric 50% din bătăile normale,

astfel încât înregistrările respective nu au putut fi luate în considerare (situația a 5 dintre pacienții înscriși în studiu).

Artefactele pot fi recunoscute vizual după două criterii:

1. Aspectul triunghiular al diagramei Poincaré, cu unele puncte coliniare cu punctul de origine;
2. aspectul haotic al tachogramei, cu identificarea traseului normal, dar cu numeroase devieri pozitive sau negative de la acesta.

În consecință, măsurătorile au trebuit repetate până la dispariția completă a acestora.

*Compararea parametrilor matematici (descriptori statistici) obținuți prin cele două metode*

S-au luat în considerare parametri din toate cele trei categorii (metode de timp, de frecvență și diagrama Poincaré). Calcularea acestora s-a efectuat cu software-ul *Kubios HRV Analysis*. Toți parametrii au avut o corelație aproape perfectă, cu un indice  $R^2$  de peste 0,95, semnificând faptul că metodele sunt echivalente în scopul obținerii intervalelor RR utilizate în analiza VFC.

Rezultatele demonstrează faptul că PPG poate servi ca o alternativă pentru ECG în evaluarea variabilității frecvenței cardiace. Toate categoriile de parametri au prezentat similarități majore între cele două metode, acestea fiind confirmate și de testarea statistică. Prin urmare, concluzionăm că PPG poate fi un instrument de precizie în evaluarea matematică și geometrică a VFC. Cu toate acestea, este necesar un management riguros al artefactelor, și evitarea acestora pe cât posibil, ceea ce poate crea un disconfort semnificativ atât examinatorului, cât și pacientului (acesta nu trebuie să miște deloc mâna, respectiv capul).

## Studiul parametrilor nonlineari de variabilitate a frecvenței cardiace pe un lot de pacienți cu infarct miocardic acut recent

**Dispozitivul de înregistrare** folosit a fost construit de autorul acestei teze, având ca nucleu un amplificator operațional, cu caracteristici de amplificare și filtrare calculate conform necesității de a obține un semnal ECG cât mai pur, neparazitat de influențe musculare.

**Înregistrările** de semnal ECG în scopul calculării parametrilor VFC au fost obținute în derivația DI, cu ajutorul unor electrozi conectați la încheieturile celor două mâini. Electrocul indiferent a fost conectat la glezna piciorului drept. Pentru fiecare subiect, înregistrarea a avut o durată de 7 minute, în clinostatism, timp în care acesta a fost rugat să nu vorbească și să nu se miște.

### Rezultate

Pacienții cu IMA au avut o frecvență cardiacă medie mai scăzută decât subiecții din lotul de control ( $p = 0,002$ ). Acest lucru poate fi datorat tratamentului cu medicamente beta-blocante instituit obligatoriu la acești pacienți, în scopul scăderii tensiunii arteriale și a împiedicării remodelării miocardice post-IMA. De asemenea, s-a constatat o scădere a SDRR la pacienții cu IMA, comparativ cu lotul de control ( $p = 0,001$ ). Această scădere se datorează, pe de o parte, istoricului patologic, și pe de altă parte tratamentului cu beta-blocante instituit la pacienți.

Analiza parametrilor entropici (noutatea acestui studiu) a dezvăluit informații interesante referitoare la complexitatea ritmului cardiac la bolnavii cu IMA. Astfel, majoritatea parametrilor (ApEn, SampEn, DF  $\alpha 1$ , CorDen) au avut valori mai scăzute la pacienții cu IMA, diferențele fiind semnificative statistic doar în cazul CorDen ( $p = 0,001$ ). Acest lucru semnifică faptul că la acești pacienți complexitatea ritmului cardiac este mai scăzută, deci o alternanță simpato-vagală mai dezechilibrată față de lotul de control. Singurul parametru care a avut o valoare mai mare la lotul IMA a fost DF  $\alpha 2$  ( $p = 0,003$ ), semnificația acestei diferențe nefiind cunoscută.

Dintre toți acești parametri, singurul care s-a corelat cu SDRR conform testului regresiei a fost CorDen, cu un  $R^2$  de 0,824. Acest lucru este concordant cu rezultatele obținute în cadrul aceluiași studiu la diabetici și la subiecți sănătoși, unde s-a concluzionat, de asemenea, că parametrul CorDen este singurul care se corelează, într-o oarecare măsură, cu SDRR (considerat standardul de aur în aprecierea variabilității ritmului cardiac).

Având în vedere faptul că analiza parametrilor entropici a constituit o noutate a acestui studiu, ne-am propus să evaluăm corelația acestora cu parametrii consacrați de



evaluare globală a VFC, dintre care cel mai relevant este considerat SDRR (deviația standard a intervalelor RR succesive). Corelația a fost evaluată prin testul regresiei. Astfel, s-a constatat faptul că, dintre toți parametrii entropici, doar Dimensiunea corelației (CorDen) a prezentat o bună corelare cu SDRR, relația dintre cele două fiind lineară. Această categorie de parametri necesită studii suplimentare, pe loturi mai mari de subiecți, în condițiile unor patologii diverse.

## **Provocări privind măsurarea variabilității frecvenței cardiace în cabinetul medicului de familie**

Un cabinet de medicină de familie reprezintă locul în care se prezintă atât pacienți cu cele mai variate patologii, cât și oameni sănătoși, în scop de *screening* sau pentru obținerea unor diverse acte medicale (de exemplu, adeverințe care certifică starea de sănătate și lipsa unor boli cronice). De aceea, am considerat că un astfel de cabinet este un bun început pentru testarea fiabilității implementării VFC de rutină. Diversitatea patologiilor a permis aprecierea utilității testării VFC în condiții reale, de cabinet medical (într-un ritm de lucru alert, sub presiunea rezolvării unui număr cât mai mare de cazuri și a respectării programărilor), nu doar în condiții de laborator.

### **Materiale și metode**

Pentru obținerea semnalului utilizat pentru calcularea parametrilor VFC, s-a folosit un sistem de detecție a bătailor cardiace pe bază fotopletismografică. Un studiu efectuat în 2012 (Mirescu și Harden, 2012), dar și o serie de alte studii (Assad și colab., 2012; Medeiros, 2010; Combatalade, 2010; Chevalier și colab., 2011; Elgedi și colab., 2011) atestă posibilitatea folosirii fotopletismogramei (PPG) pentru VFC, cu câteva condiții:

- Excluderea pacienților cu tremur al extremităților, indiferent de cauză;
- Subiectul să nu se miște;
- Asigurarea etanșeității senzorului pe tegument.

Nu s-au constatat diferențe semnificative statistic între parametrii obținuți din cele două semnale (PPG și ECG), atestând echivalența celor două în utilitatea pentru calculul variabilității frecvenței cardiace.

Semnalul obținut se prelucrează după același algoritm ca semnalul ECG, în scopul calculării parametrilor VFC, detectarea vârfurilor făcându-se automat.

Studiul a fost efectuat luând în considerare 70 de pacienți voluntari care s-au prezentat la cabinetul medicului de familie în perioada octombrie 2013 - februarie 2014 (39 femei, 31 bărbați; vârsta 19 – 70 ani). Dintre aceștia, 31 de adresanți nu erau în evidență cu boli cronice sau antecedente semnificative, prin urmare au fost incluși în lotul martor, pe baza căruia s-au stabilit valorile normale ale unora dintre parametri VFC.

### **Rezultate și discuții**

Înregistrările de la restul de 65 de pacienți au putut fi folosite pentru calculul parametrilor VFC și reprezentarea grafică a acestora.

Înregistrările efectuate asupra pacienților sănătoși au permis calcularea unor valori normale ale parametrilor VFC urmăriți.

În general, aceste valori concordă cu cele din literatura internațională (Malik, 1996; Singh și colab., 1998; Taelman, 2008; Tsai și colab., 2014) și cu date culese în cazul unui studiu pe o populație românească (Țibre, 2007). Mai mult, acestea sunt valorile care au fost considerate normale în studiile ulterioare.

### **VFC și hipertensiunea arterială**

După eliminarea pacienților cu multiple comorbidități, au rămas 16 pacienți înregistrați cu diagnosticul unic de hipertensiune arterială (HTA). Aceștia au avut vârsta cuprinsă între 40 și 71 de ani și HTA grad II.

Este foarte dificil de făcut distincția între modificările VFC date de hipertensiunea arterială și cele date de tratamentul antihipertensiv, având în vedere că toți pacienții cu HTA aveau instituit tratamentul cu beta-blocante, care afectează semnificativ echilibrul simpato-vagal, având acțiune simpaticolitică. În cadrul studiului, nu s-au identificat subiecți nou-depistați cu HTA, care să nu beneficieze încă de terapie.

Conform literaturii, HTA afectează echilibrul simpato-vagal și viceversa (Karim și colab., 2006; Singh și colab., 1998) contribuind la constituirea unui cerc vicios de natură să întrețină mecanismul fiziopatologic și să faciliteze apariția complicațiilor.

## **Efectele acute ale fumatului de țigară convențională asupra echilibrului simpato-vagal, măsurate prin intermediul variabilității frecvenței cardiace**

**Prezentul studiu a avut ca obiectiv** evaluarea efectelor acute ale fumatului de țigări asupra echilibrului simpato-vagal.

### **Materiale și metode**

Au fost incluși în studiu 25 de voluntari sănătoși, fumători habituali de peste 3 ani, cu vârsta cuprinsă între 20 și 22 de ani (15 de sex feminin). Pentru înregistrarea traseului ECG s-a folosit dispozitivul Neurosoft Poly-Spectrum-8, utilizând doar electrozii membrelor (deci, în total, 6 derivații: DI, DII, DIII, aVL, aVR și aVF).

Subiecții au fost rugați să nu fumeze cu cel puțin 4 ore înainte de experiment și, de asemenea, să nu consume substanțe psihostimulante de genul cafeinei (cu proveniența din cafea sau din băuturi energizante, foarte consumate în rândul tinerilor de vârsta celor participanți la studiu).

Fiecărui subiect i s-a efectuat o electrocardiogramă clasică (pe 10 secunde), pentru eliminarea unei posibile patologii cardiace care ar fi putut interfera cu determinările de variabilitate.

### **Rezultate**

Toți subiecții au prezentat electrocardiograma în parametri normali, nedecelându-se modificări patologice (atât ritmologic, toți subiecții prezentând ritm sinusal, cât și morfologic).

*Parametrii de timp.* Primul lucru care s-a observat a fost faptul că, în timpul fumatului, s-a constatat o creștere a frecvenței cardiace, lucru resimțit și subiectiv de către subiecți, diferențele fiind semnificative din punct de vedere statistic ( $p < 0,001$ ). În perioada imediat următoare, frecvența cardiacă a început să scadă, continuând procesul de scădere în ultimul interval de 5 minute ( $p < 0,001$ ).

Deviația standard a intervalelor RR (SDRR) este considerată un descriptor independent al VFC. În cele 5 minute cât timp au fumat, s-a constatat o scădere a SDRR, semnalizând o scădere globală a VFC sub acțiunea substanțelor inhalate din fumul de țigară. Această scădere a continuat și în următorul interval de 5 minute, valoarea crescând în al doilea interval, fără a ajunge la valoarea inițială până la sfârșitul măsurătorii. Diferențele nu sunt semnificative statistic.

Un alt descriptor independent al VFC este pNN50, procentul de bătăi cardiace succesive între care există un interval de cel puțin 50 ms, din toate bătăile cardiace

înregistrate pe întregul traseu. Așa cum era de așteptat (datorită corelației puternice dintre pNN50 și SDRR), acest parametru a scăzut semnificativ în timpul fumatului ( $p < 0,001$ ), continuă să scadă în intervalul următor de 5 minute, apoi începând apoi să crească în timpul celui de-al doilea interval.

*Parametrii de frecvență* nu au fost considerați relevanți în acest studiu, din cauza deviației standard foarte mare a fiecărui lot. Însă, în ciuda acestui aspect, s-a constatat că în timpul fumatului raportul LF/HF a crescut, această creștere continuând în intervalul de 5 minute după, raportul prezentând tendința de scădere în timpul celui de-al doilea.

Conform unei părți a literaturii, această creștere a raportului ar putea fi relevantă pentru creșterea tonusului simpatic, ceea ce este în concordanță cu creșterea frecvenței cardiace. Cu toate acestea, există studii care, pe baze matematice, infirmă corelația dintre creșterea raportului LF/HF și creșterea tonusului simpatic. În concluzie, autorul se rezumă la a considera creșterea acestui raport relevantă doar pentru scăderea globală a variabilității.

*Parametrii nonlineari.* Cele mai evidente modificări din punct de vedere vizual au fost cele ale parametrilor nonlineari. Pentru fiecare din cele 4 trasee ale fiecărui subiect s-a efectuat diagrama Poincaré și s-au calculat parametrii SD1 și SD2.

### **Discuții**

Studiul de față atrage atenția asupra unor modificări acute induse de fumat și determinate noninvaziv prin intermediul parametrilor VFC. Am demonstrat existența unei alterări semnificative a echilibrului simpato-vagal, care are loc în timpul fumatului și care persistă pentru cel puțin 5 minute după fumat.

Deși efectele cronice ale fumatului asupra organismului sunt cunoscute și pe deplin înțelese, studiul răspunde la nevoia înțelegerii afectelor acute ale acestei deprinderi.

## **Efectele acute ale fumatului de țigară electronică asupra echilibrului simpato-vagal, măsurate prin intermediul variabilității frecvenței cardiace**

**Scopul studiului** a fost evaluarea efectelor acute ale fumatului de țigară electronică asupra balanței simpato-vagale.

### **Materiale și metode**

Au fost incluși în studiu 15 voluntari sănătoși, fumători habituali de peste 3 ani, cu vârsta cuprinsă între 20 și 22 de ani (8 de sex feminin). Pentru înregistrarea traseului ECG s-a folosit dispozitivul Neurosoft Poly-Spectrum-8, utilizând doar electrozii membrelor (deci, în total, 6 derivații: DI, DII, DIII, aVL, aVR și aVF).

Catacteristicile țigării electronice Vapez<sup>®</sup> au fost:

- Baterie de 1000 mAh;
- Atomizor cu rezistență Clearomizor 2,1±0,2 Ω;
- Soluție de nicotină Liqua 10 ml Berry Mix, cu o concentrație de nicotină de 24 mg/ml.

### **Rezultate**

Toți subiecții incluși în studiu au prezentat ritm sinusal, fără a se decela anomalii ale electrocardiogramelor.

*Parametrii de timp* au exprimat variații discordante, cel puțin în comparație cu valorile obținute în cazul fumătorilor de țigări convenționale. Frecvența cardiacă medie a crescut în intervalul de 5 minute în care subiecții au fumat ( $p < 0.05$ ), continuând să crească în primul interval de 5 minute după fumat, cu tendință de revenire spre valoarea inițială până la sfârșitul celui de-al treilea interval, modificările fiind în concordanță cu cele suferite de media intervalelor RR.

Pe de altă parte, deviația standard a intervalelor RR (SDRR), în concordanță cu deviația standard a frecvenței cardiace (SDHR), considerați descriptori independenți ai variabilității, a crescut în intervalul aferent fumatului, semnificând o creștere globală a variabilității frecvenței cardiace, deci o echilibrare a balanței simpato-vagal ( $p < 0.05$ ). Această modificare este opusă față de cea constatată la același parametru în cazul fumatului de țigări convenționale.

După intervalul aferent fumatului, SDRR și SD HR au scăzut, ajungând la valoarea inițială și continuând scăderea, până la sfârșitul traseului înregistrat. Practic, pe baza acestui parametru, se poate spune că variabilitatea frecvenței cardiace a înregistrat, în mod

contraintuitiv, o creștere în timpul inhalării soluției de nicotină, scăzând apoi chiar sub valoarea inițială.

Aceste rezultate sunt sprijinite și de variația pNN50, care a prezentat o creștere cu aproximativ 20% din valoarea inițială în timpul fumatului, scăzând apoi până la jumătate din valoarea inițială și rămânând constantă până la sfârșitul măsurătorii.

*Parametrii nonlineari* au arătat o creștere a raportului LF/HF care a atins maximum în primul interval de 5 minute după fumat (dublându-se față de valoarea inițială,  $p = 0,02$ ), apoi scăzând în următoarele două intervale, dar fără a reveni la valoarea inițială. Conform unei părți a literaturii (aceea care consideră că raportul LF/HF este relevant pentru evaluarea echilibrului simpato-vagal) (Gondim, 2015; Karakaya, 2007; Middlekauff, 2014), se poate spune că fumatul de țigară electronică are tendința de a crește activarea tonusului simpatic .

Deși nu se observă modificări vizuale ale diagramei Poincaré, descriptorii statistici ai acesteia prezintă variații, dintre care unele sunt semnificative.

În ceea ce privește SD1, acesta crește în timpul fumatului ( $p > 0,05$ ), scăzând sub valoarea inițială pe tot parcursul celor 3 intervale post-fumat ( $p < 0,05$  la compararea valorilor din lotul *Înainte* și *Fumat* cu cele corespunzătoare loturilor *După 1*, *După 2* și *După 3*). Același tipar de variație se constată și în cazul parametrului SD2.

Din compilarea datelor obținute mai sus, se poate concluziona că, pe lotul studiat, variabilitatea frecvenței cardiace a crescut în timpul fumatului de țigară electronică, scăzând semnificativ pentru cel puțin 15 minute după aceea (până la finalul perioadei măsurate).

## **Variabilitatea frecvenței cardiace la diabetici: reprezentări grafice și descriptori statistici**

Studiul a fost efectuat pe un lot de 25 de subiecți diabetici (22 – 70 ani, 12 de sex feminin), internați în Secția Clinică Diabet și Boli Metabolice a Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj, în perioada 01.09.2016 – 21.12.2016. Au fost selectați acei pacienți care nu prezentau tulburări de ritm sau alte anomalii electrocardiografice care ar fi putut interfera cu analiza de ritm cardiac. Dintre pacienți, 12 au prezentat diabet zaharat tip I, cu o vechime de 8 – 16 ani, iar 13 au prezentat diabet zaharat de tip II, cu o vechime de 10 – 22 ani. Șase pacienți prezentau complicații neuropatice documentate.

Pentru stabilirea valorilor de referință, s-au luat în considerare 50 de subiecți sănătoși (22 – 57 ani, 23 de sex feminin), aflați în evidența unui cabinet individual de Medicină de Familie din Cluj-Napoca. Aceștia s-au prezentat la medicul de familie pentru investigații *screening* sau în scopul obținerii unor dovezi (adeverințe) ale stării de sănătate.

### **Rezultate și discuții**

Una dintre cele mai valoroase modalități de interpretare vizuală a VFC este tachograma. Aceasta permite o apreciere comparativă rapidă a variabilității pentru două intervale. Din compararea vizuală a tachogramei unui subiect sănătos cu tachograma unui bolnav de diabet, se observă faptul că acesta din urmă prezintă o variabilitate a ritmului cardiac mult mai scăzută decât subiectul sănătos.

Media intervalelor RR și frecvența cardiacă medie au fost asemănătoare la cele două loturi studiate, fără diferențe semnificative statistic ( $p = 0,5$ , respectiv  $p = 0,45$ ). Deviația standard a intervalelor RR (SDRR) a fost însă mult mai mică la pacienții diabetici decât la subiecții sănătoși ( $p < 0,001$ ), semnificând o variabilitate a ritmului cardiac mult mai scăzută în cazul diabeticilor. NN50 și pNN50 au prezentat, de asemenea, valori semnificativ mai scăzute la diabetici comparativ cu subiecții sănătoși ( $p = 0,04$ , respectiv  $p = 0,01$ ). Cu toate acestea, în studiul de față a existat o mare variabilitate interindividuală a acestor parametri, concretizându-se în valori mari ale deviației standard, ceea ce scade relevanța folosirii acestor parametri pentru compararea variabilității celor două loturi.



**Parametri nonlineari.** Un alt descriptor vizual valoros al VFC este diagrama Poincaré (bineînțeles, doar atunci când există o altă diagramă de control). Aceasta oferă informații rapide, în funcție de suprafața descrisă de dispersia punctelor pe grafic. În cazul subiecților diabetici, această arie este mult mai scăzută față de cea descrisă la un subiect sănătos, trădând o variabilitate scăzută. Acest lucru, împreună cu aspectul tachogramei, constituie instrumente vizuale valoroase în aprecierea variabilității.

Noutatea acestui studiu a fost interpretarea parametrilor entropici ai VFC, care corespund complexității semnalului, valorile acestora fiind cel puțin surprinzătoare. Astfel, s-a constatat că ApEn ( $p > 0,05$ ), SampEn ( $p > 0,05$ ) și DFA  $\alpha 2$  ( $p < 0,01$ ) au prezentat valori mai mari la subiecții diabetici. Acest lucru vine în contradicție cu variabilitatea scăzută înregistrată prin toți ceilalți parametri, din toate cele trei categorii. Practic, din acești trei parametri (dintre care unul cu modificări semnificative statistice), rezultă că semnalul prezintă o complexitate mai mare la diabetici, în condițiile în care variabilitatea este mai scăzută. Bibliografia a confirmat existența unor studii care au atestat această discrepanță, sugerând faptul că acești parametri pot revela date inaccesibile prin parametrii clasici ai VFC (Weippert, 2014). Conform acestora, predominanța simpatică determină o creștere a entropiei și complexității ritmului cardiac, chiar dacă variabilitatea frecvenței cardiace scade (Weippert, 2014).

Ceilalți doi parametri entropici, CorDen și DFA  $\alpha 1$  au prezentat scăderi ale valorilor medii la diabetici, comparativ cu subiecții sănătoși ( $p < 0,01$  pentru CorDen,  $p = 0,83$  pentru DFA  $\alpha 1$ ).

Pentru stabilirea unei posibile corelații între parametrii globali ai VFC și parametrii entropici, s-a efectuat analiza regresiei lineare între SDRR (considerat de majoritatea autorilor drept un descriptor global relevant al VFC) și cei cinci parametri statistici luați în considerare, rezultatele fiind exprimate sub forma coeficientului de corelație  $R^2$ .

## **Valoarea citologiei orale în diagnosticul modificărilor mucoasei bucale în diabetul zaharat**

### **Scopurile studiului au fost:**

- Evaluarea alterărilor morfologice ale celulelor exfoliate scuamoase orale prin trei tehnici diferite de colorare: Papanicolaou, APT (eng. *polychrome tannin blue*)-Drăgan și Hematoxină-Eozină (HE);
- Compararea fiabilității celor trei metode de colorare și stabilirea elementelor specifice care pot fi evidențiate cu ajutorul fiecăreia dintre metode;
- Corelarea modificărilor observate cu tipul de DZ (tip I sau tip II) și cu durata bolii;
- Stabilirea unor modificări ale florei microbiene orale în DZ.

### **Materiale și metode**

**Subiecții.** Au fost investigați 30 de pacienți adulți (19 – 87 ani), selectați dintre pacienții Centrului de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice, din cadrul Spitalului Clinic de Urgență Cluj: 10 cu status potențial prediabetic, fără semne clinice de DZ (cu valori glicemice  $\geq 120$  mg/dL și istoric familial de DZ) și 20 de pacienți cu DZ (10 cu DZ tip I, 10 cu DZ tip II), din fiecare tip de DZ 5 fiind fără complicații și 5 cu complicații (în special microvasculare). Acești pacienți erau sub tratament cu insulină (în cazul celor cu DZ tip I), antidiabetice orale sau combinație a celor două metode terapeutice (în cazul celor cu DZ tip II). Durata bolii a fost între 3 și 30 de ani.

Grupul de control a fost alcătuit din 30 de subiecți sănătoși, cu valori glicemice  $< 120$  mg/dL, fără antecedente familiale de DZ.

Criterii de excludere:

- Fumatul, datorită posibilelor modificări induse de fumat celulelor din mucoasa orală;
- Alcoolismul;
- Subiecți cu gingivită sau boală parodontală.

### **Rezultate**

Conform criteriilor Bethesda 2001 de raportare pentru citologie (Solomon și Nayar, 2004), toate frotiurile au fost considerate satisfăcătoare din punct de vedere al numărului de

celule. Tipurile predominante de celule au fost cele superficiale și intermediare, cu rare celule parabazale. Toate colorațiile au evidențiat corect citoplasma și nucleul celulelor scuamoase.

Pentru interpretare, modificările celulelor scuamoase orale au fost grupate în funcție de colorație.

**Colorația Papanicolaou** a separat celulele în funcție de stratul de proveniență: majoritatea au avut origine superficială (colorate portocaliu, datorită conținutului ridicat de keratină), mult mai puține celule intermediare (de culoare verde) și foarte rare celule parabazale (verde-albăstrui).

Nu s-au înregistrat diferențe între celulele recoltate de la lotul martor și cele de la lotul de prediabetici. În ambele situații, nucleii au fost mici, cu cromatina compactă și raportul nucleu-citoplasmatic în limite normale. Formele ușoare de DZ au fost caracterizate de un număr crescut de granulații de keratohialin dispuse perinuclear, dar numărul acestora a scăzut în cazul formelor complicate.

S-au observat numeroase celule superficiale binucleate, uneori agregate sub formă de clustere. De asemenea, în toate cazurile de DZ, indiferent de prezența complicațiilor sau de tipul de DZ, s-au înregistrat atipii moderate, concretizate prin raport nucleu-citoplasmatic crescut și cromatină inomogenă, cu hiperchromazie focală.

De asemenea, toate cazurile de DZ au prezentat vacuole lipidice în citoplasmă; în trei cazuri de DZ tip I formă complicată s-a observat prezența de celule cu halou perinuclear și rare fenomene de cariorexis și carioliză.

**Colorația APT-Drăgan** a evidențiat modificări similare colorației Papanicolaou. La subiecții din lotul de control, precum și la cei din lotul cu valori glicemice prediabetice, aspectul citologic a fost unul normal, cu nucleii mici și compacți, și raport nucleu-citoplasmatic obișnuit.

Formele ușoare de DZ au fost caracterizate de celule cu granule citoplasmatică periferice, degenerescență lipidică a citoplasmei, celule binucleate și aspecte de raport nucleu-citoplasmatic ușor crescut, alături de rari nucleii distrofici, de dimensiuni mici.

În formele complicate de DZ tip II, un număr crescut de celule alfa și beta au prezentat aspecte de citoliză. De asemenea, s-au observat vacuole lipidice intracitoplasmatică la acești pacienți, dimensiunile lor fiind variabile (de la dimensiuni mici, până la vacuole care ocupă aproape întreaga citoplasmă). Modificările citoplasmatică au fost însoțite de modificări ale aspectului membranei nucleare (aceasta apărând mai palidă) sau hiperchromazie nucleară focală.

**Colorația Hematoxină-Eozină**, în ciuda faptului că nu permite diferențierea celulelor în funcție de stratul de proveniență, și-a dovedit utilitatea în aprecierea modificărilor cromatinei cu o rezoluție mult mai mare decât celelalte colorații, făcând-o deosebit de importantă în aprecierea modificărilor subtile care pot apărea la acest nivel.

Ca în cazul celorlalte colorații, nu s-au observat diferențe între celulele recoltate de la lotul martor și cele recoltate de la lotul de pacienți cu status prediabetic.

La toți subiecții diabetici, indiferent de tip, evoluție sau gravitate, majoritatea frotiului era ocupat de celule cu granulații eozinofile distribuite neuniform în citoplasmă și granule de keratohialin (bine delimitate, de dimensiune mai mare și colorate mai intens decât granulațiile).

Din punct de vedere al cromatinei, s-au observat celule cu grade diferite de condensare, aspectul acestora variind de la albastru-uniform (uneori palid), până la hiperchromazie sau agregări de cromatină sub membrana nucleară (în special în formele complicate de DZ tip I). De asemenea, s-au observat numeroase celule binucleate și incluzii clare intranucleare.

Pacienții cu forme complicate de DZ au prezentat, de asemenea, celule cu picnoză nucleară accentuată, unele cu pierderea completă a nucleului, precum și agregate celulare în care celulele erau de dimensiuni diferite, cu raport nucleu-citoplasmatic variat (modificări reactive în contextul inflamației leucocitare abundente). Nu s-au observat atipii nucleare certe, nici aspecte de displazie scuamoasă sau malignitate.

Colorația HE a fost de un real folos și în ceea ce privește evidențierea inflamației leucocitare. Astfel, pacienții cu forme complicate de DZ au prezentat inflamație bogată, asociată sau nu cu proliferarea florei bacteriene sau cu modificări ale florei saprofite orale.

### **Concluzii**

Citologia exfoliativă orală, de sine stătătoare, este o metodă cu valoare diagnostică redusă în ceea ce privește DZ, detectând modificări reactive induse de boală, dar fără elemente de specificitate pentru un anumit tip de DZ. Utilizată însă împreună cu alte metode de *screening*, aceasta își poate dovedi utilitatea în aprecierea prezenței și gravității bolii.

## CONCLUZII FINALE

1. S-a constatat echivalență între parametrii variabilității frecvenței cardiace (VFC) derivați din semnalul fotopletismografic și cei derivați din semnalul electrocardiografic, fiecare metodă prezentând avantaje și dezavantaje, cu referire în special la confortul subiectului, dar și al examinatorului; un dezavantaj major al folosirii fotopletismografiei este susceptibilitatea mare la artefacte de înregistrare.

2. VFC este global mai scăzută la pacienții care au suferit un infarct miocardic acut recent.

3. VFC este global mai scăzută la pacienții hipertensivi; această modificare poate fi pusă pe seama efectelor tensiunii arteriale crescute asupra echilibrului simpato-vagal, pe de o parte, și pe seama efectelor medicamentelor antihipertensive, pe de altă parte.

4. VFC este global mai scăzută în cazul diabeticilor, aspect care nu se corelează însă cu complexitatea ritmului cardiac.

5. Fumatul de țigară convențională scade rapid parametrii VFC, valorile revenind lent la cele înregistrate înainte de a fuma.

6. Fumatul de țigară electronică are ca efect creșterea acută a parametrilor VFC, care durează atâta timp cât se fumează, efectele dispărând rapid.

7. Diabetul zaharat induce modificări nespecifice ale celulelor scuamoase ale mucoasei orale, care sunt decelabile prin frotiuri citologice recoltate din acest situs: creșterea reactivă a raportului nucleu-citoplasmatic, binucleere, modificări de keratinizare (granule de keratohialin, keratină intracitoplasmatică dispusă lamelar), distrofie a citoplasmei (vacuole lipidice), anomalii de dispunere a cromatinei, dar și prezența unei inflamații abundente și a unei flore microbiene bogate.

## BIBLIOGRAFIE

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*, J Clin Microbiol, 2005, 43(11), pp. 5721–5732
- Aggarwal S, Tonpay PS, Triskha S, Bansal A. *Prevalence of Autonomic Neuropathy in Diabettes Mellitus*, Curr Neurobiol, 2011, 2(2):101-105
- Ahmed MT, Garib BT. *Cytological Features of Oral Cytobrush Smears in Type II Diabetes Mellitus Patients*, Tikrit Journal for Dental Sciences, 2012, 1, 6-12
- Ahrné S, Nobaek S, Jeppsson B, Adlerberth I, Wold AE, Molin G. *The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa*, J Appl Microbiol, 1998, 85(1), pp. 88–94
- Alberti S, Spadella CT, Francischone TR, Assis GF, Cestari TM, Taveira LA. *Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometry*, J Oral Pathol Med, 2003, 32(9), pp. 538–543
- Allen J. *Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement*, Physiol Meas, 2007, pp. 1-39
- Al-Maskari AY, Al-Maskari MY, Al-Sudairy S. *Oral manifestations and complications of diabetes mellitus: a review*, Sultan Qaboos Univ Med J, 2011, 11(2), pp. 179–186.
- Apetrei E. *Cardiologie clinică*, Editura Medicală Callisto, București, 2015, pp. 133-138
- Assad S, Ding F, Fu N, Xu YJ. *Correlating Heart Rate Variability with Mental Fatigue*, A Major Qualifying Project Report Submitted to the Faculty of the Worcester Polytechnic Institute, 2012, pp. 10-21
- Assadi R. *Conduction System of the Heart*, medscape.com, accesat online pe emedicine.medscape.com la data în decembrie 2016
- Aubert AE, Steps B, Beckers F. *Heart Rate Variability in Athletes*, Sports Medicine, 2003, 33(12), 889-919
- Balcioğlu AS, Müderrisoğlu H. *Diabetes and cardiac autonomic neuropathy: Clinical manifestations, cardiovascular consequences, diagnosis and treatment*, World J Diabetes, 2015, 6(1), 80-91
- Balsamo Gardim C, Alfonso P. de Oliveira B, Fernanda B. Bernardo A, Loch Gomes R, Lopes Pacagnelli F, Lorençoni RM, Vanderlei LC. *Heart Rate Variability in Children with Type 1 Diabetes Mellitus*, Rev Paul de Pediatr, 2014, 32(2), 279-285
- Batabyal B, Chakraborty S, Biswas S. *Role of the oral micro flora in human population: A brief review*, J Pharm Pharm Sci, 2012, 3(12), 2138-2148
- Billman GE. *The LF/HF ratio does not accurately measure cardiac sympatho-vagal balance*, Front Physiol, 2013, 4, pp. 1-5
- Bittencourt M, Busato IM, Albini M, Azavedo-Alanis L, Grégio AM, Soares de Lima AA, Naval Machado MA. *Cytological analysis of epithelial cells in adolescents with type 1 diabetes mellitus*, Arch Oral Dent Res, 2013, 9(2), 185-191
- Bortolotto LA, Blacher J, Kondo T, Takazawa K, Safar ME. *Assessment of Vascular Aging and Atherosclerosis in Hypertensive Subjects: Second Derivative Photoplethysmogram Versus Pulse Wave Velocity*, Am J Hypertens, 2000, 13, 165-171
- Brennan M, Palaniswami M, Kamen P. *Do Existing Measures of Poincaré Plot geomery Reflect Nonlinear Features of Heart Rate Variability?*, IEEE Trans Biomed Eng, 2011, 48(1), pp. 1342-1347
- Brock C, Softeland E, Gunterberg V, Brondum Frokjær, Lelic D, Brock B, Dimcevschi G, Gregersen H, Simren M, Drewes AM. *Diabetic Autonomic Neuropathy Affects Symptom Generation and Brain-Gut Axis*, Diabetes Care, 2013, 36(11), 3698-3705

- Brotman DJ, Bash LD, Qayyum R, Crews D, Whitsel EA. *Heart rate variability predicts ESRD and CKD-related hospitalization*, Clin J Am Soc Nephrol, 2010, 21(9), pp. 1560-1570
- Bušek P, Vaňcova J, Opavsky J, Salinger J, Nevšimalova S. *Spectral Analysis of Heart Rate Variability in Sleep*, Physiol Res, 54, 2005, 369-376
- Carel RS. *Cost-Effectiveness Analysis of a Computerized ECG Interpretation System in an Ambulatory Health Care Organization*, J Med Syst, 6(2), pp. 121-130
- Chevalier G, Sinatra S. *Emotional Stress, Heart Rate Variability*, Inter Med, 2011, 10(3):16-22
- Chu Duc H, Nguyen Phan K, Nguyen Viet D. *A Review of Heart Rate Variability and its Applications*, APCBEE Procedia 7, 2013, 80-85
- Clifford GD. *Signal Processing Methods for Heart Rate Variability*, Thesis submitted to the University of Oxford, 2002
- Comănescu-Neamțu R. *Citologia bucală-jugală în diabet: aspecte morfocitochimice*. IM-Stomatologie, Timișoara, 1979
- Combatalade CD. *Basics of Heart Rate Variability Applied to Psychophysiology*, Thought Technology Ltd., 2010, pp. 5-9
- Couceiro R, Carvalho P, Paiva RP, Henriques J, Quintal I et. al. *Assessment of cardiovascular function from multi-Gaussian fitting of a finger photoplethysmogram*, Physiol Meas, 2015, 36(9), pp. 1801-1825
- Cuculici GP, Gheorghiu AW. *Guyton & Hall – Tratat de fiziologie a omului, ediția a 11-a*, Editura Medical Callisto, 2007, pp. 116-119, 123-126, 748-759, 972-976
- D'Souza MS, Markou A. *Neuronal Mechanisms Underlying Development of Nicotine Dependence: Implications for Novel Smoking-Cessation Treatments*, Addict Sci Clin Pract, 2011, 6(1), pp. 4-16
- Drăgan-Lungulescu M. *Citodiagnostic cu metoda de colorare rapidă APT-Drăgan*, Editura de Vest, Timișoara, 2004, pp. 15-19
- Elgendi M, Fletcher R, Norton I, Brearley M, Abbott D, Lovell NH, Schuurmans D. *On Time Domain Analysis of Photoplethysmogram Signals for Monitoring Heat Stress*, Sensors, 2015, 15, pp. 24716-24734
- Elgendi M, Jonkman M, DeBoer F. *Heart Rate Variability and the Accelerated Plethysmogram signals measured at rest*, Communications in Computer and Information Science, 2011, 127, pp. 266-277
- Elgendi M. *Standard Terminologies for Photoplethysmogram Signals*, Curr Cardiol Rev, 2012, 8, pp. 215-219
- Emmerling H. *Systemic diseases with oral signs*, DHV6138/Fall, 2009
- Fowler MJ. *Microvascular and macrovascular complications of diabetes*, Clin Diabetes, 2008, 26(2), pp. 77-82
- Garg V. *Noninsulin pharmacological management of type 1 diabetes mellitus*, Indian J Endocr Metab, 2011, 15(Suppl 1), pp. 5-11
- Ginghină C. *Mic tratat de cardiologie*, Editura Academiei Române, București, 2010, pp. 26-28
- Gondim RM, Quintanella Farah B, da Franca Bandeira Ferreira Santos C, Mendes Ritti-Dias R. *Are smoking and passive smoking related to heart rate variability in male adolescents ?*, Einstein (Sao Paulo), 2015, 13(1): 27-33
- Gurenlian JR. *The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health*, Int J Dent Hyg, 2007, 81(5), pp. 1-11
- Guțiu IA. *Tulburări de conducere ale inimii – fiziopatologie, clinică, tratament*, Editura Tehnică, București, 1994, pp. 101-102, 19-27

- Haslbeck M, Luft D, Neundörfer B, Stracke H, Ziegler D. *Diagnosis, Treatment and Follow-up of Diabetic Neuropathy, 1st Edition*, 2004
- Henry BL, Minassian A, Paulus MP, Geyer MA, Perry W. *Heart rate variability in bipolar mania and schizophrenia*, Journal of Psychiatric Research, 2009 (article in press)
- Hongo RH, Goldschlager N. *Status of Computerized Electrocardiography*, Cardiol Clin, 24, 2006: 491-504
- Jaiswal M, Urbina EM, Wadwa RP, Talton JW, D'Agostino RB, Hamman RF, Fingerlin TE, Daniels S, Marcovina SM, Dolan LM, Dabelea D. *Reduced Heart Rate Variability Among Youth With Type 1 Diabetes*, Cardiovasc Metab Risk, 2013, 36, 1, pp. 157-162
- Jajarm HH, Mohtasham N, Moshaverinia M, Rangiani A. *Evaluation of oral mucosa epithelium in type II diabetic patients by an exfoliative cytology method*, Journal of Oral Sciences, 2008, 5(3), pp. 335-340
- Jenkins GW, Kemnitz CP, Tortora GJ. *Anatomy and Physiology – From Science to Life*, John Wiley & Sons, Inc., 2007, pp. 709-712
- Karakaya O, Barutcu I, Kaya D, Metin Esen A, Saglam M, Melek M, Onrat E, Turkmen M, Esen OB, Kaymaz C. *Acute Effect of Cigarette Smoking on Heart Rate Variability*, Angiology, 2007, 58(5), pp. 620-624
- Karim N, Hasan JA, Ali SS. *Heart Rate Variability – A Review*, J Basic Appl Sci, 7(1), 2011, 71-77
- Kazanowska K, Hałoń Radwan-Oczko M. *The role and application of exfoliative cytology in the diagnosis of oral mucosa pathology – contemporary knowledge with review of the literature*, Adv Clin Exp Med, 2014, 23(2), pp. 299–305
- Kory Calomfirescu Ș, Moș AM. *Complicațiile neurologice în diabet zaharat. Sindroame neurologie paraneoplazice*, Librăriile Crica, 1996, 12-16
- Kumar V, Abbas A, Aster J. *Robbins Patologie: Bazele morfologice și fiziopatologice ale bolilor, Ed. A 9-a*, Editura Medicală Callisto, 2014, pp. 730-748
- Lakhtakia R. *The history of diabetes mellitus*, Sultan Qaboos Univ Med J, 2013, 13(3), pp. 268-370
- Llewelin JG. *The Diabetic Neuropathies: Types, Diagnosis and Management*, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003, 74(Suppl II), pp. 15-19
- Loscalzo J. *Harrison – Medicină cardiovasculară*, Editura All, 2013, pp. 86-91
- Loss R, Sandrin R, França BH, de Azevedo-Alanis LR, Gregio AM, Machado MA, Lima AA. *Cytological analysis of the epithelial cells in patients with oral candidiasis*, Mycoses, 2011, 54(4), pp. 130-135
- Lungulescu Drăgan M. *Citodiagnostic cu metoda de colorare rapidă APT-Drăgan*, Editura de Vest, 2004, 15-20, 97-116
- Majumdar S, Bhagat Singh și colab. A. *Normal Microbial Flora of Oral Cavity*, J Adv Med Dent Sci Res, 2014, 2(4), pp. 62-66
- Majumdar S, Singh și colab. AB. *Normal microbial flora of the oral cavity*, J Adv Med Dent Sci Res, 2014, 2(4), pp. 62–66
- Makivić B, Djordević Nikić M, Willis MS. *Heart Rate Variability (HRV) as a Tool for Diagnostic and Monitoring Performance in Sport and Physical Activities*, J Exerc Physiol Online, 2013, 3, 103-131
- Malik M. *Heart rate variability – Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use*, Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology, Eur Heart J, 17, 1996, 354-381
- Marsh P. *Role of the Oral Microflora in Health*, Microb Ecol Health Dis, 2000, 12(5), pp. 130-137



- McCraty R. *Heart Rate Variability: New Perspectives on Physiological Mechanisms, Assessment of Self-regulatory Capacity, and Health Risk*, Glob Adv Health Med, 2015, 4(1), 46-61
- Medeiros, JM. *Development of a Heart Rate Variability Analysis Tool*, A Thesis submitted for obtaining the degree of Masters in Biomedical Engineering, Department of Physics, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 2010, pp. 24-25
- Meurman JH, Siikala E, Richardson M, Rautemaa R. *Non-Candida albicans Candida yeasts of the oral cavity*, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (A. Méndez-Vilas – Ed.), 2007, pp. 719-731
- Middlekauff HR, Park J, Moheimani RS. *Adverse Effects of Cigarette and Noncigarette Smoke Exposure on the Autonomic Nervous System. Mechanisms and Implications for Cardiovascular Risk*, J Am Coll Cardiol, 2014, 64(16), 1740-1750
- Mirescu ȘC, Harden SW. *Photoplethysmography as a Potential Alternative to Electrocardiography for Recording Heart Rate Intervals Used in Variability Analysis*, J Med L, Volume 5 (Special Issue), 2012, pp. 123-128
- Mirescu ȘC, Păiș R, Stănoiu BP, diNatale L, Șovrea AS. *The value of exfoliative cytology in the diagnostic of oral mucosa changes in diabetes mellitus*, Rom J Morphol Embryol, 2016, 57(4), 1313-1322
- Mirescu ȘC, Petrescu M, Petrescu F, Mirescu NC, David L. *Challenges in implementing heart rate variability testing in a family medicine practice: strengths, pitfalls and caveats*, Studia Biologia UBB, LIX(2), 2014, pp.105-113
- Mirescu ȘC. *Computer sound card used as analog-to-digital converter in a teaching physiology laboratory*, Studia Biologia UBB, LX(2), 2015, pp. 85-88
- Neamțu E. *Aplicarea și evaluarea colorației rapide APT-Drăgan în studiul citologiei bucale*. IM-Stomatologie, Timișoara, 1974
- Oates PJ. *The polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy*. In: Tomlinson DR, editor. *Neurobiology of Diabetic Neuropathy* Neurobiology of Diabetic Neuropathy, vol. 50, London; UK, Academic Press, 2002, pp. 325-392
- Ognean I, Dojană N, Roșioru C. *Fiziologia animalelor, Vol I*, Presa Universitară Clujană, Cluj-Napoca, 2000, pp. 217-218
- Olinici, CD, Renata V, Doinița C, Gheban D. *Biologia celulară și anatomia patologică*, Editura Floarea Albastră, Zalău, 1999, pp. 195-212
- Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. *Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends*, Oman Med J, 2012, 27(4), pp. 269–273
- Orlov S, Bril V, Orszag A, Perkins BA. *Heart Rate Variability and Sensorimotor Polyneuropathy in Type 1 Diabetes*, Diabetes Care, 2012, 35(4), 809-816
- Pala A, Chowbey R, Sonvanschi N, Patel D, Shah A, Venkatesh C. *A review of oral manifestations of systemic diseases*, Int J Oral Health med Res, 2016, 2(6), pp. 131-132
- Pandit S, Gonsalves M, Karkera B, Jasphin S. *Diabetes: Risk Factor for Oral Cancer ? – A Review*, Int J Adv Health Sci, 2015, 1(10), 25-28
- Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Yam WC, Jin LJ, Samaranayake LP. *Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions*, Oral Dis, 2010, 16(2), pp. 136–145
- Paritala SA. *Effects of Physical and Mental Tasks on Heart Rate Variability*, A Thesis Submitted to Louisiana State University, 2009
- Park SH, Lee L, Shearston JA, Weitzman M. *Patterns of electronic cigarette use and level of psychological distress*, PloS One, 2017, 12(3), PMID 28278239
- Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. *Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults*, J Med Microbiol, 1991, 35(1), 5-11

- Piero MN, Nzaro GM, Njagi JM. *Diabetes mellitus – a devastating metabolic disorder*, Asian J Biomed Pharm Sci, 2014, 40(4), pp. 1-7
- Pilt K, Meigas K, Temitski K, Viigimaa M. *Second derivative analysis of forehead photoplethysmographic signal in healthy volunteers and diabetes patients*, IFMBE Proceedings, 2013, 410-413
- Pinducciu G, Micheletti L, Piras V, Songini C, Serra C, Pompei R, Pintus L. *Periodontal disease, oral microbial flora and salivary antibacterial factors in diabetes mellitus type 1 patients*, Eur J Epidemiol, 1996, 12(6), pp. 631–636
- Pradhapan P, Tarvainen MP, Nieminen T, Lehtinen R, Nikus K, Lehtimäki T, Kahonen M, Viik J. *Effect of heart rate correction on pre- and post-exercise heart rate variability to predict risk of mortality – an experimental study on the FINCAVAS cohort*, Front Physiol, 2014, 5, pp. 1-10
- Preston AJ, Gosney MA, Martin MV. *Oral Flora of Elderly Patients following Acute Medical Admission*, Gerontology, 1999
- Rivera C, Nuñez-de-Mendoza C. *Exfoliative cytology of oral epithelial cells from patients with type 2 diabetes: cytometric analysis*, Int J Clin Exp Med, 2013, 6(8), pp. 667-676
- Schipke JD, Arnold G, Pelzer M. *Effect of respiration on short-term heart rate variability*, J Clin Basic Cardiol, 1999, 2(1), 92-95
- Seifi S, Feizi F, Moazzezi Z, Mehdizadeh M, Zamani B. *Evaluation of oral mucosal epithelium in diabetic male patients by exfoliative cytology method*, J Diabetes Metab Disord, 2014, 13(77), 1-7
- Shareef BT, Ang KT, Naik VR. *Qualitative and quantitative exfoliative cytology of normal oral mucosa in type 2 diabetic patients*, Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2008, 13(11), pp. 693-696
- Sharma M, Tiwari SC, Singh K, Kishor K. *Occurrence of Bacterial Flora Infections of Diabetic and Non-Diabetic Patients*, Life Sci Med Res, 2011, pp. 1-6
- Shilitoe E, Weinstock R, Kim T, Simon H, Planer J, Noonan S, Cooney R. *The oral microflora in obesity and type-2 diabetes*, J Oral Microbiol, 2012, 4
- Singh și colab. JP, Larson MG, Tsuji H, Evans JC, O'Donnell CJ, Levy D. *Reduced Heart Rate Variability and New-Onset Hypertension. Insights Into Pathogenesis of Hypertension: The Framingham Heart Study*, Hypertension, 1998, 32, 2, pp. 293-297
- Solomon D, Nayar R (eds). *The Bethesda System for reporting cervical cytology: definitions, criteria, and explanatory notes*, 2nd edition, Springer, 2004
- Soule EK, Maloney SF, Guy MC, Eissenberg T, Fagan P. *User Identified Positive Outcome Expectancies of Electronic Cigarette Use: A Concept Mapping Study*, Psychol Addict Behav, 2017, published online, PMID 28277706
- Stys A, Stys T. *Current Clinical Applications of Heart Rate Variability*, Clin Cardiol, 1998, 21, pp. 719-724
- Taelman J, Vandeput S, Spaepen A, Van Huffel S. *Influence of Mental Stress on Heart Rate and Heart Rate Variability*, ECIFMBE 2008, IFMBE Proceedings 22, 2008, pp. 1366-1369
- Takahashi N. *Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases*, Elsevier Congress Series 1284, 2005, pp. 103-112
- Takazawa K. *Second derivative photoplethysmogram*, Vasa, 2015, 44(1), 3-4
- Tozoğlu Ü, Bilge OM. *Exfoliative cytology of type 1 diabetic patients*, Eur J Gen Med, 2010, 7(3), pp. 264-268
- Tsai JF, Cho W, Jou SH, Lin CM. *Heart rate variability and meditation with breath suspension*, Biomed Res, 2014, 25(1), pp. 6-10

- Țibre V. *Corelații clinico-electrofiziologice în complicațiile neurologice periferice după tratamentele oncologice*, Teză de Doctorat, Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, 2007
- Vineet RV. *Flora of the oral cavity*, Smashword Edition License Notes, 2015
- Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. *Diabetic Autonomic Neuropathy*, *Diabetes Care*, 2003, 26(5), pp. 1553-1579
- Von Borell E, Langbein J, Després G, Hansen S, Letterier C et. al. *Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals – A review*, *Physiol Behav*, 92, 2007, pp. 293-316
- Vučović-Rebrina S, Barada A, Smirčić-Duvnjak L. *Diabetic Autonomic Neuropathy*, *Handbook of Clinical Neurology*, 2013, 117, 279-294
- Wardlaw GM, Hampl JS. *Perspectives in Nutrition, 7th Ed.*, 2007, 175-179
- Weippert M, Behrens M, Rieger A, Behrens K. *Sample Entropy and Traditional Measures of Heart Rate Dynamics Reveals Different Modes of Cardiovascular Control During Low Intensity Exercise*, *Entropy*, 2014, 16, 5698-5711
- Williams DW, Walker R, Lewis MA, Allison RT, Potts AJ. *Adherence of Candida albicans on oral epithelial cells differentiated by Papanicolaou staining*, *J Clin Pathol*, 1999, 52(7), pp. 529–531
- Zdrenghea D. *Disritmiile cardiace, Vol. I*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1990, pp. 14-17
- Zimmerman RL. *Molecular diagnostics in the cytology laboratory: slowly making its way there*, *Diagn Histopathol*, 2008, 14(12), pp. 609–613
- \*\*\*American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*, *Diabetes Care*, 2013, 36(Suppl 1), pp. 67-74
- \*\*\*World Health Organisation. *Prevalence of Tobacco Smoking*, 2015, accesat online în februarie 2017
- \*\*\*European Society of Cardiology. *Atrial Fibrillation 2016 (Management of). ESC Clinical Practice guidelines*, *Eur Heart J*, 2016, 37(38), pp. 2893-2962
- \*\*\*European Society of Cardiology. *Guidelines for the diagnosis and management of syncope (version 2009)*, *Eur Hearth J*, 2009, 30, pp. 2631-2671
- \*\*\*European Society of Cardiology. *ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC)*, *Eur Heart J*, 2012, 33(20), pp. 2569-2619
- \*\*\*GroupHealth. *Type I Diabetes – Treatment Guideline*, 2015, pp. 3-7
- \*\*\*Heart Rate Variability Analysis System – *Clinical Information*, Medicare, 2010, p. 9
- \*\*\*World Health Organisation. *Global Report on Diabetes*, 2016, pp. 20-21
- \*\*\*World Health Organisation. *Use of Glycated Haemoglobin (AbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus*, 2011, pp. 4-7