



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
GRIGORE T. POPA IAȘI



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CORELAȚII ÎN TRE FACTORII GENETICI ȘI EPIGENETICI ÎN PATOLOGIA BOLII CORONARIENE

Conducători doctorat:

Prof. Univ. Dr. Magda Mariana Bădescu

Prof. Univ. Dr. Marina Cătălina Arsenescu

Student doctorand:

Maria-Cristina Apăvăloaie (Vlădeanu)

- 2019 -



Cuprins

MOTIVAȚIA STUDIULUI	3
OBIECTIVELE STUDIULUI.....	5
MATERIAL ȘI METODĂ.....	5
EVALUAREA CONTRIBUȚIEI FACTORILOR DE RISC EPIGENETICI DIN PRIMA ETAPĂ A STUDIULUI - REZULTATE.....	9
ANTECEDENTE PERSONALE PATOLOGICE – PREZENȚA FACTORILOR DE RISC CORONARIAN.....	9
STATUS INFLAMATOR.....	10
STATUS CORONARIAN – REZULTATE CORONAROGRAFIE.....	11
EVALUAREA CONTRIBUȚIEI FACTORILOR DE RISC EPIGENETICI DIN A DOUA ETAPĂ A STUDIULUI –	13
ANTECEDENTE PERSONALE PATOLOGICE – PREZENȚA FACTORILOR DE RISC CORONARIAN.....	13
PARAMETRI ECOCARDIOGRAFICI.....	14
PROFILUL LIPIDIC.....	14
STATUS INFLAMATOR.....	15
EVALUAREA CONTRIBUȚIEI FACTORILOR DE RISC GENETICI DIN PRIMA ETAPĂ A STUDIULUI - REZULTATE..	15
GENA APOB100	15

GENA ENZIMEI DE CONVERSIE A ANGIOTENSINEI	16
EVALUAREA CONTRIBUȚIEI FACTORILOR DE RISC GENETIC DIN A DOUA ETAPĂ A STUDIULUI.....	18
PROFILUL LIPIDIC ȘI ALELA D	19
STATUSUL INFLAMATOR ȘI ALELA D	19
FracȚIA DE EJEcȚIE ȘI ALELA D	20
HIPERTENSIUNEA ARTERIALĂ (HTA) ȘI ALELA D	20
MODIFICĂRILE ECOCARDIOGRAFICE ȘI ALELA D	20
DISCUȚII	21
CONCLUZII	30
LISTA LUCRARILOR ” IN EXTENSO” PUBLICATE DE AUTOR DIN TEMATICA DOCTORATULUI	32
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	33

MOTIVAȚIA STUDIULUI

Boala coronariană este o patologie puternic răspândită la nivel mondial, atât în țările în curs de dezvoltare, cât și în Occident. Deși mortalitatea este în scădere în țările vestice, evenimentele coronariene acute continuă să reprezinte aproximativ o treime din cauzele de deces ale persoanelor peste 35 de ani. Reactualizarea bazei de date a Societății Americane de Cardiologie (AHA) din 2016 a scos în evidență ca 15.5 milioane de persoane de peste 20 de ani din Statele Unite ale Americii ar avea boală ischemică. Mai mult, prevalența crește cu vârsta și se estimează că la fiecare 42 de secunde, un cetățean american suferă un infarct miocardic. Nici în România situația nu este mai puțin îngrijorătoare, întrucât peste 60% dintre decese sunt cauzate de această patologie și se estimează că aproximativ 40 de adulți mor zilnic în țara noastră din cauza infarctului miocardic acut.

Studiul Framingham a realizat cea mai completă descriere a factorilor de risc coronarieni, furnizând totodată informații importante pentru elaborarea unor strategii optime de prevenție primară și secundară.

Pe lângă evenimentele coronariene simptomatice, există însă și pacienți cu ischemie miocardică silențioasă, aceștia constituind grupul de risc din care provin pacienții cu moarte subită cardiacă. În realitate, situația nu este chiar „din senin”, acești pacienți având un profil de risc coronarian mare și semne presimptomatice de boală cardiacă. Aproximativ 2-4 % din populația generală suferă de ischemie silențioasă coronariană, care, deși asimptomatică, poate fi detectată printr-un test de efort sau monitorizare ambulatorie a activității electrice a cordului. Prevalența mare a acestor cazuri este întâlnită în special în rândul bărbaților care au doi sau mai mulți factori de risc coronarieni.

Infarctul miocardic rămâne cea mai severă formă a evenimentelor acute, în contextul posibilelor complicații, precum insuficiența cardiacă sau cardiomiopatia dilatativă, consecințe ale tulburărilor de contractilitate severe, care reduc performanța cardiacă. În România, cel mai mare studiu pe infarct este RO-STEMI (registru pacienților cu infarct miocardic cu supradenivelare de segment ST din

România). Acest registru a inclus 15,076 pacienți cu infarct miocardic acut tip STEMI din 19 centre intervenționale și 45 centre non-intervenționale și a fost inițiat din 2011. Pentru fiecare pacient, autorii au înregistrat datele demografice, clinice, tipul de tratament (medicamentos sau intervențional) și evoluția post tratament. Rezultatele au evidențiat factori de risc și evoluții similare cu ale pacienților din alte studii similare europene. Cei mai importanți predictorii independenți pentru mortalitatea intraspitalicească la pacienții cu tratament intervențional au fost clasa Killip avansată, contractilitatea redusă, vârsta avansată și localizarea anterioară a infarctului. Pe de altă parte, revascularizarea percutană, tratamentul cu beta blocante, statine, inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei sau blocații receptorilor angiotensinei, au fost asociați cu o mortalitate intraspitalicească mai redusă la pacienții din România.

Această teză a fost lucrată în cadrul grantului CHRONEX, prin Fondul Social European, Programul Operațional Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, contract nr POSDRU/159/1.5/S/133377. Acest proiect a avut drept scop cercetarea în domeniul bolilor cronice, pentru îmbunătățirea strategiilor de prevenție și tratament.

În ultimii ani, s-a pus tot mai mult accent pe evoluția diferită a pacienților cu un profil coronarian aparent similar, pusă pe seama încărcăturii genetice. Pornind de la observația că studiile din alte regiuni ale lumii au evidențiat predispoziția către boală coronariană, în special cu leziuni bi sau trivasculare, a pacienților purtători ai alelei D din alcătuirea genei enzimei de conversie a angiotensinei, am realizat acest studiu. Având în vedere că dislipidemia este un factor de risc coronarian major și că majoritatea pacienților aveau modificări ale profilului lipidic, am lărgit sfera cercetării genetice și în direcția mutațiilor apoproteinei B100, factor proaterogen din compoziția LDL colesterolului. Cercetarea de față este prima din România pe această temă și reprezintă un punct de pornire spre elaborarea de noi strategii de prevenție. Este important, ca membrii activi ai comunității academice, să cunoaștem ultimele descoperiri și să implementăm studii care să verifice ipotezele și în cadrul populației țării noastre.

OBIECTIVELE STUDIULUI

Cercetarea prezentă are drept scop o mai bună cunoaștere și înțelegere atât a rolului polimorfismului genetic al enzimei de conversie a angiotensinei, cât și a implicării interacțiunii dintre alela D și factorii de risc cardiovascular convenționali în determinismul bolii coronariene.

Principalele obiective au fost:

1. Evaluarea prezenței factorilor de risc clasici la pacienții incluși
2. Determinarea mutațiilor genei apoproteinei B100 la nivelul codonului 3500 (A/G-înlocuirea adeninei cu guanină)
3. Determinarea mutațiilor genei enzimei de conversie a angiotensinei (I/D, inserții și deleții)
4. Studiul interacțiunii factorilor de risc și al parametrilor ecocardiografici (hipertrofie ventriculară stângă, tulburări de contractilitate) cu cele trei genotipuri identificate (II, ID, DD).

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul a fost realizat pe pacienți cu boală coronariană acută (angină instabilă și infarct miocardic acut) internați la Institutul de Boli Cardiovasculare Prof. Dr. George I.M. Georgescu din Iași. Toți pacienții au efectuat coronarografie pentru evaluarea substratului coronarian al bolii acute ischemice și revascularizare prin angioplastie cu stent pentru cei care au îndeplinit criteriile conform ghidului European.

Au fost incluși pacienți cu boală coronariană diagnosticată și minim doi factori de risc prezenți. Definirea factorilor de risc s-a realizat conform prevederilor Ghidului European (Graham et al., 2007), după cum urmează:

1. Hiperlipemia-Colesterol total> 200mg/dl, LDL> 100mg/dl și/sau HDL< 40 mg/dl pentru bărbați și <50 mg/dl pentru femei și trigliceride>150 mg/dl sau valori normale ale profilului lipidic sub tratament anterior cu statine

2. Hipertensiunea arterială- valori tensionale peste 140/90 mmHg la trei măsurători diferite sau necesitatea medicației antihipertensive pentru controlul valorilor tensionale
3. Diabet zaharat- glucoza a jeun peste 126 mg/dl la 3 determinări distincte sau necesarul de medicație pentru controlul valorilor glicemice
4. Istoricul familial de boală cardiovasculară-rudă de gradul I cu boală cardiovasculară diagnosticată la sub 50 de ani sau după menopauză
5. Fumat- pe baza declarației pacienților, vechime și cantitate
6. Indicele de masă corporală(IMC) a fost calculat conform formulei greutate (kg)/talie(m²)², cu valori normale între 18 și 24.9, suprapondere 25-29.9 și obezitate peste 30.

Din anamneză și examen clinic am extras următorii parametri: motivele internării, antecedente heredo-colaterale semnificative (rude de gradul I cu boala coronariană, accident vascular cerebral, arteriopatie obliterantă a membrelor inferioare), antecedente personale patologice, condiții de viață și muncă (mediul urban/rural, active/pensionar, expunere profesională la noxe, tabagism, consumator de alcool, energizante).

La examenul clinic am consemnat tensiunea arterială, frecvența cardiacă, talia și greutatea, utilizate pentru calculul indicelui de masă corporală, ascultația cardiac (caracter ritmic/aritmic al zgomotelor cardiace, prezența de sufluri supraadăugate).

Bilanțul hematologic și biochimic evaluat a fost reprezentat de: hemoleucogramă, număr leucocite și formula leucocitară, număr trombocite, sindrom inflamator (viteza de sedimentare a hematiilor, proteina C reactivă, fibrinogen), funcție renală (uree, creatinine), funcție hepatică (transaminaze), glicemie, enzime de citoliză miocardică în dinamică (CK MB, LDH, TGO), profil lipidic (colesterol total, LDL,HDL, trigliceride). S-au recoltat 2 ml suplimentari pentru dozările genetice: gena enzimei de conversie a angiotensinei(ECA) și gena apoB100. Probele au fost stocate la -18 grade până la începerea prelucrării.

Toți pacienții au efectuat electrocardiogramă (pentru analiza ritmului, evaluare segment ST și undă T) și ecocardiografie (pentru

evaluarea dimensiunilor cavităților cardiace, morfologiei și funcției valvelor, contractilității ventriculului stâng). Parametrii ecocardiografici incluși în studiu au fost prezența hipetrofiei ventriculare stângi, fracția de ejeție, akinesia și/sau hipokinezia ventriculului stâng în diverse segmente). Severitatea bolii coronariene a fost evaluată în funcție de numărul de artere coronare afectate (caracterul uni/bi/tricoronarian), precum și de severitatea stenozei (stenoze severe peste 70%), conform rezultatelor angiografice.

Protocolul experimental a fost aprobat de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie Gr. T. Popa, Iași și a fost realizat în concordanță cu principiile Declarației de la Helsinki II. Toți pacienții au citit, înțeles și semnat un consimțământ informat în momentul înrolării în studiu.

Studiul s-a desfășurat în două etape. Inițial am inclus 58 de pacienți, repartizați în două loturi în funcție de tipul bolii coronariene acute: lot cu angină instabilă (AI) și lot cu infarct miocardic. Am căutat mutațiile genei enzimei de conversie a angiotensinei și ale genei apoproteinei B100 la toți pacienții și am analizat corelația dintre aceste mutații și boala coronariană, precum și legătura dintre mutațiile identificate și factorii epigenetici.

În a doua parte a studiului am adăugat încă 96 de pacienți și, întrucât rezultatele din prima etapă au sugerat că o împărțire a pacienților pe loturi ținând cont de severitatea bolii coronariene dată de numărul de artere coronare afectate ar fi mai utilă ca semnificație, am reorganizat pacienții în 4 loturi: fără leziuni coronariene semnificative (0C), uniconarieni (1C), biconarieni (2C) și tricoronarieni (3C). Primul lot a constituit lotul martor. Am determinat aceiași factori epigenetici ca în prima etapă, dar pentru determinările genetice, am efectuat doar analiza polimorfismului genei enzimei de conversie a angiotensinei, rezultatele în această direcție fiind mai promițătoare decât cele despre polimorfismul genei apoproteinei B100, caz în care nu am identificat niciun pacient cu mutație în prima parte a studiului.

Pentru determinarea **polimorfismului genetic al genei ECA** am folosit kitul **MutaGel ACE**, care determina mutațiile de tipul inserții (I)/ deleții(D) pe baza analizei secvenței ALU de la nivelul intronului

16. Un kit permite 24 de determinări. Kitul MutaGel ACE conține primerii specifici pentru identificarea ambelor mutații: alela I (fragmentul de 490 bp) și alela D (fragmentul de 190 bp), amestecul master (Master Mix) pentru polimerizarea în lanț (enzima Taq, MgCl₂, dNTP, soluția tampon), control pozitiv pentru genotipurile care conțin alela I, control pozitiv pentru genotipurile care conțin alela D, contro-uri negative și soluție de puritate înaltă pentru PCR. În afară de acest kit am mai folosit kit de extracție ADN KBR3005 și reactivi pentru electroforeza în gel. În prima etapă am verificat puritatea și concentrația ADNului. Apoi am utilizat următorul program de amplificare: pas de hold inițial (denaturare inițială) la 95 grade timp de 5 minute, urmat de 30 de cicluri de amplificare exponențială, fiecare ciclu având 3 variații de temperatură (denaturare la 94 grade, timp de 60 de secunde, hibridizare la 57 de grade timp de 60 de secunde și elongare la 72 de grade, timp de 90 de secunde) și pas de hold final 72 grade 5 minute și apoi 4 grade. În continuare am separat materialul amplificat prin electroforeză în gen de agaroză 1,5%, am colorat fragmentele cu fluorocrom SybrGreen și le-am analizat utilizând spectrofotometria UV cu lungimi de undă 312 nm. În final, am realizat identificarea fragmentelor prin compararea cu scala ADN (DNA ladder).

Pentru determinarea polimorfismului **genei apoB100** am folosit kitul **MutaGel ApoB100**, conceput special pentru analiza codonului 3500 al genei apoB100, în scopul identificării ADNului mutant (cu guanină) sau normal (cu adenina). Un kit permite 24 de determinări și conține mix PCR ApoB100 (enzima Taq, MgCl₂, dNTP, soluție tampon și nucleotide specifice pentru regiunea codon 3500), control pozitiv, control negativ, soluție tampon pentru enzima de restricție, enzima de restricție (specifică pentru mutația 3500-A). Am utilizat următorul program de amplificare: pas de hold inițial (denaturare inițială) la 95 grade timp de 5 minute, urmat de 35 de cicluri de amplificare exponențială, fiecare ciclu având 3 variații de temperatură (denaturare la 95 grade, timp de 30 de secunde, hibridizare la 58 de grade timp de 30 de secunde și elongare la 72 de grade, timp de 60 de secunde) și pas de hold final la 72 de grade timp de 5 minute, apoi la 4

grade. Apoi am realizat digestia fragmentelor amplificate prin incubare la 65 de grade împreună cu amestecul de digestie, timp de 3 ore și separarea fragmentelor digerate prin electroforeză în gel de agaroză 3,5% . Ulterior am colorat fragmentele cu fluorocrom SybrGreen timp de 5 minute și le-am analizat utilizând spectrofotometria UV cu lungimi de undă 312 nm.

Datele au fost încărcate și prelucrate cu ajutorul funcțiilor statistice din SPSS 18.0 la pragul de semnificație de 95%.

EVALUAREA CONTRIBUȚIEI FACTORILOR DE RISC EPIGENETICI DIN PRIMA ETAPĂ A STUDIULUI - REZULTATE

Grupul de studiu a fost constituit din **58 pacienți** cu boală coronariană, împărțit în două loturi în funcție de tipul afectării: lot IMA (30 de pacienți cu infarct miocardic acut) și lot AI (18 pacienți cu angina instabilă).

ANTECEDENTE PERSONALE PATOLOGICE – PREZENȚA FACTORILOR DE RISC CORONARIAN

Diabetul zaharat s-a remarcat în antecedentele patologice personale ale 60% dintre pacienții cu infarct miocardic acut și 60,7% dintre pacienții cu angină instabilă, diferențe procentuale nesemnificative din punct de vedere statistic ($p=0,956$).

Dislipidemia s-a remarcat în antecedentele patologice personale cu ponderi mari, aproximativ egale în ambele loturi investigate (90% vs 89,3%; $p=0,929$).

Obezitatea Pe cazuistica studiată se remarcă în lotul IMA, la pacienții cu infarct miocardic acut, o pondere de 30% de pacienți cu obezitate grad I și 23,3% obezitate grad II, distribuții de frecvență nesemnificative în comparație cu lotul AI, pacienți cu angină instabilă, unde se înregistrează o pondere de 46,4% dintre pacienți cu obezitate grad I și 21,4% cu obezitate grad II ($p=0,753$).

Fumatul Aproximativ 1/2 dintre subiecți sunt fumători (46,7% dintre pacienții cu IMA respectiv 50% dintre pacienții cu AI) ($p=0,800$).

În sinteză, parametrii clinici nu au indus un risc estimat crescut de infarct miocardic acut în raport cu angina instabilă, în ambele loturi predomină dislipidemia (90% vs 89,3%; $p=0,929$), diabetul zaharat (60% vs 60,7%; $p=0,956$) și obezitatea (56,3% vs 67,9%; $p=0,956$) (Tabel I).

Colesterolul total a variat de la 90 la 298 mg/dl, la 39,7% dintre pacienți valorile individuale au excedat limita de referință (<200 mg/dl). În funcție de afectarea coronariană, s-a remarcat o valoare medie semnificativ mai crescută la lotul cu angină instabilă a valorilor medii ale colesterolului total (169,83 vs 209,54 mg/dl; $p=0,002$).

LDL-colesterolul a variat de la 38 la 219 mg/dl, la 36,2% dintre pacienți valorile individuale au excedat limita de referință (<140 mg/dl). Pe loturi de studiu s-a remarcat o valoare medie semnificativ mai crescută la lotul cu angină instabilă a valorilor medii ale LDL-colesterolului (101,03 vs 138,50 mg/dl; $p=0,001$).

HDL-colesterolul a variat de la 22 la 81 mg/dl, la 41,4% dintre pacienți valorile individuale au fost sub limita de referință (>40 mg/dl) (fig. 31). Nu s-au remarcat diferențe semnificative din punct de vedere statistic ale valorilor medii ale HDL-colesterolului între grupurile de studiu (43,77 vs 44,04 mg/dl; $p=0,928$).

Trigliceridele s-au încadrat în intervalul 54-440 mg/dl, 37,9% dintre valori excedând limita de referință pentru valorile normale (fig. 32). Pe loturi de studiu, valorile medii au fost ușor mai crescute la lotul cu angină instabilă, fără a se înregistra diferențe semnificative în comparație cu cele din lotul cu infarct miocardic acut (150,67 vs 155,29 mg/dl; $p=0,814$).

STATUS INFLAMATOR

VSH a variat de la 2 la 130 mm/h, la 62,1% dintre pacienți valorile individuale au excedat limita de referință (<20 mm/h) (fig. 33). În funcție de afectarea coronariană, s-a remarcat o valoare medie a valorilor medii ale VSH ușor mai crescută la lotul cu angină instabilă (31,63 vs 35,07 mm/h; $p=0,660$).

Valorile individuale ale **CRP** s-au încadrat în intervalul 0,30-77 mg/dl, 53,4% dintre valori fiind peste limita de referință (<4 mg/dl) (fig. 34). Media grupului cu infarct miocardic acut a fost ușor mai crescută, fără a înregistra diferențe semnificative comparativ cu cea înregistrată la pacienții cu angină instabilă (8,61 vs 7,57 mg/dl; $p=0,715$).

Fibrinogenul Valorile individuale ale acestui parametru au variat în intervalul 276-1012 mg/dl, 51,7% fiind peste limita de referință (<500 mg/dl) (fig. 35). Valorile medii ale fibrinogenului nu au înregistrat diferențe semnificative în funcție de boala coronariană (554 vs 545 mg/dl; $p=0,845$).

STATUS CORONARIAN – REZULTATE CORONAROGRAFIE

Pe cazuistica studiată predomină caracterul 1C coronarian (41,4%), în schimb ponderea cumulativă a caracterelor 2C și 3C a fost de aproximativ 57% (fig.1).

Pe loturi de studiu, se constată următoarele aspecte ($p=0,584$):

- la pacienții cu infarct miocardic un vârf de frecvență al caracterului 1C (43,3%), la acești pacienți înregistrându-se un singur caz normal (3,3%);
- distribuția caracterului coronarian la pacienții cu angină instabilă a înregistrat ponderi ușor mai crescute ale caracterelor 2 (35,7% vs 30%) și 3 (25% vs 23,3%) față de cei cu infarct miocardic.

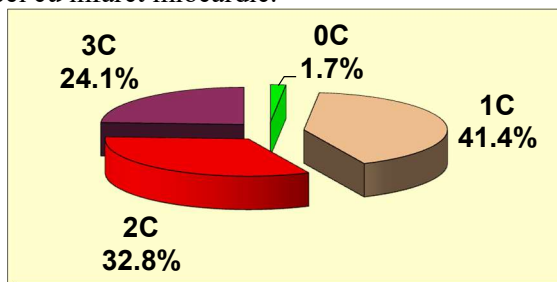


Fig.1. Distribuția cazurilor în funcție de caracterul coronarian (OC =pacienți fără leziuni semnificative; 1C= pacienți unicoronarieni, 2C= pacienți bicoronarieni, iar 3C=pacienți tricornarieni)

Caracterul coronarian, în funcție de parametrii clinici a evidențiat următoarele aspecte:

➤ lot IMA

- caracterul 1C este semnificativ mai frecvent întâlnit la vârste de peste 65 ani (52,6%; $p=0,046$) și la pacienții cu obeți (55,5%; $p=0,05$);
- caracterul 2C predomină ca frecvență la fumători (42,9%; $p=0,026$);
- caracterul 3C a înregistrat o frecvență mai crescută la pacienții cu diabet zaharat (38,9%; $p=0,037$)

➤ lot AI

- caracterul 1C predomină semnificativ la sexul masculin (47,6%; $p=0,013$) și la pacienții cu dislipidemie (40%; $p=0,001$);
- caracterul 2C predomină la vârste de peste 65 ani (46,2%; $p=0,851$) și la pacienții cu obezitate (42,1%; $p=0,087$);
- caracterul 3C a înregistrat o frecvență mai crescută la pacienții cu diabet zaharat (35,1%; $p=0,345$) și la pacienții cu obezitate (31,6%; $p=0,087$).

La lotul IMA, caracterul 2C coronarian s-a asociat cu valori medii semnificativ mai crescute ale CRP ($p=0,001$) și TGP (0,05). La caracterul 3C s-au asociat valori semnificativ mai crescute ale trigliceridelor ($p=0,044$).

La lotul AI, caracterul 2C coronarian s-a asociat cu valori medii semnificativ mai crescute ale fibrinogenului ($p=0,05$) și VSH-ului ($p=0,028$). La caracterul 3C s-au asociat valori semnificativ mai crescute ale trigliceridelor ($p=0,021$).

EVALUAREA CONTRIBUȚIEI FACTORILOR DE RISC EPIGENETICI DIN A DOUA ETAPĂ A STUDIULUI –

Grupul de studiu a fost constituit din **154 pacienți** cu boală coronariană, împărțit în patru loturi în funcție de caracterul coronarian: lot 0C (24 pacienți cu modificări coronariene nesemnificative), lot 1C (48 pacienți cu modificări unicoronariene), lot 2C (48 pacienți cu modificări bicoronariene) și lot 3C (34 pacienți cu modificări tricoronariene). Am adăugat, în plus față de prima etapă a studiului, 2 noi parametri: prezența hipertrofiei ventriculare stângi și a tulburărilor de kinetică (hipokinezie sau akinezie), evaluate ecocardiografic. Am realizat analiza statistică a datelor prin aceleași metode ca în prima parte a studiului.

ANTECEDENTE PERSONALE PATOLOGICE – PREZENȚA FACTORILOR DE RISC CORONARIAN

Diabetul zaharat s-a remarcat în antecedentele patologice personale ale 94,1% dintre pacienții cu modificări tricoronare și 62,5% dintre pacienții cu modificări unicoronare, diferențe procentuale semnificative din punct de vedere statistic în comparație cu ponderea pacienților diabetici cu modificări coronariene nesemnificative (16,7%) ($p=0,001$).

Dislipidemia s-a remarcat în antecedentele patologice personale cu ponderi mari în toate loturile investigate, variind de la 83,3% la lotul cu modificări coronare nesemnificative și unicoronare până la 100% la lotul cu modificări tricoronare ($p=0,016$).

În ceea ce privește **obezitatea**, pe cazuistica studiată, se remarcă următoarele aspecte ($p=0,05$):

- în lotul de pacienți cu modificări unicoronare 29,2% dintre pacienți prezentau obezitate grad II și 8,3% obezitate grad III;
- în lotul de pacienți cu modificări bicoronare 45,8% dintre pacienți prezentau obezitate grad I și 16,7% obezitate grad II;
- în lotul de pacienți cu modificări tricoronare 52,9% dintre pacienți prezentau obezitate grad I și 11,8% obezitate grad II;

Fumatul Aproximativ 1/2 dintre subiecții cu modificări coronare semnificative sunt fumători ($p=0,062$).

PARAMETRI ECOCARDIOGRAFICI

Akinezia La pacienții cu modificări triconariene s-a remarcat cea mai mare frecvență de cazuri cu akinezie (82,4%; $p=0,001$).

Hipokinezia La pacienții cu modificări triconariene s-a remarcat cea mai mică frecvență de cazuri cu hipokinezie (17,6%; $p=0,002$).

Hipertrofia ventriculară stângă (HVS) La pacienții cu modificări triconariene s-a remarcat cea mai mare frecvență de cazuri cu HVS (88,2%; $p=0,001$) (fig. 59).

În sinteză, dislipidemia, diabetul zaharat, obezitatea, antecedentele heredocolaterale, akinezia și HVS s-au asociat semnificativ mai frecvent cu modificările triconare.

PROFILUL LIPIDIC

Colesterolul total a variat de la 101 la 320 mg/dl, la 44,8% dintre pacienți valorile individuale au excedat limita de referință (<200 mg/dl), însă nu s-au evidențiat diferențe semnificative ale valorilor medii în funcție de afectarea coronariană ($p=0,922$).

LDL-colesterolul a variat de la 48 la 252 mg/dl, la 40,9% dintre pacienți valorile individuale au excedat limita de referință (<140 mg/dl). Pe loturi de studiu nu s-au remarcat diferențe semnificative ale valorilor medii ($p=0,793$) (Tabel XXXI).

HDL-colesterol a variat de la 22 la 81 mg/dl, la 40,3% dintre pacienți valorile individuale au fost sub limita de referință (>40 mg/dl) (fig. 62). Din punct de vedere statistic, valorilor medii ale HDL-colesterolului au fost semnificativ mai reduse la pacienții cu modificări bi- și triconare ($p=0,011$) (Tabel XXXII).

Trigliceridele s-au încadrat în intervalul 44-455 mg/dl, 40,3% dintre valori excedând limita de referință pentru valorile normale (fig. 63). Pe loturi de studiu, valorile medii au fost semnificativ mai crescute la pacienții cu modificări triconariene ($p=0,001$) (Tabel XXXIII).

STATUS INFLAMATOR

VSH a variat de la 2 la 130 mm/h, la 58,4% dintre pacienți valorile individuale au excedat limita de referință (<20 mm/h) (fig. 64). În funcție de afectarea coronariană, s-a remarcat o valoare medie a valorilor VSH semnificativ mai crescută la lotul cu modificări bicoronariene ($p=0,001$).

Valorile individuale ale **CRP** s-au încadrat în intervalul 0,30-25 mg/dl, 52,6% dintre valori fiind peste limita de referință (<4 mg/dl) (fig. 65). Media grupului cu modificări bicoronariene a fost semnificativ mai crescută ($p=0,001$).

Fibrinogenul. Valorile individuale ale acestui parametru au variat în intervalul 130-1029 mg/dl, 48,7% fiind peste limita de referință (<500 mg/dl) (fig. 66). Valorile medii ale fibrinogenului au fost semnificativ mai crescute la pacienții cu modificări bicoronariene ($p=0,001$). Prin trasarea curbelor ROC se constată faptul că markerii procesului inflamator au fost buni predictorii în determinismul modificărilor bicoronariene ($AUC>0,600$).

EVALUAREA CONTRIBUȚIEI FACTORILOR DE RISC GENETICI DIN PRIMA ETAPĂ A STUDIULUI - REZULTATE

GENA APOB100

Nu am identificat niciun genotip mutant la pacienții din studiul nostru.

Fragmentele amplificate, nedigerate au lungime de 170 bp. După procesul de digestie, am obținut doar fragmente normale (wild) de 140 bp. Nu am identificat niciun fragment mutant (lungime 110 bp, așa cum are controlul pozitiv) (fig.2).

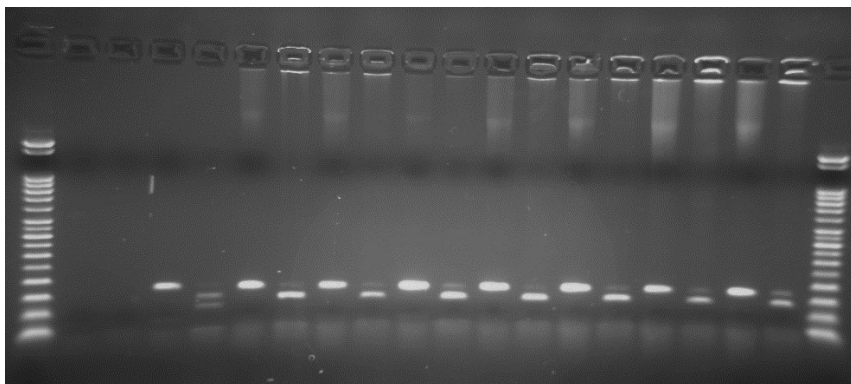


Fig.2. Rezultate determinare genotip apoB100, ordinea în gel-fragmente nedigerate (170 bp), control pozitiv (110 bp) și fragmente de la pacienții din studiu (140 bp),

GENA ENZIMEI DE CONVERSIE A ANGIOTENSINEI

Identificarea genotipurilor ECA a fost realizată în funcție de lungimea ampliconilor, după migrarea în gel. Ampliconul de 190 bp semnalează prezența alelei D, iar ampliconul de 480 bp semnalează prezența alelei I. Controlul pozitiv este heterozigot. Am identificat toate cele trei variante de genotip posibile: II, ID și DD (fig.3). În lotul AI am identificat 6 pacienți cu genotip II, 19 pacienți cu genotip ID și 5 pacienți cu genotip DD. În lotul IMA am identificat 2 pacienți cu genotip II, 16 pacienți cu genotip ID și 10 pacienți cu genotip DD.

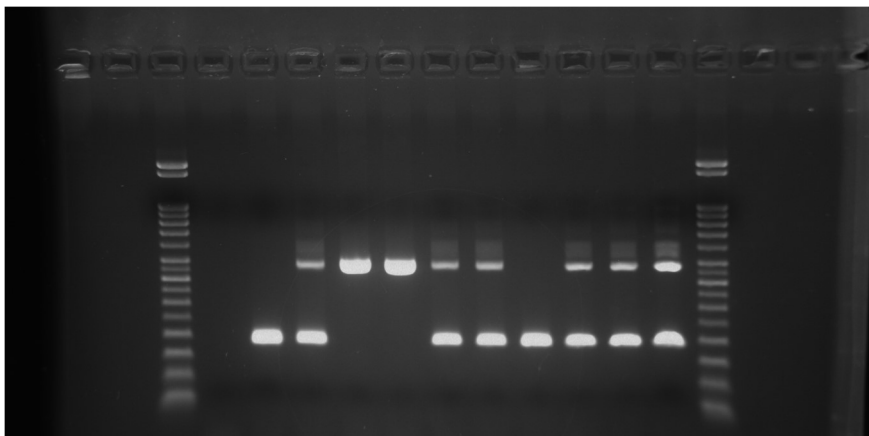


Fig.3. Migrarea ampliconilor ECA în gel: II (480 bp), ID (480/190 bp) și DD (190 bp)

Enzima de conversie a angiotensinei, corelată cu parametrii clinici a evidențiat următoarele aspecte:

- lot IMA
 - genotipul II a înregistrat ponderi variind între 16,7% și 22,2%%;
 - genotipul ID a fost semnificativ asociat cu vârste de peste 65 ani, diabet zaharat, dislipidemie, obezitate și fumat ($p < 0,05$);
 - caracterul 3C a înregistrat o frecvență mai crescută la pacienții cu diabet zaharat (27,8%);
- lot AI
 - genotipul II a înregistrat ponderi sub 10%;
 - genotipul ID predomină semnificativ la sexul masculin (52,4%; $p = 0,05$) și la pacienții cu dislipidemie (52%; $p = 0,050$), fumători (74,4%; $p = 0,001$);
 - genotipul DD predomină la pacienții diabetici (53,8%; $p = 0,045$), și a înregistrat o frecvență comparabilă cu genotipul ID la grupa de vârstă de peste 65 ani (47,4%) și la pacienții cu obezitate (47,1%).

La lotul IMA, enzima de conversie a angiotensinei genotipul ID s-a asociat cu valori medii semnificativ mai crescute ale CRP ($p=0,05$). La genotipul DD s-au asociat valori semnificativ mai crescute ale trigliceridelor ($p=0,011$).

La lotul AI, enzima de conversie a angiotensinei genotipul ID s-a asociat cu valori medii semnificativ mai crescute ale HDL-colesterolului ($p=0,05$) și VSH-ului ($p=0,016$). La genotipul DD s-au asociat valori semnificativ mai crescute ale potasiului seric ($p=0,046$).

EVALUAREA CONTRIBUȚIEI FACTORILOR DE RISC GENETIC DIN A DOUA ETAPĂ A STUDIULUI

Enzima de conversie a angiotensinei, corelată cu parametrii clinici a evidențiat următoarele aspecte:

- **lot 0C**
 - 21/24 pacienți (87,5%) prezentau genotip II, dintre care 76,2% bărbați, 57,1% cu vârste de peste 65 ani, cu dislipidemie (81%) și obezitate (71,4%);
 - genotipul ID s-a decelat la 3 paciente, cu vârste de peste 65 ani, obeze și cu dislipidemie;
- **lot 1C**
 - predomină genotipul ID (83,3%) la sexul masculin (80%), cu vârste peste 65 ani (65%), fumători (55%), la pacienții cu dislipidemie (80%) și diabet zaharat (55%);
 - genotipul II s-a identificat la 16,7% dintre pacienții cu modificări uniconariene: 6 bărbați, cu diabet zaharat, dislipidemie și obezitate, numai 3 fumători;
- **lot 2C**
 - la 75% dintre pacienți s-a identificat genotipul ID, dintre care 61,1% de sex masculin, 58,3% cu vârste sub 65 ani, 88,9% pacienți cu dislipidemie și 61,1% cu obezitate;
 - genotipul II s-a identificat la 8,3% dintre pacienții cu modificări bicoronariene: 4 bărbați, cu vârste peste 65 ani, fumători, cu dislipidemie;

- genotipul DD s-a identificat la 16,7% dintre pacienții cu modificări bicornariene: 8 bărbați, cu vârste peste 65 ani, cu diabet zaharat, dislipidemie și obezitate, numai 2 fumători;
- **lot 3C**
 - la 82,4% dintre pacienți s-a identificat genotipul DD, dintre care 82,1% de sex masculin, 57,1% cu vârste peste 65 ani, toți cu dislipidemie, 92,9% diabetici și 57,1% cu obezitate, jumătate dintre ei fumători;
 - genotipul ID s-a identificat la 14,3% dintre pacienții cu modificări tricoronariene: 3 femei și 3 bărbați, cu diabet zaharat, dislipidemie și obezitate.

PROFILUL LIPIDIC ȘI ALELA D

La pacienții cu modificări 2C (206,63 mg/dl; $p=0,028$) și 3C (200,71 mg/dl; $p=0,005$) - genotip DD s-a înregistrat un nivel mediu semnificativ mai crescut al **colesterolului total**.

Nivelul mediu al **LDL-colesterolului** a fost semnificativ mai crescut la pacienții cu modificări 2C (151,88 mg/dl; $p=0,016$) și 3C (133,25 mg/dl; $p=0,001$) - genotip DD.

Nivelul mediu al **HDL-colesterolului** a fost semnificativ mai redus la pacienții cu modificări 3C - genotip DD (39,79 mg/dl; $p=0,027$).

Nivelul mediu al **trigliceridelor** a fost semnificativ mai crescut la pacienții cu modificări 3C - genotip DD (230,21 mg/dl; $p=0,017$).

STATUSUL INFLAMATOR ȘI ALELA D

La pacienții cu modificări 2C (12,60 mg/dl; $p=0,018$) și 3C (6 mg/dl; $p=0,033$) - genotip DD s-a înregistrat un nivel mediu semnificativ mai crescut al **CRP**. Nivelurile medii ale fibrinogenului și **VSH** nu au înregistrat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în funcție de ECA și genotip .

FRACȚIA DE EJEȚIE ȘI ALELA D

Fracția de ejeție a variat în intervalul 30-60%, valori individuale aflate sub limita de referință (60-70%) la toți pacienții. Pe loturi de studiu s-a remarcat o valoare medie semnificativ mai redusă la lotul cu modificări triconariene (37,65%; $p=0,001$).

Valoarea medie a fracției de ejeție a fost semnificativ mai redusă la pacienții cu genotip DD (36,39%; $p=0,001$).

HIPERTENSIUNEA ARTERIALĂ (HTA) ȘI ALELA D

Dintre pacienții cu HTA std. I, 85,7% prezentau genotip II; 64% dintre pacienții cu HTA std. II, prezentau genotip ID, iar 35,6% dintre pacienții cu HTA std. III, prezentau genotip DD ($p=0,001$) (fig.4).

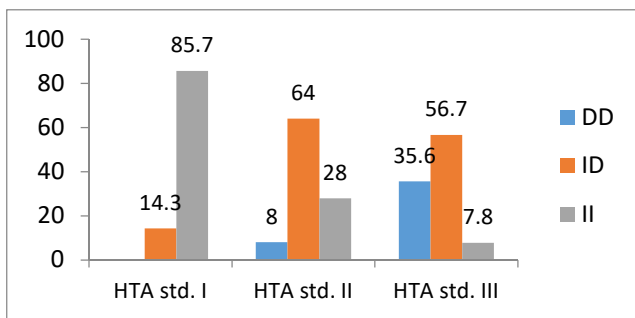


Fig.4 . Corelația genotipului cu HTA

MODIFICĂRILE ECOCARDIOGRAFICE ȘI ALELA D

Dintre pacienții cu **akinezie**, 54% prezentau genotip DD, 39,7% genotip ID și numai 6,3% genotip II ($p=0,001$).

Dintre pacienții cu **hipokinezie**, 2,9% prezentau genotip DD, 75,7% genotip ID și 21,4% genotip II ($p=0,001$).

Dintre pacienții cu **hipertrofie ventriculară stângă** (HVS), 41,4% prezentau genotip DD, 52,9% genotip ID și numai 5,7% genotip II ($p=0,001$).

DISCUȚII

Etapa curentă a cercetării s-a axat pe studiul factorilor de risc pentru boala coronariană, în funcție de severitatea acesteia (caracterul uni/bi/tricoronarian versus prezența stenozelor nesemnificative, ca lot martor). Am realizat analiza statistică a rezultatelor în două etape, prima privind legătura factorilor de risc clasici, de mediu cu boala coronariană și severitatea acesteia (analiza epigenetică), iar a doua etapă am dedicat-o studiului dintre factorii genetici și severitatea bolii coronariene, precum și interacțiunii dintre genetic și epigenetic în determinismul acestei patologii complexe.

Consumul de tutun este un factor de risc epigenetic major. În prima parte a studiului, am observat că jumătate de pacienți erau fumători, fără diferențe semnificative statistic între infarct miocardic și angină (46,7% fumători cu infarct și 50% fumători cu angină instabilă). Mai mult, balanța negativă tinde să încline în favoarea anginei instabile. Asocierea dintre fumat și alcool a fost mai puternic asociată cu infarctul miocardic, deși această diferență a fost semnificativă statistic doar pentru fumat (Merry et al., 2011), diferit față de rezultatele din studiul nostru.

Legătura strânsă dintre diabetul zaharat și boala ischemică a fost îndelung studiată de-a lungul timpului, ambele patologii fiind în creștere la nivel mondial. Prevalența diabetului zaharat în rândul pacienților noștri a fost foarte crescută. În prima parte a studiului, infarct miocardic versus angină instabilă, ponderea diabetului zaharat a fost aproximativ egală între loturi (60% din cei cu infarct și 60,7% din cei cu angină instabilă). Aceste rezultate sunt în contradicție cu alte studii, care susțin prevalența mai mare a diabetului la cei cu infarct. Esteghamati et al. au inclus în cercetarea lor 514 pacienți cu angină instabilă sau infarct miocardic acut, dintre care 30% erau diabetici, cu o vechime medie a bolii între 13,4 $\pm$ 8,7 ani. Rezultatele au arătat o pondere semnificativ mai mare a infarctului miocardic în rândul pacienților diabetici. Însă localizarea și extensia infarctului, precum și amploarea creșterilor enzimactice nu au înregistrat diferențe între diabetici și non diabetici, contrar descoperirilor din studiul nostru (Esteghamati et al., 2006). În a doua parte a studiului, odata cu mărirea

loturilor și redistribuția pacienților în funcție de severitatea bolii vasculare, am evidențiat noi asocieri. Din totalul de 154 de pacienți, 90 au fost diabetici (58%). Mai mult, am observat o asocieră între severitatea bolii coronariene și diabetul zaharat, întrucât acesta din urmă a fost prezent la 94,1% dintre triconarieni (32 de pacienți din 34) și 62,5 % dintre biconarieni (30 pacienți din 48) față de 16% în lotul martor (4 din 24) ($p=0.001$). Această descoperire este în concordanță cu alte studii anterioare. Trialul FREEDOM a arătat că pacienții diabetici au leziuni mai extinse și mai severe, adesea necesitând by pass aorto-coronarian (Dangas et al., 2014). Pentru evaluarea extensiei bolii coronariene au utilizat Scorul Coronarian, alcătuit din distribuția segmentară a leziunilor și analiza morfologică a plăcii aterosclerotice. Scorul Coronarian a fost semnificativ mai ridicat în cazul pacienților diabetici versus lotul de control ($P<0.001$). De asemenea, diabeticii au înregistrat un număr mai mare de leziuni proximale. Analiza morfologică a scos la iveală ponderea ridicată a plăcilor vulnerabile (24.37% vs. 15.33%; $P<0.01$) și a stenozelor mai severe (70-90%) în lotul diabetic (70.53.% vs. 57.33%; $P<0.05$). Așadar, faptul că în lotul martor leziunile au fost mai severe și mai extinse, sugerează rolul diabetului zaharat de predictor independent al aterosclerozei (Uddin et al., 2005).

Tulburările profilului lipidic reprezintă un alt factor epigenetic major. Dovezile privind legătura dintre progresia bolii coronariene și nivelul LDL și al trigliceridelor sunt multiple și concludente. Particulele LDL oxidate lezează endoteliul și induc ruptura plăcilor. Tot referitor la lipoproteine, putem vorbi și despre o relație inversă între HDL și progresia bolii coronariene. Nivelul scăzut al HDL este un factor de risc independent și puternic pentru infarct miocardic și accident vascular cerebral, deși există și pacienți cu infarct care au un nivel normal de HDL (Perez-Mendez et al., 2014). Un studiu realizat de Xenophontos et al., a analizat legătura dintre HDL scăzut (<40 mg/dl), fumat și infarctul miocardic la pacienți de sex masculin din Cipru și a observat că fumatul reduce concentrațiile de HDL și apoproteină și crește LDL și trigliceridele, contribuind astfel la riscul de infarct miocardic (Xenophontos et al., 2008). Mai mult, studiul lui Virmani et al., a arătat

ateroamele care au un capişon subţire, cu risc mare de ruptură, sunt cel mai adesea întâlnite la pacienţii cu HDL mic şi raport colesterol total/HDL ridicat (Virmani et al., 2006). În prima parte a studiului nostru, 41.4% dintre pacienţi aveau HDL sub 40 mg/dl, dar nu am înregistrat diferenţe statistic între cele două loturi (angină instabilă şi infarct miocardic acut). Însă în a doua parte a studiului, am observat o preponderenţă semnificativă statistic a nivelului redus al HDL la pacienţii cu leziuni bi şi triconariene. În ceea ce priveşte colesterolul total şi nivelul LDL, nu am observat diferenţe semnificative între loturi. La prima vedere, rezultatele par neaşteptate, dar având în vedere că 90% dintre pacienţi au istoric de dislipidemie şi erau deja sub tratament cu statine la momentul includerii în studiu, putem desprinde observaţia că rezultatele la nivelul profilului lipidic au fost influenţate de tratamentul hipolipemiant. Rolul important al particulelor proaterogene de LDL este binecunoscut, după cum arată rezultatele multor studii, printre care şi cele ale lui White et al. şi Holmes et al. (Holmes et al., 2015; White et al., 2016), precum şi rezultatele unor trialuri clinice randomizate axate pe tratamentul hipolipemiant (Baigent et al., 2010; Mihaylova et al., 2012).

În ceea ce priveşte trigliceridele, 40.3% dintre pacienţii analizaţi de noi au avut valori peste limita de referinţă, cu valori semnificativ mai crescute la pacienţii triconarieni. Dislipidemia, inflamaţia şi răspunsul imunologic la metabolismul lipidic anormal constituie baza producerii şi dezvoltării bolilor cardiovasculare. Rezultatele noastre sunt concordante cu cele ale altor studii în domeniu. Soeiro et al., a evidenţiat că un nivel al trigliceridelor peste 1.13 mmoli/L creşte semnificativ riscul cardiovascular (Soeiro et al., 2015). Se pare că rolul trigliceridelor este mai mare decât s-a crezut o lungă perioadă de timp (Kolovou et al., 2011; Boren et al., 2014; Matsumoto et al., 2014; Tenenbaum et al., 2014). Cu cât nivelul trigliceridelor a fost mai mare, cu atât a crescut mai mult şi riscul de infarct (Jiao et al., 2018).

Obezitatea este un alt factor de risc tradiţional pentru bolile cardiovasculare. În prima parte a studiului, am observat că 56,7% dintre pacienţii cu infarct miocardic erau obezi şi 43,3 % normoponderali.

Ponderea obezității a fost mai crescută în lotul cu angină instabilă, deși diferențele dintre loturi nu au avut semnificație statistică ($p=0,860$). Aceste rezultate constituie argumente pentru asocierea dintre excesul ponderal și boala coronariană. Zhu Jun et al., a realizat o meta analiză pentru a demonstra implicarea supraponderiei și obezității în determinismul bolii coronariene. Atât statusul supraponderal, cât și obezitatea au crescut riscul de infarct. Sindromul metabolic, care include obezitatea abdominală, a dublat riscul cardiovascular și a crescut mortalitatea de 1,5 ori (Zhu et al., 2014). Mai mult, odata diagnosticată boala cardiacă, prezența obezității accelerează progresia leziunilor. Pacienții supraponderali și cei obezi sunt predispuși la insulino-rezistență și diabet zaharat, ceea ce le agravează prognosticul (Savage, 2017).

Clasic, evaluarea severității bolii coronariene se realizează prin coronarografie, care împarte pacienții în uni, bi, triconarieni sau leziuni de trunchi comun și stenoze de peste 50% sau peste 70% (Ringqvist et al., 1983). Combinarea acestor parametrii duce la alcătuirea unor scoruri de risc coronarian (Dash et al., 1977; Gensini et al., 1983). Rubinstein a observat că pacienții obezi trimiși pentru coronarografie erau mai tineri și aveau afectare de trunchi comun în procent mai redusă (Rubinshtein et al., 2006).

Inflamația, un proces central în dezvoltarea bolii coronariene, apare ca răspuns al coronarelor la oxidarea lipidică, leziune și uneori în infecții. Factorii de risc clasici, precum hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, fumatul sunt agravați de moleculele LDL oxidate și inițiază un proces inflamator cronic, cu apariția plăcii vulnerabile, predispusă la ruptură și tromboză. Studiile epidemiologice au demonstrat legătura importantă dintre markerii inflamației și riscul de evenimente cardiovasculare (Ross, 1999). Markerii inflamatori evaluați în cadrul cercetării noastre au fost VSH, fibrinogenul și proteina C reactivă (PCR).

În prima parte a studiului, 62,1% dintre pacienți aveau VSH peste limita de referință, 53,4% PCR ridicată și 51,7% fibrinogenul crescut, dar fără diferențe semnificative între infarct miocardic acut și angină instabilă. Aceste rezultate pledează pentru asocierea dintre

sindromul coronarian acut și sindromul inflamator, din care fac parte ambele patologii. În ceea ce privește rolul inflamației în severitatea leziunilor, am observat valori mari ale fibrinogenului în lotul cu modificări bicoronariene ($p=0.001$). Fibrinogenul joacă un rol important în etapa finală din cascada coagulării și anume, formarea fibrinei, fiind deci atât marker al inflamației, cât și factor de coagulare (Danesh et al., 2000). Inflamația este dependentă de interacțiunea dintre fibrinogen și leucocite, intermediată de integrine (Stefanadi et al., 2010). Rolul fibrinogenului, singur sau asociat cu alți markeri, în determinismul evenimentelor coronariene a fost îndelung cercetat de-a lungul timpului. Xu et al. au afirmat ipoteza că fibrinogenul ar putea constitui o verigă între stres și sindroamele coronariene (Xu et al., 2012). Fibrinogenul este asociat și cu alți factori de risc, precum hipertensiunea arterială și hipercolesterolemia.

PCR este sintetizată de către ficat ca răspuns la interleukina 6 și contribuie semnificativ la aterogeneză, alterarea plăcii de aterom și tromboză. Trombina și factorul de creștere derivat din plachete (PDF) induc augmentarea producției de interleukină 6, ceea ce crește eliberarea de PCR la nivelul ficatului, agravând astfel inflamația și tromboza. Adicional, PCR activează sistemul complement și amplifică eliberarea de factor tisular din monocite (Libby, 2001; Ridker, 2003). Aceste mecanisme explică implicarea PCR în constelația fiziopatologică care duce la apariția sindroamelor coronariene acute, fiind nu doar un factor predictiv pentru producerea evenimentelor acute la adulții cu vârstă medie aparent sănătoși, ci și pentru evoluția postinstalară a unui sindrom coronarian acut (Ridker, 2002).

Brunetti et al., au inclus în studiul lor 192 p acienți cu sindroame coronariene, dintre care 138 cu infarct miocardic acut (28 cu infarct non-Q) și 54 cu angină instabilă. Autorii au măsurat PCR, creatinkinaza MB, LDH și troponina I, au evaluat fracția de ejeție prin ecocardiografie și distrucția miocardică cu ajutorul nivelului plasmatic al enzimelor de citoliză miocardică. Pacienții au fost monitorizați timp de 6 luni de la evenimentul acut. Diferit față de rezultatele noastre, care nu au obiectivat diferențe între lotul infarct versus lotul angină instabilă, autorii au descoperit valori ale PCR semnificativ mai mari la pacienții

cu infarct cu undă Q față de infarctul non-Q și angina instabilă, precum și între infarctul non-Q și angina instabilă ($p < 0,01$). În ceea ce privește riscul de evenimente adverse cardiace majore la 6 luni, acesta a fost mai mare pentru pacienții cu infarct cu undă Q care aveau valori de vârf ale PCR. Însă spre deosebire de cercearea noastră, care subliniază asocierea PCR ridicată cu leziunile bicoronariene, studiul lui Brunetti et al. nu a identificat corelații CRP-angiografie coronariană.

Următoarea etapă a constituit analiza mutațiilor genetice. Prima mutație investigată a fost polimorfismul genei apoB100. Relația strânsă dintre apoproteina B100 și nivelul circulant de particule LDL aterogene este unanim recunoscut. Legarea LDL de receptorul său este esențială pentru epurarea moleculelor aterogene. Așadar, mutațiile la nivelul genei apoB100 sau la nivelul receptorului pentru LDL afectează acest proces. Înlocuirea argininei cu glutamina la nivelul codonului 3500 duce la hipercolesterolemie (Frostedgard et al., 1990). Având în vedere rolul important al hiperlipo proteinemiei în ateroscleroză, principalul proces care stă la baza bolii coronariene, am decis să includem în cercetarea noastră și acest parametru. Contrar așteptărilor noastre, dozările genetice efectuate la pacienții incluși nu au decelat prezența acestei mutații.

Având în vedere că aproximativ 2/3 din colesterolul circulant este încorporat în particulele de LDL, complexul LDL-LDL Receptor este esențial în menținerea metabolismului lipidic adecvat (Brown, Goldstein, 1986). Mutațiile pot să apară la nivelul LDL sau al receptorului. Hipercolesterolemiile familiale cresc riscul de infarct miocardic. Însă, cum mutațiile receptorului sunt responsabile de numai 5% din cazurile de boala coronariană la pacienții sub 60 de ani (Brown, Goldstein, 1986; Goldstein, Brown, 1989), atenția s-a îndreptat spre mutațiile apoB100, cea mai studiată fiind mutația de la nivelul codonului 3500. Raportat la cercetarea noastră, deducem că pe lângă criteriul hipercolesterolemiei la pacienții coronarieni pe care i-am inclus, ar fi fost util să dozăm inițial și nivelul seric al apoB100 și să realizăm studiul genetic numai la acei pacienți cu nivel peste limita superioară a normalului.

Asocierea dintre mutația acestei gene și boala coronariană este încă în plină cercetare la nivel mondial, rezultatele fiind controversate. Studiile prezentate în literatura de specialitate demonstrează prezența mutației în număr mare în zona Europei centrale, cu scăderea incidenței pe măsură ce ne deplasăm spre sudul și estul continentului (Horvath et al., 2002). Studiul nostru este primul din România pe această temă. Prin urmare, este posibil ca această mutație să fie rară pe teritoriul țării noastre, dar reprezintă cu siguranță o temă bună de cercetare pe viitor, pe un număr mai mare de pacienți din mai multe zone ale țării, cu aplicarea acestui criteriu suplimentar al includerii în studiu doar a celor cu nivel seric ridicat de apoB100.

Boala arterială coronariană (BAC) reprezintă o patologie poligenică. Declanșarea și severitatea sa depind de interacțiunea dintre factorii genetici și factorii de mediu. Genotipurile DD, ID și II sunt asociate cu niveluri înalte, intermediare, respectiv joase de ECA (Cambien et al., 1994). Studiul nostru arată că cele trei genotipuri influențează severitatea bolii coronariene, interacționând cu factorii de risc convenționali. Relația dintre BAC și polimorfismul genetic (genotip DD) a fost luată în discuție pentru prima dată de Cambien et al. De atunci, tema a fost îndelung dezbătută, rezultatele fiind în continuare neclare, cu unele studii pozitive (Gardemann, 1998), și altele negative (Ferries et al., 1999; Canavy et al., 2000). Polimorfismul I/D este responsabil de 20-50% dintre diferențele de nivel plasmatic ale ECA, ceea ce presupune ca 50-80% provin din influența factorilor de mediu sau din interacțiunea dintre aceste polimorfisme și factorii de mediu (Cambien et al., 1994).

Cercetarea de față a obiectivat o puternică corelație între mutațiile ECA și sexul masculin, vârsta peste 65 de ani, fumat, diabet și obezitate, în special în grupurile cu leziuni bicoronariene. În ceea ce privește fumatul, corelația acestui parametru cu ECA la pacienții noștri s-a înregistrat în special la grupurile cu leziuni bicoronariene și tricornariene, sugerând o contribuție importantă în dezvoltarea bolii coronariene. Nicotina potențează expresia ECA, ducând la o activitate plasmatică și tisulară crescută a angiotensinei (Zhang et al., 2001). Mai mult, alela D a fost asociată cu disfuncție endotelială, în special la

fumători (Buttler et al., 1999). Atât fumatul, cât și alela D au fost corelate cu un nivel crescut de angiotensină II, având drept rezultat formarea de anioni superoxid și degradarea oxidului nitric, iar în final disfuncție endotelială (Drexler, Hornig, 1999). Fumatul alterează mecanismele protectoare antioxidante, modificând expresia genei ECA (Zhang et al., 2001).

Se pare că genotipul DD, spre deosebire de genotipul II, ar fi puternic asociat cu riscul de diabet zaharat și dezvoltarea complicațiilor sale (Marre et al., 1994) și cu hipertensiunea arterială (Zee, 1992). Totuși, există și studii care nu susțin această asociere (Chiang, 1997; Daimon, 2003). Mai mult, un studiu realizat în Australia a scos în evidență o legătură puternică între alela I și hipertensiunea arterială familială în populația australiană (Zee et al., 1992). Un studiu important în această direcție realizat în Arabia Saudită a dovedit o pondere mare a alelei D la pacienții hipertensivi și diabetici cu sau fara hipertensiune ($p < 0,0001$), rezultate similare cu cele ale unui studiu important din Taiwan (Hsieh et al., 2000). Aceste descoperiri sunt susținute și de alte cercetări din alte regiuni, care atestă prevalența crescută a genotipului DD și a alelei D la pacienții diabetici și hipertensivi (Jeng et al., 1997; Daimon et al., 2003). Cercetarea curentă se încadrează în rândul studiilor pozitive, corelația polimorfismelor ECA cu diabetul zaharat fiind semnificativă statistic la pacienții uni și bicononarieni ($p = 0,004$, respectiv $p = 0,001$). Stephens J.W. au analizat prevalența mutațiilor ECA la pacienți caucazieni diabetici și non-diabetici și au demonstrat prevalența genotipurilor DD, ID în rândul pacienților diabetici ($p < 0,001$), precum și corelația pozitivă cu istoricul familial de diabet ($p = 0,03$) (Stephens et al., 2005). Legătura dintre diabetul zaharat și alela D a creat numeroase controverse de-a lungul timpului. În mod surprinzător, meta analiza lui Zhou D. et al pe populația din China, publicată în 2012, care a inclus 41 de studii (4708 cazuri și 5368 subiecți control), a infirmat asocierea dintre polimorfismul ECA și diabetul zaharat tip 2 (Zhou et al., 2012). Prin contrast, în populația egipteană, Zarouk et. al., au adus în atenție asocierea alelei D atât cu diabetul zaharat, cât și cu hipertensiunea arterială, sugerând că la această categorie de pacienți, inițierea precoce a terapiei cu inhibitori ai

ECA și blocații ai receptorilor ECA, ar putea fi utilă pentru prevenirea complicațiilor ulterioare (Zarouk et al., 2009).

Dintre markerii inflamatori analizați, am obținut corelație semnificativă statistic doar între proteina C reactivă (PCR) și polimorfismul ECA, fibrinogenul și VSH neînregistrând diferențe semnificative în funcție de ECA și genotip. Cele mai ridicate valori ale CRP au fost identificate la pacienții cu genotip DD cu leziuni bicornariene și tricornariene. Este dovedit că angiotensina II stimulează procesul inflamator, prin inducerea sintezei de citokine, precum interleukina 6 și factorul de necroză tumorală α , iar inflamația joacă un rol cheie în ateroscleroză, baza fiziopatologică a bolii coronariene (Kranzhofer et al., 1999). Activitatea ECA și concentrațiile sale plasmatice sunt determinate de polimorfisme genetice (Rigat et al., 1992). Genotipul DD are o activitate plasmatică cu 85% mai mare decât genotipul II (Rigat et al., 1990). Nivelul ridicat de PCR la pacienții cu boală coronariană pare a fi un predictor prognostic chiar mai potent decât LDL colesterolul (Ridker et al., 2002). Pacienții cu risc mare au în general plăci de aterom vulnerabile și în consecință pot dezvolta infarct miocardic acut consecutiv închiderii vasului (Ridker, 2003). Se crede că nivelul mare al PCR este mai degrabă un martor al vulnerabilității plăcii, decât al gradului de extensie al aterosclerozei, în timp ce angiotensina II are un rol mai mare asupra extensiei ateromatozei decât asupra vulnerabilității (Libby, Ridker, 2004).

Hipertensiunea arterială esențială este un alt factor de risc cardiovascular cunoscut. SRAA contribuie la menținerea balanței hidro-electrolitice și astfel la reglarea tensiunii arteriale. Prin cele două funcții majore ale sale, una de a activa angiotensina II, un puternic vasoconstrictor și cealaltă de a inactiva bradikina, ECA deține un rol central în homeostazia tensională. Astfel, este de așteptat ca polimorfismele acestei gene, asociate cu o activitate plasmatică mai scăzută sau mai ridicată, să determine dezechilibre tensionale (Badaruddoza et al., 2009). Studiul nostru evidențiază asocierea semnificativă statistic dintre un grad mai redus de hipertensiune și alela I și un grad înalt de hipertensiune și alela D.

Hipertrofia ventriculară stângă (HVS), una dintre mărcile patologice ale hipertensiunii arteriale, reprezintă, în realitate, consecința adaptării ventriculului stâng la creșterea postsarcinii. La baza acestui mecanism stă încercarea cordului de a menține un debit cardiac normal, în condițiile unei suprasolicitări de presiune. Astfel, HVS funcționează ca mecanism compensatoriu optim până la un anumit nivel, dincolo de care se produce decompensarea, cu instalarea insuficienței cardiace. Un pacient cu HVS are un risc de 4 ori mai mare de a dezvolta un infarct miocardic acut, decât un pacient cu același nivel presional, dar fără hipertrofie (Cosenso-Martin et al., 2015).

În ultimii ani a existat un interes din ce în ce mai mare pentru asocierea dintre polimorfismul I/D al ECA, nivelul seric al angiotensinei II și hipertensiune arterială, HVS. Totuși, rezultatele acestor studii sunt controversate. Studiul nostru se încadrează în această linie a cercetărilor pozitive. Dintre pacienții cu HVS, 41,4% au prezentat genotip DD, 52,9% genotip ID și numai un procent mic de 5,7% aveau genotip II. Cardoso et al., au depistat o frecvență mai mare a hipertensiunii arteriale la femeile cu genotip II, în timp ce bărbații de sex masculin aveau preponderent ID sau DD (Cardoso et al., 2008). În studiul nostru, nu s-au observat diferențe semnificative statistic între cele două sexe privind HVS.

CONCLUZII

1. Majoritatea pacienților cu sindrom coronarian acut incluși au fost de sex masculin și s-a observat preponderența bărbaților atât în ceea ce privește infarctul miocardic acut, cât și în ceea ce privește angina instabilă, dar nu au existat diferențe semnificative între sexe între leziunile uni, bi, triconariene.
2. Mai mult de jumătate dintre pacienți erau fumători și, deși nu am identificat diferențe semnificative între infarct și angină instabilă, având în vedere că ambele sunt patologii acute, severe, putem afirma că tutunul rămâne un factor de risc epigenetic important pentru evenimente cardiace de amploare.

3. Istoricul familial pozitiv a fost întâlnit predominant la pacienții cu leziuni severe (boală trivasculară), ceea ce aduce încă o dată în discuție atât rolul predispoziției genetice în această patologie cât și rolul obiceiurilor alimentare din familie.
4. Aproape jumătate dintre pacienți au prezentat valori scăzute ale HDL, iar jumătate dintre aceștia erau fumători, ceea ce evidențiază influența nocivă a tutunului asupra acestui parametru metabolic protector, antiaterogen.
5. Lipoproteinele aterogene au fost crescute în lotul nostru, dar nu la nivelul la care ne-am fi așteptat, ținând cont de severitatea leziunilor. Dar cum anamneza a evidențiat că 90% aveau dislipidemie diagnosticată anterior și urmau deja terapie cu statine în momentul producerii evenimentului coronarian acut, putem explica amplexarea redusă a leziunilor prin acest tratament.
6. Mai mult de jumătate dintre pacienții cu infarct miocardic acut erau obezi, cu o pondere chiar mai crescută a obezității la pacienții bi și triconarieni, față de cei fără leziuni semnificative și unicoronarieni. Aceste aspecte întăresc binecunoscutul rol al obezității în determinismul bolii ischemice cardiace.
7. Rezultatele noastre confirmă implicarea diabetului zaharat în accelerarea aterosclerozei coronariene, cu declanșarea de evenimente cardiace acute.
8. Fibrinogenul și proteina C reactivă au fost crescute la pacienții bicoronarieni, fără diferențe semnificative între infarct și angină instabilă. Aceste modificări au fost observate în special la acei pacienți din studiu care erau diabetici, hipertensivi, fumători și dislipidemici, ceea ce constituie un argument pentru faptul că toți acești factori epigenetici induc inflamație și dezechilibrarea plăcii de aterom, cu apariția plăcii instabile, vulnerabile.
9. Contrar așteptărilor noastre, la nici unul dintre pacienții incluși nu am obținut mutații ale genei apoproteinei B100, posibile explicații putând fi zona geografică (aceste mutații sunt rare și predomină în centrul Europei) și numărul mic de pacienți.
10. Cele mai importante elemente de noutate ale cercetării de față s-au obținut din studiul polimorfismului genetic al ECA. Astfel, în lotul

martor (leziuni ne semnificative) aproape toți pacienții erau purtători II (87.5%), ponderea alelei D crescând odată cu agravarea leziunilor coronariene, spre un procent de 82% de purtători DD în lotul de pacienți tricolorarieni.

În concluzie, importanța clinică a acestui studiu constă în faptul că toate aceste descoperiri ar putea explica răspunsul diferit la medicamentele cu acțiune la nivelul ECA, răspuns determinat de genotipul fiecărui pacient. În acest sens, sunt necesare studii suplimentare care să evalueze efectele farmacogenetice individuale ale polimorfismului ECA pentru îmbunătățirea strategiilor terapeutice și prognostice în sindroamele coronariene acute.

LISTA LUCRARILOR ” IN EXTENSO” PUBLICATE DE AUTOR DIN TEMATICA DOCTORATULUI

1. **Apăvăloaie (Vladeanu) M.C.**, Bararu Bojan I., Bădulescu O.V., Pleșoianu C.E., Jitaru D., Bojan A., Iliescu D., Sîrbu P.D., Ciocoiu M., Bădescu M., Arsenescu Georgescu C. Determination of platelet parameters with impedance automated analyzers in diabetic patients with coronary artery disease. *Rev Chim-Bucharest* 2019; 70(4): 1242-1244.
2. **Apăvăloaie M.C.**, Bararu I., Pleșoianu C.E., Jitaru D., Dragoș L., Ciocoiu M., Arsenescu Georgescu C., Bădescu M.. Inflammatory and genetic markers (Apo B100 and angiotensin-converting enzyme gene) in the coronary artery disease. *Rev.Med.Chir.* 2016; 120 (3):530-536 ISSN: 0048-7848.
3. **Apăvăloaie M.**, Bararu I., Jitaru D., Ciocoiu M., Bădescu M., Arsenescu Georgescu C. Genetic determinism in the acute coronary syndrome. *RJAC* 2016; 4(10): 173-181, ISSN 2327-5707, e ISSN 2473-6562.
4. **Apăvăloaie M.**, Bararu I., Ciocoiu M., Bădescu M., Arsenescu Georgescu C. Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms

in coronary artery disease-a controversial role. *Rev Med Chir.* 2015; 119(3):784-790, ISSN 0048-7848.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Ades P, Savage P. Obesity in coronary artery disease: an unaddressed behavioral risk factor. *J Prev Med Public Health.* 2017; 104: 117-119.

Akin I, Nienaber Ch. Obesity paradox in coronary artery disease. *World J Cardiol.* 2015; 7(10): 703-708.

Badaruddoza AJS, Bhanwer R, Sawhney NK, et al. A study of angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in essential hypertension among a business community Punjab. *J Hum Genet.* 2009; 9(3-4):231-234.

Brunetti ND, Troccoli R, Correale M et al. C-reactive protein in patients with acute coronary syndrome: correlation with diagnosis, myocardial damage, ejection fraction and angiographic findings. *Int J Cardiol.* 2006; 109(2): 248-256.

Butler R, Morris AD, Burchell B, Struthers AD. DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans. *Hypertension* 1999; 33: 1164-1168.

Cambien F, Costerousse O, Tired L, et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994; 90: 669-676.

Cardoso RL, Nogueira AR., Salis LHA, et al. The association of ACE gene D/I polymorphism with cardiovascular risk factors in a population from Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(6): 512-518.

Cosenso-Martin Neves L, Vaz-de-Melo Oliveira R, Rocco Pereira L, et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism, 24-hour blood pressure profile and left ventricular hypertrophy in hypertensive individuals: a cross-sectional study. *Eur J Med Res.* 2015; 20(1): 74.

Dangas GD, Farkouh ME, Sleeper LA, et al. Long-term outcome of PCI versus CABG in insulin and non-insulin-treated diabetic patients: results from the FREEDOM trial. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:1189-97.

Esteghamati A., Abbasi M., Nakhjavani M et al. Prevalence of diabetes and other cardiovascular risk factors in an Iranian population with acute coronary syndrome. *Cardiovasc Diabetol*. 2006; 17(5): 15.

Gardemann A, Fink M, Stricker J, et al. ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 1998; 139: 153-159.

Hsieh MC, Lin SR, Hsieh TJ, et al. Increased frequency of angiotensin converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15:1008–1013.

Hussain M, Awan FR, Gujjar A, et al. A case control association study of ACE gene polymorphism (I/D) with hypertension with Punjabi population from Faisalabad, Pakistan. *Clin Exp Hypertens*. 2018; 40(2): 186-191.

Jiao ZY, Li XT, Li YB, et al. Correlation of triglycerides with myocardial infarction and analysis of risk factors for myocardial infarction in patients with elevated triglyceride. *J Thorac Dis*. 2018; 10(5): 2551–2557.

Jiang X, Sheng H, Li J, et al. Association between renin- angiotensin system gene polymorphism and essential hypertension: a community-based study. *J Hum Hypertens*. 2009; 23:176–181.

Kokawa K, Nishizawa Y, Hosoi M. Effect of polymorphism of apolipoprotein E and angiotensin-converting enzyme genes on arterial wall thickness. *Diabetes* 1997; 46: 682- 687.

Kolovou GD, Mikhailidis DP, Kovar J, et al. Assessment and clinical relevance of non-fasting and postprandial triglycerides: an expert panel statement. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011; 9:258-70.

Matsumoto S, Gotoh N, Hishinuma S, et al. The role of hypertriglyceridemia in the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction. *Nutrients* 2014; 6:1236-50.

Merry A, Boer J, Schouten L, et al. Smoking, alcohol consumption, physical activity, and family history and the risks of acute myocardial

infarction and unstable angina pectoris: a prospective cohort study. *BMC Cardiovascular Disorders* 2011;11:13.

Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet* 2012; 380: 581-590.

Niemiec P, Zak I, Wita K. The D allele of angiotensin I converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism is associated with the severity of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46: 446-452.

Niraj A, Pradhan J, Fakhry H, et al. Severity of coronary artery disease in obese patients undergoing coronary angiography: Obesity Paradox revisited. *Clin Cardiol.* 2007; 30(8):391–396.

Niu W, Qi Y, Hou S, et al. Haplotype-based association of the renin-angiotensin-aldosterone system genes polymorphisms with essential hypertension among Han Chinese: the Fangshan study. *J Hypertens.* 2009; 27:1384–1391.

Oren I, Brook JG, Gershoni-Baruch R, et al. The D-allele of the angiotensin- converting enzyme gene contributes towards blood LDL-cholesterol levels and the presence of hypertension. *Atherosclerosis* 1999; 145(2): 267-271.

Panagiotakos DB, Toutouzas PK. Importance of LDL/HDL cholesterol ratio as a predictor for coronary heart disease events in patients with heterozygous familial hyper cholesterolaemia: a 15-year follow-up (1987-2002). *CurrMedRes Opin.* 2003; 19:89–94.

Parsa AFZ, Jahanshahi B. Is the relationship of body mass index to severity of coronary artery disease different from that of waist-to-hip ratio and severity of coronary artery disease? Paradoxical findings. *Cardiovasc J Afr.* 2015; 26(1):13–16.

Peng N, Liu J, Gao D. Angiotensin II-induced C-reactive protein generation: Inflammatory role of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; 193: 292–298.

Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003; 107: 363–369.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990; 86:1343-1346.

Rossi R, Iaccarino D, Nuzzo A, et al. Influence of body mass index on extent of coronary atherosclerosis and cardiac events in a cohort of patients at risk of coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovas.* 2011; 21(2):86–93.

Rubinshtein R, Halon DA, Jaffe R, et al. Relation between obesity and severity of coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *Am J Cardiol.* 2006; 97(9):1277–1280.

Stephens JW, Dhamrait SS, Cooper JA. The D allele of the ACE I/D common gene variant is associated with type 2 diabetes mellitus in Caucasian subjects. *Mol Genet Metab.* 2005; 84(1): 83-89.

Wang CH, Li SH, Weisel RD. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 2003;107:1783–1790.

White J, Swerdlow D, Preiss D, et al. Association of lipid fractions with risks for coronary artery disease and diabetes *JAMA Cardiology* 2016; 1: 692-699.

Xenophontos S, Hadjivassiliou M, Karagrigoriou A, et al. Low HDL cholesterol, smoking and polymorphism are associated with myocardial infarction in Greek Cypriot males. A pilot study. *Open Cardiovasc Med J.* 2008; 2:52–9.

Xu W, Hang J, Guo L, et al. Plasma fibrinogen: A possible link between job stress and cardiovascular disease among Chinese workers. *Am J Ind Med.* 2012; 55:167–175.

Zhu J, Su X, Li G, et al. The incidence of acute myocardial infarction in relation to overweight and obesity: a meta-analysis. *Arch Med Sci.* 2014; 10(5): 855-862.

Zhang S, Day I, Ye S. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001; 154: 277-283.

