**MINISTERUL SĂNĂTĂŢII AL REPUBLICII MOLDOVA**
**INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 616.329-002-008.9

**SCURTU ALINA**

# PARTICULARITĂŢILE CLINICO-PARACLINICE ALE BOLII DE REFLUX GASTROESOFAGIAN ÎN RAPORT CU METABOLISMUL ŞI POLIMORFISMUL GENETIC AL OXIDULUI NITRIC

**321.01 – BOLI INTERNE (Gastroenterologie)**

Autoreferatul
tezei de doctor în ştiinţe medicale

**CHIŞINĂU, 2016**

Teza a fost elaborată la Disciplina Medicina Internă semiologie, Departamentul Medicina Internă, Universitătea de Stat de Medicină şi Farmacie „Nicolae Testemiţanu” din Republica Moldova.

**Conducător ştiinţific**: **Istrati Valeriu**, doctor habilitat în ştiinţe medicale, profesor universitar, Om Emerit

**Consultant ştiinţific**: **Dumbrava Vlada-Tatiana**, doctor habilitat în ştiinţe medicale, profesor universitar, Om Emerit

**Referenţi oficiali:** **Ţîbîrnă Ion,** doctor habilitat în ştiinţe medicale, profesor universitar, IP USMF „Nicolae Testemiţanu”

**Duca Maria,** doctor habilitat în ştiinţe biologice, profesor universitar academician, AŞM.

**Componenţa Consiliului ştiinţific specializat:**

**Matcovschi Sergiu – preşedinte,** doctor habilitat în ştiinţe medicale, profesor universitar

**Corlăteanu Alexandru – secretar ştiinţific,** doctor în ştiinţe medicale, conferenţiar universitar

**Bivol Grigore** - doctor în ştiinţe medicale, profesor universitar

**Bodrug Nicolae** - doctor habilitat în ştiinţe medicale, profesor universitar

**Mihu Ion** - doctor habilitat în ştiinţe medicale, profesor universitar, IMSP Institutul Mamei şi Copilului

**Tagadiuc Olga** - doctor habilitat în ştiinţe medicale, conferenţiar universitar.

Susţinerea va avea loc *16 martie 2016, ora 14$^{00}$* la şedinţa Consiliului Ştiinţific Specializat D 50.321.01-02 de pe lângă Universitatea de Stat de Medicină şi Farmacie „Nicolae Testemiţanu” din Republica Moldova (MD-2004, or. Chişinău, bd. Ştefan cel Mare şi Sfânt, 165).

Teza de doctorat şi autoreferatul pot fi consultate la biblioteca Universităţii de Stat de Medicină şi Farmacie „Nicolae Testemiţanu” din Republica Moldova (MD-2004, or. Chişinău, bd. Ştefan cel Mare şi Sfânt, 165) şi la pagina web a CNAA (www.cnaa.md)

Autoreferatul a fost expediat la _____ 2016

**Secretar ştiinţific al Consiliului ştiinţific specializat:**

doctor în ştiinţe medicale, conferenţiar universitar **Corlăteanu Alexandru**

**Conducător ştiinţific:**

doctor habilitat în ştiinţe medicale, profesor universitar **Istrati Valeriu**

**Consultant ştiinţific**

doctor habilitat în ştiinţe medicale, profesor universitar **Vlada-Tatiana Dumbrava**

**Autor:** **Scurtu Alina**

**© Scurtu Alina,2016**

## REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea şi importanţa temei.** BRGE este una dintre cele mai frecvente boli ale civilizaţiei moderne [8]. La finele secolului XX, în ţările economic avansate s-a constatat o tendinţă evidentă de reducere a morbidităţii prin boala ulceroasă şi de creştere a morbidităţii prin BRGE, fapt reflectat în postulatul proclamat la a VI Săptămână comună a gastroenterologilor (Birmingham, 1997) - „secolul XX – secolul bolii ulceroase, secolul XXI – secolul BRGE" [6].

Prevalenţa globală înaltă în toate grupurile de vârstă [11], tendinţa persistentă de creştere a incidenţei pe toate continentele, îndeosebi în ţările economic avansate [14], persistenţa îndelungată a leziunii cu evoluţie cronică recidivantă, agravarea semnificativă a calităţii vieţii şi statutului psihologic a pacienţilor [11], costuri considerabile de management medico-social [11, 14], spectru larg de manifestări esofagiene şi extraesofagiene, care complică mult diagnosticul precoce şi tratamentul adecvat al bolii [5,9], dezvoltarea unor complicaţii grave, implementarea în practica medicală a metodelor contemporane de diagnostic [13], existenţa unor dificultăţi în tratamentul maladiei [8] - evidenţiază afecţiunea printre alte leziuni esofagiene şi determină necesitatea elaborării noilor algoritmi de diagnostic şi tratament [11,14].

Prevalenţa BRGE variază în diferite ţări: de la 10-20% în ţările Europei de Vest, Americii de Nord [12], Americii de Sud şi Australiei [15] până la 5% în ţările Asiei. Aceste diferenţe epidemiologice ale BRGE în diferite regiuni ale lumii reflectă atât stilul de viaţă, tradiţiile culturale şi obiceiurile alimentare [7], cât şi diversele metode şi criterii utilizate pentru diagnosticul BRGE.

În Republica Moldova afecţiunea este mai frecventă decât se raportează, deşi prevalenţa BRGE nu este precizată din cauza tabloului clinic polimorf şi insuficienţei metodelor de explorare paraclinică, necesare pentru confirmarea diagnosticului [3,V-T. Dumbrava şi coautorii, 2002]. Conform Biroului Național de Statistică Medicală, date epidemiologice privind BRGE în Republica Moldova nu sunt. Lipsesc și datele statistice despre incidența și prevalența acestei patologii în populația adultă și pediatrică din Republica Moldova.

**Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare.** Actualmente, s-au obţinut progrese importante în diagnosticul şi tratamentul BRGE [11], în evaluarea manifestărilor extraesofagiene [18,19] şi a complicaţiilor leziunii, deseori severe şi fatale. Patogenia BRGE rămâne şi la momentul actual studiată insuficient. RGE patologic, cu expoziţia excesivă a esofagului la refluatul gastric, reprezintă principalul mecanism patogenic al bolii [10]. Ineficienţa mecanismului antireflux este condiţionată de incompetenţa SEI, dismotilitatea antroduodenală, diminuarea clearence-ului esofagian şi a capacităţii de protecţie a mucoasei esofagiene. Scăderea presiunii SEI este cel mai important element al

barierei antireflux. Una din cauzele scăderii presiunii bazale a SEI este considerată modificarea nivelului de NO - neurotransmiţător al neuronilor intramurali neadrenergici necolinergici [20].

Capacitatea NO de a acţiona ca un regulator fiziologic sau un agent posibil toxic pot fi cauzate de prezenţa şi activitatea izoformelor de NOS. Sunt cunoscute patru tipuri de NOS: endotelială (eNOS), neuronală (nNOS), mitocondrială (mtNOS), care sunt constitutive şi macrofagală (iNOS) - inductibilă. Sintazele NO sunt expresia genelor NOS1, NOS2 şi NOS3. Izoformele NOS posedă particularităţi individuale atât în mecanismul de acţiune, cât şi în importanţa efectelor biologice asupra organismului. NO sintetizat de iNOS participă la instalarea proceselor inflamatorii în diverse maladii. NO, produs de eNOS, codificată de gena NOS3, este cel mai puternic vasodilatator endogen [2]. Însă, date despre rolul polimorfismului genelor NOS1 şi NOS2 în declanşarea şi evoluţia BRGE în literatura de specialitate nu am găsit.

Studiul particularităţilor metabolismului şi rolului NO în apariţia dereglărilor motorii şi neuroregulatorii la pacienţii cu BRGE a constatat o diferenţă statistic semnificativă între indicatorii metabolismului NO şi severitatea manifestărilor clinice şi endoscopice ale BRGE [20].

**Scopul studiului** a constat în cercetarea particularităţilor clinico-evolutive şi de diagnostic ale bolii de reflux gastroesofagian în raport cu nivelul metaboliților stabili al oxidului nitric în serul sangvin și sucul gastric, precum şi cu polimorfismul genelor NOS1 și NOS2 .

**Obiectivele studiului:**

1. Studiul epidemiologic cu evidentierea incidenței simptomelor BRGE in populatia matură din unele regiuni ale Republicii Moldova conform rezultatelor anchetarii a unui eșanțion de respondenți, cu vîrsta cuprinsă între 17 și 79 ani.
2. Studierea particularităţilor clinico-evolutive ale bolii de reflux gastroesofagian în funcţie de tipul de afectare a mucoasei esofagiene.
3. Evaluarea modificărilor endoscopice, morfologice si pH-metriei in 24 ore in boala de reflux gastroesofagian în dependenţă de severitatea afectării mucoasei esofagiene.
4. Studierea ritmului circadian al simptomelor pacienților cu BRGE în dependență de forma evoluției (erosivă, nonerosivă).
5. Determinarea nivelului metaboliţilor stabili al oxidului nitric în serul sanguin şi sucul gastric la pacienţii cu diverse tipuri de afectare a mucoasei esofagului.
6. Studierea polimorfismului genelor, care codifică sintazele oxidului nitric: NOS1 si NOS2 la pacienţii cu boala de reflux gastroesofagian.
7. Elaborarea criteriilor de diagnostic şi pronostic la pacienţii cu boală de reflux gastroesofagian in dependenta de tipul de afectare a mucoasei esofagului.

**Metodologia cercetării științifice.** În cadrul acestui studiu pacienții au fost selectați conform criteriilor de includere și de excludere. Metodele de investigare au fost generale: chestionarul clinico-anamnestic și chestionarul din clinica Mayo, tradus în limba română şi rusă, şi recomandat de Societatea Americană de Gastroenterologie pentru studierea epidemiologiei BRGE, examen medical complex, investigații paraclinice, instrumentale, morfologice și metode de cercetare speciale – determinarea nivelului metaboliților NO in serul sanguin și sucul gastric și studierea polimorfismului genelor NOS1 și NOS2 in asociere cu diverși factori de risc.

**Noutatea și originalitatea științifică.** În premieră a fost efectuat studiul epidemiologic cu evidențierea incidenței BRGE la populația matură în unele regiuni ale RM, folosind ancheta clinicii Mayo. Sau apreciat unele particularități clinico-evolutive ale diferitor forme de afectare a mucoasei esofagiene în BRGE prin aprecierea ritmului circadian al acestei maladii și analizând rezultatele endoscopice și pH-metriei în 24 de ore. Au fost determinați metaboliții stabili al NO în serul sangvin și sucul gastric la pacienții cu BRGE in raport cu diferite forme de afectare a mucoasei esofagului. În premieră s-a studiat polimorfismul genelor NOS1 și NOS2 la pacienții cu BRGE cu diferite tipuri de afectare a mucoasei esofagului. Originalitatea cercetării constă în evidențierea particularităților clinico-evolutive, endoscopice şi morfologice ale bolii de reflux gastroesofagian în funcţie de gradul de afectare a mucoasei esofagiene şi nivelul oxidului nitric, studierea polimorfismului genelor NOS în instalarea şi dezvoltarea afecțiunii. Rezultatele obținute au permis elaborarea unor criterii de diagnostic al pacienților cu diferite tipuri de afectare a mucoasei esofagului în BRGE, unde au fost luate în considerare datele clinice, endoscopice, nivelul metaboliților NO din serul sangvin, sucul gastric şi rezultatele studierii polimorfismului genetic a NOS1 și NOS2.

**Problema științifică soluționată in teză** constă in fundamentarea științifică a rolului oxidului nitric in dezvoltarea și evoluția bolii de reflux gastroesofagian și determinarea particularităților clinice ale diferitor forme ale maladiei in cauză cea ce va contribui la elaborarea criteriilor diagnostice, fapt ce va permite evidențierea metodelor de monitorizare și prevenire a complicațiilor severe ale BRGE.

**Semnificaţia teoretică a lucrării.** Studiul reprezintă un suport științific important pentru elucidarea particularităților clinice și evolutive a diferitor forme a BRGE în raport cu nivelul metaboliților oxidului nitric. Rezultatele obţinute permit elaborarea măsurilor de profilaxie a complicațiilor severe a bolii de reflux gastroesofagian.

**Valoarea aplicativă a cercetării.** Rezultatele obţinute permit pronosticarea şi elaborarea măsurilor de profilaxie și tratament a bolii de reflux gastroesofagian.

**Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:**

1. Simptomele caracteristice pentru boala de reflux gastroesofagian se întîlnesc frecvent în populația matură a Republicii Moldova

2. Formele endoscopice a BRGE (erosivă și nonerosivă) au diferite particularități clinice și morfologice, și reflectă gradul de afectare a mucoasei esofagului. Pacienții cu forma erosivă a BRGE mai frecvent au prezentat așa simptome ca durerea toracică și disfagia și de asemenea simptome extradigestive. Subiecții cu BRGE forma erosivă au prezentat mai frecvent un profil circadian patologic comparativ cu cei cu forma nonerosivă.

3. Nivelul plasmatic și gastric al metaboliților oxidului nitric este mai mare la pacienții lotului de bază comparativ cu lotul martor și evident predomină la pacienții cu forma erosivă a bolii de reflux gastroesofagian.

4. Polimorfismul genei NOS1 nu a depistat diferența statistică între lotul martor și lotul de bază. Varianta alelică C/C a genei NOS2 se întîlnește mai frecvent la pacienții cu BRGE cu o durată a maladiei mai lungă de 10 ani.

5. Analiza genetică constată că purtătorii genotipulul C/C al polimorfismului G954C al genei NOS2, asociat cu factorul de durată a maladiei peste 10 ani și a modificărilor histomorfologice a epiteliului esofagului denotă un risc de dezvoltare a esofagului Barrett de 3,9 ori mai mare, comparativ cu alte genotipuri.

**Implementarea rezultatelor ştiinţifice:** Principalele rezultate ale studiului sunt aplicate în procesul didactic a IP USMF „Nicolae Testemiţanu" al Catedrei Medicină Internă Semiologie și Disciplinei Gastroenterologie din cadrul Departamentului Medicina Interna cu implementarea în activitatea curativă a S IMSP Spitalul Feroviar Central din Chișinău, a IMSP Spitalului Clinic Municipal №1, Chișinău și IMSP Spitalului Ministerului Sănătății.

**Aprobarea rezultatelor cercetării.** Rezultatele studiului au fost prezentate şi discutate în cadrul următoarelor reuniuni ştiinţifice: Conferința Științifico-Practică "Medicina modernă, actualități și perspective", 27-28 mai 2010, Chișinău, RM; Congresul III al medicilor de familie din Republica Moldova cu participare internațională, 17-18 mai 2012, Chișinău, RM; Congresul III Național de Gastroenterologie și Hepatologie cu participare internațională, 20-21 iunie 2013, Chișinău, RM; Congresul național de medicină internă, 2013, România. Teza a fost discutată și aprobată in cadrul ședinței Disciplinei de Medicina Internă Semiologie al USMF «Nicolae Testemițanu» din 22.04.2015 (proces-verbal nr.11) și la ședinta Seminarului Științific de Profil „Boli Interne" din cadrul IP USMF „Nicolae Testemiţanu", din 25. 05.2015 (proces-verbal nr.1).

**Publicații la tema tezei.** Materialele tezei au fost publicate în 16 lucrări ştiinţifice, inclusiv 3 articole fără coautori şi 13 în ediții recenzate.

**Volumul şi structura tezei.** Teza este expusă pe 126 de pagini de text imprimat, constă din introducere, 4 capitole, concluzii generale şi recomandări practice, rezumat în limbile română, rusă, engleză, bibliografie cu 198 de referinţe, include 30 de figuri, 36 tabele, 5 formule şi 4 anexe.

**Cuvinte-cheie:** boala de reflux gastroesofagian, metabolism, oxid nitric, polimorfism genetic.

## CONȚINUTUL TEZEI

### 1. BOALA DE REFLUX GASTROESOFAGIAN (Revista literaturii)

În acest compartiment sunt relatate informaţii contemporane din literatura de specialitate cu referire la BRGE, insistând mai mult asupra particularităţilor clinico-paraclinice ale bolii în raport cu nivelul metaboliților oxidului nitric şi polimorfismul genetic al sintazelor NO. Sunt formulate problema de cercetare şi direcţiile de soluţionare a ei.

Studiile realizate în diferite ţări au constatat valori înalte, dar şi deosebiri semnificative ale incidenţei şi prevalenţei BRGE: indicatori semnificativ mai mari s-au constatat în America de Nord şi Europa, comparativ cu ţările din America de Sud, India, Africa şi Orientul Mijlociu. Aceste diferenţe epidemiologice ale BRGE în diferite regiuni ale lumii reflectă atât stilul de viaţă, tradiţiile culturale şi obiceiurile alimentare, cât şi diversele metode şi criterii utilizate pentru diagnosticul BRGE. În Republica Moldova lipsesc datele statistice despre incidența și prevalența BRGE.

Leziunile mucoasei esofagiene sunt determinate de creşterea factorilor de agresiune (nocivitatea fluidului de reflux) şi ineficienţa factorilor de apărare ale mucoasei esofagiene. Tranziţia de la refluxul fiziologic la BRGE este condiţionată de factori anatomici şi fiziologici, în cadrul cărora rolul primordial este deţinut de integritatea anatomică şi funcţională a SEI.

În ultimele decenii au fost obţinute rezultate ce mărturisesc rolul patogenic al NO în dezvoltarea şi progresarea BRGE. S-a determinat interrelaţia tabloului clinic şi a stadiului endoscopic a bolii cu nivelul metaboliților oxidului nitric. NO şi celulele nervoase, în care acesta este prezent în calitate de mediator, au un rol important în patogeneza BRGE.

Persistă o discordanță de evidențe a rolului polimorfismelor genelor NOS în morbiditate, care, posibil, reflectă problemele în studiul de replicare, cum ar fi diferența în populațiile din fiecare eșantion, fapt care impune necesitatea continuării cercetărilor în diverse populații etnice.

Actualmente principalele probleme ale BRGE sunt: determinarea definitivă a etiologiei, descifrarea mecanismelor relaxării tranzitorii a SEI, veriga principală în patogenie, crearea tabloului epidemiologic, diagnosticul precoce al esofagului Barrett, evaluarea clinică a eficienţei tratamentului şi prognozarea recidivelor afecţiunii.

## 2. MATERIALUL ŞI METODELE DE CERCETARE

Studiul a fost realizat in cadrul secțiilor de gastrologie ale Spitalului Clinic Central Feroviar din Chișinau si Spitalului Raional Ribnita in perioada anilor 2010-2014. Diagnosticul de BRGE a fost stabilit în baza tabloului clinic și a fost confirmat prin examenul endoscopic și morfologic, conform ghidurilor internaționale și a criteriilor recomandate de Protocolul Clinic National «Boala de reflux gastroesofagian la adult». [17]

Conform design-ului studiului, epidemiologia bolii de reflux in populația matură a RM a fost cercetată pe un eșanțion de 1820 de respondenți, din diferite raioane ale țării și cuprind regiunile geografice de Nord, Centru, Sud. Pentru realizarea acestui scop a fost utilizat chestionarul din clinica Mayo.

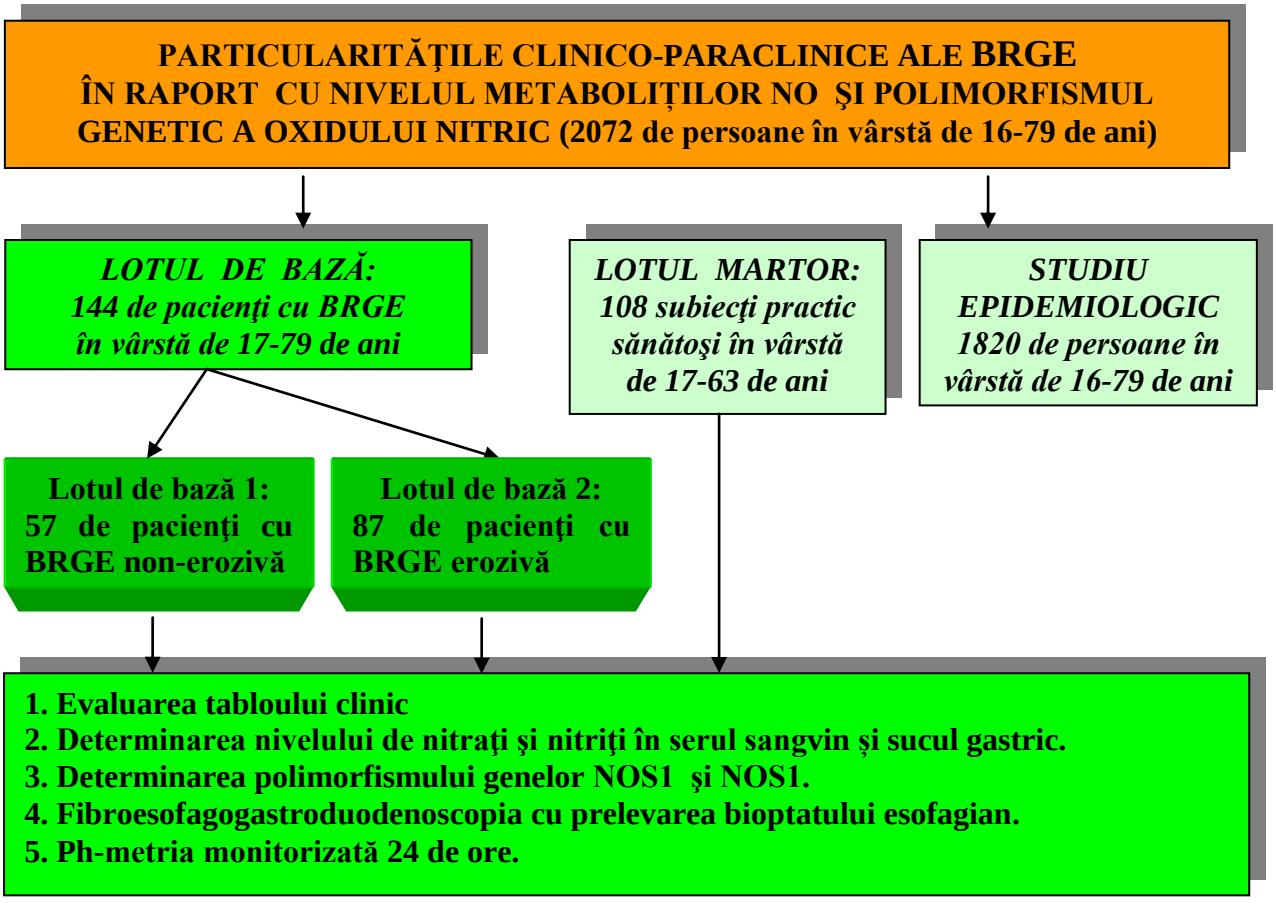


Figura 1. Designul studiului

Studiul complex a fost efectuat pe un lot din 252 de persoane în vârstă de 17-79 de ani, inclusiv 110 (43,7%) de bărbați și 142 (56,3%) de femei. Lotul de bază a inclus 144 de pacienţi cu BRGE şi a fost constituit din 2 subloturi: 57 de pacienţi cu BRGE non-erozivă (lotul de bază 1) şi 87 de pacienţi cu BRGE erozivă (lotul de bază 2). Lotul martor a fost constituit din 108 de subiecţi practic sănătoşi şi asimptomatici.

*Criteriile de includere în studiu:* În studiu au fost incluși bărbați și femei cu BRGE erozivă și non-erozivă în vârstă de 17 ani sau mai mult care nu au administrat tratament cu IPP pentru cel puțin 7 zile înainte de studiu pH și au semnat consimțământul informat în scris.

*Criteriile de excludere au fost:* Au fost excluși din studiu pacienţii cu: antecedente de tratament chirurgical gastrointestinal (antireflux, la esofag sau stomac), cu simptome clinice sugestive pentru obstrucția intestinală, contraindicaţii generale la endoscopie, tulburări de coagulare, hepatită cronică și ciroză hepatică, afecţiuni asociate avansate ale altor organe şi sisteme (sistemul pulmonar, sistemul cardiovascular, sistemul digestiv, sistemul urogenital), afecţiuni oncologice, tuberculoză şi femeile gravide.

**Programe și metode de examinare.**

Persoanele incluse în lotul de bază au fost examinate conform unui chestionar, special elaborat de noi, care includea: informaţii demografice, anamneza, istoricul medical și de medicație, obiceiurile sociale (fumat și consum de alcool), tabloul clinic al afecţiunii (frecvența și severitatea simptomelor), utilizarea metodelor speciale de investigaţie pentru determinarea caracterului modificărilor funcţionale şi proceselor patologice ale BRGE. Protocolul studiului a fost aprobat de Comitetul de Etică al IP USMF ”Nicolae Testemițanu”. Consimțământul informat în scris pentru a participa în studiu a fost obținut de la fiecare pacient înainte de înrolarea în studiu.

**Metode instrumentale.** *Endoscopia digestivă superioară* a fost realizată de un endoscopist experimentat după metoda standard, cu un videoendoscop GIFQ 40 (Olympus, Japonia) în secția endoscopie a IMSP Institutul Mamei şi Copilului. Au fost examinate motilitatea esofagului, starea funcţională a SEI şi a joncţiunii esogastrice, aspectul mucoasei esofagiene în locul de tranziţie (linia „Z”) şi a pliurilor (înălţimea, grosimea, elasticitatea şi capacitatea de a se nivela).S-a evaluat prezența esofagitei conform sistemului de clasificare Los Angeles, a complicațiilor BRGE (stricturi esofagiene, esofagul Barrett sau cancerul esofagian), a herniei hiatale (o distanță de cel puțin 2 cm între joncțiunea esofagogastrică și hiatusul diafragmatic), a ulcerului esofagian, a inflamațiilor, tumorilor sau altor probleme de la nivelul tractului digestiv superior. La toţi pacienţii s-au prelevat **fragmente bioptice** de epiteliu scuamos. *Examenul histopatologic* al mucoasei gastroesofagiene a permis evidenţierea leziunilor mucoasei esofagiene induse de reflux, vizualizarea gradului şi componenţei infiltratului inflamator, pune în

evidenţă leziuni microscopice: inflamaţii (specifice şi nespecifice), ulceraţii, leziuni displazice, tumori. Au fost utilizate criteriile de diagnostic ale BRGE descrise în 1970 de Ismail-Beigi F. şi coautorii şi completate în 1980 de Geboes K. şi coautorii. Prelevarea probelor bioptice, de obicei 4-5, s-a efectuat din treimea inferioară a esofagului, din diferite sectoare ale zonei afectate, şi s-au colorat cu hematoxilină şi eozină - metodă bine cunoscută în literatura de specialitate. *Examenul pH-metric gastroesofagian 24 ore s-a* efectuat cu pH-metrul portabil «Гастроскан-24». Au fost analizaţi parametrii aprobaţi după DeMeester, inclusiv durata totală a pH<4,0%; durata pH<4,0% în poziţie verticală; durata pH<4,0% în poziţie orizontală, numărul total de refluxuri (n)>47, indicele DeMeester. *Examenul radiologic cu substanţă de contrast* (sulfat de bariu) pune în evidenţă tulburările motorii esofagiene, modificările morfologice, de sediu, de contur şi de volum (îngustări sau dilataţii de lumen, hernia hiatală etc.).

**Determinarea metaboliţilor NO în materiale biologice (ser sangvin şi suc gastric).** Nivelul metaboliţilor NO (concentraţia sumară de nitraţi şi nitriţi) s-a determinat prin metoda calorimetrică la spectrofotometrul cu microplăci Power Wave HT, firma BioTek (SUA), prin evaluarea intensităţii culorii reacţiei de azotare a sulfamidei de către ionul $NO^{2-}$ [1, 4].

**Metoda de identificare a genotipurilor genei NOS1 și NOS2.** Determinarea genelor NOS a fost efectuată după metodă caz-control: la 106 de pacienți cu BRGE erozivă și non-erozivă și la 106 de persoane practic sănătoase asimptomatice. Polimorfismul genelor candidate (C/T al genei NOS1 și G954C al genei NOS2-promotor ) s-a identificat prin metoda de analiză a lungimii fragmentelor amplificate şi a fragmentelor polimorfe de restricţie (restriction fragment length polymorfism, RFLP). ADN-ul genomic a fost extras din probele de sânge prin metode standard.Identificarea genotipurilor genei NOS1 şi NOS2 la persoanele investigate s-a efectuat prin amplificarea porţiunilor corespunzătoare a genomului ale genelor NOS1 şi NOS2, utilizând metoda PCR cu primerii specifici.

**Metode de procesare statistică a rezultatelor.** Rezultatele investigaţiilor au fost procesate computerizat în pachetul statistic „Statistical Package for the Social Science" versiunea 21.0 pentru Windows (SPSS, Inc, Chicago, IL, 2012). Pentru compararea variabililor discrete s-a utilizat metoda $\chi^2$ cu corecţia lui Yates sau metoda exactă a lui Fisher. Valorile numerice ale cercetărilor realizate au fost supuse analizei statistice, calculându-se parametrii variaţionali, valorile medii, eroarea standard a mediei, intervalul de fidelitate a mediei. Pentru compararea valorilor medii între grupuri s-a utilizat testul t pentru eşantioane independente (în cazul distribuţiei apropiate de normal) sau testele statisticii neparametrice (în cazul distribuţiei asimetrice). Statistic semnificative s-au considerat diferenţele când valoarea bilaterală p<0,05. Au fost calculat odds ratio (OR) și intervale de încredere (95% CI) –stabilirea asocierii între polimorfisme și complicații BRGE.

## 3. TABLOUL CLINIC AL BOLII DE REFLUX GASTROESOFAGIAN RAPORTAT LA REZULTATELE PARACLINICE.

### 3.1. Analiza frecvenței simptomelor BRGE în populația matură a Republicii Moldova

La momentul actual nu avem date despre epidemiologia BRGE în Repulica Moldova. Pentru realizarea scopului de bază al cercetării și determinarea ratei eșantionului experimental, am examinat prevalența BRGE în Republica Moldova. În literatura autohtonă, dar și la Centrul Național de Management în Sănătate, nu am găsit careva date despre incidența și prevalența BRGE la populația matură și la copii în Republica Moldova.

Pentru studierea răspindirei simptomelor BRGE in populația matură a RM, au fost anchetaţi 1820 de respondenţi din toată republica cu vîrsta cuprinsă între 16 şi 79 de ani. În urma repartiției a 1820 de respondenți se atestă că 1141 (62,7%) au fost femei şi 679 (37,3%) bărbați.

Efectuând stratificarea conform vârstei a fost detectată următoarea distribuție: sub 20 ani – 43 (2,4%), 21-30 ani – 322 (17,7%), 31-40 ani – 253 (13,9%), 41-50 ani – 383 (21,0%), 51-60 ani – 416 (22,9%), 61-70 ani – 274 (15,1%) şi peste 70 de ani – 129 (7,1%) de persoane. A fost respectat raportul de respondenți în zonele geografice în conformitate cu incidența populației în zonele respective.

Conform anchetei propuse pentru scrining au fost depistate un șir de simptome ce caracterizează boala de reflux gastroesofagian și au fost subdivizate în modul următor (incluse în chestionar): simptome tipice pentru BRGE: pirozis, regurgitație, durere retrosternală, disfagie; simptome atipice (extradigestive) ale BRGE: a) respiratorii: tuse, disfonie, dispnee (sufocare nocturnă), b) cardiace: cardialgii, palpitații.

Pirozisul, cel mai frecvent şi caracteristic simptom al esofagitei peptice și al dispepsiei funcționale, cel puțin un episod în viață, a fost depistat la 1408 (77,4%) din 1820 anchetaţi. Doar 412 (22,6%) persoane nu au avut nici odată senzaţie de arsură

Din cele 1408 cazuri, care au indicat prezenţa pirozisului, 978 au avut acest simptom foarte rar (1 epizod în lună) şi au alcătuit 53,7%. La 317 (17,4%) de respondenţi senzaţia de arsură epigastrică a fost menţionată frecvent (1-2 ori pe săptămână), iar în 113 (6,2%) - arsura a fost prezentă permanent. Zilnic pirozisul a fost menţionat de către 248 (13,6%) de persoane.

Simptomele extraesofagiene, ce caracterizează BRGE, se întîlnesc cu o frecvențe de la 2,8% pînă la 30%.

Analizând frecvența răspândirii simptomelor BRGE în Republica Moldova, comparativ cu alte studii epidemiologice, constatăm că media (17,4%) corespunde cu media generală în țările Europei, unde au fost efectuate studii similare (media - 18,6%, de la 7,7% până la 36,0%). În Albania (11,9%), Spania (12,4%), Italia (7,7%), iar în Danemarca (36,0%), Franța (31,3%) și Germania (25,0%) se constată o prevalență considerabilă, comparativ cu media europeană.

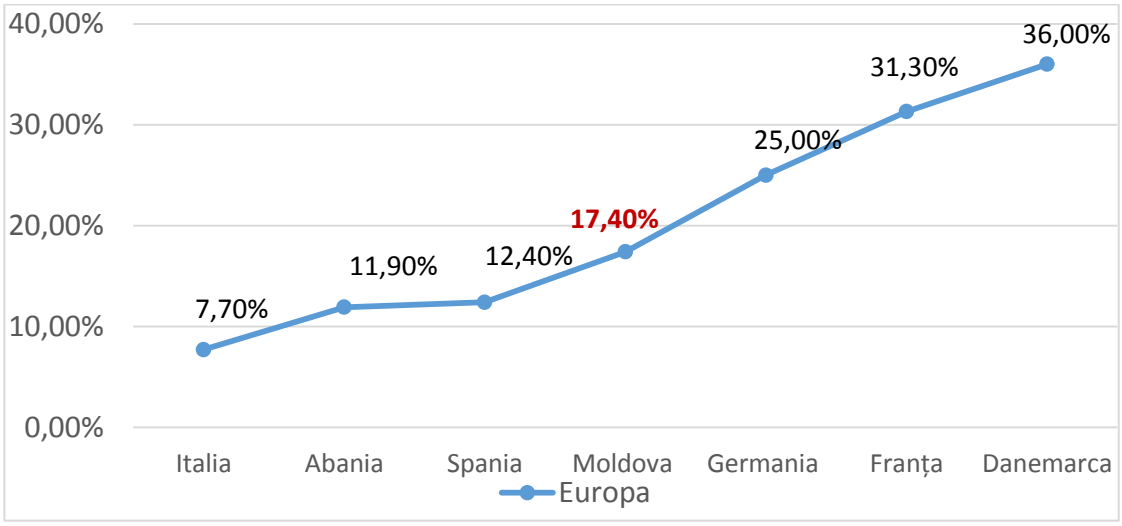


Figura 2 . Indidența BRGE în Moldova comparativ cu țările europene

De menționat că în diferite regiuni ale aceiași țări prevalența BRGE este diferită: în Suedia, unde media este de 18,6%, dispersarea constituie de la 8,8% până la 25,9%. În America, de asemenea, prevalența BRGE este diferită: media este de 17,1%, în America de Nord – 20,6%, în America de Sud – 13,4%. În Asia prevalența acestei maladii este mai mică, comparativ cu Europa și America (media – 10,2, de la 1,7% până la 35,0%). În Turcia acest indicator constituie 22,5%. Prevalență destul de mică este raportată și în Japonia: media – 6,6%, de la 3,0% până la 10,0%.

### 3.2.Particularităţile clinico-evolutive ale bolii de reflux gastroesofagian în funcţie de gradul de afectare a mucoasei esofagiene.

Studiul particularităților BRGE a fost efectuat pe un lot alcătuit din 144 pacienți, care a fost divizat în 2 subloturi de bază, în dependentă de forma endoscopică a BRGE: **lotul de pacienți cu BRGE non-erozivă (LB1)** a inclus 57 de pacienți, inclusiv 24 (42,1%) de bărbați și 33 (57,9%) de femei.Valoarea medie a vârstei în LB1 a constituit 46,46±1,9 ani; **lotul de pacienți cu BRGE erozivă (LB2)** a inclus 87 de pacienți, inclusiv 42 (48,3%) de bărbați și 45 (51,7%) de femei. Valoarea medie a vârstei în LB2 a constituit 48,64±1,4 ani; **lotul martor** a fost alcătuit din 108 persoane practic sănătoase.

**Estimarea factorilor de risc ai bolii de refux gastroesofagian**. Studiul factorilor de risc ai BRGE a relevat că de la 70,2% de pacienți din LB1 la 74,7% de pacienți din LB2 consumă excesiv ceai şi/sau cafea, iar circa 97,4% din ei folosesc hrană ferbinte. Sa constatat că în LB2– 51,7% pacienți erau fumători, comparativ cu forma non – erosivă (35,1%) de pacienți, iar în lotul martor tabagismul era răspândit numai la 25% ($p< 0,05$). Un alt factor nociv pentru mucoasa esogastrice este alcoolul. Acest factor a fost depistat la 14,0% de pacienți din LB1, 48,2% de pacienți din LB2 și 20,2% din lotul martor.

Un factor important, care influenţează severitatea afectării mucoasei esogastrice în BRGE este durata maladiei (tab.1).

Tabelul 1. Repartizarea pacienţilor cu BRGE non-erozivă şi erozivă (%) în funcţie de durata maladiei

| № | Forma BRGE | Durata maladiei | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | < 5 ani, ( M±m:4,3±0,3) | | 5 – 10 ani ( M±m:7,2±0,7) | | >10 ani ( M±m:12,8±0,4) | |
| | | abs. | % | abs. | % | abs. | % |
| 1. | BRGE,forma non erosivă | 52 | 36,1 | 7 | 4,9 | - | - |
| 2. | BRGE, forma erosivă | - | - | 60 | 41,7 | 27 | 18,8 |

Analizând acest criteriu am constatat că durata maladiei la pacienţii cu BRGE forma non erosivă a alcătuit in medie 4,3±0,3 ani (de la 2 pină la 5 ani), iar pacienţii lotului 2, forma erosivă au avut o longevitate mai mare – de la 5 pînă la 10 ani, avînd media bolii de 7,2±0,7 ani (60 pacienti), iar 27 de pacienţi au avut o longevitate mai mare de 10 ani (media fiind de 12,8±0,4 ani).

**Particularităţile circadiene a boala de reflux gastroesofagian.**

Importanţă are nu numai frecvenţa simptomelor, dar şi particularităţile circadiene de manifestări.

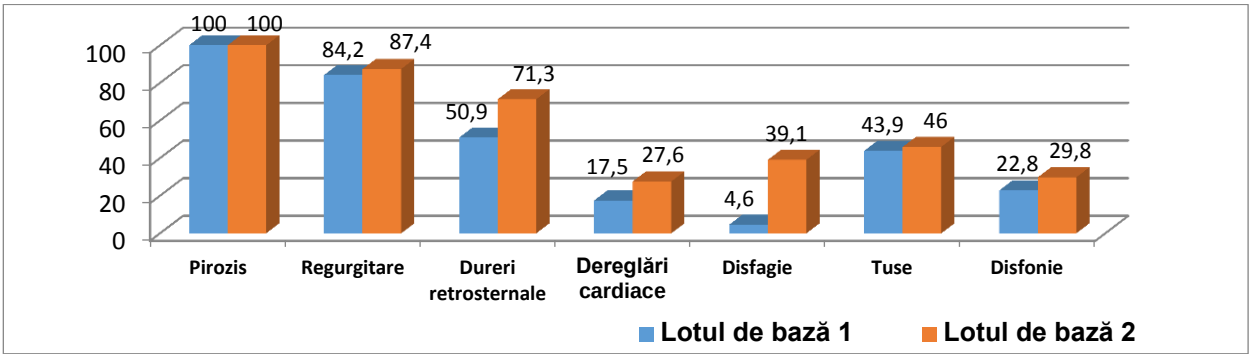


Figura 3. Frecvenţa simptomelor la pacienţii cu BRGE non-erozivă şi BRGE erozivă (%) în perioada diurnă

Analiza tabloului clinic şi a frecvenţei simptomelor în perioada diurnă la pacienţii cu BRGE a constatat următoarele rezultate. Pirozisul şi regurgitaţia, ca simptome cardinale, tipice ale BRGE identic de frecvent se întîlnesc în ambele forme a maladiei, atît în perioada diurnă cît şi nocturnă (fig.3, fig.4). Frecvenţa lor în perioada nocturnă totuşi este subiacentă frecvenţei diurne. In perioadă diurnă tusea nu are o diferenţă statistică semnificativă în LB1 şi LB2, dar mai frecvent se întîlneşte la pacienţii cu forma erosivă în timpul nopţii ( LB1-29,8, LB2-35,6%, $p<0,05$). Sindromul dolor se întîlneşte mai frecvent în LB2, comparativ cu LB1 în perioada diurnă ($p<0,05$) şi de asemenea în perioada nocturnă (LB1-29,8%, LB2-54,0%, $p< 0,05$). Astfel,

putem constata, că în forma erosivă, așa simptome ca durerea și tusea poartă o semnificație diagnostică mai înaltă pentru forma erosivă a bolii de reflux gastroesofagian. De asemenea constatăm că pirozisul, regurgitație, durerea și tusea semnificativ sunt mai frecvente în perioada nocturnă la pacienții cu forma erosivă comparativ cu forma nonerosivă al bolii de reflux gastroesofagian.

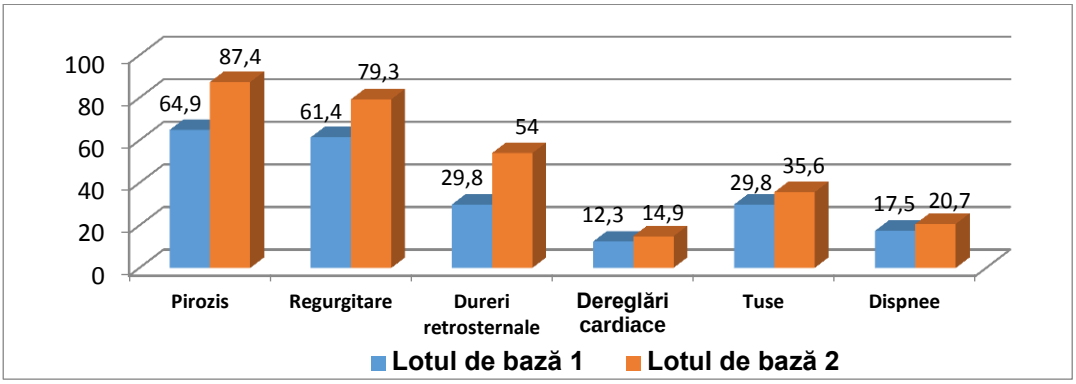


Figura 4. Frecvenţa simptomelor la pacienţii cu BRGE non-erozivă și BRGE erozivă (%) în perioada nocturnă

**Analizind manifestările circadiene ale BRGE**, constatam că in perioadă nocturnă la forma erosivă atît simtomele tipice, cît și cele extraesofagiene au o frecvență mult mai inaltă in perioadă nocturnă (statistic semnificativă, $p<0,05$). Accesele de sufocare nocturnă, care se declanșează datorită regurgitației nocturne superioare, nu au o diferența statistică semnificativă in cele 2 loturi de pacienți ($>0,05$).

În scopul instalării unui diagnostic corect şi a depistării complicaţiilor, la adresarea sau internarea pacienţilor am efectuat un set de investigaţii paraclinice, teste funcţionale şi de laborator.

**Caracteristica endoscopică a bolii de reflux gastroesofagian.** Endoscopia digestivă superioară are ponderea cea mai mare pentru diagnosticarea BRGE, eventual cu biopsie de mucoasă, determinarea pH-ului esofagian şi gastric. Endoscopia digestivă superioară, efectuată la 57 de pacienţi din LB1, a evidenţiat esofagită catarală în 22 (43,1%) de cazuri, fără prezența macroscopică a eroziunilor mucoasei, hernie hiatală în 3 (5,9%) cazuri, insuficienţa SEI în 45 (88,2%) de cazuri. Stenoză esofagiană, ulcer esofagian şi esofag Barrett nu au fost diagnosticate.

În LB2, endoscopia digestivă superioară a fost efectuată la 87 de pacienţi şi a evidenţiat esofagită peptică în 87 (100,0%) de cazuri, stenoză esofagiană în 1 (1,2%) caz,inele Șațki - 5(5,8%), ulcer esofagian în 2 (2,3%) cazuri, hernie hiatală în 22 (25,6%) de cazuri, esofag Barrett în 5 (5,8%) cazuri, insuficienţa SEI în 75 (87,2%) de cazuri. Repartizarea esofagitei de reflux în funcție de gradul, conform clasificării Los-Angeles (1994), au prezentat 14 (13,1%) pacienţi, gradul 2 - 53 (63,1%) de pacienţi, gradul 3 - 19 (22,6%) pacienţi şi gradul 4 - 1 (1,2%) pacient.

**Caracteristice histopatologice ale bolii de reflux gastroesofagian**.La pacienţii cu BRGE şi esofagite, examenul histologic al mucoasei esofagului se efectuează în scopul depistării oportune a sindromului Barrett şi cancerului esofagian. În studiul nostru, examenul histologic al bioptatului a fost realizat la 39 de pacienţi din LB1 şi la 75 de pacienţi din LB2. Examinarea a constatat modificări histologice uşoare (inflamaţie esofagiană, creşterea stratului de celule bazale, alungirea papilelor) la 39 (100,0%) de pacienţi din LB1 și la 75 (100,0%) pacienţi din LB2, eroziuni esofagiene la 6 (15,4%) pacienţi din LB1 și la 75 (100%) pacient din LB2, displazie uşoară (2-2,7%) și metaplazia mucoasei (sindromul Barrett) la 21 (28%) pacienți din LB2; Ulceraţii esofagiene au fost constatate doar la 4 (5,3%) pacienţi din LB2.

**Valorificarea pH-metriei în diagnosticului bolii de reflux gastroesofagian.** În scopul precizării cantitative a severităţii RGE, diferenţierii patologiei de reflux de alte boli, stabilirii existenţei unei corelaţii între regurgitarea de acid şi diverse simptome extraesofagiene am realizat pH-metria timp de 24 de ore. Procedura, efectuată la pacienţii cu BRGE, a constatat următoarele rezultate: timpul total cu pH<4 – 7,48 ±0,8% în LB1 și 12,1±3,5% în LB2, timpul cu pH<4 în poziţie ortostatică - 5,15±0,8% în LB1 și 19,5±3,5% în LB2, timpul cu pH<4 în poziţie clinostatică - 7,17±1,1% în LB1 și 28,0±19,0% în LB2, numărul de refluxuri cu pH<4 în 24 de ore - 37,38±6,4 în LB1 și 98±4,8 în LB2, numărul de refluxuri cu pH<4 şi durata peste 5 min – 4,0±0,7 în LB1 și 8,0±0,8 în LB2, durata celui mai lung reflux - 14,4±3,8 minute în LB1 și 29,55±6,2 minute în LB2. Cuantificarea RGE a fost efectuat prin intermediul scorului DeMeester, valoarea medie a cărui era de 23,03±1,8 la pacienții din LB1 și 63,47±9,3 la pacienții din LB2.

## 4. REZULTATELE STUDIERII METABOLIȚILOR OXIDULUI NITRIC ȘI POLIMORFISMULUI GENELOR NOS1 ȘI NOS2 ÎN BOALA DE REFLUX GASTROESOFAGIAN

### 4.1. Nivelul metaboliților oxidului nitric în serul sanguin și sucul gastric în funcție de gradul de afectare a esofagului (gradul și forma BRGE).

Studierea nivelului metaboliților NO este o problemă de actualitate majoră și indispensabilă pentru aprofundarea cunoștințelor despre patogenia BRGE. Perspectiva studiului constă în evidențierea noilor criterii clinice, de diagnostic și dezvoltarea recomandărilor de modulare a proceselor de formare a BRGE.

Pentru realizarea scopului cercetării a fost studiat nivelul metaboliților oxidului nitric în serul sanguin, sucul gastric în debutul studiului și după o lună de tratament.

La debutul studiului, în lotul de pacienți cu BRGE non-erozivă **(LB1)** valoarea medie a nitraţilor **în serul sangvin** a fost de 83,43±0,7 µmol/l (de la 76,02 µmol/l până la 99,40 µmol/l), la pacienți cu BRGE erozivă **(LB2)** valoarea medie a nitraţilor în serul sangvin a fost de 97,02±0,4 µmol/l (de la 79,9 µmol/l până la 104,5 µmol/l) şi în **LM** valoarea medie a nitraţilor în serul sangvin a fost de 71,76±0,8 µmol/l (de la 62,7 µmol/l până la 84,48 µmol/l).

Inițial, concentrația nitraţilor și nitriților în serul sangvin era statistic semnificativ mai mică în LM, comparativ cu LB1 (83,43±0,7 µmol/l în LB1 *vs* 71,76±0,8 µmol/l în LM; $p<0,05$) și cu LB2 (97,02±0,4 µmol/l în LB2 *vs* 71,76±0,8 µmol/l în LM; $p<0,05$). Nivelul metaboliților oxidului nitric în serul sanguin la pacienți în LB1 statistic este semnificativ mai mic, comparativ cu LB2 (83,43±0,7 µmol/l în LB1 *vs* 97,02±0,4 µmol/l în LB2; $p<0,05$). Se determină o creștere evidentă a concentrației metaboliților NO la pacienții cu BRGE.

In grupul pacienților cu forma nonerozivă, concentrația metaboliților NO a alcătuit 83,43 mcmol/l fiind mai înaltă comparativ cu grupul de control, iar în grupul de pacienți cu forma erozivă acest indice marchează 97,02 mcmol/l și este veridic mai înaltă comparativ cu forma nonerozivă și LM. Se determină o creștere evidentă a concentrației metaboliților NO la pacienții cu BRGE (forma erozivă) comparativ cu pacienții cu forma non erozivă.

În cursul determinării concentraţiei metaboliților oxidului nitric în **sucul gastric**, au fost obținute următoarele rezultate:

La debutul studiului, în lotul de pacienți cu BRGE non-erozivă **(LB1)** valoarea medie a nitraţilor și nitriților în sucul gastric a fost de 42,92±0,6 µmol/l (de la 38,8 µmol/l până la 54,8 µmol/l), la pacienții cu BRGE erozivă **(LB2)** valoarea medie a nitraţilor în sucul gastric a fost de 52,09±0,3 µmol/l (de la 40,4 µmol/l până la 56,7 µmol/l) şi în **LM** valoarea medie a nitraţilor și nitriților în sucul gastric a fost de 26,8±0,5 µmol/l (de la 22,3 µmol/l până la 32,4 µmol/l).

Metaboliții oxidului nitric în sucul gastric prezentau valori statistici semnificativ mai mici în LB1, comparativ cu LB2 (42,92±0,6 µmol/l în LB1 *vs* 52,09±0,3 µmol/l în LB2; $p<0,001$), în LM, comparativ cu LB1 (42,92±0,6 µmol/l în LB1 *vs* 26,8±0,5 µmol/l în LM; $p<0,001$) și cu LB2 (52,09±0,3 µmol/l în LB2 vs 26,8±0,5 µmol/l în LM; $p<0,001$).

Studierea particularităților metabolismului oxidului nitric denotă că, creșterea nivelului de metaboliți (nitrați și nitriți) in mediile biologice, sunt caracteristice pentru boala de reflux gastroesofagian atât formei erozive, cât și formei nonerozive. Concentrația metaboliților oxidului nitric depistată la pacienții cu forma nonerozivă a BRGE în serul sanguin și sucul gastric, statistic este mai înaltă comparativ cu lotul martor. Acest fenomen dovedește participarea oxidului nitric în dezvoltarea procesului patologic în boala de reflux gastroesofagian.

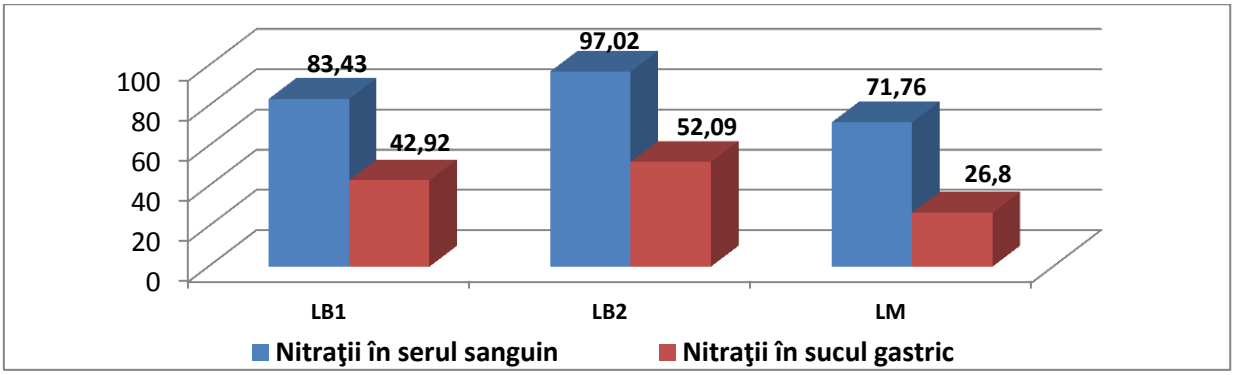


Figura 5. Nivelul nitraţilor şi nitriţilor în serul sangvin şi sucul gastric (µmol/l) în funcţie de lotul de studiu

A fost studiat nivelul metaboliților oxidului nitric în serul sanguin ( la ambele forme a BRGE – erosivă şi nonerosivă) in dependență de durata de evoluție a maladiei. Pentru acest scop, pacienții au fost divizați in trei subloturi: cu durată sub 5 ani (n=50), 5-10 ani (n=67) şi cu durată mai mare de 10 ani (n=27). Rezultatele obținute sunt expuse în tabelul 3.

Analizînd tabelul constatăm, că nivelul metaboliților oxidului nitric, corelează cu forma endoscopică a BRGE, dar depind şi de **durata maladiei.**

Tabelul 3. Nivelul metaboliților oxidului nitric în **serul sangvin** în raport cu durata maladiei

| **№** | **Forma BRGE** | **< 5 ani, ( M±m:4,3±0,3),** | **5 – 10 ani ( M±m:7,2±0,7)** | **>10 ani ( M±m:12,8±0,4)** |
|---|---|---|---|---|
| 1. | BRGE, forma non erosivă | 76,06±0,7* µmol/l, n=50 | 86,17±0,6 µmol/l, n=7 | |
| 2. | BRGE, forma erosivă | | 94,08±0,6 µmol/l n=60 | 98,27±0,5** µmol/l n=27 |

P*;**<0,001 diferența statistică între pacienți cu durata bolii sub 5 ani şi peste 10 ani

În lotul de pacienți cu durata bolii sub 5 ani, concentrația metaboliților oxidului nitric constituie 76,06±0,7 µmol/l, iar la pacienții cu durata maladiei 5 – 10 ani, concentrația metaboliților oxidului nitric constituie 86,17±0,6 µmol/l (LB1) şi 94,08±0,6 µmol/l (LB2). Acest indice a fost maximal la pacienții cu durata maladiei peste 10 ani - 98,27±0,5 µmol/l (predominant la pacienții cu forma erosivă a BRGE).

Analiza statistică a acestor indici, constată diferență veridică ($p<0,001$) a concentrației metaboliților oxidului nitric in serul sanguin la pacienții cu durata maladiei peste 10 ani (98,27±0,5 µmol/l), comparativ cu durata bolii pînă la 5 ani (76,06±0,7 µmol/l).

În aşa mod, s-a constatat, că există un grad înalt de corelare pozitivă ($r_{xy}=0,998$, $p<0,05$) între durata maladiei şi concentrația metaboliților oxidului nitric la pacienții cu boala de reflux gastroesofagian. A fost determinată tendința de creştere a concentrației nitriților, proportional cu

gradul severității maladiei și durata de timp al BRGE. Existența coeficientului de corelare a concentrației metaboliților oxidului nitric cu gradul de severitate al afectării esofagului, permite de a constata importanța NO în declanșarea și dezvoltarea BRGE, astfel nivelul metaboliților oxidului nitric ar putea fi un marker redutabil al procesul inflamator al mucoasei esofagiene.

### 4.2. Polimorfismul genelor sintazelor oxidului nitric în boala de reflux gastroesofagian.

Numeroși factori (exogeni și endogeni) joacă un anumit rol în patogenia bolii de reflux gastroesofagian (BRGE). În ultimul timp s-au efectuat cîteva cercetari în diferite țări, care arată legătura dintre multitudinea factorilor genetici și BRGE, complicațiile ei, esofagul Barret și adenocarcinom. Factorii genetici includ rolul polimorfismului unor gene care codează citokinele pro- și antiinflamatorii, gena COX-2, gena care reglează proteinele ciclului celular, genele factorului de creștere epidermal, etc [21],

Reieșind din scopul cercetării, examenul genetic a fost efectuat prin determinarea polimorfismului genelor NOS1 și NOS2. Gena NOS1 este localizată pe cromozomul 12q24.2, alcătuit din 29 exoni și 28 introni cu mărimea de 200 κb și codifică sintaza neuronală a oxidului nitric (nNOS), care produce NO și este implicată in reglarea motilității esofagului. Gena NOS2 este localizată pe cromozomul 17q11.2, alcătuit din 26 exoni și 25 introni cu mărimea de 37 κb și codifică sintaza inductibilă a oxidului nitric (iNOS), care produce cantitatea excesivă de oxid nitric, provocând procese inflamatorii. Sintaza oxidului nitric (iNOS) este localizată în macrofage, neutrofile, limfocite, hepatocite și în mare măsură este dependentă de factorii endogeni (TNF-alpha,interleukine). [21]

Studiul a fost efectuat pe un lot de 106 de pacienți cu BRGE și 106 de persoane sănătoase (caz-control), care au alcătuit lotul martor în vârstă de 17-79 de ani. Lotul martor a inclus 44 (41,5%) de bărbați și 62 (58,5%) de femei. Lotul de bază a fost divizat în 2 subloturi: lotul de bază 1 format din 45 (42,5%) de pacienţi cu boala de reflux gastroesofagian, forma non-erozivă şi lotul de bază 2, format din 61 (57,5%) de pacienţi cu forma erozivă.

**Distribuția genotipurilor genelor NOS1 și NOS2 în lotul martor și pacienții cu boala de reflux gastroesofagian.** Frecvența comparativă a genotipurilor **genei NOS1 a fost studiată** la pacienții cu boala de reflux gastroesofagian și persoanele care au alcătuit lotul martor.

Comparînd frecvența variantelor alelice a polimorfismului genei NOS1, în lotul de bază și lotul martor, constatăm că nu există diferența a frecvenței variantei alelice în ambele loturi.

A fost cercetată distribuția genotipurilor **genei NOS2** în lotul martor și pacienții cu boala de reflux gastroesofagian.

Tabelul 5. Frecvența genotipurilor polimorfismului G954C al genei NOS2-promotor la pacienții cu BRGE comparativ cu lotul martor

| Varianta alelică | Lotul de baza (n=106) | | Lotul martor (n=106) | | P ($\chi^{2)}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | |
| G/G | 29 | 27,4 | 47 | 44,3* | P>0,05 |
| G/C | 50 | 47,2 | 46 | 43,4 | P>0,05 |
| C/C | **27** | **25,5** | **13** | **12,3*** | **P<0,05** |

*Notă:* p<0,05 *unde* p *reprezintă diferența statistică între incidența genotipului în lotul examinat şi cel martor, p* <0,01.*

Analizând gena NOS2 la pacienții cu BRGE și lotul martor, constatăm, că varianta alelică C/C la pacienții cu BRGE predomină (25,5%), comparativ cu lotul martor (12,3%), p < 0,05.

**Distribuția genoțipurilor genelor NOS1 și NOS2 în lotul martor și pacienții cu diferite forme ale bolii de reflux gastroesofagian.** Analizând gena NOS1 la pacienți cu diferite forme de BRGE, constatăm**,** că nu avem diferențe statistice în ambele loturi. Am putea spune că aceasta variantă nu influențează posibilitatea genetică de declanșare a patologiei.

Frecvența comparativă a genotipurilor **genei NOS2** la pacienții cu diferite forme de BRGE.

Tabelul 6. Frecvența genotipurilor polimorfismului G954C al genei NOS2-promotor la pacienții cu BRGE (forma non-erozivă și forma erozivă) comparativ cu lotul martor

| Varianta alelică | Lotul de baza 1 (n=45) | | Lotul de baza 2 (n=61) | | Lotul martor | | P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | abs. | % | |
| G/G | 17 | 37,8 | 21 | 34,4 | 47 | 44,3 | >0,05 |
| G/C | 19 | 42,2 | 23 | 37,7 | 46 | 43,4 | >0,05 |
| C/C | 9 | 20,0 | **17** | **27,9** | **13** | **12,3** | **<0,05** |

*Notă:* p<0,05 *unde* p *reprezintă diferența statistică între incidența genotipului în lotul de bază 2 şi lotul martor.*

Analizând gena NOS2 la pacienți cu BRGE forma erozivă și forma non eroivă, constatăm, că varianta alelică C/C la pacienții din LB2 predomină (27,9%), comparativ cu LM (12,3%), p < 0,05. (tabelul 6).

**Distribuția genoțipurilor genelor NOS1 și NOS2 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE.** Frecvența genotipurilor polimorfismului C/T al genei NOS1 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE.

Analizând genotipurile polimorfismului C/T al genei NOS1 la pacienții cu diferite forme ale BRGE (non-erozivă și erozivă) nu am stabilit nici o asociere între polimorfismele genei NOS1 și cele două forme de BRGE, cînd am comparat un genotip cu altul. Analiza statistică nu a depistat nici o asociere cu un risc crescut de esofagită de reflux la pacienții cu BRGE, atît pentru forma erozivă, cît și cea non-erozivă.

Frecvența genotipurilor polimorfismului G954C al genei NOS2 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE.

Tabelul 7. Riscul de esofagită în funcție de genotip pentru polimorfismul G954C al genei NOS2 la pacienții cu forma non-erozivă

| Varianta alelică | Lotul de baza 1(forma non-erozivă), n =45 | | Lotul martor, N=106 | | OR (95%CI) | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | | |
| G/G | 17 | 37,8 | 47 | 44,3 | 0,85 (0,44-1,64) | >0,05 |
| G/C | 19 | 42,2 | 46 | 43,4 | 0,97 (0,51-1,84) | >0,05 |
| C/C | 9 | 20,0 | 13 | 12,3 | 1,63 (0,65- 4,08) | >0,05 |

*Notă: OR-odds ratio; 95% CI-intervale de încredere -stabilirea asocierii între polimorfisme și forme severe al BRGE*

La pacienții cu forma non-erozivă în funcție de genotip pentru polimorfismul G954C al genei NOS2 analiza statistică nu a arătat nici o asociere cu un risc crescut de esofagită de reflux, p > 0,05.( tabelul 7)

Tabelul 8. Riscul de esofagită în funcție de genotip pentru polimorfismul G954C al genei NOS2 la pacienții cu forma erozivă

| Varianta alelică | Lotul de baza 2 (forma erozivă), n = 61 | | Lotul martor, n=106 | | OR (95%CI) | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | | |
| G/G | 21 | 34,4 | 47 | 44,3 | 0,77 (0,42-1,41) | >0,05 |
| G/C | 23 | 37,7 | 46 | 43,4 | 0,86 (0,48-1,57) | >0,05 |
| C/C | **17** | **27,9** | **13** | **12,3** | **2,72 (1,03- 4,99)** | **<0,05** |

*Notă: OR-odds ratio; 95% CI-intervale de încredere -stabilirea asocierii între polimorfisme și forme severe al BRGE*

Rezultatele noastre arată că purtătorii genotipului C/C polimorfismului G954C al genei NOS2-promotor la pacienții cu BRGE, forma erosivă, au o asociere de risc crescut de 2,7 mai mare decăt purtătorii genotipurile G/G și G/C (OR 2,72; (95%CL: 1,03- 4,99, respectiv OR 0,77; 95% CI: 0,42-1,41 și OR 0,86; 95% CI: 0,48-1,57). Diferențele au fost nesemnificative statistic pentru purtătorii alelei G (G/C +G/G versus C/C).

**Distribuția genotipurilor genelor NOS1 și NOS2 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE în raport cu durata maladiei.** Frecvența genotipurilor polimorfismului C/T al genei NOS1 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE în raport cu durata maladiei.

A fost efectuată analiza distribuției variantelor alelice a polimorfismului genei NOS1 în raport cu durata maladiei. S-a constatat că varianta alelică C/C se întîlnește cu o frecvență de 27,5% la pacienții cu durata maladiei sub 10 ani, comparativ cu 35,8% din lotul martor (p>0,05).

Tabelul 9. Riscul de esofagită in funcție de genotip pentru polimorfismul C/T al genei NOS1 cu durata maladiei < 10 ani

| **Varianta alelică** | **<10 ani** | | **Lotul martor** | | OR (95%CI) | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | | |
| C/C | 19 | 27,5 | 38 | 35,8 | 0,77 (0,41-1,44) | >0,05 |
| C/T | 32 | 46,4 | 50 | 47,2 | 0,98 (0,57-1,68) | >0,05 |
| T/T | 18 | 26,1 | 18 | 17,0 | 1,53 (0,75-3,20) | >0,05 |
| total | 69 | | 106 | | | |

În același timp se constată o frecvență joasă a acestei variante alelice (C/C) la pacienții cu o durată a maladiei mai mare de 10 ani, respectiv 10,8% și 35,8% din lotul martor ($p<0,05$) (tab.10). Referitor la varianta alelica T/T se constată o frecvența mai mare la pacienții cu durata maladiei mai mare de 10 ani (51,1%), comparativ cu lotul martor (17,0%),($p<0,01$). Reieșind din diferența de distribuire a diferitor variantei alelice a polimorfismul C/T al genei NOS1, a fost calculat riscul dezvoltării diferitor forme de esofagită în dependență de durata maladiei.

Tabelul 10. Riscul de esofagită in funcție de genotip pentru polimorfismul C/T al genei NOS1 cu durata maladiei > 10 ani

| **Varianta alelică** | **>10 ani** | | **Lotul martor** | | OR (95%CI) | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | | |
| C/C | 4 | 10,8 | 38 | 35,8 | **0,30 (0,10-0,90)** | **<0,05** |
| C/T | 14 | 37,8 | 50 | 47,2 | 0,80 (0,39-1,61) | >0,05 |
| T/T | 19 | 51,4 | 18 | 17,0 | **3,0 (1,43-6,37)** | **<0,01** |
| total | 37 | | 106 | | | |

Rezultatele noastre arată că purtătorii genotipului T/T polimorfismului C/T al genei NOS1 la pacienții cu BRGE și cu durata maladiei mai mult de 10 ani au o asocierea cu un risc crescut de dezvoltare a esofagitei erozive de 3 ori mai mare decât C/C și C/T (OR 3.0; (95%CL: (1,43- 6,37), $p<0,01$, respectiv , OR 0,30; 95% CI: 0,10-1,90 și OR 0,80; 95% CI: 0,39-1,61).

Analizînd tabelul 10, constatăm, că purtătorii genotipului C/C polimorfismului C/T al genei NOS1 la pacienții cu BRGE și durata maladiei mai mare de 10 ani au o asociere cu un risc scăzut și s-a manifestat protectiv împotrivă dezvoltării esofagitei erozive (OR 0,30; 95% CI: 0,10-1,90), $p<0,05$. Conform datelor obținute, constatăm că genotipul C/C al genei NOS1 poartă o funcție protectivă în dezvoltarea formelor severe a bolii de reflux gastroesofagian.

Frecvența genotipurilor polimorfismului G954C al genei NOS2 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE în raport cu durata maladiei

A fost analizată frecvența genotipurilor polimorfismului G954C al genei NOS2 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE în dependență de durata maladiei. S-a constatat că varianta alelică C/C la pacienții cu durata maladiei sub 10 ani, se întîlnește cu o frecvență sporită (24%), comparativ cu 12,3% din lotul martor), dar diferența este statistic nesemnificativă (p>0,05).

Tabelul 11. Riscul de esofagită în funcție de genotip pentru polimorfismului G954C al genei NOS2-promotor cu durata maladiei < 10 ani

| **Varianta alelică** | **<10 ani** | | **Lotul martor** | | OR (95%CI) | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | | |
| G/G | 25 | 33,3 | 47 | 44,3 | 0,76 (0,43-1,34) | >0,05 |
| G/C | 32 | 42,7 | 46 | 43,4 | 0,99 (0,58-1,71) | >0,05 |
| C/C | 18 | 24 | 13 | 12,3 | 1,87 (0,85-4,09) | >0,05 |
| Total | 75 | | 106 | | | |

Analizînd polimorfismul genei NOS2 la pacienții cu BRGE în dependență de durata maladiei, constatăm că varianta alelică C/C la homozigoți se întîlnește mai frecvent la pacienții cu durata maladiei mai mare de 10 ani: 48,4% comparativ cu 24% la pacienții cu durata pînă la 10 ani și respectiv 12,3%- lotul martor. Diferențele repartizării genotipurilor polimorfismului G954C al genei NOS2-promotor la pacienții cu durata maladiei < 10 ani au fost nesemnificative statistic pentru asocierea cu un risc de esofagită erozivă.

Tabelul 12. Riscul de esofagită în funcție de genotip pentru polimorfismului G954C al genei NOS2-promotor cu durata maladiei > 10 ani

| **Varianta alelică** | **>10 ani** | | **Lotul martor** | | OR (95%CI) | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | | |
| G/G | 9 | 29,1 | 47 | 44,3 | 0,65 (0,3-1,54) | >0,05 |
| G/C | 7 | 22,5 | 45 | 43,4 | 0,53 (0,22-1,30) | >0,05 |
| C/C | **15** | **48,4** | **13** | **12,3** | **3,9 (1,7-9,17)** | **<0,01** |
| Total | 31 | | 106 | | | |

Conform datelor obținute, referitor la polimorfismul G/G al genei NOS2, elucidate în tab.12, constatăm, că asocierea cu un riscul de dezvoltarea esofagitei în funcție de genotip pentru polimorfismului G954C al genei NOS2-promotor cu durata maladiei > 10 ani s-a observat, că purtătorii genotipului C/C au o asocierea cu un risc crescut de dezvoltare a esofagitei erozive de 3,9 ori mai mare decăt G/G și G/C (OR 3.9; (95%CI: (1,7- 9,17), p<0,01, respectiv, OR 0,65; 95% CI: 0,3-1,54 și OR 0,53; 95% CI: 0,22-1,30).

**Distribuția genotipurilor polimorfismului G954C al genei NOS2 la pacienții cu forma erozivă a BRGE cu modificări histopatologice severe.** Istoricul natural al bolii de reflux gastroesofagian determină, că forma non-erozivă în 3-5% evoluează în esofagul Barrett, iar forma erozivă – în 10-15% cazuri.Cercetarea noastră a depistat esofagul Barrett la 23 pacienți, ce constituie 15,9%. Esofagul Barrett presupune un risc sporit de dezvoltare a adenocarcinomului esofagian.

Studiul a inclus studierea riscului de dezvoltare a metaplaziei epiteliului esofagian. Analiză separată în funcție de tipul modificărilor histopatologice a evidențiat, că purtătorii genotipului C/C polimorfismului G954C al genei NOS2 au un risc crescut de 3,9 ori pentru metaplazia epiteliului esofagian. Analizînd variantele alelice al genei NOS2, se constată, că varianta alelică C/C se întîlnește cel mai frecvent (47,8%), comparativ cu alte variante: G/G-30,4% și G/C -21,8%. De menționat, că varianta alelică C/C la pacienții cu metaplazie are o frecvență mult mai mare in lotul de bază (47,8), comparativ cu lotul martor (12,3%).

Tabelul 13. Riscul de esofag Barrett în funcție de genotip polimorfismului G954C al genei NOS2 la pacienții cu forma erosivă a BRGE și cu modificări histopatologice

| **Varianta alelică** | **Pacienții cu metaplazie + displazie, n=23** | | **Lotul martor** | | OR (95%CI) | P |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | abs. | % | abs. | % | | |
| G/G | 7 | 30,4 | 47 | 44,3 | 0,68 (0,27-0,1,7) | >0,05 |
| G/C | 5 | 21,7 | 45 | 43,4 | 0,54 (0,18-1,43) | >0,05 |
| C/C | **11** | **47,8** | **13** | **12,3** | **3,9 (1,55-9,8)** | **<0,01** |
| total | 23 | | 106 | | | |

Analiza riscului (OR) confirmă, că purtătorii genotipului C/C au un risc sporit de dezvoltare a esofagului Barrett (OR 3,9; 95% CI: 1,55-9,8), p< 0,01).

Pentru celelalte genotipuri subclasate în funcție de modificările histomorfopatologice nu au arătat nici o asociere cu un risc crescut de metaplazie a epiteliului esofagului.

Un rol foarte important în organism posedă gena NOS2, care codifică sintază inductibilă a oxidului nitric (iNOS). Aceasta izoformă a sintazei NO, este inductibilă și produce oxid nitric în cantități mari, fiind indusă de citochine proinflamatorii. Deoarece oxidul nitric, produs excesiv, participă în procesele inflamatorii ale esofagului, poate fi determinat cantitativ, astfel poate prin urmare reflecta procesul patologic al esofagului, poate servi ca marker inflamator al bolii. Unul din scopurile cercetării a fost de a determina rolul polimorfismelor genei NOS2 în evoluția modificărilor mucoasei esofagului în boala de reflux gastroesofagian.

După cum a fost menționat, a fost studiat polimorfismul G954C al genei NOS2 la persoanele din lotul martor și lotul de bază, în ambele loturi în dependență de apartenență de sex,

în dependență de forma bolii de reflux (erozivă, nonerozivă) și severitatea afectării mucoasei esofagului, de durata maladiei. De asemenea am studiat riscul dezvoltării complicațiilor BRGE, cum ar fi metaplazia epiteliului esofagului (esofagul Barrett), displazia și adenocarcinomul esofagian. După cum constatăm, conform datelor din tabelele 6 și 8, varianta alelică C/C are o distribuție mică (12,3%) în lotul martor, comparativ cu variante alelice G/C-43,4%, G/G-44,3%, iar în lotul de bază frecvența este mai crescută (LB1-20% și LB2-27,9%, $p< 0,05$. Deci, pentru genotipul C/C al polimorfismului G954C este caracteristic creșterea treptată a frecvenței de la lotul martor (12,3%), la LB1 ( BRGE - forma non erozivă)- 20,0% și LB2 (BRGE – forma erozivă) -27,9%, $p< 0,05$.

Importanța acestor fenomene este confirmată și prin calcularea riscului severității esofagitei în funcție de genotipul polimorfismului G954C genei NOS2. Conform tabelul 8, constatăm, că varianta alelică C/C la lotul martor constituie 12,3%, respectiv la lotul de bază 27,9%. Astfel purtătorii genotipului C/C au o asociere cu un risc crescut de dezvoltare a esofagitei de reflux de 2,7 ori mai mare comparative cu genotipurile G/G și G/C (OR 2,72; (95%CL: 1,03- 4,99, respectiv OR 0,77; 95% CI: 0,42-1,41 și OR 0,86; 95% CI: 0,48-1,57), $p< 0,05$.

Importante date au fost obținute la calcularea riscului de dezvoltare a esofagului Barrett, în funcție de genotipul polimorfismului G954C al genei NOS2,la pacienții cu forma erozivă a BRGE și modificări histomorfologice. După cum a fost relatat, frecvența variantei alelice C/C se întîlnește la persoanele din lotul martor in 12,3% cazuri, comparativ cu G/G-44,3% și G/C-43,4% cazuri, iar la pacienții cu BRGE forma erozivă și metaplazie a epiteliului în 47,8% cazuri, comparativ cu G/G-30,4%,și G/C-21,7%. Acest calcul demonstrează că purtătorii genotipului C/C au un risc sporit de dezvoltare a esofagului Barrett.

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

### Concluzii.

1. In rezultatul efectuarii studiului epidemiologic in regiunile de nord, centru si sud ale Republicii Moldova sa stabilit că incidența medie a BRGE este de 17,4%, iar pirozisul se anunță simptomul clinic principal și specific al maladiei.
2. Datele cercetării au demonstrat că simptomele clinice tipice ale BRGE (pirozisul, regurgitația) au o frecvență identică în ambele forme (erozivă, nonerozivă). Pirozisul a fost depistat la 57 (100%) de pacienți din LB1 și 87 (100,0%) de pacienți din LB2, iar regurgitația a fost evidențiată la 48 (84,2%) de pacienți din LB1 și 76 (87,4%) de pacienți din LB2. Așa simptome ca durerea toracică (la procesul xifoid) și indeosebi disfagia sunt inerente pentru forma erosivă a maladiei (forma non erosivă – 2,8%, forma erosivă- 39,1%, $p<0,05$).
3. Studierea ritmului circadian la pacienții cu BRGE, demarcă următoarele particularități: pentru forma erosivă este mai caracteristic predominarea unor simptome in perioadă nocturnă (pirozis 87,4%; sufocare nocturnă 20,7%; dereglări cardiace 14,9%; tusa 36,6%), comparativ cu forma non erosivă (pirozis 64,9%; sufocare nocturnă 7,6%; dereglări cardiace 7,10%; tusa 10,6%).
4. Forma evolutivă a BRGE și severitatea procesului inflamator se corelează cu indicii pH metriei monitorizată 24/ore (timpul total cu pH< 4, numărul total de refluxuri acide și indicele sumar De Meester), astfel că valoarea medie a severității este în forma erozivă de 2,75 ori mai mare față de forma non-erozivă: 63,47±9,3 *vs* 23,03±1,8.

   Pentru forma erosivă a BRGE sunt caracteristice modificări histomorfologice mai severe (metaplazia 28,0%, displazia 2,7%), dar în forma nonerosivă și endoscopic negativă morfologic se determină semne de inflamație și lipsesc complicațiile, caracteristice pentru forma erosivă.
5. Analiza nivelului seric al metaboliților stabili ai NO a decelat o tendință notabilă de elevare la pacienții cu BRGE comparativ cu persoanele sănătoase, care predomină semnificativ la pacienții cu forma erosivă față de paternul non-eroziv: 97,02±0,4 vs 83,43±0,7 μmol/l ($p<0,05$), ceea ce sugerează valoare lor predictivă privind evoluția formei erozive a maladiei.
6. Nivelul metaboliților stabili ai NO apreciati in sucul gastric este semnificativ mai înalt la pacienții cu BRGE comparativ cu persoanele sănătoase și predomină la pacienții cu forma erosivă a BRGE (52,09±0,3 μmol/l) comparativ cu forma noneroziva și 42,92±0,6 μmol/ ($p<0,001$), ceea ce demonstreaza că determinarea nivelului metaboliților stabili ai NO din sucul gastric poate servi ca marcher suplimentar important si este mai specific in

aprecierea procesului inflamator al afectarii mucoasei esofagului comparativ cu nivelul metabolitilor stabili ai NO apreciati in serul sanguin.

7. Examenul polimorfismului genei NOS1 nu a constatat diferență statistică între pacienții cu BRGE și persoanele sănătoase la variantele alelice C/C și C/T. Varianta alelică T/T este statistic nesemnificativă mai frecvent în lotul de baza, comparativ cu lotul martor: 25,5% și 17,0%, respectiv (p=0,057) și la pacienții cu BRGE non-erozivă (24,6%), comparativ cu lotul martor (35,8%). Varianta alelică C/C a genei NOS2 se întîlnește mai frecvent la pacienții cu durata mai lungă de 10 ani a bolii de reflux gastroesofagian (51,4%), comparativ cu durata până 10 ani și lotul martor (26,1% și17,0%), p<0,05.
8. Purtătorii genotipului C/C al polimorfismului G954C al genei NOS2, asociat cu factorul de durată a maladiei peste 10 ani și a modificărilor histomorfologice a epiteliului esofagului denotă un risc de dezvoltare a esofagului Barrett de 3,9 ori mai mare, comparativ cu alte genotipuri.
9. Problema științifică importantă soluționată in teză rezidă in fundamentarea științifică a rolului oxidului nitric la noima polimorfizmului genetic în patogenia bolii de reflux gastroesofagian și determinarea particularităților clinice ale diferitor forme ale maladiei in cauză, cea ce a condus la elaborarea criteriilor diagnostice, fapt ce a permis evidențierea metodelor de monitorizare și prevenire a complicațiilor severe ale BRGE.

## RECOMANDĂRI PRACTICE

1. La pacienții cu simptoame ale BRGE (pirozis, regurgitație, disfagie) se recomandă determinarea nivelului metaboliților stabili ai NO ca un criteriu suplimentar pentru aprecierea gradului severității afectării mucoasei esofagului și prognosticului acestei patologii.
2. Determinarea nivelului metaboliților stabili ai NO din sucul gastric poate servi ca marcher important al procesului inflamator a BRGE și criteriu suplimentar în aprecierea prognosticului acestei maladii.
3. Pacienților cu manifestări extradigestive nocturne, durata maladiei peste 5 ani și creșterea concentrației metaboliților stabili a oxidului nitric in serul sanguin mai mult de 97 μmol/l, sunt indicați pentru examinarea obligatorie endoscopică cu prelevarea bioptatului esofagian.
4. Pacienții purtători al genotipului C/C al polimorfismului G954C al genei NOS2, asociat cu durata maladiei peste 10 ani și cu un nivel crescut al metaboliților oxidului nitric în sucul gastric ( > 52,09±0,3 μmol/l), necesită monitorizare histomorfologică a bioptatului esofagian anual.

## BIBLIOGRAFIE


1. Gudumac V., Nastas I., Tagadiuc O. Procedeu de dozare a metaboliţilor oxidului nitric. Brevet de inovaţie nr. 4347.
2. Ichim A., Istrati V., Manea D. et al. Prevalenţa variantelor alelice GLU298ASP ale genei NOS3 la pacienţii cu infarct miocardic. Arta Medica. 2007, no. 4, p. 34-36.
3. Lupaşco I., Dumbravă V-T., Romanciuc I. Boala de reflux gastroesofagiană. Ghid de practică medicală. Chişinău, 2002, 112 p.
4. Lee Y.Y., McColl K.E. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2013, vol. 27, no. 3, p. 339-351.
5. Ates F., Vaezi M. Approach to the patient with presumed extraoesophageal GERD. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2013, vol. 27, no. 3, p. 415-431.
6. Diculescu M. Boala de reflux gastroesofagian. Stetoscop. 2003, no. 18. http://www.stetoscop.ro/arhiva/2003/18/perspectiveterapeutice.php (citat 14.05.2010).
7. Esmaillzadeh A., Keshteli A., Feizi A. et al. Patterns of diet-related practices and prevalence of gastro-esophageal reflux disease. Neurogastroenterol. Motil. 2013, vol. 25, no. 10, p. 831-e638.
8. Falk G.W. Gastroesophageal Reflux Disease. Gastroenterol. Clin. North. Am. 2014, vol. 43, no. 1, p. xi-xii.
9. Hom C., Vaezi M. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. Gastroenterol. Clin. North. Am. 2013, vol. 42, no. 1, p. 71-91.
10. Iwakir K. The role of excessive esophageal acid exposure in patients with gastroesophageal reflux disease. Clin. J. Gastroenterol. 2009, vol. 2, p. 371-379.
11. Katz P.O., Gerson L.B., Vela M.F. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. Am. J. Gastroenterol. 2013, vol. 108, no. 3, p. 308-328.
12. Reimer C., Bytzer P. Gastroesophageal reflux disease: current state-of-the-art management. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2013, vol. 27, no. 3, p. 323.
13. Richter J.E. What's new in gastroesophageal reflux disease for 2014. Gastroenterol. Clin. North. Am. 2014, vol. 43, no. 1, p. xiii-xiv.
14. Rubenstein J.H., Chen J.W. Epidemiology of gastroesophageal reflux disease. Gastroenterol. Clin. North. Am. 2014, vol. 43, no. 1, p. 1-14.
15. Watson D.I., Lally C.J. Prevalence of Symptoms and Use of Medication for Gastroesophageal Reflux in an Australian Community. World J. Surg. 2009, vol.33, no. 1, p. 88-94.
16. Wu K.L., Rayner C.K., Chuah S.K. et al. Effect of liquid meals with different volumes on gastroesophageal reflux disease. J. Gastroenterol. Hepatol. 2014, vol.29, no.3, p.469-473.
17. Protocolul Clinic Naţional ” Boala de reflux gastroesofagian la adult”.Chişinău, 2014. 31 p.
18. Istrati V., Scurtu A., Scorpan A. ș.a. Sindromul Bergman şi boala de reflux gastroesofagian. În: Sănătate Publică, Economie şi Management în Medicină. Chişinău, *2013, nr.5(50), p.34-36.*
19. Scurtu A. Polimorfismul clinic al bolii de reflux gastroesofagian. În: Sănătate Publică, Economie şi Management în Medicină. *Chişinău,* 2013, nr.5(50), p.55-58.
20. Скурту А**.** Уровень метаболитов оксида азота в плазме крови и в желудочном соке и его роль в патогенезе гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. În: Arta Medica. Chişinău, 2015, nr. 1(54), p.11-14.
21. Scurtu A. Rolul polimorfismului genetic în geneza bolii de reflux gastroesofagian. În: Arta Medica. Chişinău, 2015, nr.2(55), p.33-35
22. Scorpan A., Scurtu A., Istrati V. ș.a. Epidemiologia bolii de reflux gastroesofagian în Republica Moldova. În: Curierul medical. Chişinău, 2012, nr 3(327), p. 308-310
23. Weinberg J., Lopansri B., Mwaikambo E. et al. Arginine, nitric oxide, carbon monoxide, and endothelial function in severe malaria. Curr. Opin. Infect. Dis. 2008, vol. 21, no. 5, p. 468-475.

**LISTA LUCRĂRILOR**
**ȘTIINȚIFICE, ȘTIINȚIFICO-METODICE, DIDACTICE**
**LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE**

- **Articole științifice din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei:**

  Categoria B:

1. Istrati V., **Scurtu A.,** Bodrug N. ș.a. Boala de reflux gastroesofagian: manifestările clinice atipice şi impactul ei asupra calităţii vieţii pacienţilor. În: Curierul medical. Chișinău, 2010, nr. 3 (315), p.78-81.
2. **Scurtu A.,** Dumbrava V-T., Istrati V. ș.a. Rolul bolii de reflux gastroesofagian în dezvoltarea bronhopneumopatiei cronice. În: Sănătate Publică, Economie şi Management în Medicină. Chișinău, 2011, nr.2(2), p.79-80.
3. **Scurtu A.,** Istrati V., Dumbrava V-T. ș.a. Rolul oxidul nitric în boala de reflux gastroesofagian. În: Sănătate Publică, Economie şi Management în Medicină. Chișinău, 2011, nr.(2), p. 79.
4. Istrati V., **Scurtu A.,** Scorpan A. ș.a. Nivelul metaboliţilor oxidului nitric în serul sanguin la pacienţii cu boală de reflux gastroesofagian. În: Curierul medical. Chișinău, 2012, nr. 3(327), p. 222-223.
5. Scorpan A., **Scurtu A.,** Istrati V. ș.a. Epidemiologia bolii de reflux gastroesofagian în Republica Moldova. În: Curierul medical. Chișinău, 2012, nr 3(327), p. 308-310.
6. **Scurtu A.,** Istrati V., Scorpan A. ș.a. Rolul pH – metriei esofagiene monitorizată 24 ore în diagnosticarea bolii bolii de reflux gastroesofagian. În: Curierul medical. Chișinău, 2012, nr.3(327), 2012, p.312-314.
7. **Scurtu A.,** Istrati V., Dumbrava V-T. ș.a. Determinarea concentraţiei metaboliţilor oxidului nitric în sucul gastric la pacienţi cu boala de reflux gastroesofagian. În: Curierul medical. Chișinău, 2012, nr.3(327) , p. 311.
8. Istrati V., **Scurtu A.,** Scorpan A. ș.a. Sindromul Bergman şi boala de reflux gastroesofagian. În: Sănătate Publică, Economie şi Management în Medicină. Chișinău, 2013, nr.5(50), p.34-36.
9. **Scurtu A.** Polimorfismul clinic al bolii de reflux gastroesofagian. În: Sănătate Publică, Economie şi Management în Medicină. Chișinău, 2013, nr.5(50), p.55-58.
10. **Скурту А.** Уровень метаболитов оксида азота в плазме крови и в желудочном соке и его роль в патогенезе гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. În: Arta Medica. Chișinău, 2015, nr. 1(54), p.11-14.
11. **Scurtu A.** Rolul polimorfismului genetic în geneza bolii de reflux gastroesofagian. În: Arta Medica. Chișinău, 2015, nr, 2(55), p.33-35.

Categoria C:

12. Statova T., Istrati V., **Scurtu A.** ș.a. Dependența concentrației oxidului nitric în serul sanguin și sucul gastric de severitate esofagitei peptice. În: Anale științifice de universitatea de stat de Medicină și Farmație « Nicolae Testemițanu ».Ediția a XIV-a, vol.3. Probleme actuale in Medicina internă. Chișinău, 2013, p. 330-333

- **Articole în culegeri științifice naționale:**

13. **Скурту А.,** Бойко С. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, внепищеводные проявления и их влияние на качество жизни больных. В: Вестник. Тирасполь, 2010, nr.4, с. 3-5.

14. **Скурту А.,** Скурту С. Распространенность симптомов гастроэзофагеальной рефлюксной болезни среди взрослого населения Рыбницкого района. В: Современные аспекты реанимации и интенсивной терапии. Тирасполь, 2012, с.108-110.

- **Teze la forurile științifice internaționale (peste hotare):**

15. V.Istrati, **A. Scurtu,** A.Scorpan ș.a. Influenţa trioxidului de bismut asupra metaboliţilor oxidului nitric în BRGE. În: Congres național de medicinâ internâ. Medicina Internâ, vol. X. Rezumate. București, România, 2013, p.147.

16. A.Scorpan, G.Bivol, **A.Scurtu** ș.a. Prevalenţa simptomelor BRGE la populaţia matură din Republica Moldova. În: Congres național de medicinâ internâ. Medicina Internâ, vol. X. Rezumate. București, România, 2013, p.148.

## ADNOTARE

Scurtu Alina. **„Particularităţile clinico-paraclinice ale bolii de reflux gastroesofagian în raport cu metabolismul şi polimorfismul genetic al oxidului nitric”**.Teză de doctor în ştiinţe medicale, Chişinău, 2015.

**Structura tezei:** lucrarea este expusă pe 126 de pagini de text imprimat, constă din introducere, 4 capitole, concluzii generale, recomandări practice, rezumat în limbile română, rusă, engleză şi indice bibliografic cu 198 de referinţe, include 30 de figuri, 36 tabele, 5 formule şi 4 anexe. Rezultatele obţinute au fost publicate în 16 lucrări ştiinţifice, inclusiv 3 fără coautori şi 13 în ediţii recenzate.

**Cuvinte cheie:** boala de reflux gastroesofagian, metabolism, oxid nitric, polimorfism genetic.

**Domeniul de studiu:**gastroenterologie

**Scopul studiului:** Cercetarea particularităţilor clinico-evolutive şi de diagnostic ale bolii de reflux gastroesofagian în raport cu nivelul metaboliților stabili al oxidului nitric în serul sangvin și sucul gastric precum şi cu polimorfismul genenelor NOS1 și NOS2 .

**Obiectivele tezei:** Studiul epidemiologic incidenței simptomelor BRGE in populatia matură din unele regiuni ale RM conform rezultatelor anchetarii lor; studierea particularităţilor clinico-evolutive ale bolii de reflux gastroesofagian în funcţie de tipul de afectare a mucoasei esofagiene; evaluarea modificărilor endoscopice, morfologice si pH-metriei in 24 ore in BRGE în dependenţă de severitatea afectării mucoasei;studierea ritmului circadian al simptomelor pacienților cu BRGE în dependență de forma evoluției;determinarea nivelului metaboliţilor NO în serul sanguin şi sucul gastric la pacienţii cu diverse tipuri de afectare a mucoasei esofagului; studierea polimorfismului genelor, care codifică sintazele oxidului nitric:NOS1 si NOS2 la pacienţii cu BRGE;elaborarea criteriilor de diagnostic şi pronostic la pacienţii cu boală de reflux gastroesofagian in dependenta de tipul de afectare a mucoasei esofagului.

**Noutatea şi originalitatea ştiinţifică:** A fost apreciat rolul NO în patogenia BRGE. În premieră s-a studiat metabolismul NO și rolul lui în instalarea şi evoluţia afecţiunii. Originalitatea cercetării constă în evidenţierea particularităţilor clinico-evolutive, endoscopice şi morfologice ale BRGE în funcţie de gradul de afectare a mucoasei esofagiene şi nivelul oxidului nitric, studiul genetic consacrat polimorfismului genelor NOS în instalarea şi dezvoltarea afecţiunii şi elaborarea unui algoritm de diagnostic şi tratament la acest grup de pacienţi.

**Problema ştiinţifică importantă soluţionată în lucrare** constă in fundamentarea ştiințifică a rolului oxidului nitric in dezvoltarea și evoluția bolii de reflux gastroesofagian și determinarea particularităților clinice ale diferitor forme ale maladiei in cauză cea ce va duce la elaborarea criteriilor diagnostice, fapt ce va permite evidențierea metodelor de monitorizare și prevenire a complicațiilor severe a BRGE.

**Semnificaţia teoretică:** Studiul reprezintă un suport ştiinţific important pentru elucidarea particularităților clinice și evolutive a diferitor forme a BRGE în raport cu nivelul metaboliților oxidului nitric. Rezultatele obţinute permit elaborarea măsurilor de profilaxie a complicațiilor severe a bolii de reflux gastroesofagian.

**Valoarea aplicativă a lucrării:** Rezultatele obţinute permit pronosticarea şi elaborarea măsurilor de profilaxie și tratament a bolii de reflux gastroesofagian.

**Implementarea rezultatelor ştiinţifice:** Principalele rezultate ale studiului sunt aplicate în procesul didactic al Catedrei Medicină Internă Semiologie a IP USMF „Nicolae Testemiţanu” și implementate în activitatea curativă a Secției Gastroenterologie a IMSP Spitalul Feroviar Central din Chișinău și IMSP Spitalul Clinic Municipal nr.1.

## РЕЗЮМЕ

Алина Скурту **„Клинико-параклинические особенности гастроэзофагеальной рефлюксной болезни в соотношении с метаболизмом и генетическим полиморфизмом оксида азота”.**Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Кишинев, 2015

**Структура диссертации:** Материалы диссертации изложены на 126 страницах машинописного текста. Работа включает: введение, 4 главы, выводы и практические рекомендации, резюме на румынском, русском и английском языках. Библиографический указатель содержит 198 источника литературы. Диссертация иллюстрирована 36 таблицами, 30 рисунками, 5 формулами и 4 приложениями. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, включая 3 без соавторов и 13 в рецензированных изданиях.

**Ключевые слова:** гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, метаболизм, оксид азота, генетический полиморфизм.

**Область исследования:** гастроэнтерология.

**Цель исследования** состоит в изучении клинико-параклинических особенностей гастроэзофагеальной рефлюксной болезни в соотношении с метаболизмом и генетическим полиморфизмом генов синтаз оксида азота.

**Задачи иисследования:** эпидемиологическое исследование частоты встречаемости симптомов ГЭРБ среди взрослого населения в некоторых регионах страны по результатам анкетирования; изучение особенностей гастроэзофагеальной рефлюксной болезни в зависимости от типа повреждения слизистой оболочки пищевода; изучение суточного ритма симптомов у больных с ГЭРБ в зависимости от формы заболевания; определение уровня метаболитов NO в сыворотке крови и желудочном соке у больных с различными типом поражения слизистой пищевода; изучение генетического полиморфизма генов NOS1 и NOS2; разработка диагностических и прогностических критериев у пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью в зависимости от типа повреждения слизистой пищевода..

**Научная новизна и оригинальность исследования:** Доказана роль оксида азота в развитии и прогрессировании ГЭРБ. Впервые установлена взаимосвязь клинической и эндоскопической стадии ГЭРБ с изменениями показателей оксида азота в плазме крови и желудочном соке. Оригинальность исследования состоит в определении клинико-параклинических, эндоскопических и морфологических особенностей ГЭРБ в зависимости от степени поражения слизистой оболочки пищевода и уровня NO, в изучении генетического полиморфизма генов NOS и его роли в развитии заболевания, выявление диагностических критериев и тактики ведения пациентов с ГЭРБ.

**Научная проблема, решенная в рамках исследования** состоит в научном обосновании роли оксида азота в развитии и течении гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и определения клинических особенностей различных форм этого заболевания, что приведет к разработке диагностических критериев, которые позволят предотвратить тяжелые осложнения ГЭРБ.

**Теоретическая значимость:** исследование представляет собой важное научное обоснование для определения особенностей различных форм ГЭРБ в соотношении с уровнем метаболитов оксида азота.Полученные результаты могут быть использованы в разработке мер профилактики тяжелых осложнений ГЭРБ.

**Прикладное значение:** полученные результаты позволят прогнозирование и разработку мер профилактики и лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни.

**Пути реализации результатов исследования:** основные результаты обследования используются в процессе обучения на кафедре пропедевтике внутренних болезней КГМУ им.Н.Тестемицану и внедрены в терапевтическую активность отделения гастроэнтерологии ЦЖБ г.Кишинева и Муниципальной Клинической Больнице nr.1.

## SUMMARY

Scurtu Alina «**Clinical and paraclinical features of gastroesophageal reflux disease in relation to the level of nitric oxide metabolites and genetic polymorphism of its synthases**» The thesis for the degree of Medical Doctor, Chişinău, 2015

**Structure of the thesis:** the thesis is exposed on 126 pages of printed text, consists of an introduction, 4 chapters, general conclusions, practical recommendations, summary in Romanian, Russian, English and bibliographic index with 198 references, and includes 30 figures, 36 tables, 5 formulas and 4 annexes. The obtained results were published in 16 scientific works, including 3 without co-authors and 13 in reviewed editions.

**Keywords**: gastroesophageal reflux disease, nitric oxide, metabolism, genetic polymorphism.

**Research area:** Gastroenterology

**Aim of the study:** The purpose of this research is to study the clinical, evolutive and diagnostic features of gastroesophageal reflux disease in relation to the level of nitric oxide metabolites and genetic polymorphism of its synthases.

**Objectives:** Epidemiological study of the incidence of GERD symptoms in the adult population in some regions of the country according to the q*uestionnaire results*; a study of clinical evolutive particularities of GERD depending on the type of damage of the esophageal mucosa; assessment of the endoscopic changes, morphological and pH metry in 24 hours, depending on the severity of mucosal damage; the study of circadian rhythm of symptoms in patients with GERD depending on the type of evolution; determination of the level of NO metabolites in blood serum and gastric juice in patients with various types the mucosal damage; the study of genetic polymorphisms of genes encoding nitric oxide synthases: NOS1 and NOS2 in patients with GERD; elaborating the diagnostic and prognostic criteria in patients with gastroesophageal reflux disease depending on the type of esophageal mucosal damage.

**Scientific novelty and originality:** the role of nitric oxide in the development and progression of GERD was proved. For the first time the metabolism of NO and its role in the installing and evolution of the disease was studied. The originality of the research consists in highlighting the clinical and evolutional peculiarities, endoscopic and morphological features of GERD depending on the degree of damage to the esophageal mucosa and the level of nitric oxide, and the study devoted to genetic polymorphism of NOS genes and its role in the installation and development of the disease. It allowed to identify an algorithm for diagnosis and treatment in this group of patients.

**The important scientific problem solved in this research** is examination of the clinical, evolutive and diagnostic features of gastroesophageal reflux disease in relation to the level of nitric oxide metabolites and genetic polymorphism of its synthases.

**Theoretical value**: The obtained results can be used in the development of preventive measures and recommendations for the management of patients with gastroesophageal reflux disease.

**Applied value**: the obtained results allow to predict and develop measures on prevention and treatment of gastroesophageal reflux disease.

**Implementation of scientific results**: The main results of the survey are applied in the teaching process at the Department of Semiology of Internal Medicine at Medical University "Nicolae Testemitanu" and implemented in therapeutic activity of the Gastroenterology Department at Railway Central Hospital in Chișinău, Central Hospital, Municipal Hospital N1.

**SCURTU ALINA**

# PARTICULARITĂŢILE CLINICO-PARACLINICE ALE BOLII DE REFLUX GASTROESOFAGIAN ÎN RAPORT CU METABOLISMUL ŞI POLIMORFISMUL GENETIC AL OXIDULUI NITRIC

**321.01 – BOLI INTERNE (Gastroenterologie)**

**Autoreferatul**

**tezei de doctor în ştiinţe medicale**

Aprobat spre tipar: 10.02.2016
Hîrtie ofset 80gr. Tipar ofset.
Coli de tipar.: 2
Tipărit: ArtPoligraf

Formatul hîrtiei 60x84 1/16
Tiraj 100 exemplare
Comanda nr. 7