



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE „GEORGE EMIL PALADE” DIN TÂRGU MUREȘ
ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

**IDENTIFICAREA PROFILULUI DE RISC GENETIC PENTRU BOALA CARDIO-CEREBRO-VASCULARĂ PRIN
SCREENING GENETIC MULTIPLU**

Conducător de doctorat: Prof. Univ. Dr. Minodora Dobreanu

Doctorand: George-Valeriu Moldovan

Boala coronariană reprezintă principala cauză de morbiditate și mortalitate la nivel mondial. O treime dintre pacienții cu boală coronariană are debutul patologiei înainte de vârsta de 55 de ani în cazul bărbaților, respectiv 65 de ani în cazul femeilor, fiind diagnosticați cu boală coronariană prematură. Factorul de risc cel mai incriminat este ateroscleroza, determinată în principal de hiperlipidemie. Independent de prezența factorilor de risc, mutațiile în anumite gene care influențează metabolismul lipidic conduc la apariția bolii coronariene. În aproximativ 50% din cazuri aspectul clinic este cel al Hipercolesterolemiei Familiale (FH). Această patologie este deseori diagnosticată pe baza tabloului clinic și a testelor de laborator. Diagnosticul de certitudine al hipercolesterolemiei familiale se poate stabili numai prin analiză genetică, identificând astfel mutația determinantă. Deși la nivel internațional sunt funcționale registre specifice patologiei, girate de către societățile de profil, România nu este prezentă cu date oficiale.

Studiul derulat a avut ca principal obiectiv obținerea unui diagnostic de certitudine în hipercolesterolemia familială la pacienții cu boală cardiacă ischemică prematură manifestă clinic. O altă direcție de cercetare a fost reprezentată de realizarea unui profil genetic specific pacientului cu predispoziție spre patologia cardiovasculară. S-a urmărit sublinierea importanței diagnosticului molecular, ca fiind unul de certitudine, la pacientul cu hipercolesterolemie familială.

Lucrarea de față are la bază derularea unui studiu prospectiv în care au fost incluși pacienți diagnosticați clinic cu boală coronariană (uni-, bi- sau trivasculară) prematură, confirmată prin cateterism cardiac. Aceștia prezentau nivele crescute ale LDL-Colesterol, în contextul unor valori normale ale trigliceridelor serice. Subiecții înrolați au fost internați la nivelul Clinicilor de Cardiologie Adulți din cadrul Institutului de Urgență pentru Boli Cardiovasculare și Transplant Târgu Mureș în perioada ianuarie 2016-august 2018. Criteriile de excludere au fost reprezentate de prezența patologiilor care pot conduce, ca și complicație, la apariția bolii coronariene sau la modificări ale lipidelor serice circulante. În lotul martor au fost incluse persoane adulte clinic sănătoase.

Pentru îndeplinirea dezideratului de a identifica cele mai frecvente mutații implicate în apariția hipercolesterolemiei familiale în arealul românesc, prezenta lucrare a fost structurată în trei studii distincte, respectiv:

1. Investigarea genetică a hipercolesterolemiei familiale prin metode validate pentru diagnostic clinic;
2. Utilizarea secvențierii Sanger în diagnosticarea hipercolesterolemiei familiale;
3. Identificarea de noi biomarkeri în evaluarea riscului aterosclerotic.

În primul studiu am urmărit identificarea de mutații punctiforme asociate cu determinarea FH, dovedirea implicării variațiilor numărului de copii în etiologia FH și aplicabilitatea testelor validate clinic utilizate în cadrul studiului la populația din România. Pentru atingerea acestor obiective a fost investigat un număr de 158 de persoane din lotul de studiu și 92 de subiecți din lotul control. Lipidele serice au fost determinate cu ajutorul unor metode validate pentru diagnostic. Identificarea mutațiilor punctiforme s-a realizat cu ajutorul Familial Hypercholesterolemia Array I și II (Randox Laboratories, Crumlin, Marea Britanie), iar analiza variațiilor numărului de copii s-a realizat prin tehnica MLPA, cu ajutorul kit-ului SALSA MLPA Probemix P062 LDLR (MRC Holland, Amsterdam, Țările de Jos).

Ca și rezultate, un număr de 4 pacienți au prezentat mutații punctiforme cauzatoare ale FH. Evaluarea genetică a variațiilor numărului de copii ale genei *LDLR* nu a indicat acest mecanism ca fiind implicat în apariția tabloului clinic al FH. Deși am înregistrat o rată mică de diagnostic genetic, utilizarea testelor validate clinic pentru diagnosticul molecular al FH poate reprezenta o variantă facilă și ușor accesibilă de investigare a unei populații țintă.

Al doilea studiu propune utilizarea Secvențierii Sanger ca metodă de identificare a unor variante ale genei *LDLR* specifice FH la membrii unei familii care prezentau tablou clinic și paraclinic sugestiv. Totodată s-a urmărit identificarea unei relații de cauzalitate între modificările genetice tipice FH și severitatea tabloului clinic manifest, dar și investigarea implicării variantelor identificate în etiologia FH. Secvențierea Sanger a permis depistarea unui număr de șapte variante mononucleotidice în proba de acid nucleic provenită de la cazul index. O parte dintre variantele exonice identificate la cazul index au fost evidențiate și la rudele de gradul I ale acesteia.

Modificările genice identificate, chiar dacă per se nu sunt considerate patogene, în asociere cu alți factori predispozanți, ar putea crește riscul de apariție a bolii coronariene. Rezultatele subliniază complexitatea etiologiei genetice a acestei patologii, care implică, pe lângă gena principală, *LDLR* și alte gene ale căror modificări individuale pot conduce la prezența FH, precum și posibilitatea existenței determinismului poligenic.

Al treilea studiu a avut ca și deziderat cuantificarea riscului aterosclerotic prin evaluarea aportului variantelor alelice *APOE* în etiologia bolii coronariene, estimarea riscului de ateroscleroză prin identificarea de noi potențiali biomarkeri și evaluarea acurateții formulelor de calcul ale LDL-C. Au fost incluși un număr de 104 pacienți în lotul de studiu și 87 de persoane sănătoase în lotul control. Criteriile de includere a subiecților au fost cele prezentate în metodologia generală, la care s-a adăugat prezența tratamentului hipolipemiant de lungă durată în rândul persoanelor cu boală coronariană manifestă. Investigarea biochimică a principalelor lipide serice precum și a proteinelor plasmatiche s-au realizat utilizând sisteme analitice dedicate și reactivi validați pentru diagnostic. LDL-C a fost măsurat, dar a fost și calculat, cu ajutorul ecuației Friedewald și a Ecuației₂ (Sampson et al.). Toți subiecții au fost testați pentru prezența variantelor *APOE* rs429358 și rs7412 folosind două tehnici diferite bazate pe PCR. Pentru analiza statistică și reprezentările grafice ale datelor, a fost utilizat software-ul SPSS 23.0.

Riscul de apariție al bolii coronariene nu a fost influențat de genotipurile *APOE*. La pacienții tratați cu medicație hipolipemiantă raportul ApoB/ApoA1 nu a fost relevant ca și biomarker, însă a existat o asociere pozitivă între non-HDL-C și raportul ApoB/ApoA1, fiind probabil utilă în evaluarea ulterioară a riscului de recurență al bolii coronariene. Rezultatele obținute au dovedit acuratețea Ecuației₂ propusă de Sampson în special pentru nivele serice considerate valori țintă ale tratamentului hipolipemiant.

Gradul de originalitate al prezentei teze este conferit de investigarea genetică a pacienților din România diagnosticați clinic cu boală coronariană prematură prin tehnologii de ultimă generație. Având în vedere adresabilitatea clinicii din cadrul căreia au fost înrolați pacienții, s-a realizat o cartografiere fidelă regiunii centru a României, cu privire la această patologie. Totodată am propus pentru prima dată un diagnostic genetic etiologic, pentru acești pacienți, știind că obținerea unui diagnostic de certitudine în hipercolesterolemia familială este primordială în abordarea pacientului cu boală cardiacă ischemică prematură.