UNIVERSITATEA DE VEST "VASILE GOLDIȘ" DIN ARAD
FACULTATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE ȘI MEDICINĂ DENTARĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
Prof.univ.dr. Maria Pușchiță

DOCTORAND
Popa Călin Daniel

ARAD 2014

UNIVERSITATEA DE VEST "VASILE GOLDIȘ" DIN ARAD
FACULTATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE ȘI MEDICINĂ DENTARĂ

IMPLICAȚIILE GENETICE ALE ATEROSCLEROZEI ȘI HIPERTENSIUNII ARTERIALE LA PACIENTUL DE VÂRSTĂ MIJLOCIE ȘI PACIENTUL VÂRSTNIC

REZUMAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
Prof.univ.dr. Maria Pușchiță

DOCTORAND
Popa Călin Daniel

ARAD 2014

„Lucrarea omului trebuie să fie ca un diamant,

să strălucească oricum ai întoarce-o”

Sfântul Luca al Crimeii - *Chirurgul fără de arginți*

(1877-1961)

CUPRINS

INTRODUCERE

PARTEA GENERALĂ

CAPITOLUL I

Considerații generale asupra mecanismelor fiziopatologice și genetice cunoscute în ateroscleroză 9

1.1 Introducere 9

1.2 Mecanismul fiziopatologic de producere a aterosclerozei 9

1.3 Factorii de risc implicați în declanșarea și evoluția aterosclerozei 14

1.4 Semne și simptome caracteristice instalării aterosclerozei 17

1.5 Evaluarea și diagnosticarea aterosclerozei 17

1.6 Managementul tratamentului medicamentos la pacienții diagnosticați cu ateroscleroză . 19

1.7 Factori genetici asociați aterosclerozei 19

CAPITOLUL II

Considerații generale asupra mecanismelor fiziopatologice și genetice cunoscute în hipertensiunea arterială 22

2.1 Introducere 22

2.2 Mecanismul fiziopatologic de producere a hipertensiunii arteriale 23

2.3 Semne și simptome asociate hipertensiunii arteriale 25

2.4 Factori de risc cardiovasculari 26

2.5 Evaluarea și diagnosticarea hipertensiunii arteriale 27

2.6 Managementul tratamentului pacientului hipertensiv 29

2.7 Factori genetici asociați hipertensiunii arteriale 32

CAPITOLUL III

Parametri biochimici de evaluare a aterosclerozei și hipertensiunii arteriale 34

3.1 Rolul paraoxonazelor umane (PON) în identificarea timpurie a aterosclerozei 34

3.1.1 Mecanismul biochimic de intervenție și acțiune a PON 35

3.1.2 Semnificația clinică a paraoxonazei umane 1 și mecanismul de acțiune 36

3.2 Rolul polimorfismului genetic în patologia bolilor vasculare aterosclerotice și în hipertensiunea arterială 39

PARTEA SPECIALĂ

Obiective generale 46

Motivația cercetării 48

CAPITOLUL IV

Materiale și metode utilizate în realizarea cercetărilor. 50

4.1 Profilul biologic al lotului de studiu 50

4.2 Criterii de diagnostic 53

4.2.1 Criteriile de diagnostic pentru hipertensiune (HTA) 53

4.2.2 Criterii de diagnostic pentru sindromul metabolic 54

4.2.3 Criterii pentru diagnosticul de diabet zaharat (DZ) 54

4.3 Profilul genetic al lotului de studio 55

4.3.1 Argumente de pedigreu 55

4.3.1.1 Anamneza personală 55

4.3.1.2 Examenul clinic al pacientului 55

4.3.1.3 Ancheta familială 56

4.3.2 Argumente paraclinice 57

4.3.2.1 Teste pentru identificarea statusului biochimic al pacienților 57

4.3.2.2 Teste specific pentru identificarea markerilor
și indicilor biochimici ai aterosclerozei 59

4.3.2.3 Teste specifice pentru determinarea polimorfismului genetic 63

4.3.2.4 Alegerea chestionarului de evaluare a stresului 63

4.3.3 Prelucrarea statistică a datelor 64

CAPITOLUL V

Cuantificarea riscului aterogenic la pacienții hipertensivi din lotul de studiu, prin utilizarea unor indici și markeri specifici pentru ateroscleroză (Studiu I) 65

5.1 Introducere 65

5.2 Obiectivele studiului I 67

5.3 Material și metodă 68

5.4 Rezultate și analiza statistică 72

5.5 Discuții 86

5.6 Concluzii de etapă 88

CAPITOLUL VI

Determinarea valorilor plasmatice ale paraoxonazei umane 1 (PON1) pentru pacienții hipertensivi al căror risc familial de boli cardiovasculare este cel mai crescut și corelarea rezultatelor obținute cu valorile indicilor de ateroscleroză (Studiul II) 89

6.1 Introducere 89

6.2 Obiective 90

6.3 Material și metodă 90

6.4 Rezultate și analiză statistică 91

6.5 Discuții 97

6.6 Concluzii de etapă 99

CAPITOLUL VII

Analiza genetică a polimorfismului genelor din sistemul renină-angiotensină (SRA) și corelarea rezultatelor cu hipertensiunea arterială și ateroscleroză (Studiul III) 100

7.1 Introducere 100

7.2 Obiective 101

7.3 Material și metodă 102

7.4 Rezultate și analiza statistică 103

7.5 Discuții 111

7.6 Concluzii de etapă 113

DISCUȚII GENERALE 114

CONCLUZII GENERALE 117

CONTRIBUȚII PERSONALE 119

BIBLIOGRAFIE 121

Abrevieri . . . . . .

Lista Figurilor . . . . . .

Lista Tabelelor . . . . . .

ANEXE . . . . . .

Lista lucrărilor publicate . . . . . .

INTRODUCERE

Hipertensiunea arterială și ateroscleroza sunt cauze principale ale afecțiunilor cardiovasculare tot mai răspândite în populația umană. În prezent bolile cardiovasculare sunt principala cauză de mortalitate în lume. Din păcate, România se numără printre țările fruntașe în această problematică, cu o mortalitate de 62%, conform studiilor SEPHAR I și II **(Dorobanțu M. și colab., 2010 [1])**. Identificarea factorilor de risc pentru construirea și aplicarea unei strategii terapeutice și eficiente este unul din dezideratele cercetătorilor în domeniu. Managementul terapeutic este foarte puțin susținut de terapia medicamentoasă iar costurile de tratament ridicate limitează sfera de intervenție a medicului specialist și urmărirea corespunzătoare a pacientului. Găsirea unor markeri predictivi care să poată fi translați în măsuri preventive va contribui substanțial la reducerea numărului pacienților hipertensivi nou diagnosticați care sunt în prezent pe un trend ascendent.

Se estimează că aproximativ 40% din variația existentă în hipertensiune este determinată de variante genetice la peste 90% din pacienții diagnosticați cu hipertensiune primară sau esențială nu se identifică o cauză clară. În prezent tratamentul pacienților se bazează pe măsurători ciclice ale tensiunii arteriale și terapia medicamentoasă, prin care se încearcă reducerea cât mai rapid posibil a presiunii arteriale. În cele mai multe cazuri pacienții depind în totalitate de două-trei tipuri de medicamente.

Mult timp s-a crezut că ateroscleroza este o maladie a omului modern și că este strâns legată de stilul de viața al acestuia. Studiul HORUS **(Randall T. și colab., 2013 [2]),** arată că ateroscleroza a fost prezentă și acum peste 4000 de ani la populația antică preindustrială din Egipt și America de Sud și a dus la ipoteza că prezența aterosclerozei la omul premodern este o componentă moștenită și nu o caracteristică a stilului de viață sau a dietei.

Procesul aterogenezei începe încă din copilărie**,** astfel că identificarea timpurie a procesului aterosclerotic poate contribui la prevenirea sau întârzierea dezvoltării bolilor cardiovasculare.

S-a dovedit că endoteliul joacă un rol esențial în controlul tonusului vascular, luându-se în considerare locația sa strategică, este probabil să funcționeze ca un senzor și transmițător, care mediază hemodinamica, schimbările umorale și efectul aterogen al tensiunii arteriale **(Gibbons G.H. și Dzau V.J., 1991 [3]).**

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Partea generală a tezei este structurată în trei capitole care prezintă date de actualitate privind patologia aterosclerozei și a hipertesniunii arteriale. Primul capitol descrie mecanismul fiziopatologic al aterosclerozei, factorii de risc implicați, diagnosticul afecțiunii precum și managementul tratamentului. Capitolul al doilea tratează mecanismul fiziopatologic al hipertensiunii arteriale, cu prezentarea factorilor de risc, a simptomatologiei, a amangementului tratamentului prin utilizarea indicațiilor ultimelor ghiduri de prevenție și tratament pentru hipertensiune. De asemenea aceste două capitole au pus în evidență și componenta genetică și a factorilor de mediu care influențează mecanismul de producere și evoluție a bolilor.

Capitolul trei "Parametri biochimici de evaluare a aterosclerozei și hipertensiunii arteriale" prezintă succint date definitorii pentru cele două elemente importante din cercetările noastre și anume importanța paraoxonazelor umane, în special a paraoxonazei umane 1 (PON1) în patologia și producerea aterosclerozei și a hipertensiunii arteriale și a polimorfismului genelor implicate în aceste două afecțiuni, punându-se accent pe importanța polimorfismului genelor sistemului renină-angiotensină-aldosteron.

II. CONTRIBUȚIILE PERSONALE

Partea specială a tezei de doctorat cuprinde prezentarea materialului de lucru și a metodelor utilizate în cercetare precum și descrierea pe larg a celor trei studii realizate în vederea atingerii obiectivelor propuse.

2.1 Motivația, obiectivele și ipoteza de lucru

Afecțiunile cardiovasculare sunt boli polifactoriale cu o componentă genetică importantă, dintre acestea cele mai importante sunt hipertensiunea arterială și ateroscleroza.

Hipertensiunea afectează 25% din populația adultă și este responsabilă de aproximativ 13% din totalul deceselor la nivel mondial. Pentru un tratament adecvat este necesară identificarea cauzelor datorate stilului de viață și eliminarea acestora concomitent cu aplicarea unei terapii medicamentoase adecvate.

Ateroscleroza omului modern este o problemă actuală greu de stăpânit din punct de vedere medical, fiind posibil să facă parte din zestrea genetică lăsată de strămoși ca efect al neadaptării omului în procesarea grăsimilor astfel că necesitatea unui program de prevenție este justificat având în vedere impactul acestor maladii asupra societății noastre.

Instalarea şi progresia aterosclerozei se poate petrece mai rapid sau mai lent, în funcţie de prezenţa sau absenţa mai multor factori de risc. Numeroase studii clinice şi statistice extensive au corelat aceşti factori de risc cu apariţia bolilor cardiovasculare.

Cei mai importanţi factori de risc asociaţi bolilor cardiovasculare sunt: vârsta, ereditatea, genul masculin, fumatul, colesterolul crescut, obezitatea, sedentarismul, stresul, boli precum hipertensiunea arterială sau diabetul zaharat.

Dintre aceştia, unii factori sunt nemodificabili (precum vârsta şi ereditatea), alții (majoritatea) pot fi modificaţi şi ţinuţi sub control iar asocierea mai multor factori de risc creşte probabilitatea apariţiei bolilor cardiovasculare.

Mecanismul patologiei aterosclerozei și al hipertensiunii arteriale a fost intens studiat în ultimii ani. Prin noile metode de secvențiere și analiză a genomului uman s-a descoperit că aproape fiecare boală are componente genetice constitutive sau dobândite. Astfel că mecanismul oricărei afecțiuni poate fi mai ușor înțeles dacă identificăm configuraţia genomică aflată la baza predispoziţiei afecțiunea respective și mutaţiile genomice somatice dobândite care declanşează afecțiunea şi determină un fenotip clinic specific, așa cum este cazul neoplaziilor.

Interacțiunea dintre diferiți factori de mediu și factori genetici asociați acestor boli este foarte complexă ceea ce face dificil de cuantificat contribuția fiecărui dintre acești factori. Dezvoltarea tehnicilor de genetică moleculară a permis detecția unor markeri importanți în patogeneza bolilor cardiovasculare. În acest sens există identificate o serie de gene și polimorfisme genetice care influențează apariția și progresul bolile cardiovasculare. Studiile genetice efectuate pe grupuri largi de subiecți nu au putut să aducă lumină asupra mecanismului genetic responsabil de producerea hipertensiunii arteriale și aterosclerozei. Astfel datele din literatură sunt foarte variate și controversate ceea ce face ca în prezent să nu existe un panel de teste genetice disponibile specialiștilor prin care să se poată cuantifica riscul genetic asociat bolilor cardiovasculare.

Găsirea unor gene care să reflecte contribuția componentei genetice în bolile cardiovasculare este un obiectiv important al cercetătorilor în domeniu. Folosirea acestor gene împreună cu set de factori de risc bine caracterizați poate duce la îmbunătățirea substanțială am modului prin care poate fi anticipată dezvoltarea bolilor cardiovasculare. Pe baza acestor programe pot fi constituite programe de screening și prevenție în populație.

În contextul științific descris ne-am propus ca printr-o abordare multidisciplinară să identificăm:

- Implicațiile genetice familiale, ale aterosclerozei și hipertensiunii arteriale la un grup de pacienți hipertensivi heterogeni diagnosticați și aflați sub tratament medicamentos care prezintă boli asociate bolilor cardiovasculare și corelarea acestor date cu factori de mediu cunoscuți a fi implicați în dezvoltarea acestor boli;
- Un protocol de diagnostic îmbunătățit prin introducerea unor markeri fenotipici, biochimici și genetici ce pot contribui la aplicarea unui tratament adecvat și personalizat în funcție de profilul pacientului.

Obiectivele cercetării noastre sunt redate mai jos:

- Folosirea pedigreului personal și familial pentru cuantificarea riscului de încărcare familială pentru boli cardiovasculare, diabet zaharat tip II, dislipidemii, boli renale și alte boli asociate implicate în exacerbarea simptomatologiei cardiace;
- Identificarea riscului aterogen la pacienții hipertensivi prin utilizarea indicilor aterogenici (raporturile CT/HDL, LDL/HDL, AIP) și al riscului de a dezvolta boli cardiovasculare majore (IM sau AVC) în următorii ani prin utilizarea unui soft licențiat de estimare a acestui risc (Clinrisk-Qrisk 2013);
- Utilizarea unui chestionar de stres în vederea evaluării acestuia pentru pacienții hipertensivi aflați în studiu și corelarea rezultatelor cu markerii biochimi obținuți;
- Dozarea valorilor paraoxonazei umane 1 (PON1) pentru pacienții cu riscul de boli cardiovasculare crescut, identificat prin pedigreul familial și raportarea rezultatelor la indicii de ateroscleroză;
- Idenficarea și compararea prezenței și frecvenței unor polimorfisme cunoscute în genele care fac parte din sistemul renină-angiotensină-aldosteron la un grup de pacienți heterogeni diagnosticați cu hipertensiune dar și cu alte boli asociate.
- Realizarea unui protocol de prevenție din datele obținute din cele trei studii individuale utilizând markerii aterogenezei, valorile PON1 și softul de calcul al riscului cardiovascular Clinrisk-Qrisk2013.

2.2 Strategii de cercetare

1. Cercetările noastre s-au focalizat pe identificarea factorilor genetici importanți și cu frecvență ridicată asociați bolilor cardiovasculare principale. În acest sens investigarea aterosclerozei și hipertensiunii arteriale care sunt strâns legate și cu manifestări clinice similare a permis analiza detaliată a implicațiilor genetice aferente declanșării și instalării acestor boli.

2. Tema tezei se bazează pe nevoia de includere în practica medicală a unor strategii de prevenție a acestor boli cardiovasculare, strategii care însă nu pot exista fără un panel adecvat de factori bine caracterizați ce pot fi folosiți de markeri predictivi.

3. Cercetările noastre s-au îndreptat spre mai multe aspecte ale bolilor cardiovasculare analizate, însă cu precădere către predispoziția genetică familială și rolul polimorfismelor genetice asociate în corelație cu factorii de mediu frecvenți implicați în dezvoltarea bolii.

4. Datorită heterogenității cunoscute a acestor boli, includerea în grupul de studiu a unui număr mare de pacienți și caracterizarea fiecărui pacient în parte au constituit premisele de bază ale acestui studiu.

5. Multidisciplinaritatea cercetărilor impuse de complexitatea fenotipică a subiecților precum și metodologia în tehnicile utilizate în realizarea acestei teze de doctorat sunt tehnici moderne și rapide de analiză care au permis obținerea unor rezultate valide și reproductibile.

În ceea ce privește importanța cercetărilor de genetică, în bolile cardiovasculare, acestea vor contribui semnificativ în dezvoltarea unor terapii personalizate, bazate pe profilul clinic și familial al pacientului, care vor putea fi utilizate în practica medicală.

III. MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ÎN REALIZAREA CERCETĂRILOR

Pacienții incluși în studiu au fost selectați dintre pacienții cronici ai Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad care sunt internați periodic în secțiile clinice Medicină Internă și Boli de nutriție și diabet și din ambulatoriu.

Au fost evaluați 271 pacienți (125 gen masculin și 146 gen feminin) diagnosticați cu hipertensiune arterială și au fost grupați astfel:

- primul grup (H1) a inclus 62 de pacienți hipertensivi gradul I fără tratament;
- grupul al doilea (H2) a inclus 68 de pacienți cu sindrom X metabolic (hipertensiune gradul I/II, scăderea toleranței la glucoză, obezitate, sedentarism);
- al treilea grup (H3) a inclus 74 de pacienți hipertensivi gradul II având asociat diabet zaharat tip 2;
- grupul al patrulea (H4) a cuprins 67 pacienți hipertensivi gradul 2 având asociat diabet zaharat tip 2 și boală cronică renală;
- al cincilea grup, grupul control (C) a cuprins 45 de persoane sănătoase (fără manifestări precoce ale bolilor cardiovasculare).

Criteriile de includere pentru lotul de studiu au fost vârsta peste 40 de ani și sub 70 de ani, fără boli cardiovasculare asociate (antecedente de bypass, stentare, infarct miocardic și

accident vascular cerebral), fără consum recent de tutun, alcool, medicație hipolipemiantă (cel puțin 3 luni anterior studiului nostru).

O parte dintre subiecții incluși în lotul de studiu sunt în relație de rudenie gradul I si II. S-a preferat o astfel de abordare din prisma motivației cercetării prin care s-a dorit extragerea (predispoziția) componentei genetice familiale și estimarea ponderii acesteia în manifestarea bolii. În acest sens s-a stabilit ca pentru fiecare grup de studiu 10% din pacienți să fie înrudiți.

Pentru partea de cercetare s-au utilizat teste specifice de identificare a markerilor și indicilor biochimici ai aterosclerozei (dozarea paraoxonazei umane 1, calcularea riscului aterogenic prin folosirea de indici ai aterosclerozei cunoscuți in literatura, calcularea riscului de evenimente cardiovasculare pentru următorii 10 ani utilizând un software medical licențiat ClinRisk/Qrisk2-2013); teste specifice pentru determinarea polimorfismului genetic (metoda PCR-RFLP); folosirea chestionarului de evaluare a stresului; folosirea chestionarului de pedrigreu familial pentru cuantificarea riscului de boli cardiovasculare moștenite.

Pentru prelucrarea statistica a datelor s-a folosit programul informatic Statistica 7, instrumentele Microsoft Office Excel, Word și pentru generarea anumitor grafice programul GraphPad, toate rezultatele fiind exprimate ca valoare medie și deviație standard (DS). Datele anamnestice și parametri biochimici obținuți au fost utilizați în toate studiile ulterioare observaționale și de comparație.

IV. SUMAR AL CERCETĂRILOR EFECTUATE, AL REZULTATELOR OBȚINUTE ȘI AL CONCLUZIILOR DE ETAPĂ

Având în vedere înalta heterogenitate, etiologia multifactorială și anomaliile poligenice ale hipertensiunii arteriale, ne-am propus să identificăm un protocol de estimare eficientă a riscului cardiovascular pentru pacienții hipertensivi, utilizând indici aterogenici descoperiți în studiile din literatură, de asemenea și compararea datelor indicilor aterogenici cu software-il licențiat Qrisk2013 de cuantificare a evenimentelor cardiovasculare majore (infarct miocardic și accidentul vascular cerebral în următorii 10 ani).

O dată cu dezvoltarea noilor tehnologii de genetică moleculară, devenind posibilă genotiparea unui număr important de polimorfisme și asocierea acestora cu o serie de factori implicați în ateroscleroză, ne-am propus să ne aducem aportul la identificarea și compararea prezenței și frecvenței unor polimorfisme cunoscute la un grup de pacienți diagnosticați cu hipertensiunea arterială și alte afecțiuni asociate.

4.1 Cuantificarea riscului aterogenic la pacienții hipertensivi din lotul de studiu, prin utilizarea unor indici și markeri specifici pentru ateroscleroză (Studiu I)

4.1.1 Obiective și strategii de cercetare pentru studiul I

Obiectivele au cuprins:

- compararea parametrilor biochimici ai grupelor de pacienți aflați în studiu și ai indicilor aterogenici considerați eficienți de către studiile de specialitate, în vederea evidențierii celui mai eficient indicator al aterogenezei atât din punct de vedere al riscului estimat precum și a sensibilității față de parametrii biochimici;
- cuantificarea nivelului de stres al pacienților aflați în studiu și confruntarea datelor obținute cu indicii de aterogeneză;
- dozarea proteinuriei și calcularea ratei filtrării glomerulare în vederea evidențierii statusului renal actual al pacienților hipertensivi;
- identificarea unui protocol de cuantificare a riscului de aterogeneză precum și a riscului de evenimente cardiovasculare majore la pacienții hipertensivi cu sau fără boli cronice asociate.

Studiile epidemiologice (**Kovacic S. și Bakran M., 2012 [4])** au arătat că mai mulți factori contribuie la debutul și progresia aterosclerozei, dintre aceștia, vârsta, sexul și predispoziția genetică fiind parametri nemodificabili. Deși genul masculin este un important factor de risc, ateroscleroza devine o problemă majoră și pentru femeile care iau contraceptivele orale crescându-le riscul și mai mult atunci când sunt utilizate și după menopauză, de obicei simptomele apărând cu aproximativ 10 ani mai târziu **(Barton M. și colab., 2002 [5])**. Nivelurile crescute ale colesterolului seric reprezintă principalul factor de risc pentru ateroscleroză, mai ales fracția LDL, amintind și de alți factori de risc pentru ateroscleroză: fumatul, scăderea toleranței la glucoză, obezitatea și sedentarismul **(Fruchart și colab., 2004 [6]).** Prevalența sindromului metabolic în rândul țărilor dezvoltate este în creștere datorită creșterii incidenței obezității. Obezitatea centrală joacă un rol cheie în patogeneza sindromului metabolic: promovează inflamația, hipertensiunea arterială și dislipidemia și duce la dezvoltarea diabetului zaharat de tip 2 și aterosclerozei. Corectarea și controlarea acestora înseamnă un risc mai mic de dezvoltare sau progresie a aterosclerozei **(Grundy S. și colab., [7]).**

Estimarea riscului aterogen ora actuală se realizează în funcție de studiul pe care se bazează, ca de exemplu compararea colesterolul total, raportul HDL/LDL, calculatoare ce utilizează fie formulă Friedewald sau formula Iraniană, raportul colesterol total/HDL și multe altele. Indicele aterogenic plasmatic (AIP) este un instrument de evaluare a riscului aterogenetic, acesta se bazează pe o formulă care utilizează nivelul TG și a HDL exprimat fie în mmol/L fie în mg/dl **(MacMahon S. și colab., 2004 [8]; Ahmadi S. și colab., 2008 [9]).** Riscul de a dezvolta boli cardiace coronariene este crescut la pacienții cu niveluri ridicate ale TG și mutații ale genei HL ce influențează structura și sinteza HDL precum și creșterea TG **(Thuren T., 2000 [10]).** Hipertrigliceridemia va crește activitatea lipazei hepatice HL și consecutiv va denatura HDL, cu fiecare degradare a 1mg de HDL va determina o creștere cu 2% a riscului de boală coronariană **(Njajou O. și colab., 2009 [11]; Libby P., 2002 [12]).**

Pentru cuantificarea riscului aterogen și cel al riscului bolilor cardiovasculare ne-am propus determinarea raportului dintre TC/HDL, raportul de LDL/HDL și valorile AIP (indexul aterogenic al plasmei) între fiecare grup de pacienți hipertensivi și grupul de control.

În comparația eficienței acestora am utilizat un soft medical licențiat și autorizat QRisk^{R}2-2013 pentru estimarea riscului de evenimente cardiace majore pentru următorii 5 sau 10 ani (un program ce utilizează date din anamneză, examen obiectiv și investigații paraclinice), util de asemenea și pentru diagnosticarea pacienților care nu au fost încă diagnosticați **(Hippisley-Cocs J. și colab., 2008 [13]).**

O altă metodă folosită în cercetările noastre, utilă în stratificarea riscului de boli moștenite, a fost utilizarea chestionarului familial pentru întocmirea pedigreului familial pentru toți pacienții aflați în studiu (Fig. 21). Prin realizarea pedigreului s-a urmărit transmiterea unui caracter patologic (hipertensiunea arterială, diabet zaharat, hipercolesterolemia, boală renală ș.a.) din ascendență (străbuni, bunici, părinți) în descendență (copii și colaterali – veri de diferite grade).

Deoarece stresul prelungit poate fi un factor de risc important, am inclus și un chestionar psihologic de evaluare a stresului, având în vedere că numeroase studii leagă stresul cronic de exacerbarea simptomatologiei bolilor cronice în special a hipertensiunii arteriale, a diabetului zaharat și a aterogenezei. Semnele stresului prelungit se pot manifesta la nivel cognitiv (decizii greșite), emoțional (agitație, iritabilitate, anxietate, senzația de izolare sau chiar depresie), fizic (amețeli, diaree, constipație, greață, cefalee, vărsături, angină pectorală sau tahicardie) și comportamental (mâncat peste măsură, aport excesiv de tutun sau alcool, insomnii, ticuri nervoase ș.a.) **(Bao A., 2008 [14]).**

4.1.2 Rezultatele studiului I

Rezultatele pedigreului familial, realizat pe trei generații, ne-a furnizat informații importante privind riscul familial din ascendență sau pe linie colaterală, pentru anumite afecțiuni și ne-a indicat rezultate diferite pentru fiecare grup de studiu în parte. Astfel s-a identificat o frecvență crescută a hipertensiunii arteriale în rândul genitorilor pentru grupul H2 (pacienți hipertensivi cu sindrom metabolic asociat) și grupul de studiu H3 (pacienți hipertensivi cu diabet zaharat tip II asociat) a fost mai mare față de grupul H1 (pacienți hipertensivi) și grupul control. Pentru grupul H4 (pacienți hipertensivi cu diabet și boală renală) studiul genealogic a scos in evidență o indicență mare în rândul descendeților a transmiterii diabetului zaharat și a hipertensiunii arteriale (Fig. 1).

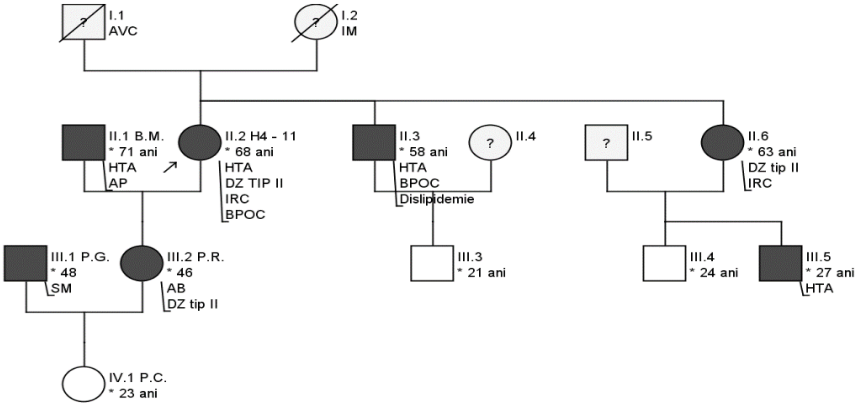


Fig. 1. **Pedigreu al unui pacientului identificat cu nr. 11 din grupul de studiu H4**
(se poate observa transmiterea diabetului zaharat (DZ) în descendență)

Datele obținute din prelucrarea punctajului chestionarelor de stres a indicat un nivel al stresului foarte ridicat pentru pacienții hipertensivi din grupurile de studiu care au asociat și alte boli cronice, cele mai mari valori înregistrându-se pentru grupul H4 (Fig. 2).

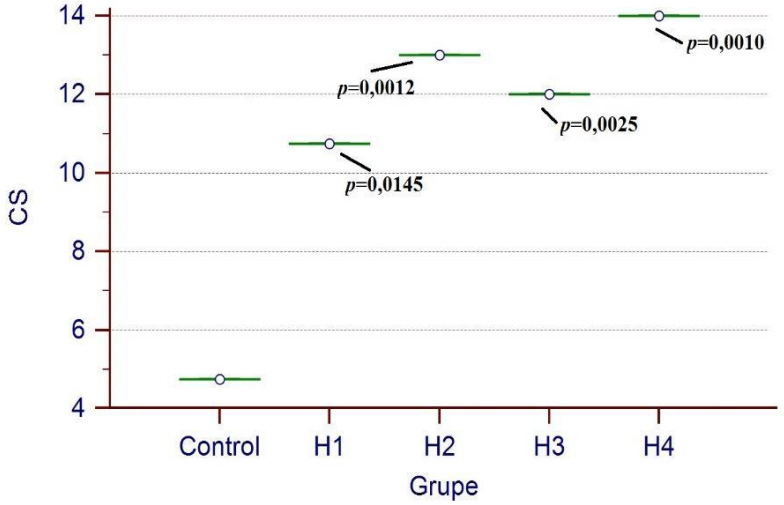


Fig. 2. **Interpretare statistică a punctajului chestionarului de stres**

(se observă un punctaj ridicat pentru toate grupurile de studiu raportat la grupul control)

Toți parametri biochimici determinați (colesterol total, trigliceride, HDL, LDL, glicemie, creatinină, nivelul proteinuriei și rata filtrării glomerulare au) pentru lotul de studiu au fost vizibil modificate față de grupul de control.

În mod particular rezultate foarte modificate ale fracțiunilor lipidice s-au înregistrat pentru grupul de pacienți hipertensivi cu sindrom metabolic (grupul de studiu H2). Pentru pacienții grupului de studiu H4 (pacienți hipertensivi cu boală renală și diabet) s-a determinat albuminurie clinică, având în vedere afectarea renală (Tabel I).

Tabelul I. **Date biochimice a grupului de studiu H4, comparativ cu grupul de control**

Parametri	**Grupul de control**		**H_4**		***p***	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
CT (mg/dl)*	186,1±11,2	188,1±10,2	244,8±46,2	252,9±51,1	0,0147	0,0125
TG (mg/dl)*	122,8±9,8	138,3±9,6	262,2±31,7	281,5±46,5	0,0255	0,0261
LDL colesterol (mg/dl)*	126,4±7,5	124,2±8,4	172,1±28,5	174,2±11,8	0,0169	0,0256
HDL colesterol (mg/dl)	58,1±2,8	52,1±4,4	42,4±48,2	36,3±12,3	0,0259	0,0169
Glicemie (mg/dl)*	88,3±1,68	92,3±2,4	298,6±22,1	286,1±28,4	0,0048	0,0158
Creatininăserică(mg/dl)*	0,84±0,18	0,92±0,12	5,2±0,73	5,8±0,86	0,0011	0,0098
Rap.albumină/creatinină(mg/g)	18±1,5-N	20±2,4-N	242±11,7-A	260±10,2-A	0,0059	0,0185
RFG (ml/min/1,73m^2)	118±2,2	120±3,4	66±4,8	58±8,2	0,0198	0,0194

Legendă:

**= media+DS, Valoarea lui p<0,05 considerat semnificativă (S), p>0,05 considerat nesemnificativ (NS); Raportul albumină-creatinină: N-valori normale, M-prezenţa microalbuminuriei, A-proteinurie clinică.*

În ceea ce privește markerul aterogenic indicat și de studiile recenteca fiind unul din cei mai buni indici de cuatificare a riscului de ateroscleroza – indicele aterogenic al plasmei (AIP – atherogenic index of plasma) ne-a furnizat date importante pentru pacienții noștri din lotul de studiu. Pentru grupul de hipertensivi cu sidrom metabolic, având în vedere faptul că pentru acest grup fracțiunile lipidice au avut valori foarte mari, AIP a fost cel mai mare, cu valori ușor mai ridicate pentru pacienții de gen masculin (Fig. 3).

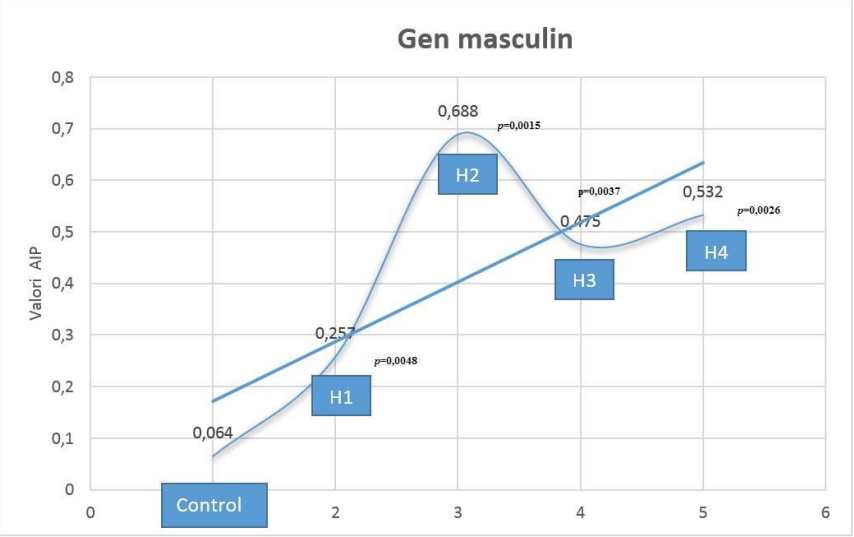


Fig. 3. **Analiză statistică a valorilor indexului AIP pentru pacienții de gen masculin din lot** (ne indică un **p**=0,0015 ceea ce arată o semnificație statistică importantă pentru grupul H2 față de grupul control și față de restul grupurilor de studiu)

Riscul de evenimente cardiovasculare viitoare l-a calculat cu software-ul licențiat Qrisk-2013 care ne indică valori procentuale pentru acest risc și cuatifică probabilitatea pentru următorii 10 ani pentru infarct miocardic și accidente vasculare cerebrale (Fig. 4).

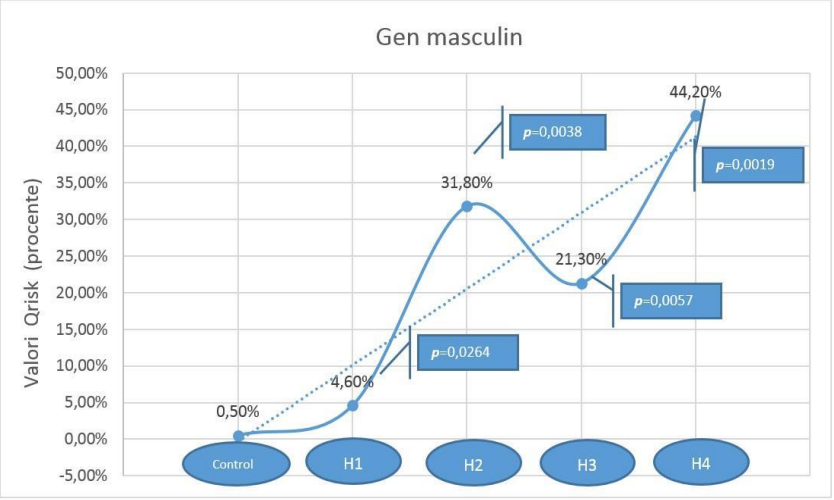


Fig. 4. **Valori procentuale ale riscului de a dezvolta evenimente cardiace majore** **(**pentru următorii 10 ani (folosind softul Qrisk-2013), datele exprimate sunt pentru genul masculin)

Pentru grupurile de studiu valorile au fost modificate față de grupul control, riscul cel mai mare avându-l grupul pacienților hipertensivi cu media de vârstă mai mare și cu multiple afecțiuni asociate, grupul de studiu H4 (cu un risc de a dezvolta boli cardiovasculare de peste 40%), cu valori mai ridicate pentru pacienții de gen masculin..

4.1.3 Concluzii de etapă ale studiului I

- Prin compararea fiecărui parametru important din studiul nostru, implicat în mod direct sau indirect în inițierea sau întreținerea aterogenezei precum și a bolilor cardiovasculare, pentru fiecare grup de pacienți hipertensivi am reușit să punem in evidentă importanța AIP și a scorului QRisck în practica medicală a clinicianului, putând fi un instrument util și economic pentru diagnosticarea, tratamentul și prevenția bolilor cardiovasculare cronice și a evenimentelor cardiace majore (în special IM și AVC).
- Microalbuminuria poate fi utilă pentru estimarea statusului renal dar și pentru reglarea tratamentului antihipertensiv, știut fiind faptul că la valori mici este reversibilă sub un tratament optim.
- Dacă pe langă indicele AIP și scorul Qrisk asociem și punctajul chestionarului de stres obținem o imagine clinico-medicală și mai corectă a pacientului analizat, reușind astfel să presonalizăm mijloacele terapeutice abordate.
- Din acești indici prezentați în studiu se poate constitui un protocol eficient de prevenție pentru bolile cardiovasculare și pentru că fiecare indice este specific pentru un anumit stadiu al bolii hipertensive și ateromatoase se pot asocia și împreună devin un instrument mai optim de diagnostic preventiv.

4.2 Determinarea valorilor plasmatice ale paraoxonazei umane 1 (PON1) pentru pacienții hipertensivi al căror risc familial de boli cardiovasculare este cel mai crescut și corelarea rezultatelor obținute cu valorile indicilor de ateroscleroză (Studiul II)

4.2.1 Obiective și strategii de cercetare studiul II

Obiectivele au cuprins:

- selectarea pacienților cu riscul cel mai mare de boli cardiovasculare utilizând pedigreul personal și familial;
- determinarea valorilor indicelui aterogenic al plasmei (AIP);
- determinarea valorilor paraoxonazei umane 1 (PON1);
- suprapunerea rezultatelor indicilor și markerilor de ateroscleroză.

Cele mai recente cercetări genetice **(Bergmeier și colab., 2004 [15])** au arătat că, din familia paraoxonazelor (PON1, PON2 și PON3) paraoxonaza umană 1 joacă un rol important în protejarea moleculelor LDL și HDL de a fi oxidate de radicalii liberi. O activitate serică scăzută a PON1 este corelată cu un risc crescut de boli coronariene, infarct miocardic și ateroscleroză carotidiană. Prin urmare, este direct implicată în procesul aterogenezei și al riscului de boli cardiovasculare.

Pentru a pune în evidență acuratețea indicilor aterogenici am utilizat și în acest studiu softul medical licențiat QRiskR2-2013, ale cărui valori le-am comparat cu valorile AIP și PON1.

4.2.2 Rezultatele studiul II

Din numărul inițial de pacienți aflați în studiu (271), s-au selectat 120 de subiecți hipertensivi, datorită limitării financiare a studiului (costuri ridicate ale kiturilor PON1), care au împărțiți similar ca și în studiul precedent respectându-se criteriile de selecție ale vârstei și bolilor cronice asociate. Cele patru grupe de studiu le-am notat astfel: grupul I (denumit în continuare H1) format din 30 de pacienți hipertensivi nou-descoperiți (14 gen masculin și 16 gen feminin), cu vârsta cuprinsă între 35-45 de ani fără tratament cronic; grupul II (H2) s-a constituit din 30 de subiecți (17 gen masculin și 13 gen feminin) diagnosticați cu hipertensiune arterială, scăderea toleranței la glucoză, obezitate (sindrom metabolic); grupul III (H3)a cuprins tot 30 de pacienți (11 gen masculin și 19 gen feminin) hipertensivi și cu diabet zaharat tip II; grupul IV (H4) a cuprins 30 pacienți (13 gen masculin și 17 gen feminin) hipertensivi

cu diabet zaharat tip II și afectare renală. Grupul de control a inclus 25 de subiecți sănătoși clinic (15 gen masculin și 10 gen feminin).

După obținerea datelor PON1 am calculat pentru grupurile de pacienți hipertensivi aflați în studiu și indicele aterogenic al plasmei (AIP), care utilizează o formulă logaritmică și valori ale trigliceridelor (TG) și ale HDL colesterol. Ulterior pentru un rezultat optim de comparație a indicilor de risc cardiovascular și a valorilor PON1 am utilizat și în acest studiu calculatorul Qrisk2-2013.

Valorile PON1 pot fi ușor modificate de alimentație, exerciții, stres, medicamente și stilul de viață. Luând în considerare aceste condiții, rezultatele PON1 au fost obținute după două dozări diferite la un interval de 2-3 săptămâni. Valorile rezultate au fost apropiate și s-a făcut media celor două determinări.

Datele obținute ne-au indicat valori sub limita normală (70-100 ng/dl) ale paraoxonazei umane 1 (PON1) pentru toți pacienții lotului de studiu. Câțiva pacienți din grupul control au avut valori scăzute ale PON1 (50-65 ng/dl) fără a prezenta alte afecțiuni asociate, dar au prezentat risc moderat de boli cardiovasculare în ascendență (bunici cu hipertensiune, diabet zaharat sau sindrom metabolic).

Valorile cele mai scăzute s-au identificat pentru grupurile de pacienți hipertensivi cu afecțiuni asociate (grupurile de studiu H3 și H4) (Fig. 5).

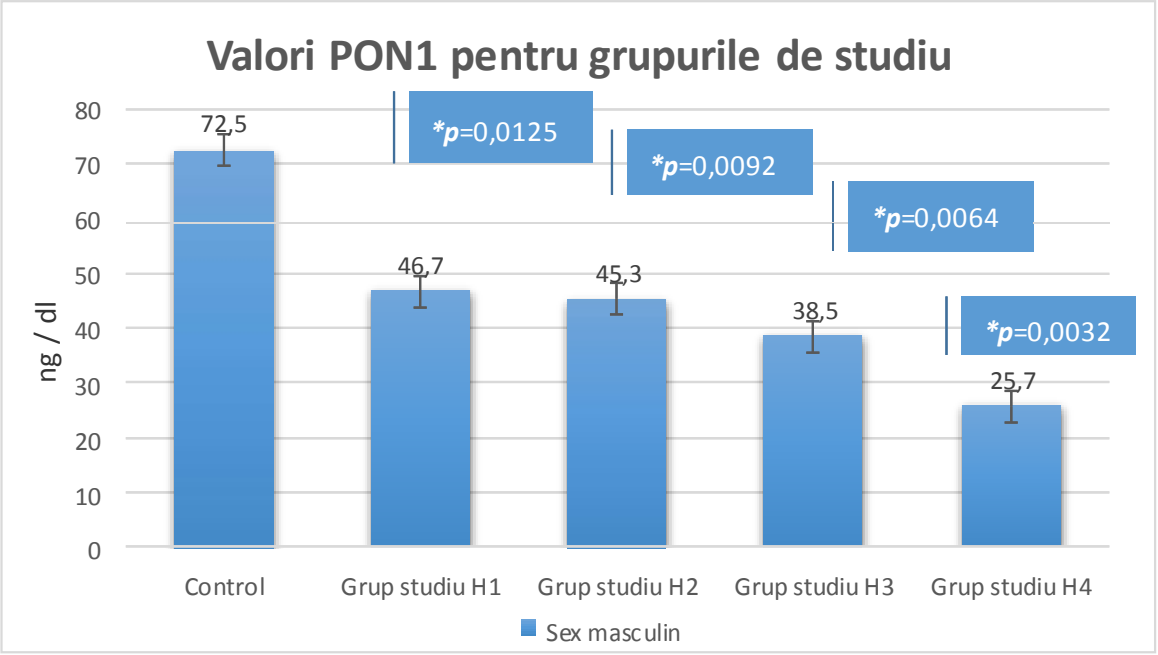


Fig. 5. **Valorile ale paroxonazei umane 1 (PON1)**
(exprimate ca medie pentru grupurile de studiu H1-H4 pentru genul masculin; *valoarea lui p<0,0001 (extrem de semnificativ statistic), valoarea lui p<0,001 (foarte semnificativ statistic), valoarea lui p<0,01 (semnificativ statistic) în comparație cu grupul control)

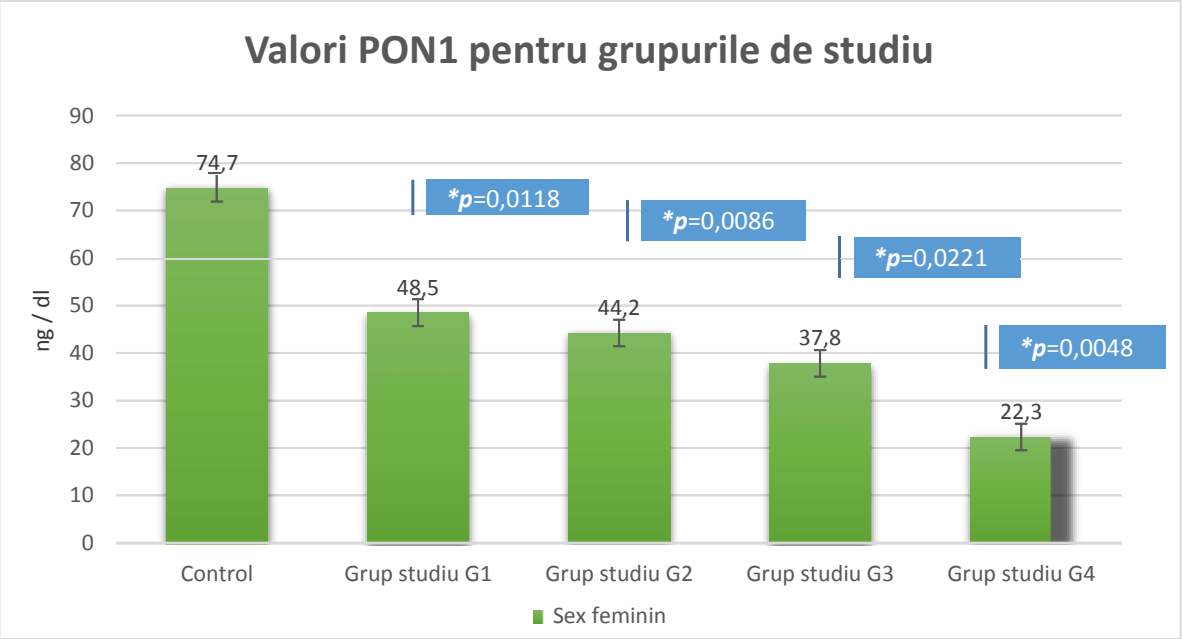


Fig. 6. **Valorile ale paroxonazei umane 1 (PON1)**
(exprimate ca medie pentru grupurile de studiu H1-H4 pentru genul feminin; *valoarea lui p<0,0001 (extrem de semnificativ statistic), valoarea lui p<0,001 (foarte semnificativ statistic), valoarea lui p<0,01 (semnificativ statistic) în comparație cu grupul control)

În grupul de studiu H1 (pacienți nou descoperiți cu hipertensiune arterială) valorile PON1 au fost în medie 46,7 ng/dl la persoanele de gen masculin (față de lotul control 72,5 ng/dl) și 48,5 ng/dl la persoanele de gen feminin.

La grupul H2 (pacienți hipertensivi cu sindrom metabolic) valorile PON1 au fost în medie 45,3 la persoanele de gen masculin (față de lotul de control 72,5 ng/dl) și 44,2 ng/dl la persoanele de gen feminin.

La grupul H3 (pacienți cu hipertensiune arterială și diabet zaharat tip II) valorile PON1 au fost în medie de 38,5 ng/dl la pacienții de hen masculin față de lotul de control de 72,5 ng/dl și 37,8 ng/dl la cei de gen feminin față de lotul control 74,7 ng/dl.

La grupul H4 (pacienți cu hipertensiune arterială, diabet zaharat tip II și boală renală) valorile PON1 au fost în medie 25,7 ng/dl față de lotul de control 72,5 ng/dl pentru persoanele de gen masculin și 22,3 ng/dl la persoanele de gen feminin față de lotul de control 74,7 ng/dl.

Se constată astfel valori ale lui p<0,01 fiind semnificativ din punct de vedere statistic la toate grupele de studiu (H1, H2, H3 și H4) față de lotul de control (Fig. 5 și Fig.6).

Față de valorile AIP și rezultatul softului Qrisk 2013, pentru pacienții din lotul de studiu, valorile PON1 au fost mai scăzute pentru pacienții de gen feminin, așa cum se poate observa în fig. 6 pentru grupul de pacienți hipertensivi cu boli asociate (grupurile H3 și H4) față de pacienții de gen masculin din aceleași grupuri de studiu (Fig. 7).

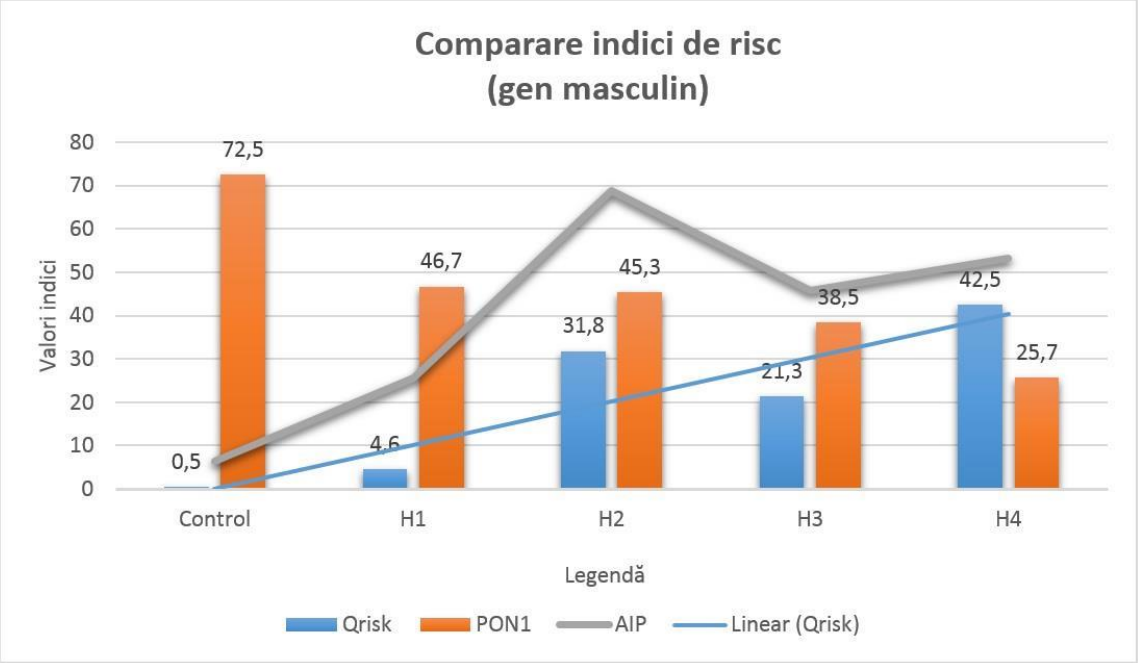


Fig. 7. **Compararea indicilor de risc aterogen cu valorile PON1**
(pentru genul masculin al grupelor de studiu)

Scorul Qrisk confirmă rezultatele PON1, indicând un risc foarte crescut de boli cardiovasculare pe termen lung pentru grupul de pacienți hipertensivi cu boli cronice asociate (diabet zaharat și afectare renală). Se infirmă astfel rezultatele din literatură, conform cărora activitatea PON1 crescută este asociată cu cote în scădere a aterosclerozei.

4.2.3 Concluzii de etapă ale studiului II

- Riscul aterogenic poate fi ușor estimat doar prin utilizarea valorilor fracțiunilor lipidice din putându-se calcula indicii de risc cardiovasculari.
- Indicele aterogenic (AIP) este cel mai sensibil la valorile fracțiunilor lipidice. Daca asociem acest index cu determinarea valorilor PON1 atunci avem o și mai acuratețe privind estimarea riscului de a dezvolta boli cardiovasculare.
- Prin evaluarea datelor obținute și făcând legătura cu cele două cele mai noi și utile instrumente medicale, nivelurile AIP și PON1, putem estima riscul pacientului pentru eventualele evenimente CV în anii următorii.
- Valoarea PON1 este mai precisă decât AIP pentru riscul cardiovascular, chiar dacă valorile PON1 pot fi influențate de mai mulți factori (ce pot schimba valorile sale cu câteva procente) indică totuși cu exactitate riscul cardiovascular.

- Dacă suprapunem rezultatele PON1 cu cele ale scorului Qrisk, se observă o similitudine în rezultate, indicând la fel riscul mare de evenimente majore CV pentru pacienții cu mai mulți factori de risc.
- PON1 este mult mai sensibil ca determinare a riscului aterogenic și de boli CV viitoare chiar și la pacienții cu mai puțini factori de risc.
- Determinarea valorilor PON1, poate constitui un instrument de cuantificare util și eficient pentru riscul de aterogeneză și de a dezvolta în timp boli cardiovasculare.

4.3 Analiza genetică a polimorfismului genelor din sistemul renină-angiotensină (SRA) și corelarea rezultatelor cu hipertensiunea arterială și ateroscleroza (Studiul III)

4.3.1 Obiective și strategii de cercetare studiul III

Obiectivele au curpins:

- identificarea prezenței și frecvenței unor polimorfisme cunoscute în genele care fac parte din sistemul RAS la un grup de pacienți heterogeni diagnosticați cu hipertensiune dar și cu alte boli asociate;
- suprapunerea valorilor indicilor de risc pentru ateroscleroză (valorile plasmatice ale PON1, valorile AIP și valorile scorului de boli cardiovasculare viitoare Qrisk) cu rezultatele frecvenței polimorfismului genetic.

Sistemul renină-angiotensină-aldosteron este implicat in homeostazia sodiului și potasiului precum și în menținerea tensiunii arteriale. Renina este secretată la nivelul rinichilor atunci când în organism tensiunea arterială înregistrează scăderi mari, crescând presiunea arterială printr-un mecanism complex vasoconstrictor **(Paul M. și colab., 2006[16]).**.

Lotul de pacienți (64) a fost selectat din grupul de subiecți hipertensivi din studiul anterior respectându-se notarea grupurilor de pacienți hipertensivi (H1-H4), pe criteriul pedigreului cu cel mai mare risc de boli cardiovasculare, urmărindu-se în ascendență prezența hipertensiunii arteriale, a diabetului zaharat tip II, a sindromului metabolic și a afecțiunilor renale.

AND-ul genomic a fost izolat din leucocite folosind Qiagen DNasy Blood isolation kit. Cantitatea de ADN obținută a fost verificată prin spectofotomerie utilizând spectofotometrul Nanodrop. Calitatea ADN a fost evaluată prin migrarea unei cantități de 10% din cea extrasă. O cantitate de aproximativ 50ng a fost folist pentru reacția de amplificare PCR.

Pentru acesta s-au folosit 12.5 µl PCR Mastermix Promega, 0,5 µM primeri și 2U de Taq polimerază Promega. Condițiile de amplificare au fost: 95°C timp de 10 min, urmată de 35 cicluri la 94°C-30 sec., 64°C (Met235Thr) timp de 30 sec., 57°C (Thr174Met), 59°C (A2350G), 1,5 minute la 72°C urmată de o extensie finală 10 min la 72°C.

Ampliconii obținuți au fost verificați prin migrarea în gel de agaroză de 1,5% a 10 µl din volumul reacției PCR. Cantitatea rămasă a fost supusă digestiei enzimatice cu *Tth111I* (pentru Met235Thr), *NcoI* (pentru Thr174Met) și *BstU1* (A2350G). Digestia enzimatică s-a

realizat conform recomandărilor furnizorului (Fermentas).

Pacienții homozigoți și heterozigoți au fost identificați prin migrare în gel de agaroză a fragmentelor obținute în urma digestiei. Mărimea fragmentelor corespunzătoare tipului normal și a celui mutant sunt următoarele:

4.3.2 Rezultatele studiului III

Analiza PCR-RFLP a permis identificarea pacienților din grupul analizat care prezintă mutația de interes și calculul riscului relativ conferit de prezența mutațiilor la pacienții investigați (Fig. 8 și Fig. 9).

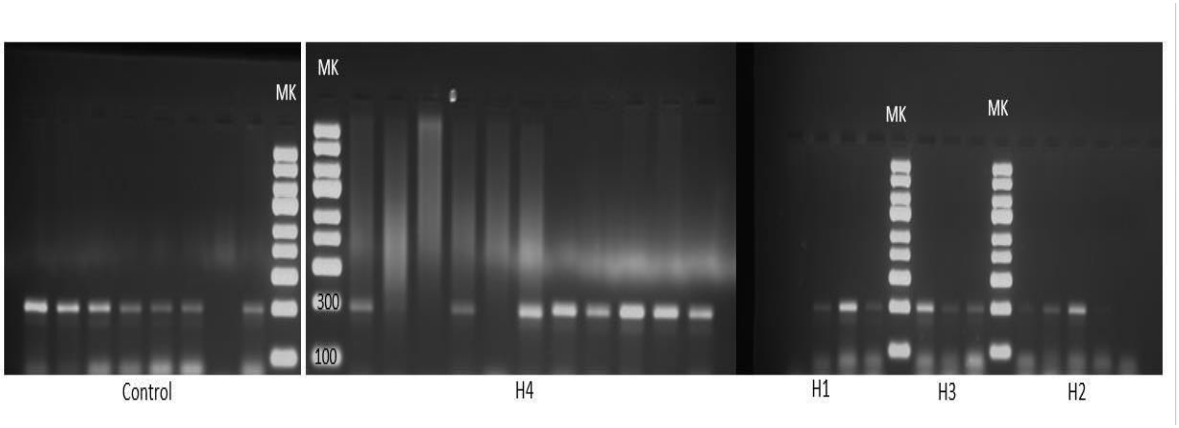


Fig. 8. **Amplificarea PCR a genei AGT-Met235Thr și obținerea fragmentului de interes de 165pb** (Mk=Marker ADN SM1551 Fermentas)

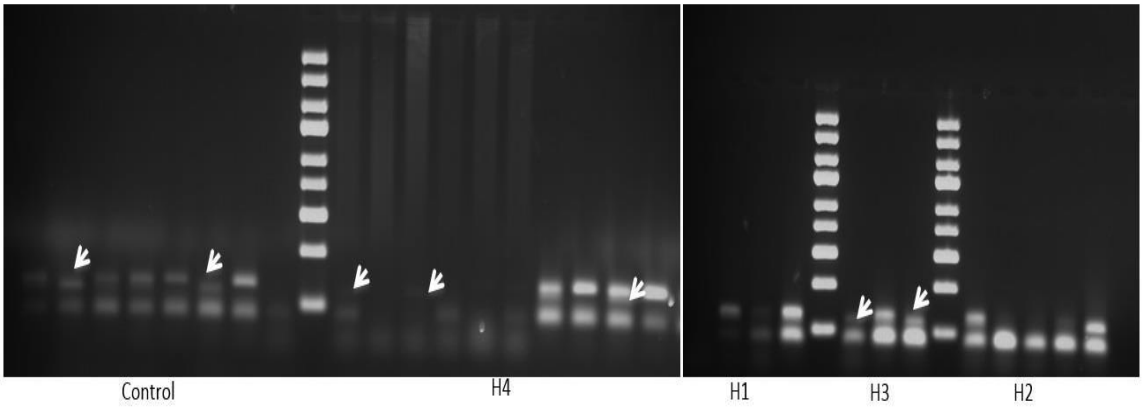


Fig. 9. **Digestia enzimatică a ampliconului genei AGT -Met235Thr și diferențierea homozigoților și heterozigoților din grupul de pacienți**
(Pacienții și respectiv gena mutantă (fragmentul de 141 pb) sunt indicate cu o săgeată. Mk=Marker ADN SM1551)

S-au identificat mutații ale genei AGT-Met235Thr și pentru subiecții din grupul control (Fig. 9), de asemenea frecvente mutații au fost pentru grupul H4, pacienții hipertensivi cu boli cronice asociate (diabet zaharat tip II și boala renală cronică).

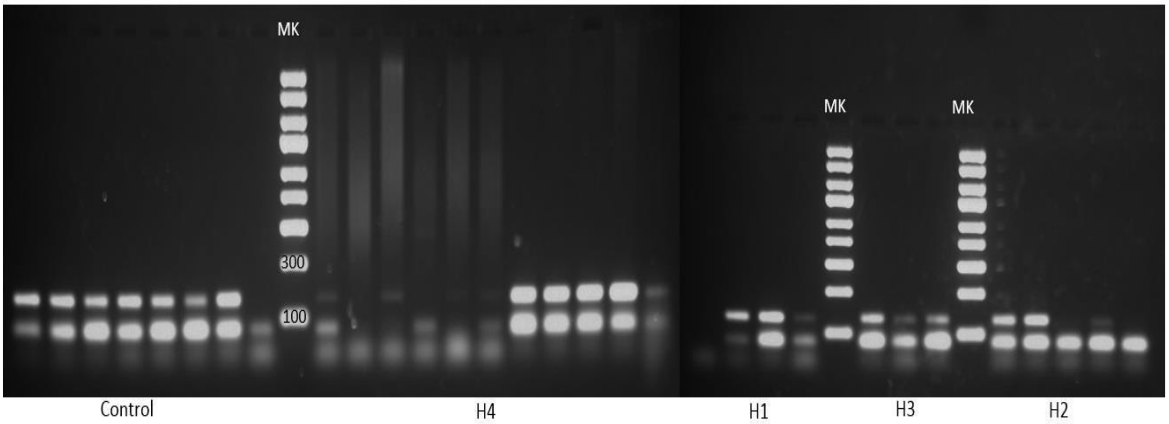


Fig. 10. **Amplificarea PCR a genei AGT-THR174MET și obținerea fragmentului de interes de 303pb** (Mk=Marker ADN SM1551 Fermentas)

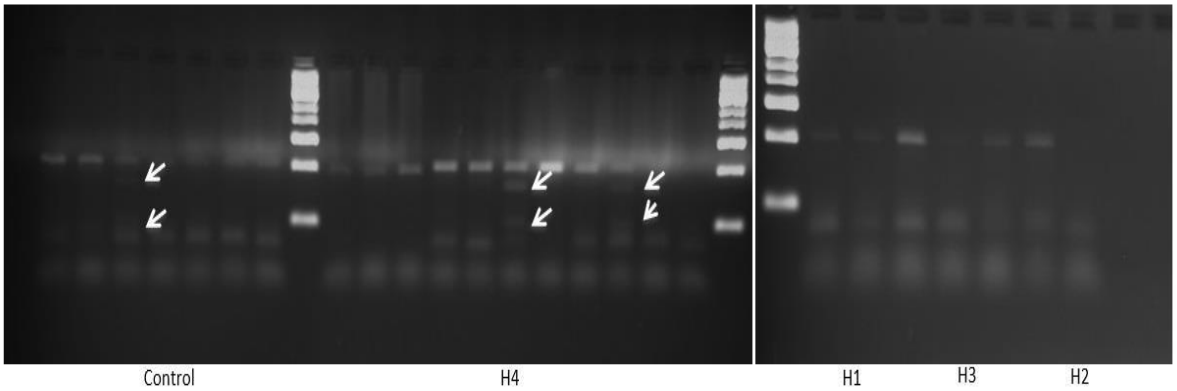


Fig. 11. **Digestia enzimatică a ampliconului genei AGT-THR174MET și diferențierea homozigoților și heterozigoților din grupul de pacienți**.
(Pacienții și respectiv gena mutantă (fragmentul de 211 și 92pb) sunt indicate cu o săgeată. Mk=Marker ADN SM1551)

După amplificare (Fig. 10), digestia enzimatică a ampliconului genei AGT-Thr174Met a pus în evidență prezența polimorfismului la mai mulți subiecți din grupul H4, precum și pentru un pacient de gen masculin din grupul control (Fig. 11).

Frecvența pacienților homozigoți și a celor heterozigoți la fiecare grup în parte este indicată în tabelul II. Se poate observa că și în cadrul grupului de control există pacienți homozigoți pentru unul dintre cele mai frecvent asociate polimorfisme cu hipertensiunea în sistemul de gene RAS.

Risc crescut se poate observa la pacienții hipertensivi cu diabet și boală renală cu o frecvență ridicată a genotipului homozigot T235/T235 ceea ce este în concordanță cu datele

din literatura de specialitate. Nu am detectat la nici un pacient din grupul luat în studiu prezența mutației A2350G.

Tabelul II. **Polimorfisme M235T-AGT și T174M-AGT în grupurile de studiu**

	M235T- AGT	**Raportul de homozigoți (T235/T235)/ heterozigoți (M2335/T235) (%)**	T174M- AGT	**Raportul de homozigoți (T174/T174)/ heterozigoți (T174/M174) (%)**
	Control	**20/0**	**Control**	**0/14,2**
Hipertensivi cu alte boli asociate	OR=0,85 96%CI (0,14-10,9), p=0,80	20/20	OR=0,25 95%CI (0,02-2,43), p=0,23	0/18,8
Hipertensivi esențiali	OR=2.05 96%CI (0,07-5,4), p=0,6	0/0	OR=3 95%CI (0,11-7,8), p=0,50	0/0
Diabetici	OR=0,37 95%CI (0,03-3,99), p=0,41	66,6/0	OR=0,37 95%CI (0,03-3,99), p=0,41	0/20
Sindrom metabolic	OR=3,2 95%CI (0,12-8,08), p=0,47	0/0	OR=0,25 95%CI (0,01-3,98), p=0,32	0/0

Din studiul pedigreurilor familiale s-au stabilit conexiuni între subiecții din grupul control și pacienții din loturile de studiu. De exemplu polimorfismul genei M235T-AGT a fost prezent și la mamă și la fiu, ambii fiind pacienți incluși în studiu (Fig. 12)

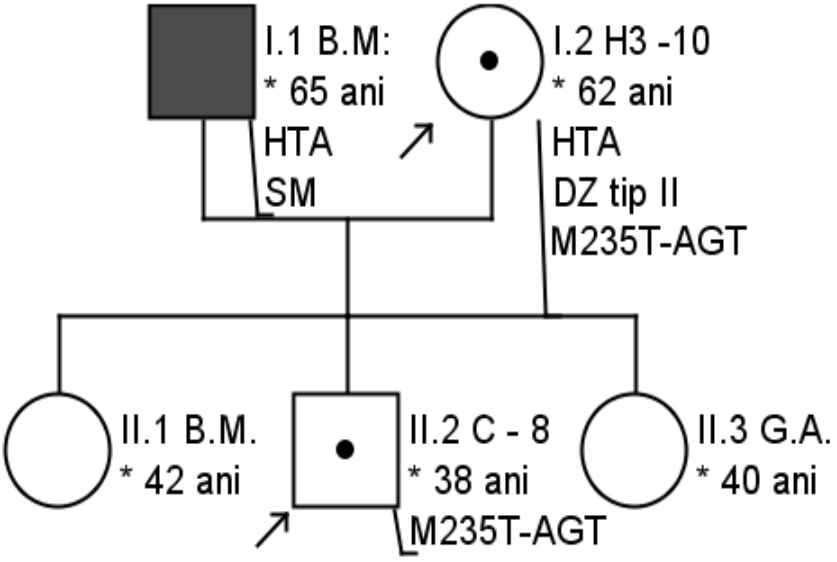


Fig. 12. **Polimorfism M235T pentru pacienții H3-10 și C-8**
(pacienții indicați prin săgeată, s-au aflat în grad I de rudenie; de asemenea datorită polimorfismului C-8 prezintă un risc crescut de a dezvolta HTA în viitor)

Frecvența polimorfismului genelor M235T și AGT-Thr174Met a fost cea mai crescută pentru grupul de studiu H4 (peste 30%), grup pentru care am calculat media și DS a valorilor plasmatice PON1, AIP și Qrisk2013 (Fig. 13).

În studiul nostru se poate observa că valorile PON1 sunt mai scăzute pentru grupul de pacienți cu frecvență mai mare a incidenței polimorfismului genelor sistemului RAA. Particularitatea studiului a fost că s-a descoperit că la subiecții din grupul studiu cu polimorfism genetic valorile PON1 au fost destul de scăzute față de ceilalți subiecți din grupul de studiu, de exemplu pacientul C-8 a avut cea mai mică valoare a PON1 48 ng/dl (știind că limitele normale sunt 70-100 ng/dl).

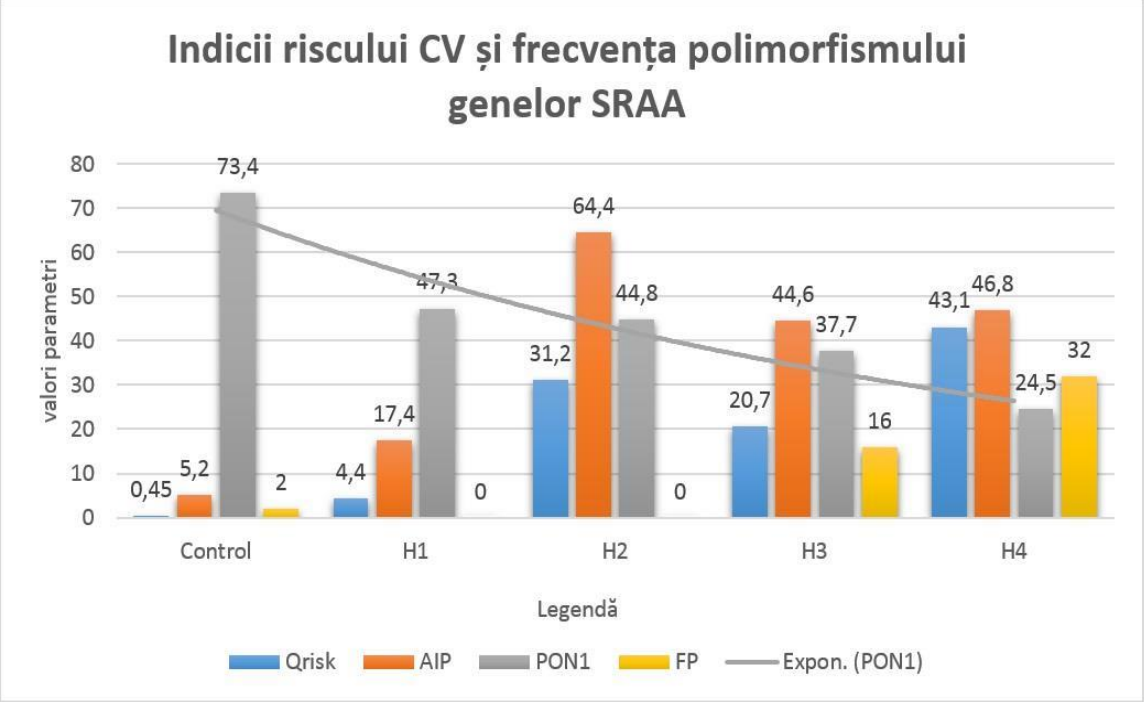


Fig. 13. **Asocierea rezultatelor valorilor indicilor de aterogeneză cu incidența polimorfismului studiat pentru fiecare grup de studiu**
(legendă: H1-H4 – grupurile de studiu; Qrisck – soft de calcul risc de BCV; AIP – indicele aterogenic al plasmei; PON1 – paraoxonaza umană 1; FP – frecvență polimorfism genetic)

Risc crescut se poate observa la pacienții hipertensivi cu diabet și boală renală cu o frecvență ridicată a genotipului homozigot T235/T235 ceea ce este în concordanță cu datele din literatura de specialitate. Nu am detectat la nici un pacient din grupul luat în studiu prezența mutației A2350G.

4.3.3 Concluzii de etapă

- Stabilirea unui panel de teste genetice ar putea deveni eficientă în calcularea riscului și în managementul ulterior al pacientului.

- Costurile necesare efectuării testelor genetice ridicate precum și heterogenitatea acestor boli au împiedicat găsirea unui panel potrivit de teste care să aibă relevanță clinică.
- Din pedigreul familial s-a putut observa foarte ușor incărcarea familială pentru fiecare pacient în parte pentru anumite afecțiuni.
- Asociat cu valorile PON1 și cu ajutorul softului Qrisk se poate cuantifica riscul de aterogeneză și cel al dezvoltării de boli cardiovasculare chiar înainte să se manifeste, prin stabilirea unui patern specific fiecărui pacient.
- Studierea polimorfismului este utilă atunci când în ascendență sunt frecvent evenimente cardiovasculare majore (infarct miocardic și accident vascular cerebral), dar costul determinării acestuia este prea ridicat ca să fie introdus într-un protocol de diagnostic precoce.
- Deși este prezent la anumite persoane, fără afecțiuni asociate, polimorfismele genelor M235T și AGT-T174M singure nu va determina apariția hipertensiunii arteriale.

V. DISCUȚII GENERALE

Problematica afecțiunilor cardiovasculare atât de răspândite la ora actuală, frecvența unor forme de boală cu evoluție latentă, nesesizată de bolnav și adesea descoperită întâmplător, dezastruoasă prin complicațiile grave la care ajung și costisitoare pentru societate și familie, devine complexă și evolutivă.

Date din literatură **(Fruchart și colab., 2004 [17])** subliniază faptul că nivelul crescut al colesterolului seric reprezintă un factor de risc pentru ateroscleroză la fel și nivelul crescut al fracțiunilor lipidice LDL. Indicele aterogenic al plasmei, după **(Younis N. și colab.[18])** este un instrument important de calcul al riscului aterogenic bazat pe o formulă ce utilizează valorile trigliceridelor și ale HDL colesterol.

Rapoartele LDL/HDL şi CT/HDL, potrivit lui **(Grover S. şi colab., 2003[19])** sunt bune predictoare pentru evenimentele cardiovasculare viitoare, însă nivelul seric al TG poate reprezenta singur un factor de risc important pentru evenimentele cardiovasculare viitoare.

Studiile recente **(Sied R. și colab., 2010[20])** au indicat faptul că raportul dintre TG/HDL transformat logaritmic poate estima riscul aterogenic mai bine decât toate celelalte. TG şi HDL reflectă perfect balanța dintre lipoproteinele aterogene și cele protectoare. Studiile clinice au arătat că indexul aterogenic al plasmei (AIP) poate estima și riscul cardiovascular, de asemenea acest index este sensibil și la tratamentul farmacologic, fiind un barometrul al reușitei terapeutice.

Valoarea AIP a fost cea mai mare pentru grupul H2 (pacienți cu hipertensiune gradul I/II, scăderea toleranței la glucoză, obezitate centrală, dislipidemie și microalbuminurie) indicând un risc de aterogeneză crescut, dar un scor QRisk mai mic față de grupul H4 unde sunt două boli cronice asociate pe lângă hipertensiunea arterială, semn că acest grup (H4) poate dezvolta evenimente cardiovasculare în următorii 10 ani mai frecvent și într-un procent mai mare. Însă procesul aterogenezei este mai activ la pacienții cu profilul lipidic foarte modificat cu valori foarte mari (H2) decât la pacienții cu boli asociate, dar cu un profil lipidic modificat cu valorii medii (H3, H4).

Cele mai recente cercetări genetice **(Bergmeier și colab., 2004 [21])** au arătat că, din familia paraoxonazelor (PON1, PON2 și PON3) paraoxonaza umană 1 joacă un rol important în protejarea moleculelor LDL și HDL de a fi oxidate de radicalii liberi. Prin urmare, este direct implicată în procesul aterogenezei și al riscului de boli cardiovasculare.

O activitate serică scăzută a PON1 este corelată cu un risc crescut de boli coronariene, infarct miocardic și ateroscleroză carotidiană.

Raportul albumină/creatinină ne-a indicat valoarea microalbuminuriei care, conform lui Boersa și colab. se poate corela direct cu hipertensiunea arterială și funcția renală. S-a dovedit că nivelul microalbuminuriei ne indică vechimea hipertensiunii până in momentul determinării precum și eficiența tratamentului antihipertensiv, fiind reversibilă pentru pacienții cu valori mici ale microalbuminuriei, semn că aparatul glomerular nu este încă distrus, deci nu există o afectare renală marcată, pe când la pacienții din grupurile H2, H3 și H4 valorile au fost mari, foarte semnificativ statistic față de grupul C indicând și afectare renală, fapt dovedit și de valorile estimative ale RFG, cu date asemănătoare celor din literatură.

În lotul nostru de studiu, toate rezultatele obținute pentru PON1 au fost semnificative din punct de vedere statistic, valorile cele mai mici s-au remarcat pentru grupul G4 (de exemplu pentru pacienții de gen masculin ai acestui grup valoarea ***p***=0,0032 este extrem de semnificativă). În acest grup, așa cum reiese și din anamneză, acești pacienți au avut mai mulți factori de risc asociați (vârsta mai mare decât celelalte grupuri, diabet zaharat vechi și afectare renală în diferite stadii cu albuminurie clinică, așa cum s-a putut observa și în studiul I). Aceste fapte sunt confirmate și de **Gugliuci** și echipa sa [22], precum și de alți oameni de știință, care, de asemenea, au recunoscut că din familia de paraoxonaze (PON1, PON2 și PON3), cea mai activă și importantă în procesul de aterogeneză este PON1 cu toate variantele sale de polimorfism în diverse populații.

Deși pentru grupul H2 valorile AIP au fost ridicate, indicând un proces aterogenic crescut, valorile PON1 au fost scăzute pentru acest grup, dar mai mari decât pentru grupul de studiu H4. Scorul Qrisk a confirmat rezultatele PON1, indicând un risc foarte crescut de boli cardiovasculare pe termen lung pentru grupul de pacienți hipertensivi H4, dintre aceștia cu valori mai mari fiind pacienții de gen masculin (>40% scor Qrisk).

Variante ale genelor sistemului renină-angiotensină joacă un rol important în patogeneza hipertensiunii arteriale esențiale și a bolilor cardiovasculare. Sunt studii **(Hillege H. și colab. 2006[23])** care artă că polimorfismul acestor gene (ACE ID, AGT T207M, M268T, AGT1R) este puternic corelat cu incidența crescută pentru hipertensiune la pacienții care prezintă aceste mutații, fiind necesară stabilirea unui panel de teste genetice care ar putea deveni eficiente în calcularea riscului și în managementul ulterior al pacientului. Până în prezent costurile necesare efectuării testelor genetice sunt ridicate precum și heterogenitatea acestor boli au împiedicat găsirea unui panel potrivit de teste care să aibă relevanță clinică.

Datele rezultate din cele trei studii relevă faptul că la pacienții cu media de vârstă mai mică și debut de boală hipertensivă (H1) parametrii biochimici studiați au fost modificați ușor dar semnificativ statistic față de grupul control iar la celelalte grupuri de studiu modificările

au fost marcate având în vedere vechimea bolii precum și bolile cronice asociate. Aceste date au fost importante pentru cuantificarea riscului aterogenic și cel al evenimentelor cardiovasculare pe care ulterior le-am introdus în formulele de calcul al riscurilor.

Pe măsură ce datele din literatură confirmă asocierea polimorfismelor genetice cu hipertensiunea sau ateroscleroza, crește și importanța acordată terapiilor personalizate și a testărilor genetice în cazul acestor boli. Datorită datelor neconcludente din literatură rolul testelor genetice este încă discutabil.

VI. CONCLUZII GENERALE

- Prin compararea fiecărui parametru important din studiul nostru, implicat în mod direct sau indirect în inițierea sau întreținerea aterogenezei precum și a bolilor cardiovasculare, pentru fiecare grup de pacienți hipertensivi am reușit să punem in evidentă importanța AIP și a scorului QRisck în practica medicală a clinicianului, putând fi un instrument util și economic pentru diagnosticarea, tratamentul și prevenția bolilor cardiovasculare cronice și a evenimentelor cardiace majore (în special IM și AVC).
- Riscul aterogenic poate fi ușor estimat doar prin utilizarea valorilor fracțiunilor lipidice din care se pot calcula indicii de risc cardiovascular. Din studiul nostru tragem concluzia că AIP, dintre indicii aterogenici este cel mai sensibil la valorile fracțiunilor lipidice. Daca asociem acest index cu determinarea valorilor PON1 atunci avem o și mai mare acuratețe privind estimarea riscului de a dezvolta boli cardiovasculare.
- Prin evaluarea datelor obținute și făcând legătura cu cele două cele mai noi și utile instrumente medicale, nivelurile AIP și PON1, putem estima riscul pacientului pentru eventualele evenimente CV în anii următorii, fiind, de asemenea, o anchetă personalizată.
- PON1 este mai precisă decât AIP pentru riscul cardiovascular (lucru indicat de nivelurile scăzute ale PON1 plasmatic pentru pacienții tineri din studiul nostru, care sunt aparent fără risc cardiovascular).
- Chiar dacă valorile PON1 pot fi influențate de mai mulți factori (putându-i schimba valorile sale cu câteva procente) poate indica cu exactitate riscul cardiovascular.
- Suprapunerea rezultatelor PON1 cu cele ale scorului Qrisk, evidențiază o similitudine în rezultate, indicând riscul mare de evenimente majore cardiovasculare pentru pacienții cu mai mulți factori de risc; PON1 este mult mai sensibil ca determinare a riscului aterogenic și de boli CV viitoare chiar și la pacienții cu mai puțini factori de risc (grupul hipertensiv G1 și grupul control).
- Determinarea valorilor PON1 poate constitui un instrument de cuantificare util și eficient pentru riscul de aterogeneză și de a dezvolta în timp boli cardiovasculare.
- Variante ale genelor sistemului renină-angiotensină joacă un rol important în patogeneza hipertensiunii arteriale esențiale și a bolilor cardiovasculare.
- Polimorfismul genelor ACE ID, AGT T207M, M268T și AGT1R este puternic corelat cu incidența crescută pentru hipertensiune la pacienții care prezintă aceste mutații, fiind

necesară stabilirea unui panel de teste genetice care ar putea deveni eficiente în calcularea riscului și în managementul ulterior al pacientului.

- Până în prezent costurile necesare efectuării testelor genetice sunt ridicate precum și heterogenitatea acestor boli, fapt ce a împiedicat găsirea unui panel potrivit de teste care să aibă relevanță clinică.
- Riscul de evenimente cardiovasculare majore, prin accentuarea în timp a aterogenezei și hipertesniunii arteriale până în punctul când în organism se produc leziuni ireversibile în sistemul cardiovascular, se poate cuantifica prin simple calcule utilizand date din anamneză sau mai exact folosindu-ne de realizarea unui pedigreu familial, valori ala parametrilor biochimici uzuali (profil lipidic, glicemie, creatinină etc.), asocierea aceste date cu valorile PON1, ale cărui limite permit detectarea unor valori foarte mici (< 2,5 ng/dl) chiar și la persoanele aparent sănătoase și fără factori de risc se poate detecta din timp riscul real de aterogeneză și cel al bolilor cardiovasculare.

VII. CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Lucrarea de față contribuie la evidențierea riscului cardiovascular prin identificarea unui protocol de estimare eficientă a riscului aterogenic pentru pacienții hipertensivi, utilizând indici aterogenici identificați în literatură.

2. Aportul la identificarea și compararea prezenței și frecvenței unor polimorfisme la pacienții cu hipertensiune arterială și boli asociate.

3. Compararea datelor indicilor aterogenici cu softul licențiat Qrisk de cuantificare a riscului de a dezvolta evenimente cardiace majore pentru următorii 10 ani (ClinRisk-Qrisk 2013).

4. Realizarea unui protocol de prevenție utilizând markerii aterogenezei, valorile PON1 și softul de calcul al riscului cardiovascular Qrisk-2013 – protocol pentru cea mai bună metodă estimativă a celor două probleme importante aterogeneza și evenimentele cardiovasculare.

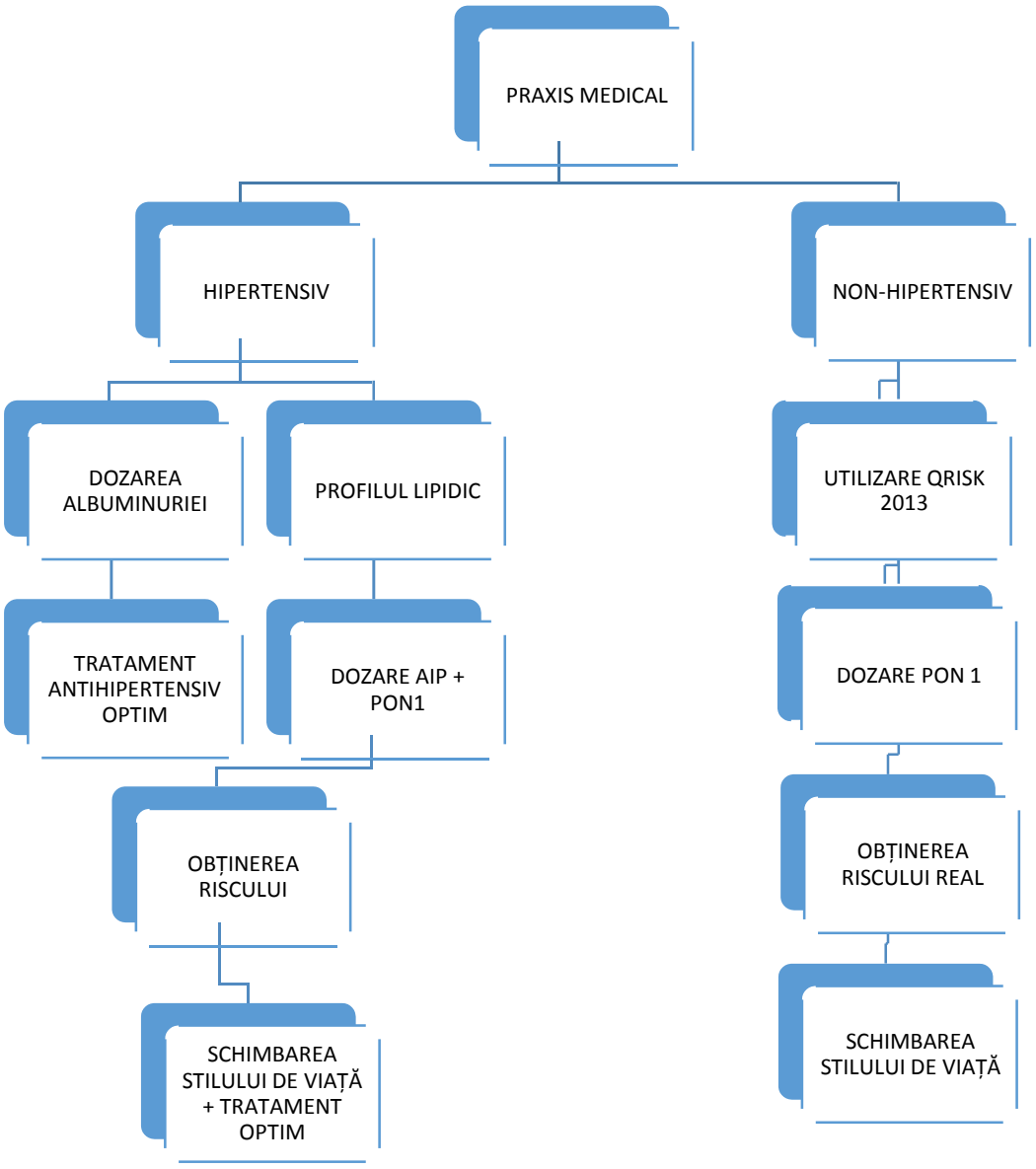
5. Cuantificarea riscului de încărcare familială pentru bolile cardiovasculare prin studiul pedigreului familial.

6. Corelarea rezultatelor obținute prin estimarea markerilor biochimici obținuți cu scorul obținut din completarea chestionarului de stres.

7. Evaluarea stresului cronic prin exacerbarea simptomatologiei bolilor cronice; propun îmbunătățirea scorului obținut prin atitudine activă psihologică, putând astfel crește calitatea vieții pacienților.

8. Contribuții la stratificarea riscului cardiovascular de boli moștenite prin utilizarea chestionarului de istoric familial în construirea pedigreului.

PROTOCOL DE CUATIFICARE A RISCULUI ATEROGENIC LA PACIENȚII HIPERTENSIVI



BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Dorobantu M, Darabont R, Badila E, Ghiorghe S. - *Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in Romania: Results of the SEPHAR Study*, Int J Hypertens. 2010 Feb 1; 2010:970694

2. Randall C Thompson et al. - *Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations*, The Lancet, Volume 381, Issue 9873, Pages 1211 - 1222, 6 April 2013.

3. Gibbons GH, Dzau VJ,. *Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension*. Hypertension 1991;18(5 Suppl):III115-21

4. Kovacic S., Bakran M. - Genetic Susceptibility to Atherosclerosis, Stroke Research and Treatment Volume 2012 (2012), Article ID 362941, 5 pages.

5. Barton M, Dubey RK, Traupe T: *Oral contraceptives and the risk of thrombosis and atherosclerosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2002; 11(3):329-32.

6. Fruchart JC, Kastelein JP, Duriez P: *Atherosclerosis: Evolving Vascular Biology and Clinical Implications New Risk Factors for Atherosclerosis and Patient Risk Assessment*. Circulation, 2004; 109:III-15-III-19.

7. Grundy S, Brewer B, Cleema J, Smith S, Lenfant C: *Definition of Metabolic Syndrome NHLBI/AHA. Conference Proceedings Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association*. Circulation, 2004; 109:433-438.

8. MacMahon S, Robson R, Johnsona R: *Use of the Friedewald Formula to Estimate LDL-Cholesterol in Patients with Chronic Renal Failure on Dialysis*. Clinical Chemistry, 1997; 43(11):2183-4.

9. Ahmadi SA, Boroumand MA, Gohari-Moghaddam K, Tajik P, Dibaj SM: *The impact of low serum triglyceride on LDL-cholesterol estimation*. Arch Iran Med, 2008; 11(3):318-21.

10. Thuren T: *Hepatic lipase and HDL metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2000; 11(3):277-83.

11. Njajou O, Kanaya AM, Holvoet P, Connelly S, Harris T: *Association between oxidized LDL-C, obesity and type 2 diabetes*. Diabetes Metab Res rev, 2009; 25(8):733-9.

12. Libby P: *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002; 420:868-74.

13. Bao AM, Meynen G, Swaab DF: *The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus*. Brain Res Rev, 2008; 57(2):531-53.

14. Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y, Robson J, Minhas R, Sheikh A: *Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2*. BMJ, 2008; 336a:332.

15. World Health Organization *The global burden of disease*: *2004 update*. Geneva, 2008.

16. Gugliucci A., Kotani K., Kimura S. - Paraoxonase 1 in Chronic Kidney Failure. Journal of Lipids Volume 2012, Article ID 726048, 10 pages.

17. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. - "Physiology of local renin-angiotensin systems". Physiol. Rev, 2006, 86 (3): 747–803.

18. Carmena R1, Duriez P, Fruchart JC *Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis*. Circulation. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III2-7:.

19. Younis N., Soran H., Greenstein A., Elseweidy E. - *Small-dense LDL and LDL glycation in metabolic syndrome and in statin-treated and non-statin-treated type 2 diabetes*, Diabetes and Vascular Disease Research October 2010 vol. 7 no. 4 289-295.

20. Grover S, Dorais M, Coupal L.- Epidemiology. 2003 May;14(3):315-20: *Improving the prediction of cardiovascular risk: interaction between LDL and HDL cholesterol.*

21. Rabbani Syed, Moin Uddin Biyabani, Shiva Prasad, Farha Deeba, Kaiser Jamil: *Correlation and Identification of Variable number of Tandem repeats of eNOS Gene in Coronary artery disease (CAD)* Original Research ArticleSaudi Journal of Biological Sciences, Volume 17, Issue 3, July 2010, Pages 209-213.

22. Bergmeier C, Siekmeier R, Groß W - *Distribution Spectrum of Paraoxonase Activity in HDL Fractions.* Clinical Chemistry 50:12; 2309 –2315 (2004).

23. Hillege H, Borggreve E, Wolffenbuttel B, Jong P, Zuurman M - *An Increased Coronary Risk Is Paradoxically Associated with Common Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene Variations That Relate to Higher High-Density Lipoprotein Cholesterol: A Population-Based Study*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2006, 91(9):3382–3388.

LISTA LUCRĂRI PUBLICATE

1. **Popa Călin, Puşchiţă Maria** - *Atherogenic Risk Quantification by using the Atherogenic Index of Plasma (AIP) and Cardiovascular Risk Calculator on Hypertensive Patients*, Medical Connection, CNCSIS B+, code 944, vol.8, nr. 1 (29), pp.29-36, 2013, ISSN 1843 – 9306.

2. **Popa Călin**, Cristina Popescu, Luminița Pilat, **Maria Pușchiță** - *Human paraoxonase 1 (PON1) and its association with cardiovascular disease risk on a group study of young hypertensive patients*, Studia Universitatis "Vasile Goldiş", Seria Ştiinţele Vieţii, Vol. 23, issue 4, 2013, pp. 501-505.

3. **Popa Călin, Pușchiță Maria** - *Microalbuminuria - more than a renal function indicator for hypertensive patients with associated chronic diseases*, Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal) Vol. XIV, issue 3, 2011, pp. 62-69, e-ISSN 2067-7790.

Lucrări acceptate spre publicare

- **Popa C.**, Pilat L., Popescu C., **Puschita M.** - *The correlation of human paraoxonase 1 (PON 1) serum levels with the cardiovascular risk for a group of hypertensive patients with associated chronic diseases*, ScienceMED, Bologna-Italia, 2014.

Lucrări acceptate la conferințe internaționale

- **Călin Popa**, Luminița Pilat, Dana Ilie, Cristina Popescu - *Evaluation of renin-angiotensin system genes polymorphisms and paraoxonase activity in a heterogeneous group of hypertensive patients*, Joint IUBMB/ICGEB Symposium on Modern Biotechnological Advances for Human Health – BAHH, May 20-22, 2014, Bucharest, Romania (accepted 19.02.2014).