

**ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI**  
**UNIVERSITATEA ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI**

Cu titlu de manuscris  
C.Z.U.: 616.1-08:577.2(043.2)

**ABDUȘA DANIELA**

**IDENTIFICAREA ȘI EVALUAREA  
UNOR GENE POTENȚIAL IMPLICATE ÎN  
BOLILE CARDIOVASCULARE**

**162.02. – GENETICA OMULUI ȘI ANIMALELOR**

**Teză de doctor în științe biologice**

**Conducători științifici**

\_\_\_\_\_

**DUCA Maria**

doctor habilitat în științe biologice,  
profesor universitar,  
academician

\_\_\_\_\_

**PALII Ina**

doctor habilitat în științe medicale,  
conferențiar universitar

**Autor**

\_\_\_\_\_

**ABDUȘA Daniela**

**CHIȘINĂU, 2017**

**© Abduşa Daniela, 2017**

## CUPRINS

<b>ADNOTĂRI (română, engleză, rusă).....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA ABREVIERILOR .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>9</b>
<b>1. CONCEPTE DE SUPORT ȘI VIZIUNI MODERNE ÎN INTERPRETAREA ETIOPATOGENICĂ A BOLILOR CARDIOVASCULARE .....</b>	<b>16</b>
1.1. Epidemiologia și factorii de risc cardiovascular .....	16
1.2. Aspecte genetice ale bolilor cardiovasculare .....	23
1.3. Abordarea transcriptomică a bolilor cardiovasculare .....	39
1.4. Concluzii la capitolul 1 .....	42
<b>2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....</b>	<b>44</b>
2.1. Materiale pentru cercetare .....	44
2.2. Metode de cercetare .....	48
2.3. Concluzii la capitolul 2 .....	55
<b>3. ANALIZA EXPLORATORIE A GENELOR CANDIDAT ÎN MANIFESTAREA UNOR PATOLOGII CARDIOVASCULARE .....</b>	<b>57</b>
3.1. Identificarea genelor candidat în manifestarea patologiilor cardiovasculare.....	57
3.2. Stabilirea genelor cu expresie diferențiată în bolile cardiovasculare.....	63
3.3. Selectarea genelor pentru studiul activității transcripționale .....	68
3.4. Concluzii la capitolul 3 .....	73
<b>4. VARIABILITATEA NIVELULUI DE EXPRESIE AL GENELOR CANDIDAT ÎN MANIFESTAREA BOLILOR CARDIOVASCULARE .....</b>	<b>75</b>
4.1. Activitatea transcripțională a genelor la adulți și copii.....	75
4.2. Variabilitatea expresiei unor gene asociate cu patologiile cardiovasculare.....	80
4.3. Concluzii la capitolul 4 .....	87
<b>5. DETERMINISMUL GENETIC AL DIFERITOR PATOLOGII CARDIOVASCULARE .....</b>	<b>88</b>
5.1. Analiza profilului de expresie a genelor în bolile cardiovasculare .....	88
5.2. Aspecte privind expresia genelor în maladiile cardiovasculare .....	96
5.3. Concluzii la capitolul 5 .....	105
<b>CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI .....</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXE.....</b>	<b>138</b>
Anexa 4.1. _Expresia relativă a genei <i>NPPB</i> , unități convenționale .....	138
Anexa 4.2. _Expresia relativă a genei <i>ABCA1</i> , unități convenționale .....	139
Anexa 4.3. _Expresia relativă a genei <i>THBS1</i> , unități convenționale.....	140
Anexa 4.4. _Expresia relativă a genei <i>SCD</i> , unități convenționale.....	141
Anexa 4.5. _Expresia relativă a genei <i>ELAVL1</i> , unități convenționale .....	142
Anexa 4.6. _Expresia relativă a genei <i>IL8</i> , unități convenționale.....	143
Anexa 4.7. _Expresia relativă a genei <i>INHBA</i> , unități convenționale .....	144
Anexa 4.8. _Expresia relativă a genei <i>JAK2</i> , unități convenționale .....	145
Anexa 4.9. _Expresia relativă a genei <i>TIMP1</i> , unități convenționale.....	146

Anexa 4.10. Expresia relativă a genei <i>TNFRSF11B</i> , unități convenționale.....	147
Anexa 4.11. Expresia relativă a genei <i>SSPN</i> , unități convenționale .....	148
Anexa 4.12. Expresia relativă a genei <i>ITGB1</i> , unități convenționale .....	149
Anexa 4.13. Expresia relativă a genei <i>ITGBL1</i> , unități convenționale .....	150
Anexa 4.14. Expresia relativă a genei <i>CYP2C8</i> , unități convenționale .....	151
Anexa 4.15. Expresia relativă a genei <i>CYP4B1</i> , unități convenționale .....	152
Anexa 4.16. Expresia relativă a genei <i>HAS1</i> , unități convenționale .....	153
Anexa 3.17. Expresia relativă a genei <i>KRT19</i> , unități convenționale.....	154
Anexa 4.18. Expresia relativă a genei <i>RGS1</i> , unități convenționale.....	155
<b>DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....</b>	<b>156</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>157</b>

## ADNOTARE

**Abdușa Daniela**, „Identificarea și evaluarea unor gene potențial implicate în bolile cardiovasculare”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2017. Teza include introducere, cinci capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 441 titluri, volumul total de 159 pagini, 29 figuri, 28 de tabele și 18 anexe. Rezultatele obținute au fost publicate în 19 lucrări.

**Cuvinte cheie:** expresia genelor, boli cardiovasculare, variabilitate, profil de expresie, cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatii primare și stenoza aortică congenitală

**Domeniul de studiu:** Genetica omului și animalelor.

**Scopul cercetării** constă în identificarea unor gene candidat prin analiza exploratorie a datelor *microarray* și asocierea lor la nivel de expresie cu cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatii primare și stenoza aortică congenitală.

**Obiectivele lucrării:** identificarea genelor candidat în producerea unor patologii cardiovasculare, în baza seturilor de date *microarray* din NCBI-GEO; evaluarea expresiei genelor potențial implicate în bolile cardiovasculare la copii și adulți; estimarea variabilității expresiei unor gene asociate cu patologia cardiovasculară; stabilirea profilului de expresie a unui set de gene în anumite condiții patologice.

**Noutatea și originalitatea științifică.** Pentru prima dată a fost evaluată la nivel sangvin activitatea transcripțională a unui set de 18 gene la pacienții din Republica Moldova cu diferite patologii cardiovasculare. Studiul molecular a evidențiat expresia diferențiată a genelor în funcție de fenotipul clinic și vârsta subiecților, a stabilit profiluri specifice de expresie pentru cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, stenoza aortică congenitală, cardiomiopatii primare și a demonstrat implicarea genelor candidat în patogeneza maladiilor cardiovasculare.

**Problema științifică importantă soluționată** constă în stabilirea *pattern*-urilor de expresie specifice fiecărui fenotip clinic studiat, demonstrarea omogenității conținutului de transcripti al genelor investigate la subiecții sănătoși și eterogenitatea înaltă la bolnavi, ceea ce relevă variabilitatea expresiei genelor în diferite stări fiziologice ale organismului, datele fiind utile în optimizarea procedurii de stratificare a pacienților cu maladii cardiovasculare.

**Semnificația teoretică.** Lucrarea reflectă o modalitate exploratorie de analiză și interpretare a rezultatelor experimentelor *microarray*, cu identificarea nu doar a genelor cu rol stabilit, dar și a altor grupe de gene potențial implicate în patologiile cardiovasculare. Rezultatele obținute în baza investigațiilor bioinformatică și molecular genetică aprofundează cunoștințele despre contribuția factorilor genetici în patogeneza stărilor patologice vizate.

**Valoarea aplicativă a lucrării.** Prin PCR cu primeri specifici au fost puse în evidență 18 gene asociate cu diferite procese biologice importante în patogeneza moleculară a bolilor cardiovasculare. Strategia bioinformatică de extragere și analiză a datelor de expresie *microarray* a permis identificarea genelor cu rol prioritar și potențial în maladiile cardiovasculare. Profilurile transcripționale ale genelor validate prin metode de laborator au fost utilizate în stratificarea pacienților cu cardiomiopatii primare, cardiopatie ischemică cu și fără fibrilație atrială și stenoza aortică congenitală.

**Implementarea rezultatelor.** Metodologia de extragere și analiză a datelor de expresie *microarray* este aplicată în identificarea genelor cu rol potențial în diferite procese biologice în cadrul Centrului Genetică Funcțională, UnAȘM. Datele obținute și expuse în teză servesc în calitate de material științifico-didactic pentru cursurile de *Biologie moleculară* și *Metode genetice de analiză* la Catedra Biologie a Facultății Științe ale Naturii, UnAȘM. Primerii specifici elaborați pentru studiul expresiei a 18 gene la subiecții cu boli cardiovasculare sunt utilizați în cadrul CGF al UnAȘM și sunt recomandați pentru cercetări genético-moleculare ulterioare. *Pattern*-urile de expresie stabilite pentru maladiile cardiovasculare studiate pot fi recomandate în detectarea și stratificarea pacienților.

## АННОТАЦИЯ

Абдуша Даниела „Идентификация и оценка генов потенциально участвующих в сердечно-сосудистых заболеваниях”, диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, Кишинев, 2017. Работа включает введение, пять глав, общие выводы и рекомендации, библиографию из 441 источников, 159 страниц общего объема, 29 рисунков и 28 таблиц. Полученные результаты отражены в 19 научных публикациях.

**Ключевые слова:** экспрессия генов, генетическая изменчивость, сердечно-сосудистые заболевания, ишемическая болезнь сердца с/и без фибрилляции предсердий, первичные кардиомиопатии, врожденный аортальный стеноз.

**Область исследований:** Генетика человека и животных.

**Цель исследования** является выявление генов-кандидатов с помощью анализа массивов генетических данных (*microarray data analysis*) и ассоциация профиля экспрессии генов с ишемической болезнью сердца с/и без фибрилляции предсердий, первичной кардиомиопатии и врожденным аортальным стенозом.

**Задачи исследования:** идентификация генов-кандидатов в возникновении сердечно-сосудистых заболеваний на основе наборов генетических данных из NCBI-GEO; оценка экспрессии генов потенциально участвующие в сердечно-сосудистых заболеваниях у детей и взрослых; выявление вариабельности экспрессии генов связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями; изучение профиля экспрессии набора 18 генов в определенных патологических состояниях: ишемическая болезнь сердца с/и без фибрилляции предсердий, первичной кардиомиопатии и врожденный аортальный стеноз.

**Новизна и научная оригинальность.** Оригинальность данной работы заключается в том, что впервые был произведен количественный анализ экспрессии 18 генов идентифицированных в базе данных *NCBI-GEO* как наследственные факторы ассоциирующиеся с сердечно-сосудистыми заболеваниями у пациентов в Республике Молдова. Была выявлена дифференциальная экспрессия генов в зависимости от клинического фенотипа и возраста субъектов, а также были получены специфические профили экспрессии для ишемической болезни сердца с/и без фибрилляции предсердий, первичной кардиомиопатии и врожденного аортального стеноза. Продемонстрирована связи генов-кандидатов с возникновением сердечно сосудистых заболеваний.

**Решенная научная проблема** состоит в расширении существующих знаний о ассоциации профиля экспрессии генов с болезнями сердца и определение характера экспрессии специфического для исследуемого клинического фенотипа что может быть использовано для оптимизации процедуры выявления сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов.

**Теоретическая значимость.** Работа отражает поисковый анализ и интерпретацию результатов данных микрочипов, с обнаружением генов с установленной ролью в сердечно-сосудистой патологии, а также новых генов, потенциально участвующих в механизмах этих заболеваний. Исследование предоставляет дополнительные доказательства значимости наследственных факторов, в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

**Прикладная ценность работы** состоит в идентификации генов с дифференциальной экспрессией в сердечно-сосудистых патологиях, выявление специфической картины экспрессии генов при ишемической болезни сердца с/и без фибрилляции предсердий, первичной кардиомиопатии и врожденном аортальном стенозе, что свидетельствует об изменении транскрипционной активности генов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также в внедрение методологии анализа массивов генетических данных в области биомедицинских исследований.

**Внедрение научных достижений.** Разработанная нами стратегия анализа данных микрочипов может быть применена для идентификации генов с потенциальной ролью в различных биологических процессах, в том числе заболеваний человека. Результаты, описанные в работе, служат в качестве научно-методического пособия для курса *Молекулярная биология и Генетические методы анализа* на Факультете Естественных Наук, УнАНМ. Специфические праймеры, разработанные для исследования экспрессии 18 генов н пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, используются в Центре Функциональной Генетики УнАНМ и рекомендованы для последующих молекулярно-генетических исследований. Паттерны экспрессии генов установленные для сердечно-сосудистых заболеваний могут быть предложены для выявления и стратификации пациентов.

## ANNOTATION

**Abduşa Daniela, “Identification and evaluation of potential genes involved in cardiovascular diseases”**, PhD thesis in Biological Sciences, Chisinau, 2017. The thesis include introduction, five chapters, general conclusions and recommendations, 441 references, a total volume of 159 pages, 29 figures, 28 tables and 18 annexes. Obtained results were published in 19 scientific papers.

**Keywords:** gene expression, cardiovascular diseases, variability, expression profile, ischemic heart disease with / without atrial fibrillation, cardiomyopathy and congenital aortic stenosis.

**Field of investigation:** Human and animal genetics.

**The purpose of the research** consists in identification of candidate genes by exploratory analysis of microarray data and their association with expression level of coronary artery disease with/without atrial fibrillation, cardiomyopathy and congenital aortic stenosis.

**Objectives of the thesis:** identification of candidate genes causing the cardiovascular diseases, based on microarray datasets from NCBI, GEO; evaluation of the gene expression potential involved in cardiovascular diseases in children and adults; estimating the variability of gene expression associated with cardiovascular diseases; establishing the expression profile of one set of genes under certain pathological conditions.

**Scientific novelty and originality.** For the first time was evaluated the expression of a set of 18 genes in patients with different cardiovascular pathologies in the Republic of Moldova was evaluated at the blood level. The molecular study revealed the differential gene expression according to the clinical phenotype and the age of the subjects, and established specific expression profiles for ischemic cardiopathy with / without atrial fibrillation, congenital aortic stenosis, cardiomyopathy, and demonstrated the implication of candidate genes in the pathogenesis of cardiovascular diseases.

**The most important solved scientific problem** consists in the establishing of the expression patterns specific to each clinical studied phenotype, demonstrating the homogeneity of the transcripts content of the investigated genes in healthy subjects and the high heterogeneity in the patients, which confirms the variability of gene expression between the different physiological states of the organism in order to optimize the procedure for stratification of the patients with cardiovascular diseases.

**The theoretical significance.** The work reflects an exploratory proceeding of analysis and interpretation of the results of microarray tests, with the identification not only of the genes with established, but also of other groups of genes potentially involved in cardiovascular pathologies. The obtained results from bioinformatics and molecular genetic investigations deepen the knowledge about the contribution of genetic factors in the pathogenesis of the targeted pathological conditions.

**The applicative value of the work.** By PCR with specific primers, 18 genes associated with various biological processes important in the molecular pathogenesis of cardiovascular diseases were highlighted. The bioinformatics strategy of extracting and analyzing the microarray expression data allowed identifying genes of priority and potential role in cardiovascular diseases. The transcriptional profiles of genes validated by laboratory methods have been used in the stratification of patients with cardiomyopathy, ischemic cardiopathy with / without atrial fibrillation and congenital aortic stenosis.

**Implementation of scientific results.** The methodology of extracting and analyzing of microarray expression data is applied in identifying of the genes with potential role in different biological processes within the Centre of Functional Genetics (CFG) of UnASM. The obtained and presented data in the thesis will serve as a scientific-didactic material for the courses of *Molecular Biology* and *Genetic Analysis Methods* at the Department of Biology of the Faculty of Natural Sciences, UnASM. The specific primers, developed for the study of 18 gene expression in subjects with cardiovascular disease, are used in the CFG of UnASM and are recommended for subsequent genetic and molecular research. The established expression patterns for the studied cardiovascular diseases can be recommended in patient detection and stratification.

## LISTA ABREVIERILOR

- ADN** – acid dezoxiribonucleic
- BCC** – boală cardiacă congenitală
- BCV** – boli cardiovasculare
- CMD** – cardiomiopatia dilatativă
- CMH** – cardiomiopatia hipertrofică
- CMP** – cardiomiopatii
- CNV** – variațiile numărului de copii (*Copy Number Variation*)
- CPI** – cardiopatie ischemică
- CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială
- CV** – cardiovascular
- EDA** – analiza exploratorie a datelor (*Exploratory Data Analysis*)
- FiA** – fibrilația atrială
- GEO** – *Gene Expression Omnibus*
- GI** – genă de interes
- GPL** – platformă
- GSE** – set de date
- GSM** – probă biologică
- GWAS** – studii de asociație la nivelul întregului genom (*Genome-Wide Association Study*)
- HDL** – lipoproteine cu densitate înaltă
- HTA** – hipertensiune arterială
- IE** – indice de expresie
- IMSP IC** – Instituția Medico-Sanitară Publică Institutul de Cardiologie
- IMSP IM și C** – Instituția Medico-Sanitară Publică Institutul Mamei și Copilului
- LDL** – lipoproteine cu densitate joasă
- NCBI** – Centrul Național pentru Informații Biotehnologice (*National Center for Biotechnology Information*)
- OMS** – Organizația Mondială a Sănătății
- qPCR/ RT-qPCR** – Real Time PCR (reacția de polimerizare în lanț în timp real)
- QTL** – loci cantitativi (*Quantitative Trait Loci*)
- SAo** – stenoza aortică congenitală
- SNP** – polimorfismul uninucleotidic (*Single-Nucleotide Polymorphism*)
- STEPS** – abordarea supravegherii pe pași a OMS (*The WHO STEPwise approach to Surveillance*)
- TEVS** – obstrucțiile tractului de ejecție al ventriculului stâng
- un.c.** – unități convenționale
- VS** – ventriculul stâng



## INTRODUCERE

### **Actualitatea și importanța temei**

Conform studiului Povara Globală a Bolilor (*Global Burden of Disease*), în anul 2013, circa 29,6% (15.616,1 mii) din totalul deceselor la nivel mondial au fost cauzate de patologiile cardiovasculare (BCV), ceea ce constituie mai mult decât toate cazurile de deces provocate de bolile de nutriție, transmisibile, materne, neonatale luate împreună, precum și dublu față de numărul celor cauzate de cancer [226, 325].

BCV sunt principala cauză de internare în spital și handicap fizic la nivelul populației adulte și vârstnice din Europa, cauzând anual peste 4 milioane de decese, ceea ce reprezintă aproximativ ½ din totalul deceselor la nivelul Uniunii Europene [268]. Evenimentele cardiace ca infarctul miocardic și moartea subită se produc tot mai frecvent la persoanele fără patologii cardiovasculare detectabile în antecedente, fapt ce pune în evidență o problemă stringentă determinată de imposibilitatea depistării patologiei cardiovasculare (CV) în stadiul preclinic pentru a preveni progresul bolii, invaliditatea și finalmente mortalitatea.

Statisticile naționale, cât și cele mondiale, atestă o prevalență crescută a factorilor de risc cardiovascular în rândul populației tinere. Astfel, în urma realizării primului studiu național *STEPS* [15] privind evaluarea factorilor de risc pentru bolile cronice netransmisibile, prin inițiativa globală a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) s-a menționat că populația Republicii Moldova, în mare parte, duce un mod de viață nesănătos. Rezultatele studiului arată că 56% din populație este supraponderală, inclusiv 23% este obeză, iar o pătrime din populația adultă din Republica Moldova fumează, principalii fumători fiind bărbații (43,6%). Trei din zece persoane (29,4%) au colesterolul total mărit în sânge și doar unul din patru cetățeni cu hipertensiune arterială se află sub medicație.

Aceste rezultate explică locul de top al Republicii Moldova printre țările din Europa la capitolul mortalității cauzate de bolile cardiovasculare [268]. Prin urmare, BCV prin morbiditatea crescută și prin gravitatea potențială a lor, reprezintă un domeniu de interes științific și o problemă de importanță medico-socială.

Actualmente, identificarea genelor care determină variabilitatea individuală a factorilor de risc, utile în evaluarea profilaxiei precoce, progresiei și severității bolilor cardiovasculare reprezintă o direcție importantă în cercetarea biomedicală și un pas esențial în înțelegerea mecanismelor care duc la dezvoltarea bolii. Deși astfel de gene nu sunt neapărat cauza condiției patologice, ele pot servi drept markeri în diagnostic sau în evaluarea riscului de a dezvolta un fenotip patologic [388].

Un progres imens în descoperirea unor gene implicate în BCV s-a produs în ultimii 15 ani, datorită secvențierii genomului uman și identificării unui număr mare de gene și polimorfisme genetice care influențează apariția și progresul bolilor cardiovasculare [316, 335, 385], în special polimorfismul uninucleotidic (SNP), în contextul studiilor de asociație la nivelul întregului genom (GWAS). Dezavantajul acestei tehnici constă în imposibilitatea de a stabili dacă genele evaluate sunt implicate direct în patogenia bolii sau sunt doar asociate cu alte determinante. Deși, identificarea unor locusuri sau alele asociate genei responsabile de apariția unei boli aduce informații valoroase, simpla asociere statistică nu demonstrează direct o relație cauză-efect.

O direcție relativ nouă și de perspectivă în medicina cardiovasculară reprezintă studierea transcriptomului uman, ce permite caracterizarea profilului transcripțional ADN-ARN. Un aspect important al acestor studii se axează pe investigarea relației dintre bolile cardiovasculare, factorii clinici și expresia genelor, rezultatele fiind esențiale în programele de monitorizare a pacienților [106, 183]. Astfel, prin urmărirea și compararea expresiei genelor între subiecții cu și fără boală pot fi determinate genele care se transcriu în cadrul unui anumit fenotip clinic. Studiarea și cunoașterea modificărilor de expresie a genelor în diferite condiții ar permite monitorizarea stării de sănătate și depistarea precoce a dereglărilor metabolice la nivel molecular, oferind perspective pentru dezvoltarea medicinei personalizate.

Cercetările asupra bolilor cardiovasculare realizate în ultimul deceniu urmăresc implementarea profilului de expresie genică în evaluarea patologiei, cu impact benefic în practica diagnostică și terapeutică, însă analiza transcriptomului uman deseori este anevoioasă din cauza unor dificultăți de obținere a țesuturilor și lipsa unor modele capabile să reproducă în mod eficient caracteristicile clinice relevante ale bolii. Actualmente studiile de specialitate tratează o direcție relativ nouă, care implică sângele periferic „*bloodomics*”. Aceasta se bazează pe faptul că celulele circulante din sânge monitorizează starea fiziologică a organismului, modificările transcripționale la nivelul acestora având loc ca răspuns la o stare patologică [257].

Expresia diferențiată a genelor în maladii cardiovasculare constituie subiectul numeroaselor cercetări [106, 183, 232, 364, 368], care au drept scop definirea proceselor biologice complexe asociate cu starea de sănătate și boală, utile în stratificarea pacienților în funcție de fenotipul clinic.

Astfel, pe baza expresiei genelor la nivel de sânge periferic, a fost elaborat un algoritm de diferențiere între persoanele sănătoase, pacienții cu cardiopatie ischemică stabilă, angină instabilă și infarct miocardic [183], au fost definite unele subtipururi tumorale [102], au fost identificați markeri moleculari [401] și au fost investigate noi terapii [69].

Întrucât expresia genelor reprezintă un indicator al stării fiziologice a celulei, studiile care se bazează pe profilul genetic al pacienților favorizează îmbunătățirea mijloacelor de predicție [371] și permit elucidarea variabilității interindividuale în răspunsul clinic la un anumit regim terapeutic, facilitând astfel practicarea medicinei personalizate. Pe un eșantion de 45 subiecți cu vârsta de  $36,5 \pm 14,8$  ani, s-a relevat că variația *pattern*-ului de expresie la subiecții sănătoși este impresionant mai mică comparativ cu variația la subiecții cu cancer sau infecții bacteriene [404]. De asemenea, s-a stabilit un nivel mai mic de variabilitate al conținutului de transcripti în celulele stem embrionare, comparativ cu cele exprimate în celulele nediferențiate [28].

Rolul primordial în variabilitatea expresiei genelor revine *factorilor genetici* (variațiilor numărului de copii ADN [167] și locilor caracterelor cantitative [167], polimorfismelor uninucleotidice [167, 363] etc), *modificărilor epigenetice* [103, 145] și *evenimentelor stocastice* [38]. Unii dintre factorii menționați cauzează consecințe invizibile în expresia fenotipică [222], alții, în funcție de tipul și localizarea mutațiilor în structura genei, determină o expresie heterocronică și ectopică [222, 243, 305] care poate provoca modificări în structura proteinei [57], afecta căile metabolice [160] și induce anumite procese patologice [192].

Caracterizarea unei stări fiziologice specifice, pe baza expresiei genice și combinarea acestor date cu factorii de risc cardiovascular permite depistarea precoce a dereglărilor metabolice la nivel molecular, identificarea purtătorilor sănătoși, monitorizarea riscului și asigură trecerea treptată de la o abordare generalizată la tratamente personalizate și terapii ghidate de răspuns.

**Scopul studiului** constă în identificarea unor gene candidat prin analiza exploratorie a datelor *microarray* și asocierea lor la nivel de expresie cu cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatiile primare și stenoza aortică congenitală.

#### **Obiectivele studiului:**

1. identificarea genelor candidat în producerea unor patologii cardiovasculare, în baza seturilor de date *microarray* din NCBI-GEO;
2. evaluarea expresiei genelor potențial implicate în bolile cardiovasculare la copii și adulți;
3. estimarea variabilității expresiei unor gene asociate cu patologia cardiovasculară;
4. stabilirea profilului de expresie a unui set de gene în anumite condiții patologice.

#### **Noutatea și originalitatea științifică**

Pentru prima dată a fost evaluată la nivel sangvin activitatea transcripțională a unui set de 18 gene la pacienții din Republica Moldova cu diferite patologii cardiovasculare. Studiul

molecular a evidențiat expresia diferențiată a genelor în funcție de fenotipul clinic și vârsta subiecților, a relevat profiluri specifice de expresie pentru cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, stenoza aortică congenitală, cardiomiopatiile primare și a demonstrat implicarea genelor candidat în patogeneza maladiilor cardiovasculare.

**Problema științifică importantă soluționată** constă în stabilirea *pattern*-urilor de expresie specifice fiecărui fenotip clinic studiat, demonstrarea omogenității conținutului de transcripti al genelor investigate la subiecții sănătoși și eterogenitatea înaltă la bolnavi, ceea ce relevă variabilitatea expresiei genelor în diferite stări fiziologice ale organismului, datele fiind utile în optimizarea procedurii de stratificare a pacienților cu maladii cardiovasculare.

#### **Importanța teoretică a lucrării**

Lucrarea reflectă o modalitate exploratorie de analiză și interpretare a rezultatelor experimentelor *microarray* cu identificarea nu doar a genelor cu rol stabilit, dar și a altor grupe de gene potențial implicate în patologiile cardiovasculare. Rezultatele obținute în baza investigațiilor bioinformatică și molecular-genetice aprofundează cunoștințele privind contribuția factorilor genetici în patogeneza stărilor patologice vizate.

#### **Valoarea aplicativă a lucrării**

Prin PCR cu primeri specifici au fost puse în evidență 18 gene asociate cu diferite procese biologice importante în patogeneza moleculară a bolilor cardiovasculare. Strategia bioinformatică de extragere și analiză a datelor de expresie *microarray* a permis identificarea genelor cu rol prioritar și potențial în maladiile cardiovasculare. Profilurile transcripționale ale genelor validate prin metode de laborator au fost utilizate în stratificarea pacienților cu cardiomiopatii primare, cardiopatie ischemică cu și fără fibrilație atrială și stenoza aortică congenitală.

#### **Aprobarea rezultatelor**

Conținutul și rezultatele tezei de doctor au fost prezentate, discutate și aprobate la ședințele Consiliului științific al Centrului de Genetică Funcțională, precum și în cadrul următoarelor întruniri științifice: International Conference of Young Researchers, Chișinău, 2012; Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2012; Conferința științifică a studenților și masteranzilor “Viitorul începe acum”, Chișinău, 2012; Conferința Transfrontalieră a Tinerilor: „Tinerii Politicieni, Juriști, Economisți, Jurnaliști, Artiști, Filologi vis-a-vis de extinderea UE”, Chișinău, 2013; Simpozionul Național cu Participare Internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, Chișinău, 2013;

Conferința Națională de Genetică Medicală cu Participare Internațională, Sibiu-Păltiniș, România, 2013; International Medical and Pharmaceutical Conference of Students and Young Scientists „Actual Problems of Medicine and Pharmacy”, Cernăuți, Ucraina, 2013; Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători”, Chișinău, 2014, 2015, 2016; International Scientific Conference for Students and PhD Students „Youth and Progress of Biology”, Lviv, Ucraina, 2015; Congresul Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, Chișinău, 2015; Conferința Internațională „Științele vieții în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri”, Chișinău, 2016; Conferința științifică cu participare internațională ”Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice”, Chișinău, 2016; International Scientific Conference ”Factors in Experimental Evolution of Organisms”, Odesa, Ucraina, 2016; International Pushchino school conference of young scientists “Biology – the science of the XXI century”, Pushchino, Rusia, 2016.

### **Sumarul compartimentelor tezei**

Teza de doctor este expusă pe 159 pagini și constă din adnotare (română, rusă, engleză), lista abrevierilor, introducere, 5 capitole de cercetări originale, concluzii generale și recomandări, bibliografia cu 441 referințe, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului. Conținutul tezei este completat cu 28 de tabele, 29 de figuri și 18 anexe. Rezultatele obținute sunt reflectate în 19 lucrări.

În **Introducere** se abordează actualitatea și importanța problemei; este formulat scopul și obiectivele urmărite pe parcursul studiului în vederea soluționării problemei de interes socio-umanitar și științific; descrisă noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor și sumarul compartimentelor tezei.

**Capitolul 1 „Concepte de suport și viziuni moderne în interpretarea etiopatogenică a bolilor cardiovasculare”** cuprinde o sinteză a celor mai recente date din literatura de specialitate privind epidemiologia bolilor cardiovasculare, atât la nivel național, cât și mondial, descrierea tehnicilor moderne de investigare transcriptomică a BCV, aspecte privind expresia genelor la nivel sangvin, noțiuni generale de genă candidat etc. Având în vedere înalta eterogenitate și etiologia multifactorială a BCV, o atenție sporită se acordă factorilor genetici și de mediu care influențează mecanismele de producere și evoluție a bolilor, cunoașterea cărora ar contribui la elaborarea strategiilor eficiente de prevenire și control a pacienților cu patologii CV. Indicațiile bibliografice sunt rezultatul documentării pe portalurile și bazele de date științifice precum

*PubMed, NCBI, OMIM, Mendeley, SpringerLink, Portalul WorldWideScience*, baze de date oficiale americane și europene etc.

**Capitolul 2 „Materiale și metode de cercetare”** include materialele utilizate pentru cercetare, strategia de lucru aplicată ca bază metodologică de analiză exploratorie a datelor de expresie *microarray*, design-ul studiului molecular, sunt menționați primerii specifici elaborați în baza secvențelor transcripțiilor genelor de interes stocate în baza de date *NCBI*. Pentru stabilirea lotului de studiu au fost definite criteriile de includere și excludere a pacienților, selectarea cărora s-a efectuat prin analiza fișelor medicale individuale, conform scopului și obiectivelor cercetării. Estimarea nivelului de expresie a genelor de interes a fost realizată prin PCR cantitativ precedat de reverstranscripție, utilizând ARN extras din probe de sânge.

**Capitolul 3 „Analiza exploratorie a genelor candidat în manifestarea unor patologii cardiovasculare”** include rezultatele proprii privind identificarea genelor candidat în manifestarea bolilor cardiovasculare, strategia elaborată pentru extragerea și analiza datelor de tip *microarray* stocate în *NCBI-GEO*. Studiul explorativ a permis stabilirea a 6088 gene candidat, dintre care 775 potențial și 63 gene prioritar implicate în *BCV*. De asemenea, capitolul prezintă rețelele biologice elaborate în vederea stabilirii interacțiunilor dintre genele candidat și asocierii cu bolile cardiovasculare. În rezultatul analizelor, au fost selectate 19 gene pentru evaluarea activității transcripționale, dintre care 5 gene cu rol prioritar (*NPPB, SCD, ABCA1, THBS1, LPA*) și 14 cu rol potențial (*ELAVL1, IL8, INHBA, JAK2, TIMP1, TNFRSF11B, SSPN, ITGB1, ITGBL1, CYP2C8, HAS1, CYP4B1, KRT19, RGS1*) în patologiile cardiovasculare.

**Capitolul 4 „Variabilitatea nivelului de expresie al genelor candidat în manifestarea bolilor cardiovasculare”** cuprinde datele obținute în urma evaluării expresiei și variabilității genelor, luând în considerație vârsta subiecților (copii și adulți) și starea organismului (stare patologică și stare de sănătate, „*de bine*”). Analiza genelor candidat a relevat o variabilitate înaltă a nivelului de expresie în rândul bolnavilor și o activitate transcripțională relativ constantă la subiecții din grupul de referință, atât la maturi, cât și copii, date care pun în evidență homeostazia celulară. De asemenea, sunt prezentate rezultatele privind expresia diferențiată a genelor între copii și adulți, astfel, pentru 17 dintre cele 18 gene incluse în studiu s-a constatat un nivel mai mare de transcripți la adulții sănătoși, comparativ cu copiii, date care relevă expresia diferențiată în timp.

**Capitolul 5 „Determinismul genetic al diferitor patologii cardiovasculare”** cuprinde descrierea rezultatelor privind analiza profilului de expresie pentru genele de interes în stenoza

aortică congenitală, cardiomiopatie ischemică asociată cu fibrilația atrială, cardiomiopatii primare și cardiopatie ischemică. Rezultatele obținute au pus în evidență modificări în profilul de expresie a genelor pentru patologiile studiate, astfel încât, în cazul stenozei aortice congenitale 10 gene prezintă supraexpresie și 2 – subexpresie, în cardiomiopatii primare 6 gene au manifestat expresie diminuată și 5 – sporită, în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, activitatea majorității genelor este inhibată (13 gene, respectiv 14 gene). De asemenea, sunt prezentate rezultatele clasificării genelor în dependență de nivelul de activitate transcripțională în patologiile cardiovasculare studiate, care a permis stabilirea genelor *foarte puternic*, *puternic*, *moderat* și *slab* sub/supraexpresate în patologiile evaluate, ceea ce sugerează rolul lor în patogeneza moleculară a acestor maladii. Capitolul include gruparea factorilor ereditari în raport cu patologiile studiate și descrierea detaliată a *pattern*-ului de expresie a genelor candidat. În baza datelor obținute și a celor din literatura de specialitate a fost elaborat un model ipotetic care ilustrează implicarea potențială a genelor studiate în patogeneza maladiilor cardiovasculare.

Compartimentul **Concluzii generale și Recomandări practice** este dedicat concluziilor studiului de față și a posibilităților de implementare în practică a rezultatelor obținute.

## **1. CONCEPTE DE SUPORT ȘI VIZIUNI MODERNE ÎN INTERPRETAREA ETIOPATOGENICĂ A BOLILOR CARDIOVASCULARE**

Bolile cardiovasculare includ patologiile care afectează inima (cardio) și/sau sistemul de vase sangvine al organismului (vascular) [246]. Cele mai multe dintre acestea sunt maladii cronice, însă altele sunt acute, cum ar fi de exemplu infarctul miocardic și accidentul vascular cerebral. Riscul de apariție a evenimentelor cardiovasculare majore este dependent de prezența unuia sau a mai multor factori de risc cardiovascular.

Din cauza etiologiei multifactoriale, bolile cardiovasculare cuprind într-un cadru larg boala cardiacă ischemică, bolile cerebrovasculare, boala periferică vasculară, hipertensiunea arterială (HTA), insuficiența cardiacă congestivă, valvulopatiile și cardiopatiile congenitale [8]. Elucidarea bazei genético-moleculare a bolilor cardiovasculare ar permite realizarea unei stratificări a riscului genetic înainte de dezvoltarea unor fenotipuri clinice patologice, inclusiv stabilirea riscului de moarte subită.

### **1.1. Epidemiologia și factorii de risc cardiovascular**

Conform datelor statistice, bolile cardiovasculare continuă să rămână principala cauză de morbiditate și mortalitate la nivel global, fiind responsabile anual de pierderea a peste 17 milioane de vieți [409, 410].

Mai mult de șase milioane din numărul total de decese prin BCV se datorează atacului vascular cerebral și peste șapte milioane de vieți revendică cardiopatia ischemică [410].

Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății, cele mai recente informații estimate cu privire la rata mortalității prin BCV sunt disponibile pentru perioada de referință 2012 (Figura 1.1). Astfel, cea mai înaltă rată a mortalității, care constituie 712 decese la 100 000 de locuitori a fost înregistrată în Turkmenistan.

Pe locul doi se găsește Kazahstan cu 636 decese la 100 000 locuitori. Mongolia, Uzbekistan, Kârgâzstan, Guyana, Ucraina, Federația Rusă, Afganistan, Tadjikistan și Republica Moldova au raportat o rată de peste 500 de decese la 100 000 de locuitori. Pe de altă parte, Japonia, Franța, Israel, Canada, Australia, Coreea de Sud, Spania și Elveția au înregistrat sub 100 de decese la 100 000 de locuitori, acestea fiind țările cu cea mai scăzută rată standardizată a mortalității cauzată de BCV în perioada dată.

Variațiile între țări, marcate de morbiditatea și mortalitatea prin BCV sunt parțial explicate de diferențele socio-economice privind factorii de risc convenționali, cum ar fi fumatul, tensiunea arterială, valorile colesterolului și a glicemiei [136].



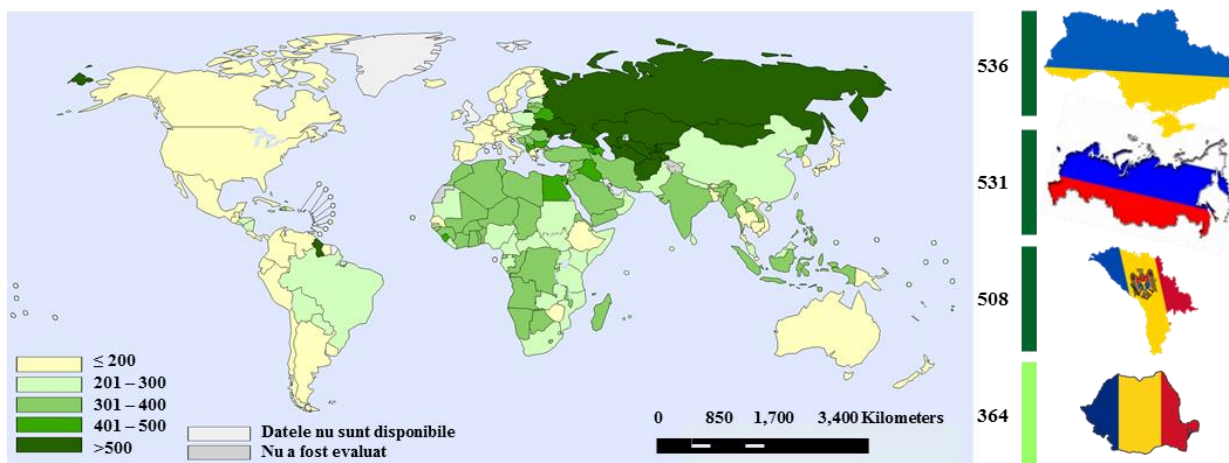


Fig. 1.1. Decese cauzate de boli cardiovasculare — rata standardizată a mortalității, 2012 (la 100000 de locuitori), conform datelor [440].

Conform ghidului elaborat de *Al patrulea Grup reunit de Lucru al Societății Europene de Cardiologie* rata de mortalitate crește cu vârsta și este mai mare la sexul masculin [136].

În Figura 1.2 sunt reprezentate primele zece țări din Europa cu cea mai ridicată rată de mortalitate prin BCV, în funcție de sex [2]. Incidența deceselor cauzate de bolile sistemului circulator este mai ridicată la bărbați în fiecare dintre țările enunțate.



Fig. 1.2. Rata standardizată a mortalității prin bolile sistemului circulator distribuită pe sexe, 2012 (la 100 000 de locuitori), conform datelor [440].

Aceste date evidențiază, în mod clar, o „supramortalitate masculină” prin BCV, însă important de precizat că femeile, care aparent au un risc mai scăzut, de fapt au doar o amânare cu 10 ani a riscului global de evenimente cardiovasculare [291].

În conformitate cu rata de mortalitate, Republica Moldova se află printre primele țări ale Europei la capitolul deceselor cauzate de bolile cardiovasculare, care rămân a fi cauza majoră de invaliditate și de spitalizări atât la nivelul populației vârstnice, cât și adulte, ceea ce contribuie în mod substanțial la creșterea costurilor din sistemul sanitar. De altfel, în Europa, circa 700 mii din

cele peste 4 milioane de decese provocate anual de BCV survin la o vârstă de până la 65 ani [381].

Conform datelor Centrului Național de Management în Sănătate și Biroului Național de Statistică al Republicii Moldova bolile cardiovasculare se plasează constant pe primul loc printre cauzele de deces, constituind 57,7% din mortalitatea totală în anul 2015 [427, 439].

Alarmant este faptul că 24,7% din aceste decese survin la vârste socialmente productive [17], iar dizabilitatea cardiovasculară a persoanelor în vârstă aptă de muncă a constituit în anul 2012 circa 19-20% din totalul de persoane cu dizabilități prin alte maladii [13].

Rata de mortalitate prin bolile cardiovasculare diferă semnificativ în profil teritorial, astfel încât, pentru anul 2015 a fost mai pronunțată în partea de nord a Republicii Moldova, raioanele Dondușeni, Briceni, Edineț, Florești, Râșcani și Ocnîța (Figura 1.3).

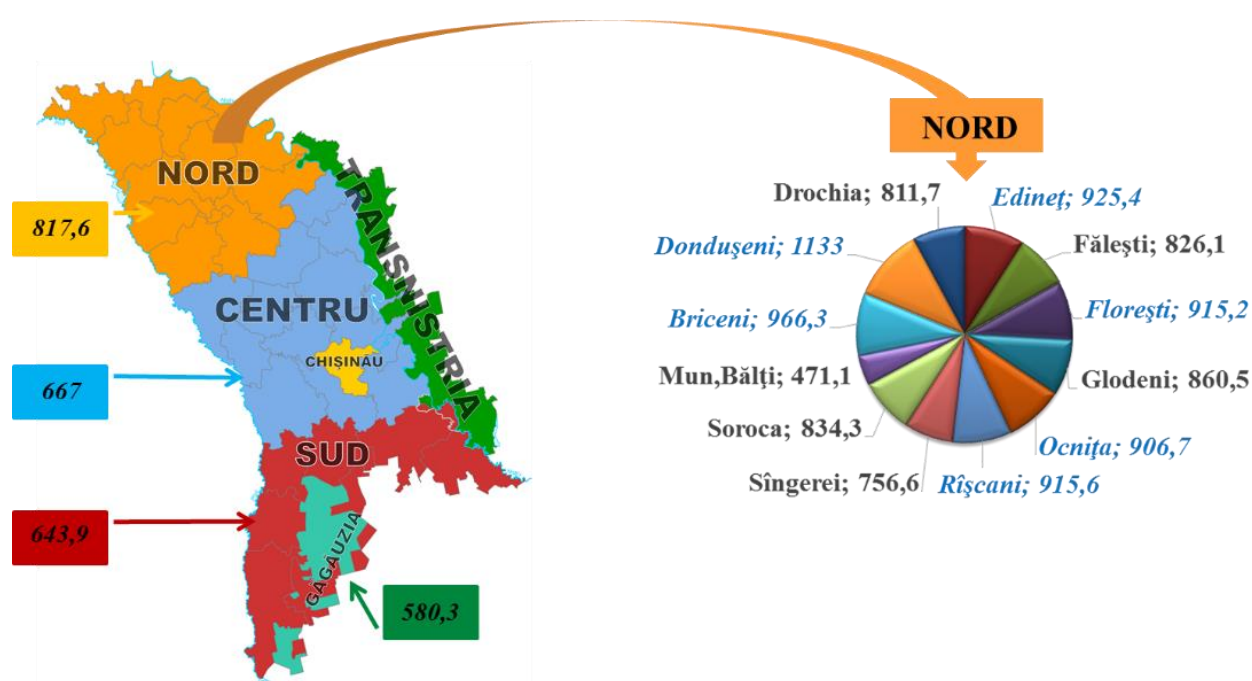


Fig. 1.3. Rata de mortalitate prin boli cardiovasculare în Republica Moldova, 2015 (la 100 000 locuitori), conform datelor [439].

În cele din urmă, afecțiunile cardiovasculare continuă să rămână o cauză majoră de sănătate publică, deși peste jumătate din decesele cauzate pot fi prevenite prin controlul eficient al factorilor de risc.

### Factorii de risc cardiovascular

Mecanismele de apariție ale bolilor cardiovasculare continuă să rămână neelucidate, iar în lipsa unei etiologii bine definite un rol important li se acordă factorilor de risc. Lansarea conceptului factor de risc, ce definește o condiție (HTA, fumatul) asociată unui pericol crescut

de a dezvolta o afecțiune cardiovasculară a constituit un progres major al studiului *Framingham* [211, 234], care a condus la îmbunătățirea strategiilor de prevenire și tratament eficient a bolilor cardiovasculare.

Factorii de risc cardiovascular pot fi convenționali și neconvenționali [118, 261], însă această delimitare nu este categorică. Astfel, primul tip nominalizat include factorii bine demonstrați care au fost descriși printre primii: sexul, ereditatea, vârsta, fumatul, consumul excesiv de alcool, HTA, obezitatea și sindromul metabolic, diabetul zaharat, sedentarismul, dislipidemia etc., majoritatea dintre care pot fi controlați fie prin modificarea stilului de viață [341], fie prin medicație [66]. Factorii care nu pot fi modificați sunt sexul, înaintarea în vârstă și antecedentele familiale de boli cardiovasculare.

Ca factor de risc primordial pentru apariția BCV, hipercolesterolemia și mai ales trigliceridemia este caracteristică pentru persoanele tinere, comparativ cu cele de vârstă înaintată. Evenimentele cardiovasculare la vârsta medie afectează predominant bărbații. Conform unor cercetări, la bărbații în pubertate androgenii scad nivelul trigliceridelor (TG) și al lipoproteinelor cu densitate înaltă (HDL) și cresc nivelul celor cu densitate joasă (LDL), confirmând, în mare parte, morbiditatea și mortalitatea cardiovasculară a bărbaților tineri [144, 321]. Secreția de estrogeni se pare că protejează femeile până la menopauză, după care riscul devine aproximativ egal pentru ambele sexe [100, 132, 307]. S-a constatat că creșterea riscului de deces prematur și dezvoltare a BCV este asociat cu modul sedentar de viață [396]. Activitatea fizică reduce cu 20-25% mortalitatea totală prin BCV [151].

Studiile în domeniu au demonstrat că fumatul pasiv crește riscul de BCV și de apariție a altor boli [200]. Efectele fumatului se amplifică în prezența altor factori de risc precum vârsta, sexul, hipertensiunea arterială și diabetul zaharat [274]. Beneficiile renunțării la fumat au fost raportate de o serie de studii și ghiduri de management a BCV [25, 298, 300, 361], fiind recomandată ca măsură eficientă de prevenire după un infarct miocardic [361].

La ora actuală există un interes sporit față de identificarea biomarkerilor cu valori de referință acceptate la nivel internațional în vederea stabilirii unor strategii complexe de diagnostic și/sau prognostic în patologia cardiovasculară. Biomarkerii sunt indicatori ai proceselor biologice normale sau patologice ce includ proteine, peptide și micro ARN-uri care pot fi măsurate în plasmă și pot reflecta modificările structurale sau funcționale ce stau la baza proceselor fiziopatologice a bolilor cardiovasculare. Astfel, au fost identificați factori noi de risc cardiovascular, denumiți neconvenționali [114, 214, 326, 384]: proteina C reactivă, homocisteina, lipoproteina (a), fibrinogenul etc., a căror utilitate clinică în stratificarea pacienților este neclarificată sau parțial confirmată (Tabelul 1.1).

Tabelul 1.1.  
Factori de risc cardiovascular [150, 158, 291, 341, 379]

FACTORI DE RISC CARDIOVASCULAR			
CONVENȚIONALI			
Predispozanți	Igieno-dietetici	Metabolici	Psihosociali
Vârsta	Fumatul	Dislipidemia	
Sexul	Dieta	Hipertensiunea arterială	
Antecedente familiale de boli CV	Sedentarismul	Diabetul zaharat	
		Obezitatea	
		Sindromul metabolic	
NECONVENȚIONALI			
<b>Citokine și factori de creștere</b>		<b>Markeri ai funcției vasculare și activității neurohormonale</b>	
CT-1	cardiotropina 1	Microalbuminuria	
OPG	osteoprotegerina	Copeptina	
OPN	osteopontina	BNP	peptidul natriuretic de tip B
NPT	neopterina	NT-proBNP	N-terminal pro-BNP
APN	adiponectina	MR-proADM	proadrenomedulina mediu-regional
GDF-15	factorul 15 de diferențiere a creșterii	MR-proANP	peptidul natriuretic pro-atrial mediu regional
Gp130	glicoproteina 130		
<b>Factori de risc inflamatorii</b>		<b>Lipide, apolipoproteine, fosfolipide</b>	
TGF-β	factorul de transformare beta	APO A1	apolipoproteina A1
CRP	proteina C reactivă	APO B100	apolipoproteina B100
Il6	interleukina 6	LpPLA2	fosfolipaza A2 asociată lipoproteinelor
MPO	mieloperoxidaza	Lp (a)	lipoproteina (a)
ST-2	membr. al familiei de receptori Il-1	sPLA2	fosfolipaza A2 secretată
TNF-α	factorul de necroză tumorală alfa	<b>Markeri ai funcției endoteliale</b>	
β2-M	beta 2 microglobulină	sCD40L	ligandul CD40 solubil
MMP	metaloproteinaze	CD62P	P-selectina
Gal-3	galectina-3	VCAM-1	molecula-1 de adeziune celulară vasculară
MCP-1	proteina chemoattractantă a monocitelor	ICAM-1	molecula-1 de adeziune intercelulară
<b>Factori de risc trombotici</b>		<b>Markeri ai funcției renale</b>	
Fibrinogen		Cistatina C	
Homocisteina		Creatinina	
tPA-antigen	activator tisular al plasminogenului	eGFR	rata de filtrare glomerulară estimată
PAI-1	inhibitor al activatorului plasminogenului	<b>Modulatori ai angiogenezei</b>	
DD	D-dimer	Angiopoetina-2	
vWF	factorul von Willebrand FvW	TIE-2	receptor endotelial al tirozinkinazei
<b>Markeri de necroză și ischemie</b>		VEGF-A	factorul A de creștere al endoteliului vascular
FFAu	acizi grași liberi	<b>Alți biomarkeri</b>	
IMA	albumina modificată de ischemie	Leptina	
TnT și TnI	troponinele cardiace I și T	ADMA	dimetil arginina asimetrică
<b>Genetici</b>		HO-1	heme oxigenaza 1
SNPs	polimorfism uninucleotidic	SAA	amiloidul seric A
microARNs	miR-133, miR-208, miR-223, miR-126, miR-143/145,	HbA1c	hemoglobina glicozilată
<b>Markeri ai aterosclerozei</b>		RDW	lărgimea distribuției eritrocitare
<b>Structurali și Funcționali</b>		8-iso PGF2α	8-iso-prostaglandina F2α
		GPX1	glutation-peroxidaza 1

ICAM-1 [244, 336], VCAM-1 [244, 336], CD62P [398], sCD40L [331], GDF-15 [31, 407], OPG [95], OPN [283], NPT [77, 284], APN [101, 201], CT-1 [49, 161], Gp130 [121], TGF-β [302], CRP [33, 312], Il6 [61, 312], MPO [123], ST-2 [329], TNF-α [76], MCP-1 [310], MMP [175], Gal-3 [141, 329], β2-M [182], Microalbuminuria [369], Copeptina [273, 373], BNP [115, 213], NT-proBNP [310, 320], MR-proADM [131, 267], MR-proANP [131], Markerii ai aterosclerozei [118], SNPs [105, 247], MicroARNs [181, 264, 266, 279, 348], LpPLA2 [126], Lp (a) [293], Troponinele cardiace [213, 308], Homocisteina [223], vWF [138], DD [248, 346], Fibrinogen [402], PAI-1 [380, 424], VEGF-A [46], Leptina [201, 420], HO-1 [349], 8-iso PGF2α [86, 370], Cistatina C [182, 344], Creatinina [182], eGFR [157].

Unii dintre acești biomarkeri pot avea semnificații multiple. Spre exemplu, creșterea troponinei la bolnavii cu infarct miocardic fără supradenivelare de segment ST (stadiul

depolarizat ventricular) poate fi marker nu doar al necrozei, ci și al formării trombusului coronarian și al embolizării distale prin microagregate plachetare, iar eliberarea de troponină în sindroamele coronariene acute poate fi considerată un indicator al probabilității crescute de răspuns la tratamentul antiplachetar și antitrombotic.

În prezent, cu toate că numărul biomarkerilor potențiali este în creștere, relativ puțini sunt aplicați în practica clinică, unii având doar valoare în cercetare. Dintre biomarkerii disponibili pentru utilizarea clinică de rutină, peptidele natriuretice sunt cele mai intens studiate și au devenit componente importante nu doar în susținerea diagnosticului, ci și în stratificarea riscului, fiind propuse de către ghidurile practice pentru terapia insuficienței cardiace [250].

Rolul unor markeri de risc în apariția BCV a fost dovedit de numeroase studii de anvergură [39, 85, 89, 148, 252, 306, 345, 351, 362]. Markerii funcției renale, inclusiv cistatina C, proteinele urinare și estimarea ratei de filtrare glomerulară furnizează informații elementare cu privire la risc și pot identifica o contribuție a bolii renale la progresia BCV. Markerii fibrozei, inflamației, ischemiei, funcției renale și necrozei pot oferi informații elementare despre factorii fiziopatologici specifici care contribuie la progresia bolii.

Folosirea concomitentă a mai multor indicatori prognostici (ca nivelul troponinelor și al peptidului natriuretic B) permite o mai bună stratificare a riscului. În practică s-a încercat definirea biomarkerilor care caracterizează pacientul cu risc cardiovascular, respectiv pacientul „vulnerabil”, caracterizat prin triada: placa de aterom, sânge și miocard vulnerabil. Pentru evaluarea prin biomarkeri, două din aceste trei componente (placa și miocardul vulnerabil) sunt mai greu accesibile comparativ ce cea de-a treia (sângele vulnerabil). Opinia actuală cu privire la rolul biomarkerilor este că modificările acestora trebuie interpretate în contextul clinic, stadiului evolutiv al afecțiunii și în relație cu rolul acestuia în fiziopatologia bolii.

Recent, pe lângă implicarea biomarkerilor proteici și peptidici în BCV este cercetată eficacitatea micro-ARN-urilor, care reprezintă molecule mici de ARN, cu rol în reglarea expresiei genelor [421]. Cercetările actuale investighează utilitatea prognostică și diagnostică a microARN-urilor pentru disfuncția ventriculului stâng, infarctul miocardic, insuficiența cardiacă, ateroscleroză, fiind deja demonstrată asocierea lor cu inhibarea fibrozei miocardice [372], leziunea mușchiului cardiac [421] etc. Moleculele de reglare microARN, transportate de către plachetele implicate în răspunsul inflamator, pot reflecta procesele fiziopatologice de bază în activarea plachetară, formarea și progresia plăcii de aterom, fiind considerate elementul crucial în inițierea aterosclerozei [35].

Întrucât combinarea a doi sau mai mulți factori de risc sporește probabilitatea apariției BCV, o atenție deosebită s-a acordat studierii interacțiunilor dintre factorii de mediu și genetici.

Studiile GWAS au permis investigarea locilor asociați cu factorii de risc modificabili: HTA [377], LDL-colesterol, HDL-colesterol și nivelul total de trigliceride [376], numărul de țigări fumate [378], diabetul zaharat de tip II (cu utilizarea caracteristicilor cantitative ale glicemiei și nivelul hemoglobinei glicozilate [390], obezitatea (cu utilizarea indicelui de masă corporală și trăsăturile legate de adipozitate) [357].

Totodată, au fost identificați loci asociați cu factorii de risc recent identificați: fibrinogenul [397], proteina C-reactivă [108], molecule de adeziune intercelulară-1 [40], nivelul homocisteinei plasmatică [236], grosimea medie a arterei carotide [50] etc.

Interacțiunea dintre diferiți factori de mediu și factori genetici asociați acestor boli este foarte complexă, ceea ce face dificil de evaluat contribuția fiecăruia dintre ei. Cuantificarea factorilor de risc neconvenționali într-un trial similar studiului INTERHEART [418], ar contribui la materializarea cunoștințelor în strategii eficiente de prevenire și control a persoanelor cu risc de a dezvolta BCV.

În Europa, cele mai importante proiecte epidemiologice în domeniul prevenției cardiovasculare sunt studiile EuroAspire I, II, III [111, 194, 408] care au demonstrat existența unui control insuficient a trei factori de risc major pentru BCV – fumatul, dislipidemia și HTA.

Aceste rezultate au fost confirmate și în cadrul studiului național *STEPS* din Republica Moldova [15], care a precizat că 56% din populația țării este supraponderală, o pătrime din populația adultă fumează, trei din zece persoane au colesterolul total mărit în sânge și doar unul din patru cetățeni cu hipertensiune arterială se află sub medicație.

De asemenea, s-a demonstrat că supraponderalitatea/obezitatea sunt fenomene frecvent întâlnite în rândul tinerilor din Republica Moldova [10]. Reducerea incidenței celor trei factori de risc major pentru BCV (fumatul, dislipidemia și HTA) ar determina scăderea mortalității CV cu peste 50%.

Cercetările care au permis identificarea markerilor de risc cardiovascular au contribuit la îmbunătățirea cunoștințelor privind mecanismele fiziopatologice implicate în BCV și la acumularea datelor care sprijină rolul biomarkerilor selectați pentru predicția riscului.

Rămâne de a stabili dacă factorii de risc neconvenționali individuali sau în asocieră cu markeri recunoscuți, cum ar fi peptidele natriuretice arată un beneficiu cost-eficient sau oferă o îmbunătățire a tratamentelor specifice pentru afecțiunile cardiovasculare.

Studii suplimentare de cuantificare a acestora și a altor biomarkeri noi sunt binevenite în speranța îmbunătățirii diagnosticului clinic, stratificarea riscului și individualizarea terapiei la pacienții cu afecțiuni cardiovasculare.

## 1.2. Aspecte genetice ale bolilor cardiovasculare

Descoperirile ultimelor decade în domeniul biologiei moleculare și geneticii își găsesc treptat locul în practica clinică, iar domeniul medicinei cardiovasculare nu constituie o excepție. Informațiile genetice sunt utile în înțelegerea patofiziologiei și diagnosticul precoce al diferitelor afecțiuni, existând premisele unei posibile individualizări în viitor a stratificării riscului și terapiei [8]. Dogma centrală a biologiei moleculare presupune un flux unidirecțional de informație pornind de la ADN spre ARN și sinteză proteică, fiind un principiu util pentru înțelegerea efectelor determinate de afectarea secvenței normale de ADN care poate antrena modificarea structurii și funcției proteinei codificate, precum și cantitatea produsă. Astfel, variabilitatea secvenței ADN este elementul-cheie al diferenței dintre indivizi, dintre normal și patologic [24].

Genele/proteinele implicate în bolile cardiace cu determinism genetic pot fi împărțite în trei clase funcționale mari: de reglare, structurale și de semnalizare electrică [303]. Mutațiile proteinelor structurale sunt asociate cu cardiomiopatii structurale – varianta hipertrofică, dilatativă și aritmogenă a ventriculului drept.

Afectarea proteinelor implicate în excitabilitate determină apariția bolilor aritmogene cu substrat genetic, precum sindromul QT lung, sindromul Brugada, în timp ce afectarea proteinelor cu rol reglator poate fi asociată atât cu afectarea structurală, cât și cu aritmii [75, 303].

După modul de transmitere și genele afectate, patologiile genetice pot fi împărțite în afecțiuni monogenice (cardiomiopatie hipertrofică, sindrom Marfan, hipercolesterolemie familială), cu transmitere mendeliană și afecțiuni poligenice „complexe” (HTA, boala coronariană ischemică, fibrilație atrială).

Bolile monogenice sunt relativ rare comparativ cu majoritatea afecțiunilor, care au o bază genetică determinată de interacțiunea complexă a mai multor gene cu factorii de mediu. Prezența unui defect genetic cu transmitere clasică mendeliană nu este însă obligatoriu urmată de apariția aceluiași fenotip clinic. De altfel, aproape toate bolile monogenice cardiace sunt caracterizate de eterogenitate genetică, un fenotip clinic poate fi determinat de mai multe gene, iar o genă (sau chiar o mutație) poate determina mai multe fenotipuri [8, 303]. De exemplu, există mai multe gene implicate în apariția cardiomiopatiei hipertrofice. În același timp, mutații ale aceleiași gene se pot exprima fenotipic diferit la mai mulți membri ai unei familii - cardiomiopatie hipertrofică la unii sau dilatativă la alții [9].

Mai mult, chiar în prezența aceluiași defect genetic, manifestările bolii pot fi diferite între purtători datorită [8]:

– expresivității variabile - gradul de manifestare a bolii la un individ, fiind demonstrată prin variabilitatea gradului de afectare între indivizii cu aceeași mutație;

– penetranței incomplete - raportul subunitar între numărul de indivizi afectați clinic și numărul de purtători ai unei mutații. Penetranța unei boli este influențată și de timp, expresia fenotipică devenind progresiv mai importantă odată cu înaintarea în vârstă.

Alelele mutante au de multe ori efect asupra mai multor organe/ sisteme, ceea ce explică afectarea pluriorganică din unele boli cu transmitere mendeliană (sindrom Marfan, sindrom Holt-Oram etc.).

Unele mutații sunt moștenite, iar altele pot fi sporadice, atunci când apar pentru prima dată într-o familie (sau la nivel germinal la un părinte). Ele sunt importante datorită riscului transiterii către urmași.

Majoritatea patologiilor cardiovasculare se încadrează în categoria „bolilor complexe” – cu componentă atât genetică, cât și de mediu. În aceste situații există o predispoziție genetică, de multe ori determinată de mai multe gene, care se asociază în timp cu expunerea la diferiți factori de mediu și determină în final apariția bolii [12]. Exemple tipice sunt reprezentate de boala coronariană ischemică, hipertensiunea arterială, majoritatea dislipidemiilor. Bolile complexe sunt mult mai frecvente decât cele cu transmitere mendeliană, iar relația între prezența unui defect genetic și apariția bolii este probabilistică. Mai mult, în timp ce studiul bolilor monogenice aduce informații importante privind mecanismele unor boli și face posibilă, în unele situații, testarea genetică și modificarea strategiei terapeutice, definirea tuturor variantelor genice asociate cu creșterea sau scăderea riscului apariției bolilor complexe este un proces mult mai dificil.

### **Stenoza aortică (SAo)**

SAo prezintă un obstacol în calea ejecției sângelui din ventriculul stâng (VS) în aortă și grupează obstrucțiile tractului de ejecție al VS (TEVS) localizate anatomic în vecinătatea valvei aortice la diverse niveluri, care pot surveni atât izolat, cât și asociate între ele sau cu alte anomalii conotruncale sau defecte septale.

Această patologie este cea mai frecventă valvulopatie a adultului și a treia boală cardiovasculară ca frecvență în Europa și America de Nord, după hipertensiunea arterială și boala cardiacă ischemică [212].

Nivelurile la care apar obstrucțiile TEVS sunt:

– *valvular* – stenoza aortică valvulară, produsă prin afectarea cuspelor aortice cu limitarea deschiderii lor în sistolă, fiind considerată o boală cardiacă congenitală (BCC) simplă;

– *subvalvular* – stenoza subaortică, considerată BCC de complexitate medie;



– *supravalvular*, la nivelul aortei ascendente – stenoza aortică supravalvulară, considerată BCC de complexitate medie.

Cea mai frecventă formă de obstrucție la golirea ventriculului stâng este stenoza aortică valvulară care poate fi congenitală (cu valve malformate de la naștere) [16] sau dobândită (cel mai frecvent degenerativă și reumatismală) [212].

Printre cauzele SAo valvulară dobândită se enumeră hiperlipoproteinemia de tip II, forma homozigotă, care produce o ateroscleroză precoce extensivă a rădăcinii aortei și a valvei aortice la tineri, precum și afectarea valvulară aortică în poliartrita reumatoidă, lupusul eritematos sistemic și boala Paget a osului [233].

Stenoza aortică valvulară congenitală este una dintre cele mai întâlnite malformații, reprezentând 5% din anomaliile congenitale de cord, frecvența căreia variază în funcție de vârstă și sex, fiind mai mare la sexul masculin pentru toate grupele de vârstă [229]. Malformația principală constă în îngroșarea foițelor valvulare aortice, ce afectează numărul, forma și dimensiunea acestora. În funcție de gradul de fuzionare și numărul de cuspe valvulare, valva aortică în SA congenitală poate fi unicuspidă, bicuspidă, tricupidă și mai rar cvadricupidă.

Într-un studiu în care a fost analizată anatomia a 932 de valve aortice excizate de la pacienții cu SA izolată și vârsta de peste 20 de ani, în vederea înlocuirii valvulare [317], s-a arătat că la 54% dintre aceștia, SAo survine pe valve aortice bicuspidă și unicuspidă.

Valva aortică unicuspidă apare secundar fuziunii celor trei foițe aortice și este întotdeauna stenotică. La sugari unicuspidia valvulară produce obstrucție severă, fiind cea mai frecventă malformație a valvei aortice răspunzătoare de SAo valvulară fatală la copiii sub 1 an [281]. La adulți această patologie este rară, fiind prezentă la aproximativ 5% dintre pacienții care necesită înlocuire valvulară aortică pentru SAo fără valvulopatie mitrală asociată [281].

*Bicuspidia aortică* reprezintă 95% din stenozele aortice valvulare congenitale. În populația generală se întâlnește cu o frecvență de 1 – 2 %, fiind cea mai frecventă anomalie congenitală a adultului, cu predominanță netă la sexul masculin [58]. Bicuspidia aortică este o afecțiune lent progresivă, însoțită de apariția și progresia stenozei aortice, alături de anevrismele de aortă ascendentă și riscul de disecție de aortă [395].

La pacienții cu bicuspidie aortică, valva are o singură comisură fuzionată și un orificiu orientat excentric. Deși valva deformată nu este stenotică la naștere, pe parcursul vieții este supusă unui stres hemodinamic anormal, care poate duce la îngroșarea și calcificarea foițelor valvulare, rezultând imobilitatea lor. Astfel, în jurul vârstei de 40-50 de ani, bicuspidia aortică devine o cauză frecventă de SAo în aproximativ 30% dintre cazuri, fiind inevitabilă intervenția chirurgicală valvulară [203].

Un posibil mecanism comun în dezvoltarea calcificărilor valvulare în bicuspidie și stenoza aortică calcificată este sugerat de implicarea genei *NOTCH1* de pe cromozomul 9 în ambele situații. Mutații ale acestei gene au fost identificate atât în familiile cu bicuspidie [55], cât și cu tricuspidae aortică [99]. *NOTCH1* este un represor al factorului de transcripție Runx2, implicat în formarea osteoblastelor. Unele studii sugerează că această genă este implicată în inhibarea calcificării în culturile de celule valvulare aortice și în formarea valvelor cardiace [270].

Bicuspidia aortică a fost mult timp considerată o afecțiune sporadică. Identificarea unei agregări familiale semnificative a stat la baza conceptului conform căruia bicuspidia aortică are de fapt o componentă genetică importantă [117]. Un studiu de înlănțuire genică a evidențiat trei regiuni cu posibile gene implicate în bicuspidie la nivelul cromozomilor 18q, 5q și 13q [285]. Deși modul de transmitere nu este clar, fiind posibilă interacțiunea mai multor gene, unii autori sugerează prezența unei transmiteri autozomal dominante cu penetranță incompletă [55].

*Valvele tricuspide stenotice* congenitale au trei foițe valvulare, dar acestea sunt îngroșate, inegale, cu calcificări și fuziune comisurală. Cea mai rară formă este *valva aortică cvadricuspidă*, rareori stenotică, formată din 4 foițe valvulare, dintre care trei cuspe normale și a patra foarte mică ca dimensiune. În majoritatea cazurilor, o valvă cvadricuspidă funcționează normal, dar de multe ori există regurgitare aortică.

Frecvent, stenoza aortică congenitală se asociază cu alte leziuni cardiace: sindrom Turner, persistență de canal arterial, transpoziția de vase mari, stenoza pulmonară supravalvulară și hipoplazia ventriculului stâng [193]. Impactul BCC asupra sănătății publice este substanțial, mulți dintre pacienți necesită un tratament complex medico-chirurgical [4], iar alții rămân cu handicapuri majore, fiind necesare cheltuieli importante pentru întreținerea lor.

### **Fibrilația atrială (FiA)**

FiA prezintă o dereglare de ritm, în care excitarea și contracția atriilor ca un tot întreg este înlocuită cu contracții frecvente neregulate și necoordonate ale diferitelor fascicule musculare ale atriilor sub influența impulsurilor ectopice (*pacemaker* localizat în afara nodului sinusal) cu frecvența de 400-700/min [176].

Într-o unitate de timp, spre nodulul atrioventricular, sosește un număr diferit de impulsuri din atri, unele fiind foarte slabe, nu ajung până la joncțiunea atrioventriculară și ventricule, iar altele ajung la nodulul atrioventricular în faza refractară. Din această cauză numai o parte din impulsuri este transmisă la ventricule, provocând excitația și contracția haotică a lor.

În majoritatea cazurilor fibrilația atrială este asociată cu patologii cardiovasculare precum valvulopatii, boala coronariană ischemică, HTA, cardiomiopatii, dar poate apărea și pe cord

aparent normal [164]. În această ultimă situație se ia în considerare prezența factorilor genetici [228, 242].

Studiile de asociere genomică au identificat două polimorfisme nucleotidice localizate la nivelul cromozomului 4q25 [22]. 35% din populația de origine europeană prezintă cel puțin una dintre cele două variante, asociate cu o creștere de 1,7, respectiv 1,3 ori a riscului de fibrilație atrială [142]. Mecanismul nu este clar în acest moment, cele 2 SNP-uri fiind adiacente genei *PITX2*, cu rol important în dezvoltarea cordului [22].

De asemenea, există și forme rare familiale de fibrilație atrială, cu transmitere autozomal dominantă sau recesivă [315]. Au fost identificate mai multe gene implicate în aceste forme, precum *KCNQ1*, *SCN5A*, *KCNJ2*, *KCNE2*, *NPPA* etc. [75]. Aceste gene codifică diferite subunități ale canalelor de potasiu sau sodiu, peptidul natriuretic atrial sau conexina 40. Astfel, gena *KCNQ1*, ce codifică subunitatea  $\alpha$  a canalului de potasiu Kv7.1, are rol în aritmogeneză, ea fiind implicată și în tipul 1 de sindrom QT lung congenital. Mutația genei *KCNQ1* responsabilă de apariția fibrilației atriale determină o intensificare a funcției proteinei pe care o codifică, în timp ce în sindromul QT lung congenital (LQT1), cauzează pierderea funcției ei [231].

### **Cardiopia ischemică (CPI)**

Boala coronariană sau cardiopia ischemică reprezintă o maladie inflamatorie cronică cauzată de ateroscleroza coronariană care determină leziuni vasculare progressive, responsabile de ischemie acută sau cronică prin îngustarea lumenului arterelor coronare și dezechilibrul dintre oferta și necesarul de oxigen la nivel miocardic.

Antecedentele heredocolaterale de cardiopatie ischemică la vârste tinere sunt un factor de risc recunoscut. În unele situații agregarea familială este determinată de prezența unor factori de risc cu transmitere genetică mendeliană (autozomal dominantă sau X-linkată) [314], însă cel mai frecvent CPI are la bază o etiologie multifactorială, complicată și insuficient înțeleasă [74, 316].

Procesul complex al aterosclerozei implică multiple căi biochimice, precum metabolismul lipidic, mediatorii inflamației, factorii coagulării [342].

Variantele genetice ale oricărei din aceste căi metabolice pot afecta funcția unor proteine-cheie, cu alterarea consecutivă a homeostaziei și accelerarea procesului aterosclerotic. Susceptibilitatea genetică în aceste situații este influențată de factorii de mediu, dar și de alți factori de risc precum HTA, diabetul zaharat, dislipidemia, la rândul lor determinate poligenic [230].

Dislipidemia este un factor major de risc pentru ateroscleroză. Unele forme de hiperlipidemie familială cu transmitere mendeliană se caracterizează prin apariția precoce a

leziunilor aterosclerotice, în jurul vârstei de 20-30 de ani. Metabolismul lipidic este sever alterat în cazul mutațiilor cu transmitere autozomal dominantă ale receptorului pentru LDL colesterol, în timp ce forma autozomal recesivă, determinată de mutațiile genei *LDLRAP1* (*LDL-R adaptor protein 1*) este asociată cu un fenotip susceptibil la tratament [112]. Deși severe și cu rol important la nivel individual, aceste forme sunt destul de rare la nivel populațional. Actualmente sunt cunoscute peste 1000 mutații ale receptorului pentru LDL, iar homo- și heterozigoții prezintă grade diferite de creștere a lipidelor plasmaticice [309]. O altă formă de hipercolesterolemie familială este asociată cu mutațiile apolipoproteinei B, principalul ligand al receptorului pentru LDL [26].

Alte mutații întâlnite în dislipidemia familială sunt localizate la nivelul genei *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type*), dar mecanismul lor de acțiune rămâne neclarificat [387]. Efectuarea secvențierii la o populație cu valori extreme de LDL colesterol a identificat diferite variante în gena *PCSK9*, cu o frecvență de apariție în populație de 3% [332]. Aceste variante sunt asociate nivelului scăzut de LDL colesterol și reducerea incidenței cardiopatiei ischemice [415].

Disfuncția endotelială determinată genetic de mutații ale genei *MEF2a*, factor de transcripție localizat la nivelul celulelor endoteliale din arterele coronare, predispune la ateroscleroză și aterotromboză [119]. Mai multe mutații ale genei *MEF2a* au fost identificate în familii cu aterotromboză coronariană cu transmitere autozomal dominantă [392].

În diferite populații au fost identificate variante alelice ale genei *ALOX5AP*, ce codifică proteina activatoare a 5-lipooxigenazei – FLAP și conferă un risc ușor crescut de infarct miocardic și accident vascular cerebral [422]. Proteina FLAP este implicată în calea leucotrienelor, iar purtătorii unor mutații ale genei *ALOX5AP* prezintă nivele crescute de leucotrienă B4. Tratamentul cu inhibitor de FLAP la purtători induce o reducere semnificativă a markerilor de inflamație, subliniind rolul potențial al acestor agenți terapeutici în prevenția infarctului de miocard [37].

Într-o meta-analiză a peste 66 mii de cazuri, s-a constatat că predispoziția genetică pentru hipercoagulabilitate, indusă de variantele genei factorului V (1691A) și ale genei protrombinei (20210A), ambele crescând nivelul trombinei circulante, conferă un risc moderat de cardiopatie ischemică [417].

Studiile de asociere genomică au identificat 11 regiuni cromozomiale asociate cu riscul crescut de cardiopatie ischemică și infarct miocardic. Cea mai importantă regiune este localizată la nivelul cromozomului 9p21 [67, 79]. Mecanismul prin care această zonă este asociată cu riscul crescut de infarct miocardic și boală coronariană ischemică este deocamdată necunoscut, mai cu

seamă că această regiune nu are un rol stabilit în codificarea proteinelor, fiind însă în apropierea a două gene (*CDKN2A* și *CDKN2B*) implicate în reglarea proliferării celulare și a apoptozei.

Dintre regiunile cromozomiale asociate cu un risc crescut de CPI, doar două afectează și factorii clasici de risc coronarian, respectiv 1p13.3 (LDL-colesterol) și 6q26-27 (lipoproteina (a)). În acest caz, de asemenea, mecanismul prin care prezența unor alele conferă risc cardiovascular crescut este în mare măsură necunoscut [328].

De-a lungul ultimilor ani au fost identificate și studiate variante ale genelor pentru apolipoproteina E [3], metaloproteinazele 3 și 9, enzima de conversie a angiotensinei [11], gena *VAMP8* (degranularea plachetară), *stromelizina-1* (metaloproteinaze matriceale), conexina 37 (integritate endotelială) asociate cu creșterea riscului de CPI [56]. Cu toate că unele dintre aceste variante genetice sunt întâlnite frecvent în populație, riscul atribuit fiecăreia dintre ele este în general redus, însă acțiunea lor sinergică, la unul și același individ, poate spori riscul de dezvoltare a CPI [98]. Deși fără rol clinic proeminent la momentul actual, identificarea tuturor variantelor genetice asociate cu creșterea susceptibilității pentru CPI va putea permite în viitor o abordare individualizată a stratificării riscului și, posibil, a terapiei.

Studiile de înlănțuire a genelor candidat au identificat variante genetice asociate cu nivelul de LDL și HDL ce duc la efecte fenotipice variate. Dintre genele candidat ce influențează riscul de CPI, *APOE* este cel mai intens studiată. Variațiile genei *APOE* (*E2*, *E3* și *E4*) au o influență puternică și coerentă asupra nivelului lipidelor plasmatic și CPI [412]. Purtătorii genei *APOE2*, care reprezintă aproximativ 12% din populație, au niveluri plasmatic de colesterol cu aproximativ 10% mai mici decât homozigoții pentru *APOE3*, în timp ce purtătorii genei *APOE4*, care reprezintă aproximativ 25% din populație, au nivelul de colesterol cu aproximativ 5% mai mare decât homozigoții pentru gena *APOE3* [168]. Comparativ cu bărbații homozigoți pentru alela *E3*, persoanele purtătoare ale alelei *E2* arată protecție față de bolile coronariene, carotidiene și accident vascular cerebral [185], în timp ce cei cu alela *E4* prezintă un risc mai mare [359].

### **Cardiomiopatiile (CMP)**

Cardiomiopatiile reprezintă afecțiuni primare și heterogene ale miocardului, caracterizate prin anomalii structurale și funcționale ale mușchiului cardiac. De-a lungul timpului, acest grup de afecțiuni a fost subdivizat în primare, în care cordul era singurul organ afectat, și secundare, în care cardiomiopia era manifestarea unei afecțiuni sistemice, cauzată de factori extrinseci: ischemie, hipertensiune arterială, boli metabolice, valvulopatii și boli cardiace congenitale etc. [107, 147, 239].

Etiologia bolii rămâne necunoscută, dar prezența unor antecedente familiale sugerează rolul factorilor genetici în producerea bolii, fiind identificate gene asociate diferitor tipuri de cardiomiopatii cu transmitere ereditară (Tabelul 1.2), din care face parte cardiomiopia hipertrofică, dilatativă [90], aritmogenă de ventricul drept, non-compactarea de ventricul stâng și restrictivă [375].

Clinic, se disting două tipuri majore ale cardiomiopatiei primare [23, 239]: hipertrofică (CMH) și dilatativă (CMD).

CMD este caracterizată prin dilatarea cavității ventriculare cu disfuncție sistolică, în timp ce CMH se caracterizează prin hipertrofia ventriculară stângă [189, 375], des asimetrică, acompaniată de dezorganizarea miofibrilară și disfuncția diastolică a ventriculelor cardiace, de obicei cu prinderea septului interventricular [358].

Atât CMD, cât și CMH sunt cauza majoră de insuficiență cardiacă frecvent asociată cu moartea subită cardiacă la tineri în timpul efortului și la sportivii de performanță [238].

**Cardiomiopia hipertrofică (CMH)** este cea mai frecventă afecțiune cardiovasculară cu transmitere ereditară, având o incidență de 0,2% (1:500) în populația generală [375], iar rata mortalității anuale se consideră a fi în jur de 1,2%, din care aproximativ jumătate reprezintă morți subite.

În registrele pediatrice, prevalența CMH în rândul copiilor este necunoscută, dar studiile populaționale raportează o incidență de 0,3-0,5/100.000 de locuitori [271].

Aproximativ 50% din formele de CMH au substrat genetic, modalitatea de transmitere fiind frecvent autozomal dominantă cu penetranță incompletă [27], influențată de sex și vârstă [311].

Descrierea originală a cardiomiopatiei hipertrofice a pornit de la identificarea de către Teare în 1958, a 8 tineri adulți cu CMH, din care 7 au murit subit [374].

Descoperirea unei mutații în lanțul greu de  $\beta$ -miozină (*MyHC*) la o familie cu CMH [128] a dus la elucidarea bazei genético-moleculare a CMH și identificarea ulterioară a peste 400 de mutații în cel puțin 21 de gene responsabile de codificarea proteinelor sarcomerice, mitochondriale sau implicate în transportul calciului [338]. În majoritatea cazurilor proteinele afectate sunt proteine sarcomerice, datorită cărui fapt, CMH este considerată o boală idiopatică a sarcomerului [311]. În acest caz hipertrofia miocardică este singurul fenotip clinic.

În cazul afectării genelor ce codifică proteine nonsarcomerice, sunt asociate frecvent și alte fenotipuri cardiace și extracardiace precum căi accesorii de conducere, surditate senzorieală, atrofie musculară etc. [303].

Tabelul 1.2.

Genele implicate în diferite tipuri de cardiomiopatii genetice [188]

GENA	PROTEINA	TIPUL DE TRANSMITERE EREDITARĂ	FENOTIPUL CLINIC				
			CMH	CMD	RCM	LVNC	ARVC
<i>MYH7</i>	Lanțul greu 7 al $\beta$ -miozinei	AD	+	+	+	+	-
<i>TNNT2</i>	Troponina cardiacă T2	AD	+	+	+	+	-
<i>TNNI3</i>	Troponina cardiacă I2	AD	+	+	+	-	-
<i>ACTC</i>	$\alpha$ -actina cardiacă	AD	+	+	-	+	-
<i>PLB</i>	Fosfolamban	AD	+	+	-	-	-
<i>MYBPC3</i>	Proteina C de legare a miozinei	AD	+	+	-	-	-
<i>VCL</i>	Metavinculina	AD	+	+	-	-	-
<i>TPM1</i>	$\alpha$ -tropomiozina	AD	+	+	-	-	-
<i>TTN</i>	Titina	AD	+	+	-	-	-
<i>TNNC1</i>	Troponina cardiacă C1	AD	+	+	-	-	-
<i>ANKRD1</i>	CARP	AD	+	+	-	-	-
<i>TCAP</i>	Teletonina	AD	+	+	-	-	-
<i>CSRP3</i>	Proteina LIM musculară	AD	+	+	-	-	-
<i>CRYAB</i>	Proteina $\alpha\beta$ cristalină	AD	+	+	-	-	-
<i>MYL3</i>	Lanțul ușor esențial al miozinei	AD	+	-	-	-	-
<i>MYL2</i>	Lanțul ușor regrator al miozinei	AD	+	-	-	-	-
<i>MYH6</i>	Lanțul greu al $\alpha$ -miozinei	AD	+	-	-	-	-
<i>CAV3</i>	Caveolina 3	AD	+	-	-	-	-
<i>JPH-2</i>	Junctofilina 2	AD	+	-	-	-	-
<i>OBSCN</i>	Obscurina	AD	+	-	-	-	-
<i>MYOZ2</i>	Miozenina 2	AD	+	-	-	-	-
<i>FKTN</i>	Fucutina	XR	-	+	-	-	-
<i>SCN5A</i>	Canalul de sodiu	AD	-	+	-	-	-
<i>SAGD</i>	$\delta$ -sarcoglican	AD	-	+	-	-	-
<i>ACTN2</i>	$\alpha$ -actinina-2	AD	-	+	-	-	-
<i>ABCC9</i>	Canalul KATP	AD	-	+	-	-	-
<i>PSEN1</i>	Presenilina 1	AD	-	+	-	-	-
<i>PSEN2</i>	Presenilina 2	AD	-	+	-	-	-
<i>FHL2</i>	Four and half LIM protein-2	AD	-	+	-	-	-
<i>LMNA4</i>	Laminina $\alpha$ 4	AD	-	+	-	-	-
<i>ILK</i>	Kinaza asociată integrinei	AD	-	+	-	-	-
<i>MYPN</i>	Miopalidina	AD	-	+	-	-	-
<i>CHRM2</i>	Receptorul 2 al acetilcolinei	AD	-	+	-	-	-
<i>DMD</i>	Distrofina	XR	-	+	-	-	-
<i>EMD</i>	Emerina	XR	-	+	-	-	-
<i>DES</i>	Desmina	AD	-	+	+	-	-
<i>TAZ</i>	Tafazina	XR	-	+	-	+	-
<i>LDB3</i>	Proteina Cypher/ZASP	AD	-	+	-	+	-
<i>LMNA</i>	Laminina A/C	AD	-	+	-	+	-
<i>DSP</i>	Desmoplachina	AR	-	+	-	-	+
<i>JUP</i>	Placoglobina	AR/AD	-	+	-	-	+
<i>PKP2</i>	Placofilina 2	AD	-	-	-	-	+
<i>TGFB3</i>	TGF $\beta$ 3	AD	-	-	-	-	+
<i>RYR2</i>	Receptorul 2 al rianodinei	AD	-	-	-	-	+
<i>DSG3</i>	Desmogleina 3	AD	-	-	-	-	+
<i>DTNA</i>	$\alpha$ -distrobrebina	AD	-	-	-	+	-

Notă: **AD** – transmitere autozomal dominantă; **XR** – transmitere recesivă X – linkată; **AR** – transmitere autozomal recesivă; **CMH** – cardiomiopatia hipertrofică; **CMD** – cardiomiopatia dilatativă; **RCM** – cardiomiopatia restrictivă; **LVNC** - cardiomiopatie prin non-compactarea de ventricul stâng; **ARVC** – cardiomiopatia aritmogenă de ventricul drept.

Datele din literatura de specialitate relevă că mutațiile la nivelul genelor ce codifică proteinele sarcomerului cardiac sunt identificate în peste 60% dintre pacienții cu istoric familial și în ~40% dintre pacienții cu forme sporadice de CMH [159].

Cele mai frecvente mutații apar la nivelul genelor ce codifică lanțul greu 7 al  $\beta$ -miozinei (*MYH7*) [276, 338] și proteina C de legare a miozinei cardiace (*MYBPC3*) [237]. Mai puțin întâlnite sunt mutațiile genelor troponinelor I și T (*TNNI3*, *TNNI2*), lanțului  $\alpha 1$  al tropomiozinei (*TPMI*) și lanțului ușor 3 al miozinei (*MYL3*) [206]. Restul genelor cunoscute precum: *TNNC1* (troponina C cardiacă), *ACTN2* ( $\alpha$ -actinina 2), *MYOZ2* (miozenina 2), *MYH6* ( $\alpha$ -miozina 6), *TTN* (titina), *CSRP3* (proteina musculară LIM), *TCAP* (teletonina), *VCL* (vinculina), *CASQ2* (calsechestrina), *JPH2* (junctofilina), *NEXN* (nelina), *CAV3* (caveolina) etc. sunt cauze mai puțin frecvente de CMH, fiecare fiind responsabilă de <1% dintre cazuri [237].

Din cele peste 400 de mutații cunoscute, mai mult de 150 implică gena *MYBPC3*, situată pe cromozomul 11 [9]. Aceste mutații pot fi de tip „*splice site*” care alterează, prin substituție, situsurile de decupare a intronilor – situsul donor (5'-GT) sau acceptor (AG-3'); deleții; inserții și mai rar de tip „*missense*” [237]. Deseori, ele determină o decalare a cadrului de citire (*frameshift*), cu producerea frecventă a unui codon stop în aval de locul deleției/inserției, rezultând o proteină „trunchiată”, de obicei instabilă și degradabilă [237]. Mutațiile genei *MYBPC3* produc 26% din cazurile de CMH și reprezintă 44% din totalul mutațiilor identificate în genele responsabile de codificarea proteinelor sarcomerului cardiac [9].

Până în prezent, cercetătorii au descoperit, peste 200 de mutații în gena *MYH7* de pe brațul lung al cromozomului 14, responsabile de CMH. Spre deosebire de mutațiile de pe gena *MYBPC3*, acestea sunt exclusiv de tip *missense* [400], deși au fost întâlnite și cazuri de deleții de codoni (del Lys847, del Glu883, del Glu927 și del Glu 930) [311]. Mutațiile acestei gene reprezintă 40% din totalul mutațiilor identificate la nivelul genelor ce codifică proteinele sarcomerului [188] și determină 25% din cazurile de CMH [9].

În general, pacienții cu o mutație a unei proteine sarcomerice au un debut al bolii mai precoce și înregistrează o prevalență familială mai ridicată, precum și un istoric de moarte subită cardiacă, decât cei fără mutații [224]. De asemenea, aceștia tind să aibă o hipertrofie mai severă, disfuncție endotelială și fibroză miocardică [277]. Câteva studii sugerează că unele mutații ale proteinelor sarcomerice sunt asociate cu un prognostic mai sever decât altele, dar aceste observații bazate pe un număr restrâns de indivizi afectați sunt limitate de raritatea mutațiilor individuale [109, 225]. Acest aspect ar trebui îmbunătățit, pe măsură ce toate dovezile sunt acumulate și depozitate în baze de date internaționale privind mutațiile individuale, așa cum este ClinVar [441].



Mutațiile genelor ce codifică proteinele reglatoare *TNNT2* și *MYL2* sunt localizate de-a lungul secvenței de codificare, în timp ce mutațiile de la nivelul genei *TNNI3*, cu excepția uneia, apar în exonii 7 și 8 [9]. Majoritatea mutațiilor care implică genele *TNNT2*, *TNNI3* [255], *TPM1*, *ACTC* [278] sunt de tip *missens*. Mutațiile genelor *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *ACTC*, *MYL2* și *MYL3* caracterizează 1-5% din pacienții cu CMH [419].

Au fost descrise mutații ce afectează o componentă a proteinkinazei AMP-activată (AMPK) [53], modulator al răspunsului celular la stresul metabolic, precum și mutații rare ce codifică proteine asociate ca vinculina și metavinculina [9, 389].

Datorită penetranței incomplete și dependenței apariției fenotipului de vârstă, identificarea precoce, înainte de apariția hipertrofiei, este dificilă în absența diagnosticului genetic. Astfel, acesta permite identificarea indivizilor cu risc ce necesită *screening* și monitorizare cardiovasculară periodică. Anumite mutații ale lanțului greu de  $\beta$ -miozină (*MYH7*) sunt asociate cu prognostic rezervat, hipertrofie importantă și risc crescut de moarte subită cardiacă, în timp ce alte mutații ale genei ce codifică troponina T (*TNNT 2*) determină doar hipertrofie ușoară-moderată, dar risc crescut de moarte subită [399]. Deși asocierile genotip-fenotip și gradul diferit de manifestare al unor mutații ar putea fi baza unei clasificări, în multe cazuri acestea sunt caracteristice unei singure familii, lipsind posibilitatea extrapolării datelor existente pentru grupe mici de pacienți [303]. În prezent există un test genetic disponibil pentru diagnosticul CMH [140], ce testează 8 dintre genele frecvent implicate în apariția CMH. Aproximativ 5% din pacienții cu CMH prezintă mai multe mutații, fie în cadrul aceleiași gene sau gene diferite, făcând necesară evaluarea genetică completă chiar și după identificarea primei mutații. Genele incluse în testul genetic disponibil comercial pentru cardiomiopatia hipertrofică familială sunt: *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *ACTC*, *MYL2*, *MYL3*. Recent, s-au introdus în același test și gene implicate în boli de depozitare care pot mima *pattern*-ul hipertrofiei (de exemplu, gena *GLA* de pe cromozomul Xp22 care codifică sinteza  $\alpha$ -galactozidazei).

Deoarece mutațiile genelor ce codifică proteinele elementelor contractile au fost identificate în <50% dintre pacienții cu CMH și doar în unele cazuri cu CMD, au fost efectuate studii în vederea identificării mutațiilor la nivelul altor gene expresate în mușchiul cardiac.

Identificarea la pacienții cu CMH a unor mutații în gena *TTN*, care codifică o proteină elastică, ce asigură legătura între filamentele groase și discurul Z, reprezintă un prim exemplu prin care a fost stabilită corelarea cu CMH a unor gene diferite de cele ce codifică proteinele elementelor contractile [333]. Alterarea funcției titinei datorată mutațiilor genei *TTN* crește legarea sa cu  $\alpha$ -actinina (Figura 1.4), proteină care asigură fixarea filamentelor subțiri la nivelul discurului Z [154, 333].

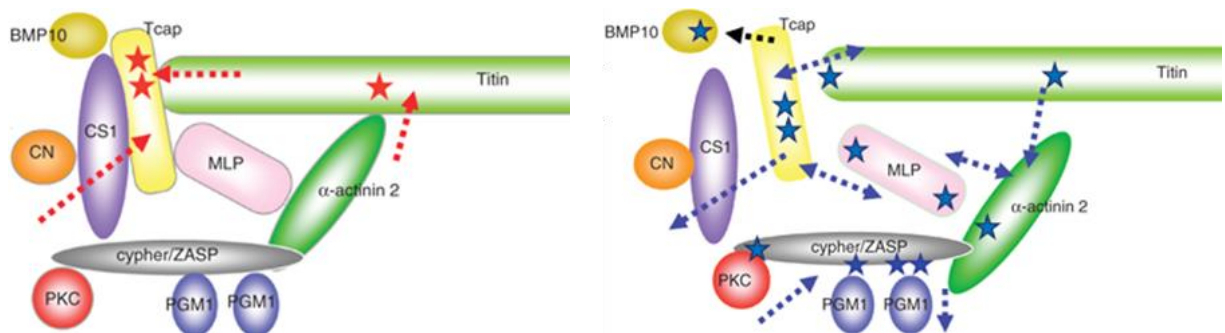


Fig. 1.4. Reprezentarea schematică a modificărilor funcționale cauzate de mutațiile genelor ce codifică proteine din banda Z [188]

*Notă:* în imaginea din *stânga* modificările funcționale cauzate de mutațiile asociate cu CMH sunt marcate prin stelute roșii, iar în *dreapta* modificările funcționale cauzate de mutațiile asociate cu CMD sunt marcate prin stelute albastre; săgețile întrerupte indică interacțiunile afectate de mutații.

*CN* – calcineurina; *CSI* – calsarcina 1; *MLP* – proteina LIM musculară; *TCAP* - teletonina.

Același fenomen este cauzat de mutațiile genei *TCAP* întâlnite în CMH, dar de această dată, legăturile strânse se formează între titină și teletonină (*TCAP*), MLP, casarcina 1 [149]. Astfel, aceste mutații pot avea ca rezultat o creștere a interacțiunii dintre componentele benzii Z, determinând o rigiditate crescută a sarcomerului, care la rândul său poate cauza o creștere a tensiunii pasive la întinderea mușchiului cardiac. Savanții presupun că mutațiile genetice asociate cu CMH, care se produc atât la nivelul genelor ce codifică proteinele benzii Z, dar și a filamentelor contractile, sunt cauza creșterii sensibilității mușchiului cardiac față de ionii de  $Ca^{2+}$ , deoarece creșterea tensiunii pasive este asociată cu o sensibilitate mărită față de aceștia [120].

De remarcat faptul că există și controverse la acest subiect, deoarece au fost identificate mutații în gena *CSR3* asociate CMH care provoacă slăbirea legării proteinei MLP cu  $\alpha$ -actinina și N-RAP [127]. Mohapatra și colaboratorii [256] au raportat că mutațiile genei *CSR3* și  $\alpha$ -actininei (*ACTA2*) identificate la pacienții cu CMD, de asemenea slăbesc interacțiunea dintre aceste componente. Prin urmare, atât CMH, cât și forma dilatativă a fost asociată cu o slăbire a legării proteinelor MLP și  $\alpha$ -actinina. Această discrepanță necesită cercetări aprofundate pentru a fi clarificată.

Deși mutațiile genelor ce codifică proteinele benzii Z: teletonina (*TCAP*) și miozinina *MYO2* [237, 280] sunt cauze mai puțin frecvente de CMH, unii cercetători [280] subliniază tot mai mult rolul proteinelor benzii Z ca molecule de semnalizare implicate în reglarea răspunsului hipertrofic cardiac.

Mutațiile genelor ce codifică proteine sarcomerice pot fi asociate atât cu CMH, cât și cu CMD, în acest moment nefiind cunoscut mecanismul prin care mutații ale aceleiași gene pot

determina două fenotipuri clinice diferite [251]. Proteinele codificate de genele afectate în formele de CMD cu substrat genetic controlează în general rezistența mecanică a miocitelor sau a joncțiunilor intercelulare, existând 6 grupe majore de molecule afectate (Figura 1.5): proteine ale membranei și laminei nucleare (lamina A/C, emerina, timopoietina, presenilina); proteine sarcomerice (actina, lanțul greu de miozină, troponina T, troponina I, troponina C, tropomiozina); proteine ale citoscheletului (desmina, distrofina); proteine ale joncțiunii intercelulare de tip „adherens” (metavinculina), ADN mitochondrial, canale ionice.

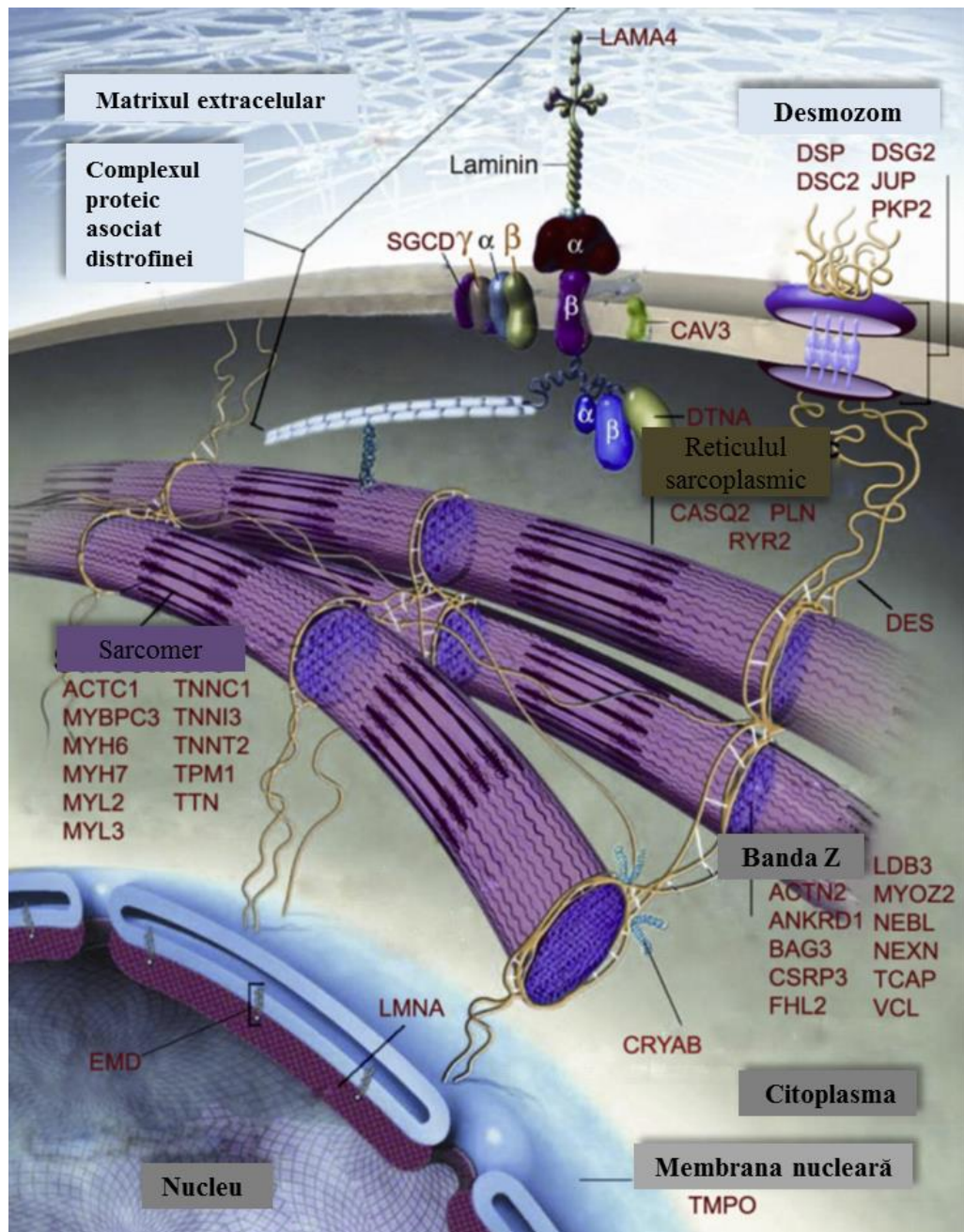


Fig. 1.5. Localizarea celulară a proteinelor implicate în cardiomiopatiile genetice [375].

*Notă:* La nivelul fiecărui component al miocitului (banda Z, sarcomer, desmozom, etc.) sunt indicate genele asociate cardiomiopatiilor.

Genele implicate în apariția CMD codifică două subgrupuri principale de proteine: proteinele citoscheletice și cele sarcomerice. Proteinele citoscheletice identificate până în prezent includ distrofina, laminina A/C, desmina,  $\beta$ -sarcoglicanul,  $\delta$ -sarcoglicanul și metavinculina. O parte din genele codificatoare ale proteinelor sarcomerice responsabile de apariția cardiomiopatiei hipertrofice sunt implicate și în apariția CMD. Printre acestea se remarcă genele cu rol în sinteza lanțului greu al  $\beta$ -miozinei, proteinei C de legare a miozinei, actinei,  $\alpha$ -tropomiozinei și troponinelor cardiace T și C, dar și mutații ale genelor ce codifică proteinele discului Z (ZASP, proteina LIM musculară,  $\alpha$ -actinina-2, miopalidina, teletonina). Alte defecte genetice raportate sunt la nivelul genelor responsabile de sinteza fosfolambanului și tafazinei.

Primul defect genetic cu transmitere autozomal dominantă identificat a fost la nivelul actinei cardiace, o proteină sarcomerică cu funcție dublă, care, pe de o parte interacționează cu componentele sarcomerului (lanțul greu al  $\beta$ -miozinei,  $\alpha$ -tropomiozina, troponinele) și are un rol principal în generarea forței în miocitul care se contractă. Pe de altă parte, actina se leagă de proteinele de ancorare distrofina și  $\alpha$ -actinina (care se află la nivelul benzii Z și discurilor intercalare), facilitând astfel transmiterea forței contractile către sarcolemă și miocitele adiacente. Se consideră că mutațiile care apar în primul caz, determină cardiomiopatie hipertrofică, iar în cea de-a doua situație – cardiomiopatie dilatativă.

Un mecanism similar a fost descris în cazul mutațiilor la nivelul genei ce codifică  $\alpha$ -tropomiozina care pot determina inversarea sarcinii electrice la suprafața tropomiozinei, afectând stabilitatea moleculei de tropomiozină și interacțiunea electrostatică a acesteia cu actina, influențând rolul filamentului subțire în transmiterea forței la sarcomerele adiacente. În cardiomiopatia hipertrofică, mutațiile la nivelul genei tropomiozinei provoacă creșterea contracției izometrice, cu utilizarea inefficientă a ATP-ului sarcomeric [155].

Dintre formele de CMD cu transmitere X-linkată, cel mai bine descrise au fost CMD X-linkată ce apare la adolescenți și adulți tineri și sindromul Barth, care este frecvent identificat la sugari și copii.

CMD X-linkată, ce apare la adolescenți și adulți tineri în jurul vârstei de 20 de ani, cu progresie rapidă de la insuficiență cardiacă la deces, prin tahicardie ventriculară sau insuficiență ventriculară, în absența transplantului cardiac, a fost asociată cu defect funcțional al genei ce codifică distrofina, proteină a cărei expresie este sever redusă sau absentă în această formă de boală. La acești pacienți este crescut nivelul seric al izoformei musculare a creatinkinazei. Femeile purtătoare ale defectului genetic pot dezvolta o formă ușoară-moderată de CMD în decada a cincea de viață, cu progresie lentă. Mutațiile genei distrofinei au fost identificate și la pacienții cu distrofie musculară Duchenne sau Becker, miopatii scheletice apărute precoce în

copilărie. Aproape toți acești pacienți dezvoltă cardiomiopatie dilatativă înaintea vârstei de 21 ani [177].

Sindromul Barth este diagnosticat la copiii de sex masculin cu insuficiență cardiacă asociată cu neutropenie (ciclică) și acidurie 3-metilglutaconică. Baza genetică a sindromului Barth sunt mutațiile de la nivelul genei tafazinei, care determină o serie de aspecte de tipul cardiomiopatiei dilatative sau hipertrofice cu dilatație, fibroelastoză, endocardică sau noncompactare ventriculară stângă [177].

În cele din urmă, elucidarea bazei genético-moleculare a cardiomiopatiilor ar permite realizarea unei stratificări a riscului genetic înainte de dezvoltarea unor fenotipuri clinice, inclusiv stabilirea riscului de moarte subită.

### **Clasificarea genelor implicate în bolile umane multifactoriale**

Genele asociate cu bolile umane complexe, cum ar fi CPI și infarctul de miocard pot fi clasificate în patru categorii majore [393]:

- genele ce cauzează maladia (*disease-causing genes*)
- genele de susceptibilitate (*susceptibility genes*)
- genele asociate cu maladia (*disease-linked genes*)
- gene amprentate genomic

**Genele ce cauzează maladia** prezintă gene direct responsabile de patogeneza bolii în urma unor mutații. În acest caz, mutațiile sunt clar definite sau bine stabilite ca fiind principala cauză a bolii. De exemplu, mutațiile la nivelul genelor *KCNQ1*, *KCNE2*, *KCNH2* [64], *SCN5A* [386] implicate în expresia unor canale ionice provoacă sindromul *Brugada*. Aceste gene au valori predictive mari și pot fi utilizate direct în testarea BCV [393].

**Genele de susceptibilitate** sunt acelea care sporesc sau reduc riscul de apariție a bolii și care, în funcție de alți factori de mediu sau genetici pot/sau nu pot provoca boala, în contextul altor factori. Mutațiile sau *SNP*-urile la nivelul acestor gene sunt prezente cu frecvențe diferite atât în populațiile în care boala se manifestă, cât și în cele sănătoase. Pentru indivizi, genele susceptibile au o valoare mai puțin predictivă pentru dezvoltarea și prognosticul bolii.

**Genele asociate cu maladia** („*gene candidat*”). S-a constatat că în apariția bolilor cronice intervin extrem de multe gene, care uneori produc, iar alteori nu produc boala. De aceea se vorbește nu de gene patogene, ci de gene-candidat în producerea acestor boli. Genele asociate cu maladia sunt acelea pentru care s-a demonstrat asocierea cu BCV prin tehnici de biologie moleculară, *microarray*, sau studii proteomice, însă relația lor cu boala, precum cauza sau consecința acestora nu a fost demonstrată. Unele dintre acestea ar putea servi ca biomarkeri în

depistarea BCV. Până în prezent, există puține informații cu privire la rolul factorilor de risc genetic care stau la baza complexității BCV. În studiile familiale s-a dovedit că mutațiile unei singure gene contribuie la manifestarea unui fenotip cardiovascular sever, cum ar fi cardiopatia ischemică și hipertensiunea arterială [74].

**Genele amprentate genomic** sunt utilizate în calitate de biomarkeri ai bolilor și în prima etapă de identificare a genelor asociate fenotipurilor patogene sau „gene candidat” [83]. Prin definiție, genele care cuprind *amprenta genomică* sunt asociate bolilor și astfel, sunt gene candidat, ce servesc drept bază pentru selectarea *SNP*-urilor asociate cu susceptibilitatea față de o boală sau față de un tratament special. Identificarea unui grup potențial de *SNP*-uri asociate cu boala, urmată de *screening*-ul ADN-ului unui pacient printr-un test sangvin pentru a depista prezența acestor variante genetice ar facilita semnificativ planificarea diagnosticului sau tratamentului. Relevarea genelor candidat ar putea îmbunătăți esențial înțelegerea biologiei bolii și, ulterior, ar duce la trasarea unor obiective potențiale pentru noi strategii de tratament.

O altă aplicare posibilă a informațiilor genomice este de a utiliza direct genele amprentate în calitate de marker biologic al bolilor. Datele de expresie a genei stabilite corespunzător, reprezintă un fenotip extrem de detaliat al pacientului, care ar putea fi utilizat pentru a stratifica cu exactitate populațiile de pacienți în ceea ce privește riscul față de o boală sau răspunsul terapeutic. În ambele cazuri, datele genomice servesc pentru a distinge printre pacienți, doar acei indivizi care sunt identici prin variabilele clinice tradiționale [262].

Astfel de profiluri de expresie de înaltă performanță, pot fi folosite pentru a compara nivelul de transcripție a genei în condiții clinice, cu scopul de a [21]:

- identifica biomarkeri de diagnostic sau de prognostic;
- clasifica bolile (de ex. tumori imposibil de distins cu ajutorul examenului microscopic);
- monitoriza răspunsul la tratament;
- înțelege mecanismele implicate în geneza procesului patologic.

Pentru bolile cardiovasculare, această preocupare este în curs de dezvoltare [83]. În acest context, tehnica ADN *microarray* reprezintă un instrument important pentru medicina clinică.

Barrens și colaboratorii săi [43] au construit un sistem ADNc *microarray* specific țesutului cardiac, numit „*CardioChip*” care conține mai mult de 10.000 de transcripți diferiți. Folosind acest sistem personalizat, pe baza țesutului cardiac prelevat din inimă fetală și adultă au fost obținute „*portrete*” specifice alterării expresiei genelor în cardiomiopatia dilatativă și hipertrofică [42, 170]. Ulterior, cipurile de tip *microarray* au fost utilizate în alte câteva studii pentru a caracteriza transcriptomul inimii umane și pentru a investiga sistemul cardiovascular

[41, 190, 210]. Frecvent, datele de expresie a genelor obținute prin *microarray* sunt validate pe baza corelației cu rezultatele RT-qPCR [63] în ceea ce privește exprimarea diferențiată (*sub-* sau *supraexpresie*) și semnificația statistică ( $p < 0.05$ ), astfel fiind selectate genele pentru a evalua puterea lor discriminativă de diagnosticare. Aplicarea acestor rezultate pentru prognosticarea riscului, prevenirii și tratamentului bolilor este încă incertă și necesită cercetări esențiale aprofundate. La moment este actuală investigarea locilor caracterelor cantitative-QTL și a expresiei genelor la nivelul acestora [195].

### 1.3. Abordarea transcriptomică a bolilor cardiovasculare

Secvențierea genomului uman [198] și ritmul accelerat al descoperirilor științifice din ultimii ani, a permis obținerea unor progrese majore în înțelegerea biologiei sistemelor, în principal a interacțiunii complexe dintre componentele sale: genom, transcriptom, proteom și metabolom.

Întreaga informație ereditară a organismului uman este codificată în genom, alcătuit din aproximativ 22 mii de gene [294], care, fiind transcrise în ARN mesager (ARNm), iar apoi translate în structuri proteice, formează modulatorii principali ai funcțiilor celulare.

Deși identificarea unor locusuri sau alele asociate genei responsabile de apariția unei boli aduce informații valoroase, simpla asociere statistică nu dovedește direct o relație cauză-efect. Profilul expresiei genice urmărește caracterizarea profilului transcripțional ADN-ARN. Astfel, prin urmărirea expresiei genice a unor secvențe genomice largi și compararea ei între indivizi cu o boală și fără ea se poate determina ce gene sunt transcrise în cadrul unui anumit fenotip clinic.

Variația expresiei genelor în probele patologice comparativ cu probele control reprezintă unul dintre cei mai simpli indicii prin care o genă poate fi considerată „*genă ce determină boala*”. Stabilirea profilurilor de expresie genică în diferite țesuturi normale sau anormale poate contribui la eficientizarea diagnosticului, tratamentului și prevenirii bolilor, inclusiv celor multifactoriale.

Inițial, modificările în expresia genelor au fost monitorizate individual pentru diverse *gene candidat*. Ulterior, datorită implementării unor noi tehnici moleculare de studiu: RNA-seq [423], *microarray*, qPCR [163] a devenit posibilă monitorizarea simultană a mai multor gene, *pattern*-ul expresiei lor reprezentând un „*portret molecular*” al probei [72, 197, 318]. Analiza comparativă a acestor „*portrete*” în cele două stări (normală vs patologică) poate identifica o „*semnătură a expresiei genelor*”, care caracterizează o stare fiziologică specifică [71, 96, 180, 191, 210, 253, 290].

Investigarea transcriptomului uman (totalitatea moleculelor de ARN) reprezintă o prioritate și o direcție relativ nouă, deosebit de importantă în medicina cardiovasculară. Genomica cardiovasculară a început să se dezvolte în anii 1980 - 1990, odată cu secvențierea clonelor din bibliotecile de ADNc obținute din țesut cardiac uman, obiectivul major axându-se pe detectarea genelor și markerilor asociați cu bolile cardiovasculare, care ar putea fi utilizați în predicția și diagnoza BCV.

Astfel, în 1997, Hwang și colab. au analizat aproximativ 76 mii secvențe marcate exprimate (ESTs – *Expressed Sequence Tags*) din diferite biblioteci de ADNc ale sistemului cardiovascular [169]. Acest studiu a constituit baza adnotării genelor exprimate în sistemul cardiovascular uman, care ilustrează potențialul studiilor transcriptomice atât în cercetările fundamentale de biologie umană, cât și în medicină [71, 243, 245, 249, 272, 289, 347, 368].

Însă, de cele mai multe ori aceste studii constituie o adevărată provocare pentru BCV, deoarece prelevarea probelor de țesut miocardic prin biopsie este dificilă și poate impune o povară inacceptabilă din partea pacientului [172, 260]. Pornind de la acest impediment major, în ultimul timp tot mai multe centre de cercetări apelează la analiza sângelui ca material inițial în studiile genetico-medicale și populaționale [165, 211].

Sângele prezintă un țesut „surogat” ideal pentru studiul expresiei genelor la om [143, 257, 258], în special în cazul afecțiunilor cardiovasculare, care sunt dificil de recunoscut din cauza eterogenității, determinată de interacțiunea factorilor genetici [116, 425], epigenetici [405], de mediu [60, 116] și de comportament [94] deoarece:

– *este o sursă relativ sigură și ușor de obținut, fiind posibilă colectarea unui eșantion mai mare de probe.*

Astfel, sunt evitate problemele de interpretare statistică și factorii de confuzie care reduc credibilitatea interpretării datelor, în cazul eșantioanelor mici și oferă oportunitatea standardizării procedurilor tehnice, ceea ce constituie un avantaj în evaluarea stării de sănătate sau boală. Recoltarea probelor de sânge este o procedură care nu depinde de preparate costisitoare și provoacă minim disconfort pentru pacienți, fiind mult mai acceptabilă decât biopsia [172, 260].

– *componentele sangvine interacționează continuu cu țesuturile corpului.*

Corpul uman este alimentat de un sistem circulator dinamic care are funcția principală de a furniza nutrienți și elemente constitutive la nivelul țesuturilor și de a elimina deșeurile metabolice, oferind conectivitate fiziologică între sisteme. Această proprietate a sângelui este importantă în menținerea homeostaziei, răspunsul organismului față de stres și în comunicarea endocrină.



– *reprezintă un indicator al stării organismului* ceea ce ar permite evaluarea și crearea de profiluri a mai multor căi patologice și fiziologice a bolilor cardiovasculare [209, 296].

– *componentele sangvine sunt implicate în patogeneza bolilor.*

Constatările studiilor cu referire la biologia vasculară a aterosclerozei și manifestările clinice susțin ipoteza că leucocitele sunt determinantul major al aterogenezei și leziunilor microvasculare [146, 207], iar trombocitele sunt implicate în procesele inflamatorii și de degradare a matricei celulare în ateroscleroza coronariană [82, 208].

– *celulele sangvine exprimă gene care sunt receptive la diverși stimuli.*

Cercetătorii au constatat un nivel diferit de exprimare al ARNm pentru insulină la subiecții testați pe nemâncate (*à jeun*) și după masă [209].

– *celule sangvine exprimă o parte substanțială a genomului uman*, un criteriu important pentru sânge în calitate de țesut „surogat”.

În studiul realizat de către Liew și colaboratorii [209], s-a constatat că celulele sangvine exprimă mai mult de 80% din transcriptomul fiecărui țesut din: creier, colon, inimă, rinichi, ficat, plămâni, prostată, splină și stomac. De asemenea, această analiză a demonstrat că celulele sangvine exprimă gene specifice de țesut, precum gena insulinei și *MYH7* care codifică lanțul greu al  $\beta$  – miozinei cardiace. Alte studii au adus dovezi privind expresia în sânge a genelor relevante pentru excitabilitatea și contractilitatea cardiomiocitelor [339] și genelor implicate în căile neuroendocrine [269].

Aceste date argumentează utilitatea potențială a celulelor sangvine în studiile „omice” privind BCV [70, 153, 209, 221, 334], dat fiind faptul că schimbările ce au loc în organism, sub influența factorilor de mediu, fiziologici și patologici, pot modifica expresia genelor, lăsând în sânge o amprentă moleculară detectabilă [162, 413]. Din aceste considerente, profilul transcripțional derivat din celulele sangvine poate oferi o alternativă țesutului prelevat prin biopsie, proprietate pe care cercetătorii își propun să o valorifice și să o aplice în identificarea de noi gene ce cauzează patologia sau a unor biomarkeri cu rol potențial în diagnosticul și prognosticul bolilor umane [62, 152, 249, 289, 343].

Un aspect important al studiilor de ultimă oră se axează pe investigarea relației dintre BCV, factorii clinici și expresia genelor. Astfel, Elashoff și colaboratorii săi au dezvoltat un algoritm de evaluare a riscului de boală coronariană obstructivă la pacienții non-diabetici, bazat pe vârstă, sex și expresia în sânge a 23 de gene, prin combinarea datelor *microarray* și qPCR colectate de la peste 1000 de subiecți [106]. Într-un alt studiu, privind profilul de expresie al genelor, au fost identificați markeri genetici și căi metabolice asociate cu creșterea severității

afecțiunilor cardiovasculare la pacienții care au suferit un prim infarct miocardic. Datele obținute relevă că creșterea severității bolii la acești pacienți este asociată cu expresia diminuată a genelor implicate în calea de tranziție epitelial-mezenchimală și modularea genelor de transport al colesterolului (*ABCA1*, *CETP*, *APOA1* și *LDLR*) [368].

Recent, Kazmi și colaboratorii [183] au identificat prin analiza expresiei genelor la nivel sangvin, două seturi de factori ereditari, care par a fi promițătoare în clasificarea grupurilor de oameni sănătoși, a pacienților cu cardiopatie ischemică stabilă, angină instabilă și infarct miocardic. Rezultatele studiului susțin utilizarea genelor identificate în diagnosticul bolilor cardiovasculare și sugerează potențiale aplicații clinice a datelor de expresie la nivel sangvin ca biomarkeri în afecțiunile cardiovasculare.

Cercetări similare au fost efectuate pentru hipertensiune și diabet zaharat de tip II [106, 364], cardiopatie ischemică [183, 323], infarct miocardic [179, 186, 368], insuficiență cardiacă [232, 253]. Astfel, datele privind expresia genelor la nivel sangvin sunt valoroase pentru identificarea genelor implicate în patogeneză bolilor, înțelegerea biologică a procesului patologic, clarificarea căilor etiologice a bolilor.

Generalizând datele din literatura de specialitate putem conchide că studiile privind evaluarea expresiei genelor la nivel sangvin sunt de perspectivă, prezintă interes și aplicabilitate în cercetările privind bolile cardiovasculare. Obiectivul principal al acestor cercetări este de a optimiza panoul de gene responsabil de boală într-un test de diagnostic molecular, bazat pe semnătura specifică a expresiei genelor în sânge, care ar oferi indicii noi privind monitorizarea pacienților și intervenția terapeutică personalizată.

#### **1.4. Concluzii la capitolul 1**

Analiza literaturii de specialitate a permis evidențierea problemelor cu care se confruntă societatea la capitolul mortalității cauzate de bolile cardiovasculare. Astfel:

1. potrivit celor mai recente relatări, BCV rămân a fi principala cauză a deceselor la nivel global, iar Republica Moldova se află printre primele țări ale Europei în ceea ce privește rata mortalității provocată de aceste maladii;

2. frecvența sporită a evenimentelor cardiace la persoanele fără maladii cardiovasculare evidente în antecedente pune în evidență imposibilitatea depistării patologiilor cardiovasculare în stadiul preclinic;

3. modificarea expresiei genelor în diferite condiții caracterizează o stare fiziologică specifică, iar cunoașterea activității transcripționale a genelor asociate bolilor cardiovasculare ar

putea fi utilă în înțelegerea biologiei procesului patologic, clarificarea căilor etiologice, dar și în prevenirea progresiei, invalidității și mortalității provocate de acestea;

4. o direcție relativ nouă în analiza transcriptomului este legată de sângele periferic, ușor accesibil, de la care *pattern*-ul molecular poate fi obținut în condiții de siguranță. Obiectivul principal al acestor studii este de a optimiza, într-un test exact de expresie, panoul de gene responsabile de boală, generate prin profiluri ARN din sânge și de a le pune în aplicare în calitate de instrumente de diagnostic molecular, pentru a determina trăsăturile clinice pe bază de semnături specifice expresiei genelor în sânge.

Din aceste considerente, ne-am propus drept **scop al studiului** identificarea unor gene candidat prin analiza exploratorie a datelor *microarray* și asocierea lor la nivel de expresie cu cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatii primare și stenoza aortică congenitală.

Pentru realizarea scopului au fost înaintate următoarele **obiective**:

1. identificarea genelor candidat în producerea unor patologii cardiovasculare, în baza seturilor de date *microarray* din NCBI-GEO;
2. evaluarea expresiei genelor potențial implicate în bolile cardiovasculare la copii și adulți;
3. estimarea variabilității expresiei unor gene asociate cu patologia cardiovasculară;
4. stabilirea profilului de expresie a unui set de gene în anumite condiții patologice.

## 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările în scopul identificării și evaluării activității transcripționale a unor gene candidat în producerea unor patologii cardiovasculare au fost efectuate în cadrul Centrului Genetică Funcțională, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, pe parcursul anilor 2012-2015.

### 2.1. Materiale pentru cercetare

Cercetarea a fost structurată în două etape de studiu:

– generarea ipotezelor de lucru și analiza exploratorie a seturilor de date *microarray* stocate în baza de date NCBI-GEO, efectuată în vederea identificării genelor cu expresie diferențiată în BCV. La această etapă, în baza seturilor de date *microarray* selectate pentru analiză au fost definite patologii cardiovasculare, care vor servi drept puncte de reper în evaluarea expresiei genelor prin qPCR.

– investigații molecular-genetice în vederea evaluării expresiei genelor cu rol potențial în patologii cardiovasculare: cardiopatie ischemică ci și fără fibrilație atrială, cardiomiopatii primare și stenoza aortică congenitală.

În continuare sunt descrise pe scurt materialul și metodele aplicate în studiul genelor potențial implicate în BCV, care sunt dependente și diferă în funcție de scopul fiecărei etape de studiu.

#### Platformele *microarray* – GEO

Utilizarea informațiilor obținute în baza tehnicilor de înaltă performanță, privind expresia genelor contribuie la sporirea înțelegerii și explicării mecanismelor patologice de bază. Aceste informații sunt accesibile pentru comunitatea științifică, fiind stocate în baze de date, cum ar fi de exemplu NCBI-GEO [44].

În calitate de material de studiu pentru identificarea unor gene candidat, prin analiza exploratorie a metadatelor experiențelor *microarray*, au servit profilurile de expresie a genelor potențial implicate în BCV, stocate în baza de date *Gene Expression Omnibus* (GEO), creată de *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI).

Baza de date GEO reprezintă o resursă accesibilă, stochează un profil vast de informații și oferă o varietate largă de tipuri de date (*microarray*, RT-PCR, SNP etc.) privind estimarea expresiei genelor [430].

Oportunitatea investigării profilurilor *microarray* stocate în baza de date *GEO* constă în sistematizarea informației referitoare la genele implicate în bolile cardiovasculare, în scopul evidențierii funcțiilor lor. Datele stocate sunt obținute de către toată comunitatea științifică în baza testelor de laborator, experimente *in silico*, *in vitro*, *in vivo*.

Acumularea informațiilor se face prin publicarea protocoalelor și a tabelelor cu valori de expresie, care pot fi analizate independent și reanalizate în dependență de scopurile proiectelor de cercetare, toate acestea fiind liber accesate și ușor manipulate.

Datele sunt structurate în diferite seturi, care reprezintă colecții de probe sau de experiențe și sunt denumite și notate în felul următor [44]:

➤ *GSM* – **Sample** este echivalentă cu o probă biologică și se consideră a fi un studiu individual, repetiție biologică sau tehnică, de asemenea este stocat sumarul experiențelor;

➤ *GSE* – **Serie** combină mai multe probe ce au fost cercetate conform unui scop comun de studiu în cadrul unei experiențe (set de date);

➤ *GPL* – reprezintă o **Platformă**, ce include toate seturile de probe înregistrate pe *GEO*, corespunzătoare cu un anumit tip de chip de la un anumit producător.

Totodată, *GEO* oferă sisteme accesibile de gestiune, care asigură accesul informațiilor de interes, obținerea și analiza datelor experimentale.

Ca rezultat, au fost selectate seturile de date ce corespund chipurilor *microarray* **GPL570 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array** și **GPL8300 Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array**. Seturile de date *microarray* de pe aceste platforme au fost descărcate cu ajutorul pachetului *GEOquery* din *Bioconductor* [84].

Pentru a completa informațiile obținute, a fost utilizată baza de date *NetAffx Analysis Center* care dispune de date suplimentare disponibile *online* privind sondele de pe chipurile respective [428].

Rezultatele analizei exploratorii a profilurilor *microarray* selectate pentru realizarea scopului studiului dat au servit drept premisă pentru selectarea materialului clinic de cercetare, în vederea evaluării expresiei unor gene cu rol potențial în manifestarea maladiilor cardiovasculare.

### **Materialul clinic de cercetare**

În calitate de material clinic de cercetare pentru testarea genelor potențial implicate în BCV au servit pacienți cu maladii cardiovasculare internați sau aflați la evidență în IMSP Institutul de Cardiologie, *Departamentul și Laboratorul Științific Insuficiență Cardiacă Cronică*, condus de dr. hab. șt. med., prof. univ. Eleonora VATAMAN și în IMSP Institutul Mamei și

Copilului, *Clinica Pediatrie, Secția Cardiologie*, condusă de dr. hab. șt. med., conf. univ. Ina PALII.

**Criteriile de selecție a pacienților.** Selectarea și recrutarea în studiu a pacienților a fost efectuată în baza criteriilor de includere și excludere. Toți participanții în studiu au semnat consimțământul informat, iar în cazul copiilor, acesta a fost semnat de către părinți sau reprezentatul legal al acestora.

*Criterii de includere în studiu a subiecților:*

- pacienți cu vârsta cuprinsă între 1 lună – 18 ani în cazul CMP și aortopatiilor congenitale;
- pacienți cu vârsta >40 ani în cazul cardiopatiei ischemice cu și fără fibrilație atrială;
- pacienți cu diagnoze deja confirmate, în conformitate cu ghidurile și protocoalele actuale, de CPI, inclusiv în asociere cu FiA; CMP (dilatative și hipertrofice) și aortopatii congenitale;
- pacienți cu diagnozele sus numite confirmate, însă fără asociere de alte maladii genetice.

*Criteriile de excludere a pacienților au inclus:*

- pacienți cu alte patologii concomitente grave (infecții severe, afecțiuni renale, hepatice, metabolice etc.);
- pacienți în stadiul terminal al insuficienței cardiace și cu funcția de pompă a ventriculului stâng <30%.

**Caracterizarea lotului de cercetare.** Studiul molecular privind evaluarea expresiei genelor identificate prin analiza exploratorie a datelor *microarray* s-a efectuat pe probe de sânge recoltate de la 69 de persoane, originare din Republica Moldova, dintre care 55 de pacienți cu patologii cardiovasculare au alcătuit lotul de studiu (32 gen masculin și 22 gen feminin), iar 14 subiecți fără afecțiuni cardiovasculare au constituit lotul de referință (Figura 2.1).

Cercetarea fiind direcționată de particularitățile de vârstă a pacienților și de tipul patologiei cardiovasculare, s-a convenit de a diviza lotul de bază în:

- *lotul de copii* – a inclus 28 de pacienți cu vârsta cuprinsă între 0-18 ani, divizat în grupul cardiomiopatii primare (CMP) și grupul stenoza aortică congenitală (SAo);
- *lotul de adulți* – a inclus 27 de pacienți cu vârsta >40 ani, divizat în grupul cardiopatie ischemică (CPI) și grupul cardiopatie ischemică în asociere cu fibrilația atrială (CPI-FiA).

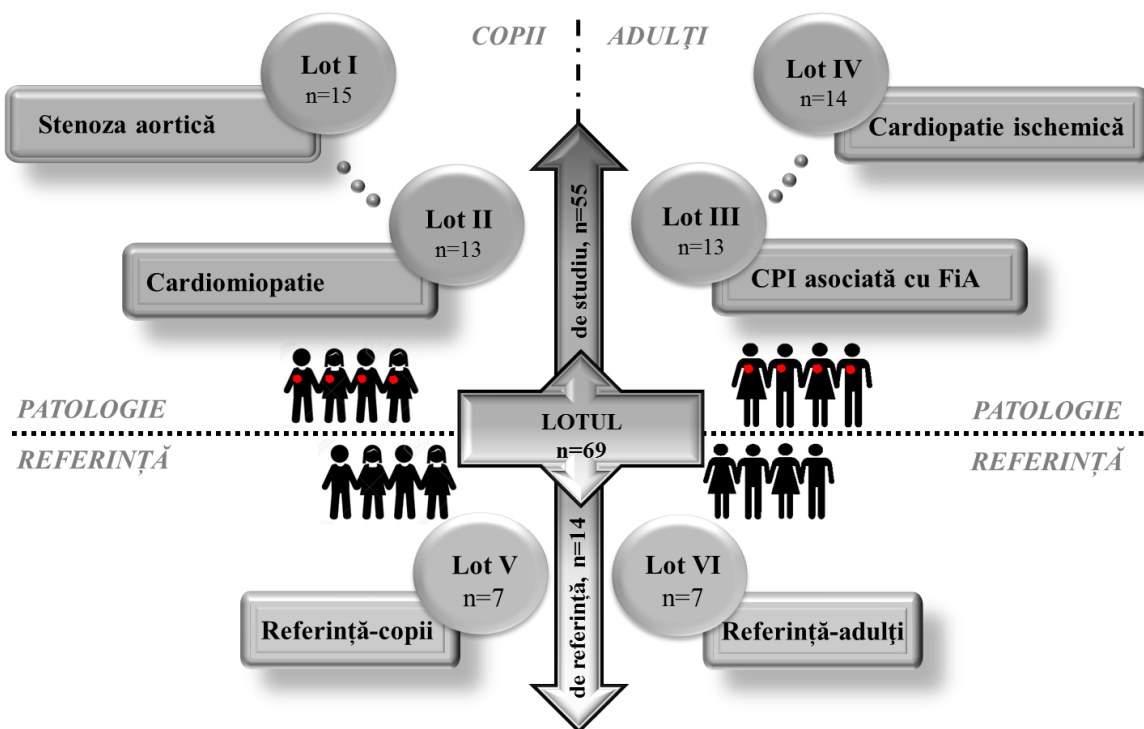


Fig. 2.1. Structura lotului de cercetare.

Notă: *CPI* – cardiopatia ischemică; *CPI-FiA* – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială.

Ca urmare, lotul de comparație a fost repartizat în două grupuri: grupul Cc – material prelevat de la subiecți, cu vârsta cuprinsă între 0 – 18 ani, care alcătuiesc lotul de comparație pentru copii; grupul Cm – material biologic colectat de la subiecți, cu vârsta >40 ani, care formează lotul de comparație pentru adulți.

Tabelul 2.1.  
Caracteristicile demografice și clinice ale loturilor studiate

<b>PATOLOGII</b>	<b>Cardiopatie ischemică <i>CPI</i></b>	<b>n=14</b>
	Vârsta medie/limite de vârstă (ani)	62 (40-79)
	♂/ ♀, n	8/6
	<b>Cardiopatie ischemică asociată cu fibrilația atrială <i>CPI-FiA</i></b>	<b>n=13</b>
Vârsta medie/limite de vârstă (ani)	63 (51-78)	
♂/ ♀, n	7/6	
<b>Cardiomiopatii primare <i>CMP</i></b>	<b>n=13</b>	
Vârsta medie/limite de vârstă (ani)	9 (0-18)	
♂/ ♀, n	8/5	
<b>Stenoza aortică congenitală <i>SAo</i></b>	<b>n=15</b>	
Vârsta medie/limite de vârstă (ani)	11 (0-18)	
♂/ ♀, n	7/8	
<b>REFERINȚĂ</b>	<b>Grupul de referință copii <i>Cc</i></b>	<b>n=7</b>
	Vârsta medie/limite de vârstă (ani)	13 (0-18)
♂/ ♀, n	3/4	
<b>Grupul de referință maturi <i>Cm</i></b>	<b>n=7</b>	
Vârsta medie/limite de vârstă (ani)	37 (40-53)	
♂/ ♀, n	0/7	

Caracteristicile demografice și clinice ale loturilor studiate sunt sumarizate în Tabelul 2.1:

- grupul CPI cuprinde 14 pacienți cu cardiopatie ischemică (8 ♂ și 6 ♀), cu vârsta cuprinsă între 40 – 79 de ani;
- grupul CPI-FiA s-a constituit din 13 subiecți (7 ♂ și 6 ♀) diagnosticați cu cardiopatie ischemică în asociere cu fibrilația atrială, cu vârsta cuprinsă între 51 – 78 de ani;
- grupul CMP a cuprins 13 pacienți (8 ♂ și 5 ♀) cu cardiomiopatii primare, având vârsta cuprinsă între 0 – 18 de ani;
- grupul SAo a inclus 15 pacienți (7 ♂ și 8 ♀) cu stenoza aortică, cu vârsta cuprinsă între 0 – 18 ani;
- grupul de comparație Cc format din 7 persoane (3 ♂ și 4 ♀), cu vârsta cuprinsă între 0 – 18 ani;
- grupul Cm format din 7 persoane (7 ♀), cu vârsta cuprinsă între 40 – 53 de ani.

### **Materialul biologic de cercetare**

Materialul biologic folosit pentru evaluarea expresiei genice a cuprins probe de sânge colectat de la 69 subiecți incluși în studiu.

După consimțământul scris al pacientului și/sau al reprezentanților legali, personalul medical competent, a recoltat câte 10 ml de sânge venos de la fiecare subiect inclus în studiu.

Probele de sânge au fost recoltate de la toți pacienții în tub vacutainer cu anticoagulant K<sub>2</sub>-EDTA, în același interval orar (9-12) fiind procesat în condiții similare: liza eritocitară, timp de 10 min cu soluție tampon de liză a hematiilor, în proporție de 1x5 volume (sânge/soluție tampon), urmată de centrifugare la 2100 rpm (rotații per minut), 10 min, 4°C. Peletul format a fost spălat cu soluție tampon PBS (*Thermo Scientific, #28374*) și centrifugat la 14 000 rpm, 30 sec, 4°C, iar fracția leucocitară îmbogățită a fost utilizată pentru extragerea ARN-ului.

Colectarea probelor de sânge și purificarea ARN-ului s-a efectuat în aceeași zi. Probele au fost transportate și depozitate la 4°C pentru cel mult 5 ore de la colectare până la inițierea procedurii de izolare a ARN-ului [81].

## **2.2. Metode de cercetare**

### **Metode de analiză bioinformatică**

În studiul de față au fost utilizate profilurile de expresie a genelor cu referire la patologii cardiovasculare, stocate în baza de date NCBI-GEO. Pentru extragerea și analiza datelor a fost utilizat mediul de programare R [30, 34, 304].



Seturile de date *microarray* au fost descărcate cu ajutorul pachetului *GEOquery* [84]. Studiul este bazat pe 2 platforme de tip *Affymetrix*.

Pachetele de adnotare folosite pentru chipurile respective sunt „*hgu95av2.db - Affymetrix 95A versiunea 2*” și pachetul „*hgu133plus2.db - Affymetrix U133 plus 2.0*” stocate pe *Bioconductor* [432, 130].

Pentru completarea informațiilor obținute privind sondele de pe chip, a fost utilizat instrumentul *NetAffy Analysis Center* (*Affymetrix*). Cu ajutorul acestei surse au fost extrase codurile de adnotare suplimentare din alte baze de date (spre exemplu portalul *ExPaSy*), care nu sunt prezente în „*hgu95av2.db*” și „*hgu133plus2.db*”.

**Analiza exploratorie a datelor *microarray*.** Analiza exploratorie a datelor (*Exploratory Data Analysis - EDA*) [382] reprezintă procesul de sumarizare a unui set de date, utilizând informații statistice numerice, tabele sau vizualizări grafice, servind la:

- evaluarea calității și exactității datelor,
- verificarea validării unor ipoteze specifice, necesare pentru inferența statistică,
- identificarea strategiilor adecvate de analiză statistică a seturilor de date.

Scopul EDA este de a spori gradul de înțelegere a setului de date de către analist, a structurii acestuia, oferind în același timp toate elementele specifice pe care cercetătorul ar dori să le extragă dintr-un set de date, cum ar fi [433]:

- extragerea variabilelor importante,
- detecția valorilor extreme/exceptionale și a anomaliilor,
- estimarea parametrilor statistici,
- identificarea ipotezelor fundamentale pentru a fi apoi testate,
- formularea unor ipoteze privind cauzele fenomenelor observate,
- selectarea și sugerarea unor tehnici statistice potrivite analizei datelor disponibile,
- furnizarea cunoștințelor privind colectarea ulterioară a datelor pentru cercetare sau experimentare.

Analiza exploratorie a datelor include grafică statistică, transformarea/prelucrarea statistică a datelor, identificarea observațiilor aberante, formularea ipotezelor referitoare la declanșarea demersului experimentelor statistice, determinarea estimațiilor robuste etc.

În acest context, studiul bioinformatic s-a realizat conform unei metodologii de extragere și analiză a datelor de expresie, bazată pe tehnicile EDA [5], elaborată în cadrul *Centrului Genetică Funcțională*, UnAȘM (Figura 2.2).

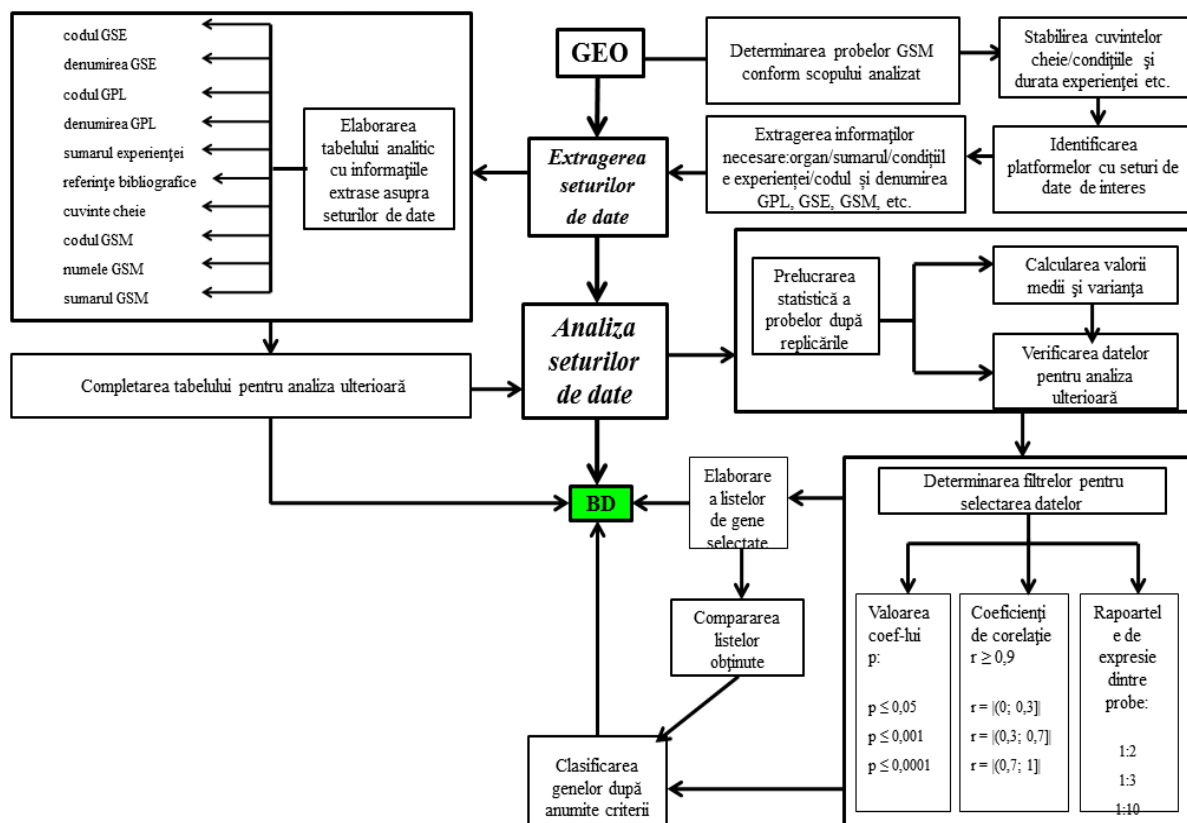


Fig. 2.2. Metodologia generală de realizare a analizei exploratorii a datelor *microarray*.

**Metode de filtrare a datelor *microarray*.** Pentru a înlătura efectele produse de diferențele dintre tipurile de chipuri utilizate s-au aplicat metodele de analiză statistică primară și s-a recurs la calcularea indicelui de expresie IE (1), ca raport dintre valoarea expresiei unei probe moleculare în patologie ( $x_2$ ), față de valoarea ei în stare normală ( $x_1$ ). Raportul obținut se logaritmează pentru a liniariza efectele de interdependență a expresiei dintre gene și, totodată, pentru a evidenția efectele produse de diminuare (semnul „-”) și sporire (semnul „+”) a expresiei genelor:

$$IE = \log \frac{x_2}{x_1} \quad (1)$$

Filtrarea unei liste de date este o operație prin care sunt selectate și extrase pentru analiză înregistrările din listă care corespund anumitor criterii de interes. În prezenta lucrare, identificarea genelor candidat s-a efectuat în baza valorilor IE, fiind axată, în special pe genele cu expresie diferențiată, caracterizate prin valoarea absolută a indicelui de expresie foarte înaltă. Pragul minimal de selecție a genelor respective a fost stabilit în urma analizei distribuției valorilor IE și numărul de rezultate produse și prin estimarea legăturii între ele prin coeficientul de corelare Pearson (2):

$$r_{xy} = \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum_i (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{s_x \cdot s_y} \quad (2)$$

unde:  $n$  – mărimea eşantionului format din măsurători pereche  $(x, y)$ ;

$x_i$  – măsurătorile individuale ale variabilei  $x$ ;

$y_i$  – măsurătorile individuale ale variabilei  $y$ ;

$\bar{x}$  – media aritmetică a variabilelor  $x$ ;

$\bar{y}$  – media aritmetică a variabilelor  $y$ ;

$S_x$  – deviația standard pentru valorile  $x$ ;

$S_y$  – deviația standard pentru valorile  $y$ .

Coeficientul de corelație poate lua valori cuprinse între  $-1$  și  $+1$ , adică satisface inegalitățile:  $-1 \leq r_{xy} \leq 1$ .

**Validarea rezultatelor.** Explorarea datelor este doar un prim stadiu de analiză, iar rezultatele obținute vor fi considerate cu titlu experimental atât timp cât nu sunt validate alternativ. De exemplu, dacă rezultatul aplicării EDA sugerează un anumit model, atunci acesta trebuie validat, aplicându-l la alt set de date, testându-i astfel calitatea predictivă.

Altfel spus, tehnicile EDA odată utilizate, rezultatele obținute se verifică. Etapa dată este necesară pentru a demonstra corectitudinea metodologiei aplicate. În acest scop, inițial a fost important de a identifica acele gene pentru care deja a fost demonstrată implicarea în BCV sau genele cu un potențial mai probabil de implicare. Acestea reprezintă rezultatele pozitiv adevărate obținute și susțin corectitudinea metodologiei utilizate. Celelalte rezultate reprezintă genele cu un potențial de implicare în BCV încă nestabilit.

Simbolul și denumirea genelor sunt utilizate în conformitate cu Comitetul de Nomenclatură a Genelor (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) [434].

### Metode de biologie moleculară

**Purificarea și determinarea calității și cantității ARN-ului.** Extractia ARN-ului total din sânge s-a realizat folosind kitul *GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA #K0871* (*Thermo Scientific*) conform recomandărilor producătorului. ARN-ul a fost extras în aceeași zi cu recoltarea probelor.

Concentrația și puritatea ARN-ului total au fost estimate spectrofotometric, prin măsurarea absorbantei la 260 și 280 nm utilizând spectrofotometrul T60 UV-VIS (*PG Instruments limited*).

Integritatea și dimensiunea ARN-ului total purificat a fost verificată prin electroforeză în gel de agaroză de 1% și colorare cu etidium bromid [139].

Mostrele purificate de ARN total au fost depozitate în congelator la  $-80^{\circ}\text{C}$  până la analiza expresiei genice.

**Evaluarea nivelului de expresie a genelor prin Real-Time PCR.** Expresia genelor identificate prin analiza exploratorie a seturilor de date *microarray* a fost estimată utilizând PCR cantitativ în timp real. RT-qPCR, se diferențiază de tehnicile clasice de cuantificare, prin faptul că detecția are loc concomitent cu etapa de amplificare (de unde și denumirea Real-Time PCR), astfel încât produsul PCR este cuantificat în faza exponențială.

Studiile efectuate anterior au demonstrat că această tehnică prezintă avantaje față de PCR cantitativ clasic, fiind astăzi acceptată ca tehnică uzuală de cuantificare a acizilor nucleici [93]. Acest lucru a fost posibil prin creșterea sensibilității, reproductibilității și prin reducerea la minim a riscului de contaminare a produșilor de amplificare [65].

Tehnica Real-Time RT-PCR cantitativă cuprinde doua etape:

a) *Revers-transcripția ARN-ului total în ADN complementar monocatenar (ADNc)*

ARN-ul total ( $0,6 \mu\text{g}/\text{ul}$ ) a fost tratat cu DNase I, RNase-free #EN0521 30 min la  $37^{\circ}\text{C}$ . ARN-ul tratat cu ADN-ază a fost utilizat în sinteza primei catene de ADNc folosind RevertAid Reverse Transcriptase #EP0441 (*Thermo Scientific*).

Alinierea primerilor Oligo(dT)18 (*Thermo Scientific*) și random hexamer (*Fermentas*) s-a efectuat timp de 5 minute la  $65^{\circ}\text{C}$ .

În etapa de transcriere inversă s-a utilizat mixul preparat conform recomandărilor producătorului. Reverstranscripția a fost efectuată la  $25^{\circ}\text{C} - 10 \text{ min}$ ,  $45^{\circ}\text{C} - 60 \text{ min}$  și  $70^{\circ}\text{C} - 10 \text{ min}$ .

b) *Reacția de polimerizare în lanț în timp real (Real-Time PCR)*

Expresia genelor studiate a fost estimată utilizând PCR cantitativ în timp real în amplificator cu detecția automată a fluorescenței DT-96 (DNA Technology, Rusia).

În această etapă produșii PCR au fost sintetizați din ADNc utilizând Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (*Thermo Scientific*).

Pentru cuantificarea expresiei genelor de interes, a fost realizat design-ul primerilor specifici (Tabelul 2.2).

Primerii utilizați au fost elaborați în baza secvențelor transcripturilor cercetați stocate în baza de date *NCBI* [435].

Identificarea secvențelor nucleotidice ale primerilor specifici a fost realizată cu aplicarea programului *NCBI/ Primer-BLAST* [416], iar verificarea acestora privind prezența structurilor secundare s-a efectuat prin *OligoAnalyzer 3.1* [282, 437].

Tabelul 2.2.  
Caracteristica primerilor utilizați în studiu

Simbolul genei	Nr. de acces	Secvența 5' -> 3'	Tm (°C)	L., pb
<i>NPPB</i>	NM_002521.2	F AAACGTCCGGGTTACAGGAGCA (22) R TTTGCGGTGCCACGGATG (19)	62.1 61.0	161
<i>ELAVL1</i>	NM_001419.2	F TCGTCAACTACCTCCCTCAGAACA (24) R CTGTGTCCTGCTACTTTATCCCGAA (25)	62.7 63.0	112
<i>ABCA1</i>	NM_005502.3	F CCTTGTCCGGATGCTGTTGGA (21) R ACATCCTCTGGGTGCTTGGC (20)	61.8 61.4	120
<i>IL8</i>	NM_000584.3	F CAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT (23) R TGGTCCACTCTCAATCACTCTCAGT (25)	62.4 63.0	128
<i>INHBA</i>	NM_002192.2	F GTTTGCCGAGTCAGGAACAGC (21) R TGCTGGAAGAGGCGGATGGT (20)	61.8 61.4	159
<i>JAK2</i>	NM_004972.3	F CGAGGGATGTGAGTGGGAGCT (21) R GCTTCTGAAACCGGCTACACAGA (23)	63.7 62.4	180
<i>LPA</i>	NM_005577.2	F GACACACTTTCTGGGCACTGCT (22) R CTTTGCTCAGGTGCTGCTGATTTC (24)	62.1 62.7	100
<i>THBS1</i>	NM_003246.2	F GCACCAACCGCATTCCAGAGTC (22) R TTGGAAGTGTGTCATCAGGCACAGG (24)	64.0 62.7	179
<i>SCD</i>	NM_005063.4	F TGTTCTGTTGCCACTTTCTTGCGAT (24) R CCCTCACCCACAGCTCCAAGT (21)	61.0 63.7	151
<i>TIMPI</i>	NM_003254.2	F TCCAGCGCCAGAGAGACAC (20) R AACTTGGCCCTGATGACGAGGT (22)	63.5 62.1	170
<i>TNFRSF11B</i>	NM_002546.3	F GCGCTCGTGTCTTCTGGACATCT (22) R GCACACGGTCTTCCACTTTGC (21)	62.1 61.8	165
<i>SSPN</i>	NM_005086.4	F CGGGATGTGACGGACTGTACCA (22) R ACAAGCACACAAGGCCGCAG (20)	64.0 61.4	97
<i>ITGB1</i>	NM_002211.3	F GGCATCCCTGAAAGTCCCAAGTG (23) R ACACGCCCTTCATTGCACCTG (21)	64.2 61.8	80
<i>ITGBL1</i>	NM_001271754.1	F TGCCAGGGAAGCTCGGATCT (20) R AGGTCTTCACAGCGGCGATCA (21)	61.4 61.8	134
<i>CYP2C8</i>	NM_001198855.1	F CGGCGTTTCTCCCTCACAACC (21) R ACAACGGAGCAGATCACATTGCAG (24)	63.7 62.7	176
<i>CYP4B1</i>	NM_001099772.1	F GGACAGCAGCTACTACCTTGCA (22) R GCCTTCGCTCCCTGATGAC (20)	62.1 63.5	177
<i>KRT19</i>	NM_002276.4	F TCCAGATGAGCAGGTCCGAG (20) R GTCTTCCAAGGCAGCTTTCATG (22)	61.4 60.3	101
<i>HAS1</i>	NM_001523.2	F TTGCAGCAGTTTCTTGAGGC (20) R CTGGAGGTGTAAGTGGTAGCA (21)	57.3 59.8	125
<i>RGS1</i>	NM_002922.3	F CCAAGGATGTAAGTCTGCTGCT (23) R CACAAGCCAGCCAGAACTCA (20)	60.6 59.4	147
<i>GAPDH</i>	NM_002046	F TGCACCACCAACTGCTTA (18) R GGATGCAGGGATGATGTTTC (19)	53.7 56.7	175

Notă: **F** – secvența nucleotidică sens; **R** – secvența nucleotidică antisens; în paranteze rotunde ( ) este indicată lungimea secvenței primer-ului; **Tm** – temperatura de denaturare; **L** – lungimea ampliconului; **pb** – perechi de baze.

Amplificarea Real-Time PCR s-a realizat în volum de 15 µl, prin programul automat de amplificare cu următorul regim: 95°C – 10 min; 5 cicluri la 95°C – 15 s, 64°C – 20 s; 40 cicluri 95°C – 15 s, 60°C – 40 s; 40 cicluri 65°C – 15 s. Fluorescența s-a detectat în decursul elongării. Lipsa amplificării produselor nespecifice și formării primerilor dimerizați a fost confirmată prin analiza curbelor de topire și electroforeză în gel de 1,4 % agaroză.

Pentru fiecare probă de ARN reacția a fost montată în trei repetări analitice. Determinarea cantitativă a ARN-ului s-a realizat la toți pacienții incluși în studiu.

În calitate de genă de referință s-a utilizat gena *GAPDH* (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, numărul de acces în baza de date NCBI: NM\_002046).

Cuantificarea relativă a fost calculată folosind metoda  $\Delta CT$  și  $\Delta\Delta Ct$  [219], iar rezultatele au fost exprimate în unități convenționale (un.c.) și *fold change* – raport de modificare a expresiei [297].

Pentru clasificarea și caracterizarea modificării expresiei genelor în condiții de patologie față de referință, s-a utilizat modelul propus de Xu și colaboratorii (Tabelul 2.3), fiind adaptat condițiilor cercetărilor noastre. Acest model este aplicat pentru a defini nivelul general de supraexpresie, subexpresie sau lipsa unor schimbări privind expresia genelor de interes.

Tabelul 2.3  
Clasificarea genelor în funcție de activitatea transcripțională [411]

SUPRAEXPRESIE ↑ (P>R)		SUBEXPRESIE ↓ (P<R)		FĂRĂ SCHIMBĂRI (P=R)
Expresia genelor în P față de R este definită prin:				
+1 (1.0 – 5 ori)	<b>Slabă</b>	-1 (1.0 – 5 ori)	<b>Slabă</b>	< 1.0
+2 (5.1 – 10 ori)	<b>Moderată</b>	-2 (5.1 – 10 ori)	<b>Moderată</b>	
+3 (10.1 – 20 ori)	<b>Puternică</b>	-3 (10.1 – 20 ori)	<b>Puternică</b>	
+4 (> 20 ori)	<b>Foarte puternică</b>	-4 (> 20 ori)	<b>Foarte puternică</b>	

Notă: **P** – patologie; **R** – referință (fără patologie).

**Metode statistice de prelucrare a datelor.** Rezultatele obținute au fost supuse prelucrării statistice, prin utilizarea metodelor de analiză variațională și descriptivă, ce implică calcularea următorilor parametri: media aritmetică ( $\bar{x}$ ), mediana, dispersia eșantionului ( $s^2$ ), deviația standard (S), eroarea standard pentru valorile medii, coeficientul de variație (CV), amplitudinea absolută a variației ( $A_x$ ), estimarea intervalului de confidență (CI) de 99%, precum și a indicelui de probabilitate „p” etc. [18].

Pentru estimarea diferențelor semnificative privind expresia genelor s-a aplicat testul statistic non-parametric *Mann-Whitney*, recomandat în cazul când valorile nu sunt distribuite

*Gaussian* [14, 87]. O diferență veridică se atestă dacă coeficientul de semnificație statistică „p” a acestui test are valori mai mici de 0,05 (5%).

Variabilitatea expresiei genelor a fost definită prin coeficientul de variație, cu pragul de trecere de la omogenitate la eterogenitate de  $CV > 35\%$  [68]. A fost utilizat parametrul intervalul de variație definit prin raportul dintre valoarea maximă a expresiei relative a genei la valoarea minimă ( $X_{\max}/X_{\min}$ ) [88, 391].

Datele au fost prelucrate statistic cu ajutorul programelor de calculator: InfoStat (versiunea 2016, *InfoStat Group, Universiy Córdoba, Argentina*), Microsoft Excel (versiunea 2013), mediul de programare statistică „R” (versiunea 2.15.0).

### 2.3. Concluzii la capitolul 2

1. În baza unei metodologii de analiză exploratorie a datelor de expresie *microarray*, stocate în baza de date NCBI-GEO, pentru identificarea genelor asociate patologiilor cardiovasculare au fost selectate platformele **GPL570** (*Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array*) și **GPL8300** (*Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array*).

2. Aplicând seturile de date *microarray* selectate au fost definite patologiile cardiovasculare (stenoza aortică, cardiomiopatii primare, fibrilația atrială și cardiopatia ischemică), care au servit puncte de reper pentru trierea subiecților în vederea evaluării expresiei genelor prin qPCR.

3. În vederea identificării și evaluării expresiei genelor potențial implicate în BCV au fost utilizate următoarele metode: analiza exploratorie a datelor *microarray* stocate în baza de date NCBI-GEO, filtrarea și validarea rezultatelor obținute, extragerea ARN-ului total din sânge, spectrofotometria și electroforeza în gel de agaroză a ARN-ului, RT-PCR, PCR cantitativ, metode statistice de prelucrare a datelor, softuri specializate pentru elaborarea și validarea primerilor.

4. Metodologia generală a cercetării științifice este prezentată în Figura 2.3.

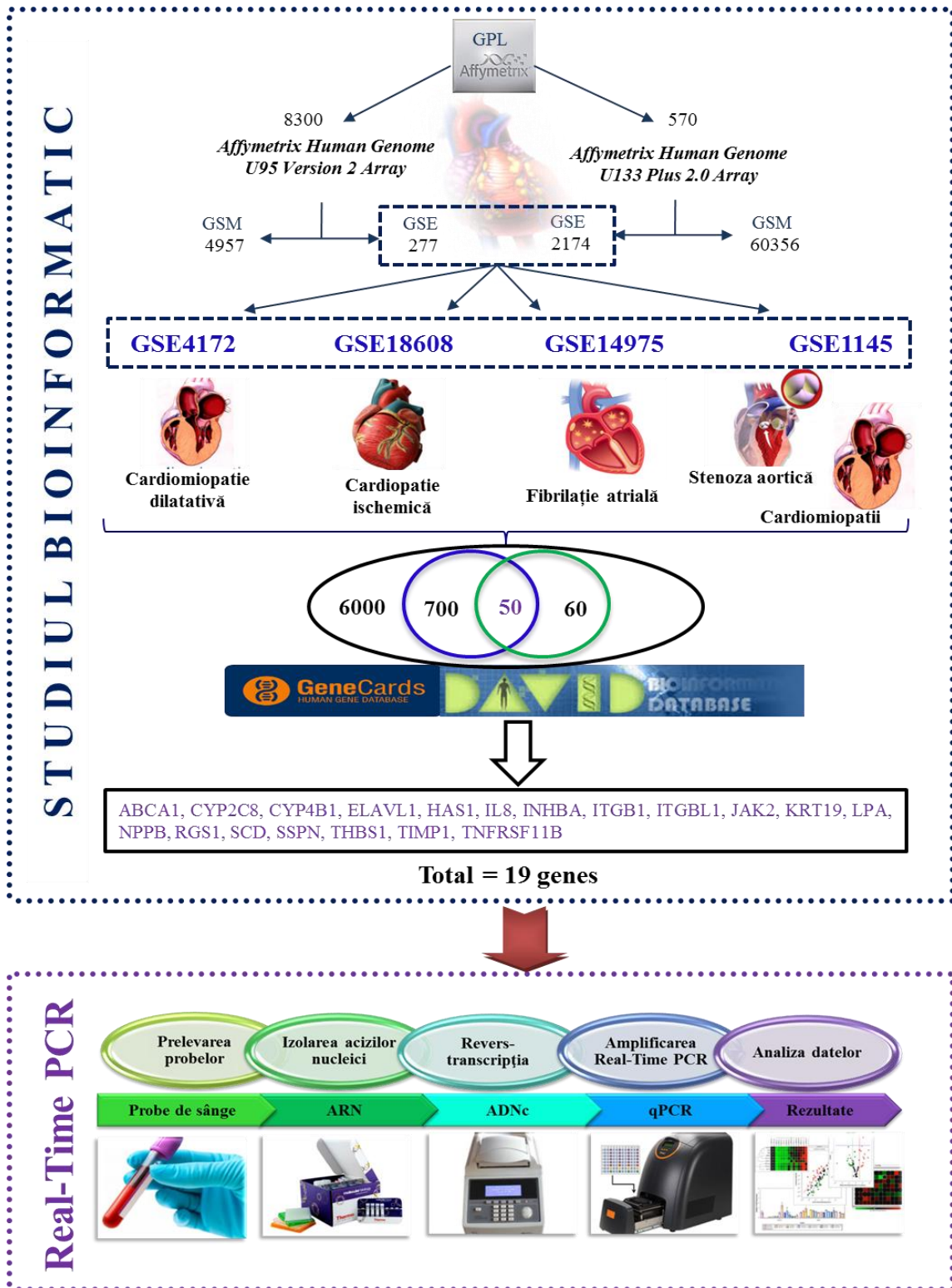


Fig. 2.3. Metodologia utilizată în studiul genelor potențial implicate în bolile cardiovasculare.



### 3. ANALIZA EXPLORATORIE A GENELOR CANDIDAT ÎN MANIFESTAREA UNOR PATOLOGII CARDIOVASCULARE

O perioadă îndelungată, cercetările în domeniul biologiei moleculare au fost limitate în ceea ce privește determinarea și cuantificarea expresiei genelor, însă dezvoltarea tehnologiei *microarray* a permis analiza simultană a expresiei a mii de gene în diferite condiții.

Studiul comparativ al datelor de expresie *microarray* reprezintă o cale eficientă pentru explicarea mecanismelor moleculare ce stau la baza proceselor biologice normale și/sau patologice, oferind o nouă abordare în studierea bolilor cardiovasculare.

Prin analize exploratorii sunt selectate cele mai potrivite instrumente statistice, care permit validarea ipotezelor referitoare la diverse fenomene, prin sumarizarea datelor, utilizând informații numerice, tabele sau vizualizări grafice. Studiile explorative sporesc gradul de înțelegere a unui set de date și oferă cercetătorului condiții suplimentare de selectare și manipulare a informației în dependență de scopul propus.

#### 3.1. Identificarea genelor candidat în manifestarea patologiilor cardiovasculare

Integrarea cunoștințelor obținute prin tehnologiile de tip *array*, în diferite laboratoare, prin aplicarea diferitor metode de extragere a datelor, induc o serie de erori. Din acest considerent, la înregistrarea seturilor în resursa *NCBI-GEO* este importantă indicarea tuturor informațiilor suplimentare care reprezintă metadata importante pentru analizele exploratorii.

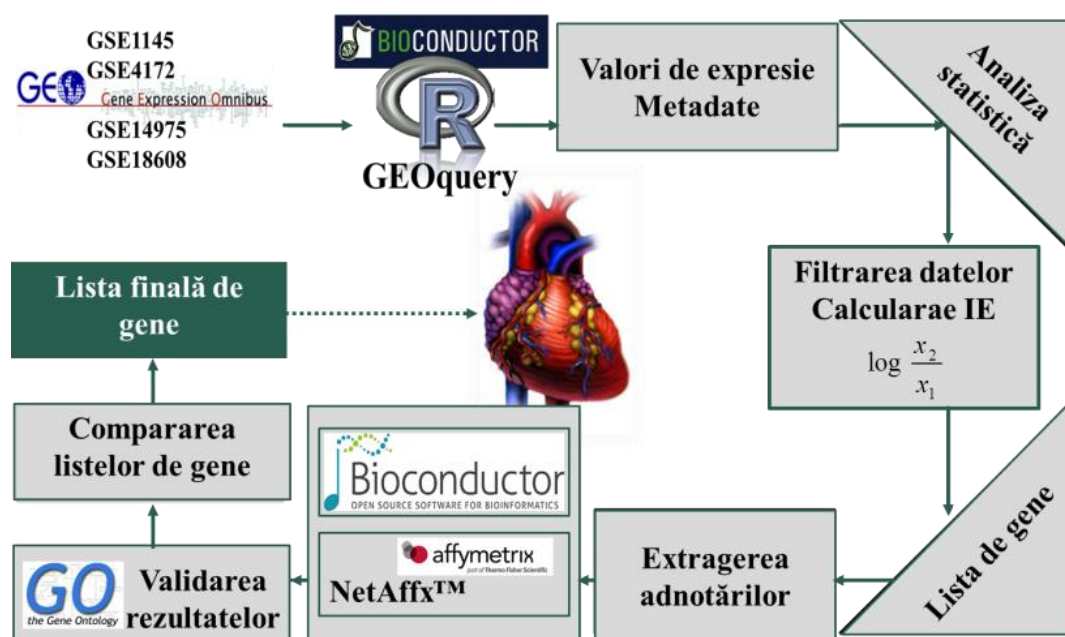


Fig. 3.1. Strategia de determinare a genelor candidat în producerea patologiilor cardiovasculare prin analiza metadatelor experiențelor *microarray* [202].

Utilizarea metadatelor reprezintă unul dintre obiectele de studiu în bioinformatică, în contextul în care aceste metode conduc la avansarea conceptelor biologice. Informațiile disponibile pot fi valorificate în momentul în care se cunoaște structura lor, a instrumentelor prin care ele pot fi integrate și analizate, sau în cazul în care se aplică o prelucrare statistică corespunzătoare pentru selectarea rezultatelor [1].

În studiul expresiei genelor, metadatele sunt indispensabile pentru identificarea datelor specifice, descărcarea seturilor cu date de interes și interpretarea rezultatelor, contribuind la obținerea cunoștințelor ce conduc la generarea de rezultate și ipoteze, care pot fi testate prin metodele analizei exploratorii.

Identificarea genelor candidat în manifestarea bolilor cardiovasculare s-a realizat în baza metodologiei de analiză a metadatelor experiențelor *microarray* [5, 202], adaptată conform structurii și a metadatelor seturilor de interes analizate în studiul respectiv (Figura 3.1).

**Investigarea platformelor și selectarea seturilor de date *microarray*.** În baza de date NCBI-GEO au fost analizate peste 3400 platforme (GPL) referitoare la testele efectuate pentru *Homo sapiens*, dintre care au fost selectate în baza descrierii experimentelor, doar platformele ce conțin date de expresie a genelor implicate în diferite patologii cardiovasculare. GPL-urile identificate au fost produse de diferite companii: *Affymetrix*, *Agilent Technologies*, *Illumina Inc.* etc. (Figura 3.2).

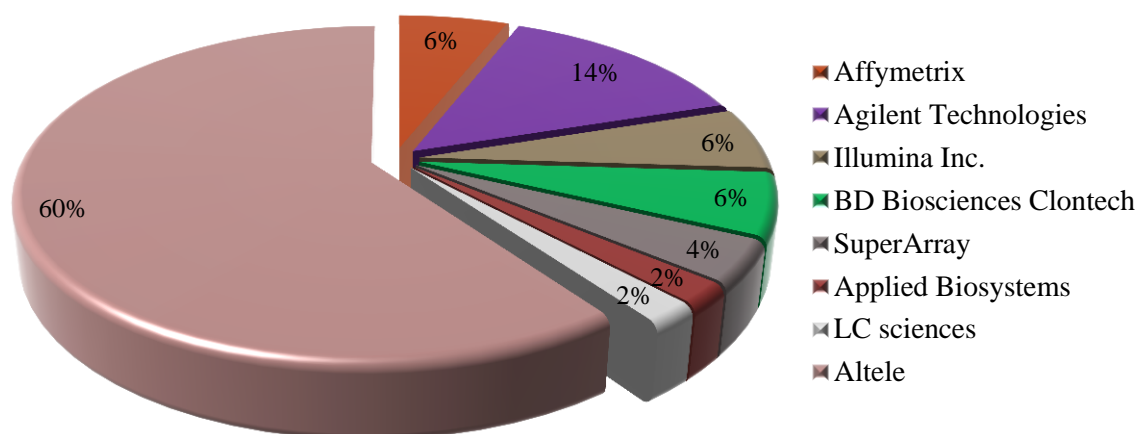


Fig. 3.2. Investigarea profilurilor de expresie *microarray*.

Pentru studiul genelor implicate în bolile cardiovasculare au fost selectate două platforme produse de Affymetrix: GPL 83000 – *Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array* și GPL570 – *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array*, care conțin aproximativ 12 mii și, respectiv, 54 mii gene (Figura 3.3.).

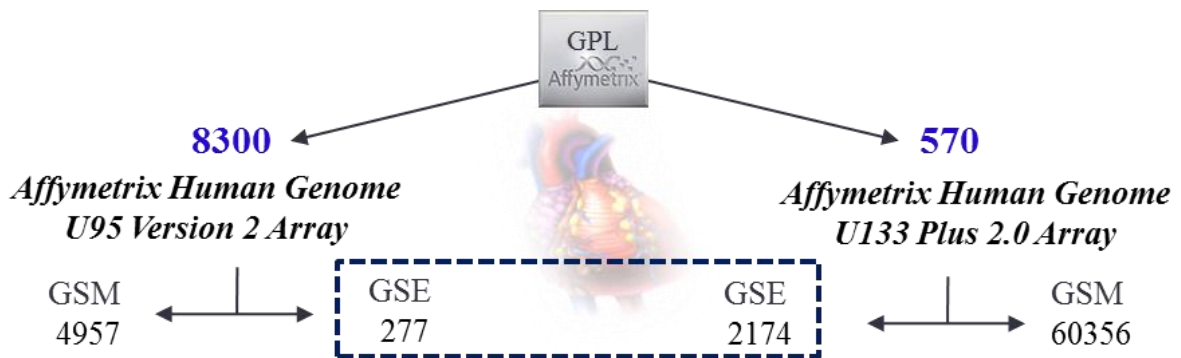


Fig. 3.3. Platformele *microarray* selectate pentru identificarea genelor potențial implicate în patologiile cardiovasculare [19].

Chipurile Affymetrix, elaborate în baza informațiilor obținute în urma secvențierii genomului uman, sunt generate pentru a acoperi numărul maximal de gene testate a unui genom, spre deosebire de cele Illumina sau altele care se axează preponderent pe polimorfismul punctiform. Totodată, metodologia de analiză și informațiile privind adnotarea genelor prezente pe chip este bine dezvoltată și utilizată pe larg în cercetările biomedicale.

Dintre toate platformele analizate, *GPL570* și *GPL8300* conțin cel mai mare număr de seturi de date și probe biologice (2 174 GSE, 60 356 GSM, respectiv, 277 GSE, 4957 GSM).

Filtrarea ulterioară a celor peste 2400 GSE a permis selectarea pentru cercetare a 4 seturi de date cu referință la bolile cardiovasculare: GSE4172, GSE1145, GSE14975, GSE18608 (Tabelul 3.1).

Pentru **GSE4172** a fost selectat întregul set de date (n=12), dintre care 4 GSM control: *GSM94870*, *GSM94855*, *GSM94854*, *GSM94831* și 8 GSM de la pacienții cu cardiomiopatie dilatativă inflamatorie: *GSM94843*, *GSM94842*, *GSM94841*, *GSM94840*, *GSM94839*, *GSM94838*, *GSM94837* și *GSM94836*.

Pentru **GSE14975** a fost selectat întregul set de date (n=10), dintre care 5 GSM control: *GSM373961*, *GSM373962*, *GSM373963*, *GSM373964*, *GSM373965* și 5 GSM de la pacienții cu fibrilație atrială: *GSM373956*, *GSM373957*, *GSM373958*, *GSM373959*, *GSM373960*.

Pentru **GSE18608** din 24 GSM au fost selectate 11 GSM, inclusiv 4 GSM control: *GSM462631*, *GSM462630*, *GSM462629*, *GSM462628* și 7 GSM de la pacienți cu CPI: *GSM462626*, *GSM462624*, *GSM462622*, *GSM462620*, *GSM462618*, *GSM462616*, *GSM462614*.

Pentru **GSE1145** au fost selectat întregul set de date (n=107), dintre care 17 GSM (inclusiv 4 GSM control, 13 GSM patologie) au fost selectate de pe GPL8300: *GSM25797*, *GSM25798*, *GSM25799*, *GSM25800*, *GSM25784*, *GSM25785*, *GSM25786*, *GSM25787*, *GSM25788*,

GSM25789, GSM25790, GSM25791, GSM25792, GSM25793, GSM25794, GSM25795, GSM25796 și 90 GSM (inclusiv 10 GSM control, 80 GSM patologii) au fost selectate de pe GPL570: *GSM18442, GSM18443, GSM18444, GSM18445, GSM18446, GSM18447, GSM18448, GSM18449, GSM18450, GSM18451, GSM18422, GSM18423, GSM18424, GSM18425, GSM18426, GSM18427, GSM18428, GSM18429, GSM18430, GSM18431, GSM18432, GSM18433, GSM18434, GSM18435, GSM18436, GSM18452, GSM18477, GSM18478, GSM18479, GSM18480, GSM18481, GSM18482, GSM18483, GSM18484, GSM18485, GSM18486, GSM18487, GSM25801, GSM25802, GSM25803, GSM25804, GSM25805, GSM25806, GSM25807, GSM25808, GSM25809, GSM25810, GSM25811, GSM25812, GSM25813, GSM25814, GSM25815, GSM25816, GSM25817, GSM25818, GSM25819, GSM25820, GSM25821, GSM25822, GSM25823, GSM25825, GSM25826, GSM25827, GSM25828, GSM25829, GSM25830, GSM25831, GSM25832, GSM25833, GSM25834, GSM25835, GSM25836, GSM25837, GSM25838, GSM25839, GSM25840, GSM25841, GSM25842, GSM25843, GSM25844, GSM25845, GSM25846, GSM25847, GSM25848, GSM25849, GSM25850, GSM25851, GSM25852, GSM25853, GSM25854.*

Tabelul 3.1.

Descrierea succintă a seturilor de date selectate pentru studiul genelor implicate în BCV

Codul GEO pentru setul de date	platformă	Titlul setului de date	Sumarul experienței	Nr.de probe	
				control	patologie
<b>GSE1145</b>	GPL8300 GPL570	Changes in cardiac transcription profiles brought about by heart failure	Rezultatele studiului oferă date despre profilul de expresie a genelor în stenoză aortică și diferite subtipuri de cardiomiopatii	4 10	13 80
<b>GSE14975</b> [20]	GPL570	Rac1-Induced Connective Tissue Growth Factor regulates Connexin 43 and N-Cadherin Expression in Atrial Fibrillation	A fost studiată transducția semnalelor în remodelarea atrială, care contribuie la patogeneza fibrilației atriale	5	5
<b>GSE18608</b> [216]	GPL570	Transcriptional Profiling of CD133+ Cells in Coronary Artery Disease and Effects of Exercise on Gene Expression	Au fost identificate genele expresate diferențiat în celulele CD133+ la pacienții cu cardiopatie ischemică	4	7
<b>GSE4172</b> [406]	GPL570	Gene expression profiling of human inflammatory Cardiomyopathy	Prin studiile de GWAS, au fost obținute profilurile de expresie pentru diferite subtipuri de cardiomiopatii	4	8

Pentru analizele ulterioare, GSE1145 de pe chipul GPL570 a fost comasat cu GSE4172, care conține valorile de expresie a genelor asociate cu diferite tipuri de cardiomiopatii.

Pentru fiecare din cele 4 GSE selectate din baza de date *NCBI-GEO* au fost extrase GSM, care descriu datele de expresie a genelor implicate în diferite patologii cardiovasculare (Figura 3.4).

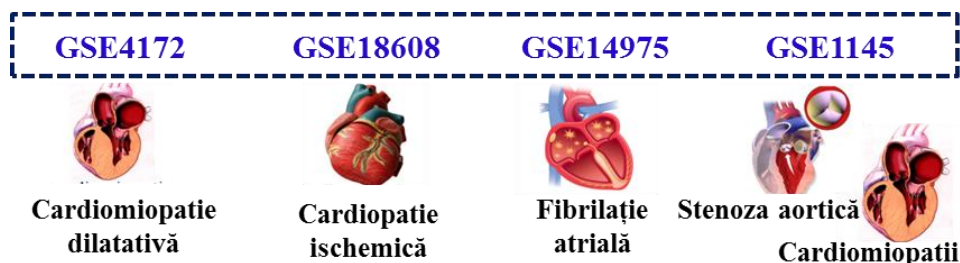


Fig. 3.4. Patologiile cardiovasculare incluse în seturile de date *microarray* selectate pentru identificarea genelor candidat [19].

**Analiza seturilor de date *microarray*.** Valorile de expresie pentru fiecare set de date au fost descărcate din baza de date *NCBI-GEO* cu ajutorul pachetului *GEOquery* [84]. Din considerentul că fișierele cu date *microarray* sunt voluminoase, iar conexiunea la Internet uneori este instabilă și cu viteză joasă, rapiditatea analizei este de obicei într-o situație critică. Prin urmare, fișierele au fost identificate și stocate local pe calculatorul de lucru.

Toate probele au fost realizate în mai multe repetiții biologice, ce a necesitat calcularea mediei replicărilor pentru fiecare probă. Astfel, aceste valori pot fi comparate între ele pentru a evidenția expresia unei gene în probe moleculare patologice, față de valoarea ei în stare normală.

Pentru estimarea efectului dat, valorile au fost transformate în *indice de expresie* (IE), ce reprezintă logaritmul raportului dintre valoarea expresiei în patologie față de control. Indicele de expresie a fost utilizat drept criteriu pentru stabilirea genelor de interes. Acestea se considerau genele cu expresie diferențiată, la care magnitudinea modificării expresiei a fost destul de mare.

În baza IE au fost obținute listele de gene pentru fiecare set de date. Pentru a stabili valoarea pragului de identificare a genelor cu expresie diferențiată a fost analizată asocierea valorilor IE cu numărul de rezultate filtrate definite ca diferențiat expresate (Figura 3.5).

Gradul de asociere, exprimat prin coeficientul de corelare, demonstrează o interdependență puternică negativă, ce semnifică că odată cu mărirea pragului IE se micșorează numărul de gene filtrate. În acest context, apare pericolul de a obține liste nule, fără careva gene asociate cu o anumită stare patologică.

Astfel, a fost stabilit empiric pragul pentru  $IE \geq 1$ , ceea ce semnifică modificarea expresiei genei de cel puțin 2 ori în cazul patologiei. Valorile pozitive relevă sporirea expresiei genelor în

cazul patologiei, iar valorile negative denotă diminuarea expresiei acestora. Totodată, pentru fiecare din patologii a fost posibil de a identifica un număr diferit de gene potențial specifice.

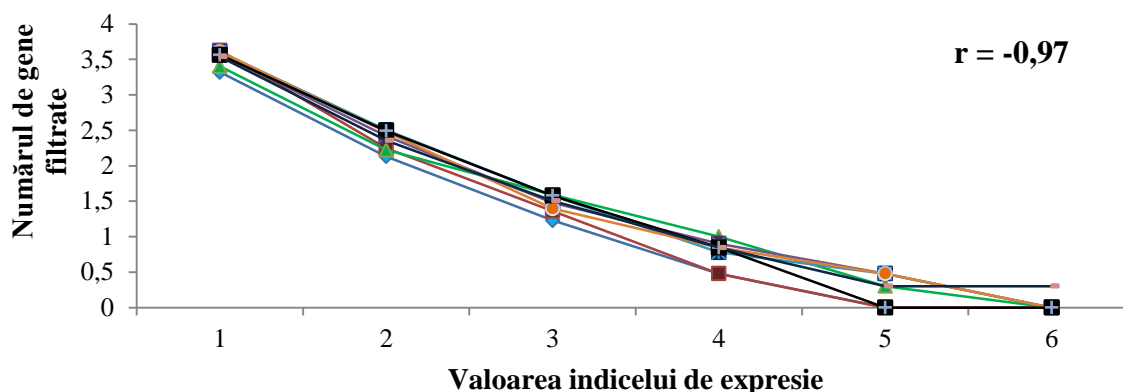


Fig. 3.5. Corelarea dintre indicile de expresie și numărul de gene filtrate.

Codurile de adnotare ale genelor care au depășit pragul de selectare au fost extrase utilizând instrumentul *NetAffy Analysis Center* (Affymetrix) și *Bioconductor*. Pentru genele care nu au fost adnotate în bazele de date, în studiu s-a utilizat codul de acces de pe chipul selectat. În calitate de identificator universal a fost utilizat codul unic de acces atribuit secvențelor din sistemul *Entrez* al Portalului *NCBI*.

**Validarea rezultatelor.** Validarea implicării în BCV a genelor, care au depășit pragul  $IE \geq 1$  a fost realizată prin utilizarea listelor de gene prioritar implicate și, respectiv, potențial implicate în patologiiile CV, elaborate de *Cardiovascular Gene Ontology Annotation Initiative*, care reprezintă o colaborare între *University College London* și *European Bioinformatics Institute* (EBI), finanțată de *British Heart Foundation* [429].

Conform *Cardiovascular GO Annotation Initiative* numărul genelor asociate patologieilor cardiovasculare este de aproximativ 4000 [431], dintre care 247 sunt prioritar implicate, iar restul sunt gene cu rol potențial în BCV [426].

Ontologia genelor (OG) reprezintă standardul stabilit pentru adnotarea funcțională a genelor. Utilizarea OG în organizarea literaturii științifice și integrarea rezultatelor obținute prin experimentele *high-throughput* de înaltă calitate, asigură crearea unei resurse bogate de informații pentru comunitatea științifică. Aceasta permite cercetătorilor să evalueze rapid și să interpreteze datele existente, dar și să genereze ipoteze pentru ghidarea studiilor ulterioare.

Peste 4000 de gene asociate cu patologiiile cardiovasculare au fost identificate ca ținte pentru adnotare cu termenii OG. Din această listă extinsă de gene asociate cu bolile cardiovasculare, o parte sunt în curs de prioritizare pentru adnotare, pe baza unor criterii cum ar

fi volumul literaturii biomedicale disponibile, implicarea în procesele cardiovasculare și a solicitărilor din partea comunității științifice din domeniul cardiovascular.

Etapa de validare a datelor filtrate conform  $IE \geq 1$  a permis identificarea și stabilirea genelor cu rol potențial și prioritar în patologii cardiovasculare (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2.  
Analiza seturilor de date *microarray*

Nr. total de probe	Numărul de gene					Indice de expresie (IE)
	cu expresie diminuată „-”	cu expresie sporită „+”	fără adnotare	potențial implicate în BCV	prioritar implicate în BCV	
<b>GSE18608, GPL570, cardiopatia ischemică</b>						
975	541	434	255	147	12	-3,14 – 2,23
<b>GSE14975, GPL570, fibrilația atrială</b>						
4542	2601	1941	1634	458	36	-3,93 – 4,77
<b>GSE1145, GPL8300, stenoza aortică</b>						
482	253	229	57	156	14	-2,89 – 3,93
<b>GSE4172/1145, GPL570, cardiomiopatii</b>						
89	62	89	62	14	1	-5,01 – 3,22
<b>6088</b>	<b>3457</b>	<b>2663</b>	<b>2008</b>	<b>775</b>	<b>63</b>	<b>Total</b>

S-a constatat că numărul de gene neafectate sau puțin afectate în cazurile patologice a fost de cel puțin 60000, iar celelalte, cca 6000, reprezintă gene candidat în manifestarea BCV, dintre care 3457 sunt gene cu expresie diminuată și 2663 cu expresie sporită. IE pentru aceste gene variază între -5,01 și 4,77. Conform *Cardiovascular GO Annotation Initiative*, dintre cele 6088 de gene candidat, 775 sunt potențial și 63 sunt prioritar implicate în BCV.

### 3.2. Stabilirea genelor cu expresie diferențiată în bolile cardiovasculare

În timpul apariției și progresiei bolii, au loc importante schimbări la nivelul expresiei genelor. Prin compararea profilurilor de expresie a genelor în diferite condiții, pot fi identificate gene individuale sau comune cu rol important în etiologia bolii. În studiul dat, genele cu expresie diferențiată se consideră a fi acelea care manifestă activitate transcripțională sporită într-un caz și, respectiv, diminuată în alt caz. În vederea identificării genelor cu expresie diferențiată în patologiile CV, în Figura 3.6. este reprezentată schematic modalitatea de comparare între ele a listelor de gene prioritar și, respectiv, potențial implicate, determinate pentru fiecare GSE, respectiv GSE18608 – cardiopatie ischemică, GSE14975 – fibrilația atrială, GSE1145 – stenoza aortică, GSE4172/1145 – cardiomiopatii.

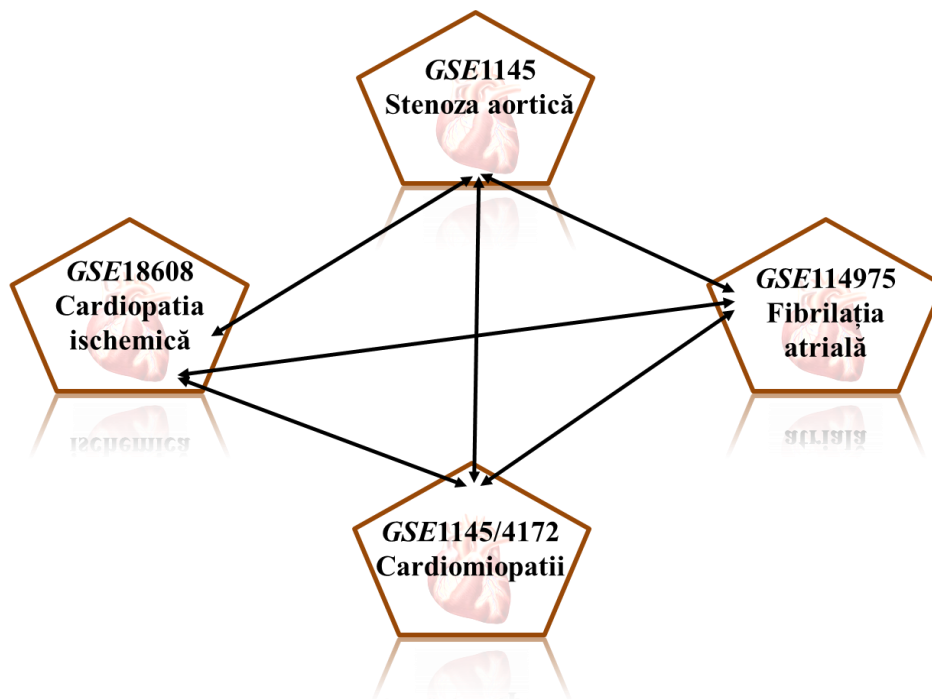


Fig. 3.6. Modalitatea de comparare a listelor de gene atribuite seturilor de date *microarray* selectate.

În rezultatul comparării listelor de gene selectate pentru FiA și CMP (Tabelul 3.3), s-a constatat că în ambele patologii genele *IL8*, *THBS1* și *SLC6A6* prezintă diminuarea expresiei, iar genele *SSPN* și *ITGBL1* – creșterea expresiei.

Tabelul 3.3.  
Compararea listelor de gene obținute pentru fibrilația atrială și cardiomiopatii

Nr. de acces <i>Entrez</i>	Simbolul genei	Indice de expresie
3576	<i>IL8</i>	Negativ
7057	<i>THBS1</i>	Negativ
6533	<i>SLC6A6</i>	Negativ
8082	<i>SSPN</i>	Pozitiv
9358	<i>ITGBL1</i>	Pozitiv

Aceste gene pot fi recomandate în calitate de indicatori în diagnosticul molecular al fibrilației atriale și cardiomiopatiilor față de celelalte patologii cardiovasculare prin valori înalte ale expresiei genelor *SSPN* și *ITGBL1* și a diminuării expresiei genelor *IL8*, *THBS1* și *SLC6A6* în cazul ambelor patologii.

Pentru fibrilația atrială și stenoza aortică au fost identificate 8 gene cu expresie sporită (*IL12RB2*, *LEF1*, *PCK1*, *MYH8*, *RBP4*, *SPOCK3*, *JAK2*, *PTGER3*) și 6 gene cu expresie diminuată (*KYNU*, *TLR6*, *LPA*, *MATN3*, *HBB*, *CYP4F11*, Tabelul 3.4).



Genele *CYP3A7*, *MET*, *ITGB6*, *GAD2* și *IHH* posedă o manifestare nespecifică pentru fibrilația atrială și stenoza aortică, din care cauză nu pot fi utilizate în calitate de biomarkeri în diagnosticul molecular.

Tabelul 3.4.  
Compararea listelor de gene obținute pentru fibrilația atrială și stenoza aortică

Nr. acces <i>Entrez</i>	Simbolul genei	IE	Nr. acces <i>Entrez</i>	Simbolul genei	IE	Nr. acces <i>Entrez</i>	Simbolul genei	IE
1056	<i>CEL</i>	-/+	10631	<i>POSTN</i>	+/-	4626	<i>MYH8</i>	Pozitiv
1305	<i>COL13A1</i>	+/-	3036	<i>HAS1</i>	-/+	5950	<i>RBP4</i>	Pozitiv
1551	<i>CYP3A7</i>	-/+*	5996	<i>RGS1</i>	-/+	50859	<i>SPOCK3</i>	Pozitiv
1580	<i>CYP4B1</i>	-/+	6299	<i>SALL1</i>	+/-	3717	<i>JAK2</i>	Pozitiv
4879	<i>NPPB</i>	-/+	6319	<i>SCD</i>	+/-	5733	<i>PTGER3</i>	Pozitiv
2263	<i>FGFR2</i>	-/+	23428	<i>SLC7A8</i>	-/+	8942	<i>KYNU</i>	Negativ
4233	<i>MET</i>	-/+*	6781	<i>STC1</i>	+/-	10333	<i>TLR6</i>	Negativ
3694	<i>ITGB6</i>	-/+*	7076	<i>TIMP1</i>	-/+	4018	<i>LPA</i>	Negativ
2572	<i>GAD2</i>	+/-*	3595	<i>IL12RB2</i>	Pozitiv	4148	<i>MATN3</i>	Negativ
3549	<i>IHH</i>	-/+*	51176	<i>LEF1</i>	Pozitiv	3043	<i>HBB</i>	Negativ
3880	<i>KRT19</i>	-/+	5105	<i>PCK1</i>	Pozitiv	57834	<i>CYP4F11</i>	Negativ

Notă: „, \*” – gene cu manifestare nespecifică în patologiiile date; **IE** – indice de expresie.

Genele *CEL*, *COL13A1*, *CYP4B1*, *NPPB*, *FGFR2*, *KRT19*, *POSTN*, *HAS1*, *RGS1*, *SALL1*, *SCD*, *SLC7A8*, *STC1* și *TIMP1* prezintă expresie diferențiată pentru patologiiile date, inclusiv genele *CEL*, *CYP4B1*, *NPPB*, *FGFR2*, *SCD* și *SLC7A8* manifestă sporirea expresiei pentru fibrilația atrială și, respectiv, diminuarea expresiei în stenoza aortică, iar *COL13A1*, *KRT19*, *POSTN*, *HAS1*, *RGS1*, *SALL1*, *STC1* și *TIMP1* prezintă sporirea expresiei în stenoza aortică și diminuarea expresiei în fibrilația atrială. Aceasta ar permite utilizarea lor în calitate de indicatori moleculari pentru diferențierea fibrilației atriale față de stenoza aortică, fibrilației atriale și a stenozei aortice față de cardiomiopatii și cardiopatie ischemică.

Etapă de comparare a listelor de gene obținute pentru stenoza aortică și cardiomiopatii a permis identificarea doar a genei *TNFRSF11B* care prezintă expresie sporită pentru stenoza aortică și diminuată pentru cardiomiopatii (Tabelul 3.5).

În cazul sporirii expresiei genei *TNFRSF11B*, se manifestă stenoza aortică, iar în cazul în care expresia genei date este diminuată, are loc dezvoltarea unei cardiomiopatii.

Tabelul 3.5.  
Compararea listelor de gene obținute pentru stenoza aortică și cardiomiopatii

Nr. de acces <i>Entrez</i>	Simbolul genei	Indice de expresie
4982	<i>TNFRSF11B</i>	+/-

În acest context, gena *TNFRSF11B* poate fi utilizată în calitate de indicator molecular al stenozei aortice față de cardiomiopatie, stenozei aortice și cardiomiopatiei față de fibrilația atrială și cardiopatie ischemică.

În cazul stenozei aortice și a cardiopatiei ischemice s-au identificat 2 gene cu expresie sporită (*KIF11* și *POSTN*) și o genă cu expresie diminuată (*ESR1*) pentru ambele patologii (Tabelul 3.6). Aceste gene pot fi recomandate pentru diagnosticul molecular al stenozei aortice și cardiopatiei ischemice față de celelalte 2 patologii cardiovasculare.

Totodată, 2 gene (*CYP2C8* și *ELAVL1*) pot fi recomandate pentru diferențierea stenozei aortice față de cardiopatia ischemică, datorită faptului că expresia genei *CYP2C8* crește în cazul stenozei aortice și scade în cazul cardiopatiei ischemice, iar a genei *ELAVL1* scade în stenoza aortică și sporește în cardiopatia ischemică.

Tabelul 3.6.

Compararea listelor de gene obținute pentru stenoza aortică și cardiopatia ischemică

Nr. de acces Entrez	Simbolul genei	Indice de expresie
1558	<i>CYP2C8</i>	+/-
1994	<i>ELAVL1</i>	-/+
2099	<i>ESR1</i>	Negativ
3832	<i>KIF11</i>	Pozitiv
10631	<i>POSTN</i>	Pozitiv

La această etapă au fost identificate 3 gene (*ABCA1*, *ACOX1*, *NCL*) cu expresie sporită pentru cardiopatia ischemică și fibrilația atrială, 5 gene (*CACNB2*, *CAMK4*, *COX4NB*, *LOX*, *PPOX*) cu expresie diminuată în ambele patologii și 7 gene (*ACSBG1*, *INHBA*, *ITGB1*, *NEU3*, *POSTN*, *THBS1*, *UPBI*) cu expresie diferențiată pentru patologii în cauză (Tabelul 3.7).

Tabelul 3.7.

Compararea listelor de gene candidat pentru cardiopatia ischemică și fibrilația atrială

Nr. de acces Entrez	Simbolul genei	Indice de expresie	Nr. de acces Entrez	Simbolul genei	Indice de expresie
23205	<i>ACSBG1</i>	-/+	19	<i>ABCA1</i>	Pozitiv
933	<i>CD22</i>	-/+*	5151	<i>ACOX1</i>	Pozitiv
3624	<i>INHBA</i>	+/-	57697	<i>NCL</i>	Pozitiv
3688	<i>ITGB1</i>	+/-	783	<i>CACNB2</i>	Negativ
10825	<i>NEU3</i>	+/-	814	<i>CAMK4</i>	Negativ
10631	<i>POSTN</i>	+/-	10328	<i>COX4NB</i>	Negativ
7057	<i>THBS1</i>	+/-	4015	<i>LOX</i>	Negativ
51733	<i>UPBI</i>	-/+	5498	<i>PPOX</i>	Negativ

Notă: „\*” – gene cu manifestare nespecifică în patologii date.

Genele *ACSBG1* și *UPBI* se disting prin expresie diminuată în cardiopatia ischemică și sporită în fibrilația atrială, iar genele *INHBA*, *ITGB1*, *NEU3*, *POSTN* și *THBS1* manifestă expresie majoră în cardiopatia ischemică și redusă în fibrilația atrială, ceea ce ne permite să constatăm că aceste gene pot fi recomandate pentru diferențierea patologiilor menționate între ele, cât și diagnosticul lor individual față de celelalte patologii.

Gena *CD22* are o manifestare nespecifică în aceste două patologii, având expresie sporită în cardiopatia ischemică și expresie atât sporită, cât și diminuată în fibrilația atrială, ceea ce ne indică că gena dată nu poate fi utilizată în diferențierea patologiilor analizate.

Compararea genelor validate pentru cardiopatia ischemică și cardiomiopatii a permis identificarea genei *THBS1*, ce prezintă expresie sporită în primul caz și expresie diminuată în cel de-al doilea caz (Tabelul 3.8).

Gena *THBS1* poate fi recomandată pentru diagnosticul molecular diferențiat al cardiopatiei ischemice față de cardiomiopatii și a cardiopatiei ischemice și cardiomiopatiilor față de celelalte patologii cardiovasculare.

Tabelul 3.8.

Compararea listelor de gene candidat pentru cardiopatia ischemică și cardiomiopatii

Nr. de acces Entrez	Simbolul genei	Indice de expresie
7057	<i>THBS1</i>	+/-

Generalizând etapa de comparare a listelor de gene validate între diferite patologii cardiovasculare, conform schemei indicate mai sus, s-au stabilit (Figura 3.7):

- 3 gene cu expresie diminuată și 2 gene cu expresie sporită pentru fibrilația atrială și cardiomiopatii;
- 6 gene cu expresie diminuată, 8 gene cu expresie sporită și 14 gene cu expresie diferențiată pentru fibrilația atrială și stenoza aortică;
- 1 genă cu expresie diferențiată pentru stenoza aortică și cardiomiopatii;
- 1 genă cu expresie diminuată, 2 gene cu expresie sporită și 2 gene cu expresie diferențiată pentru stenoza aortică și cardiopatia ischemică;
- 3 gene cu expresie sporită, 5 gene cu expresie diminuată și 7 gene cu expresie diferențiată pentru cardiopatia ischemică și fibrilația atrială;
- 1 genă cu expresie diferențiată pentru cardiopatia ischemică și cardiomiopatii;
- 6 gene cu manifestare nespecifică pentru aceste patologii.

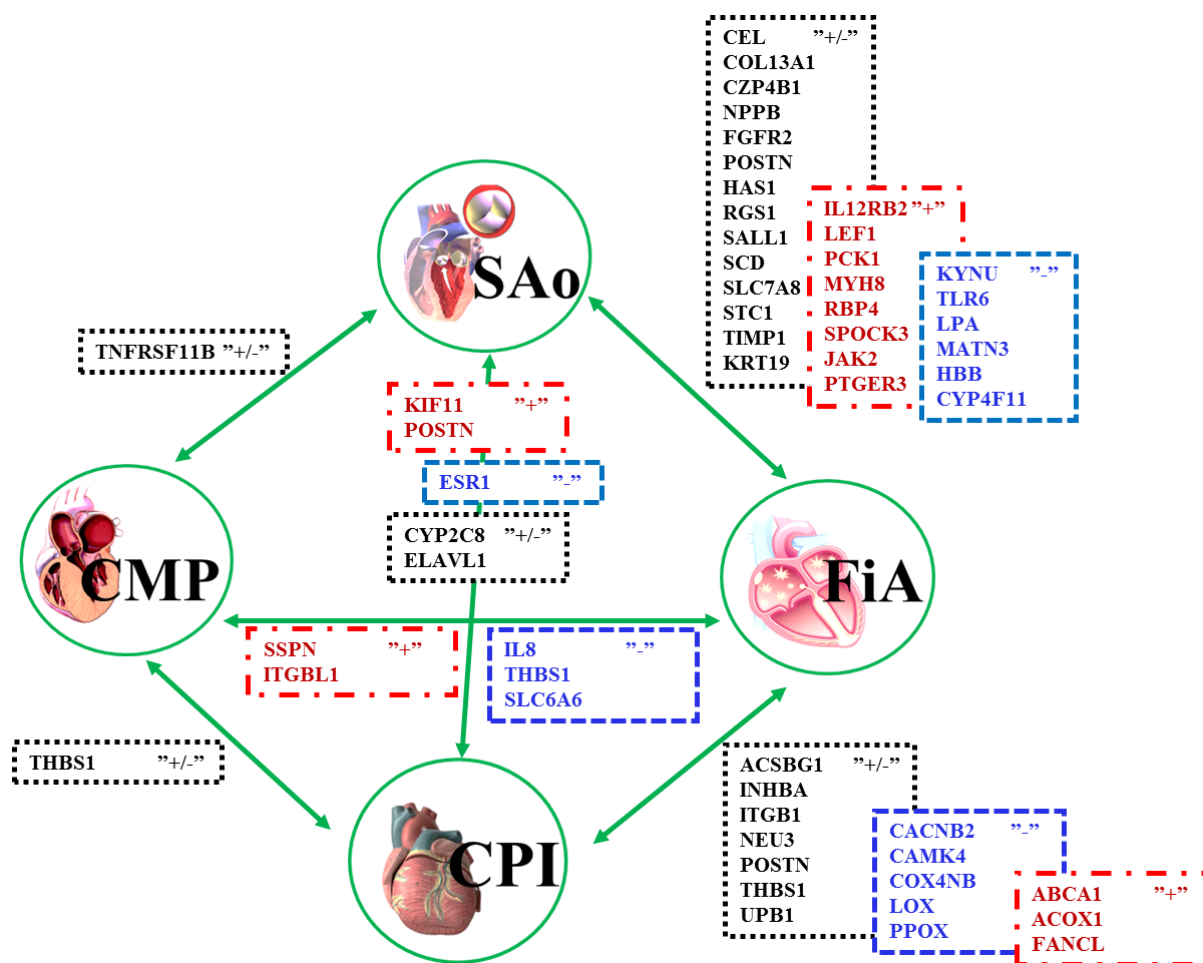


Fig. 3.7. Gene cu expresie modificată în patologiile cardiovasculare conform datelor *microarray*.  
 Notă: „-” diminuarea expresiei; „+” creșterea expresiei; „+/-” expresie diferențiată; *FiA* – fibrilația atrială; *CMP* – cardiomiopatii; *CPI* – cardiopatia ischemică; *SAo* – stenoza aortică.

În rezultatul comparării listelor de gene filtrate și validate pentru fiecare din GSE-urile selectate pentru analiza valorilor de expresie *microarray* au fost identificate 55 de gene, inclusiv 15 gene cu expresie diminuată, 15 cu expresie sporită și 25 cu expresie diferențiată pentru patologiile studiate.

### 3.3. Selectarea genelor pentru studiul activității transcripționale

În corespundere cu scopul lucrării, pentru evaluarea expresiei genelor candidat, din cele 55 de gene, utilizând *GeneCards* și *DAVID Bioinformatics Resources*, au fost selectate 19 gene, dintre care 5 cu rol prioritar (*NPPB*, *SCD*, *ABCA1*, *THBS1*, *LPA*) și 14 cu rol potențial (*ELAVL1*, *IL8*, *INHBA*, *JAK2*, *TIMP1*, *TNFRSF11B*, *SSPN*, *ITGB1*, *ITGBL1*, *CYP2C8*, *HAS1*, *CYP4B1*, *KRT19*, *RGS1*) în patologiile cardiovasculare (Tabelul 3.9). În aspectul descrierii căilor metabolice în care sunt implicate genele de interes, analiza *Pathway enrichment* a fost realizată

cu ajutorul instrumentului *Functional Annotation* în baza resursei DAVID – The *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* [436].

Tabelul 3.9.

Genele potențial și prioritar implicate în patologiile cardiovasculare [19]

SIMBOLUL GENEI	Nr. DE ACCES <i>ENTREZ</i>	DENUMIREA GENEI
<i>CYP2C8</i> <sup>1</sup>	1558	cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8
<i>CYP4B1</i> <sup>1</sup>	1580	cytochrome P450 family 4 subfamily B member 1
<i>ELAVL1</i> <sup>1</sup>	1994	ELAV like RNA binding protein 1
<i>IL8/CXCL8</i> <sup>1</sup>	3576	C-X-C motif chemokine ligand 8
<i>INHBA</i> <sup>1</sup>	3624	inhibin beta A
<i>ITGB1</i> <sup>1</sup>	3688	integrin subunit beta 1
<i>ITGBL1</i> <sup>1</sup>	9358	integrin subunit beta like 1
<i>JAK2</i> <sup>1</sup>	3717	janus kinase 2
<i>SSPN</i> <sup>1</sup>	8082	sarcospan
<i>TIMP1</i> <sup>1</sup>	7076	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
<i>TNFRSF11B</i> <sup>1</sup>	4982	tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b
<i>KRT19</i> <sup>1</sup>	3880	keratin 19
<i>HASI</i> <sup>1</sup>	15116	hyaluronan synthase 1
<i>RGS1</i> <sup>1</sup>	5996	regulator of G-protein signaling 1
<i>ABCA1</i> <sup>2</sup>	19	ATP binding cassette subfamily A member 1
<i>LPA</i> <sup>2</sup>	4018	lipoprotein(a)
<i>NPPB</i> <sup>2</sup> ( <i>BNP</i> )	4879	natriuretic peptide B
<i>SCD</i> <sup>2</sup>	6319	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
<i>THBS1</i> <sup>2</sup>	7057	thrombospondin 1

Notă: <sup>1</sup> – gene potențial implicate în BCV; <sup>2</sup> – gene prioritar implicate în BCV; *Entrez ID* – numărul de acces al genei.

Noțiunea de „*enrichment analysis*” este binevenită în cazul în care se dorește să se atribuie o semnificație biologică unui grup de gene. Interogarea realizată cu suportul DAVID – *Functional Annotation* s-a bazat pe adnotările disponibile în baza de date KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) [438]. Pentru a evita valorile fals pozitive, s-a analizat valoarea *p*. Rezultatele s-au filtrat utilizând metoda de corecție *Bonferroni* ( $p < 0.05$ ) [367].

Investigarea resurselor *KEGG* a permis identificarea a 100 de căi metabolice pentru 13 gene din setul de interes, fiind descrisă informația implicării acestora în mai multe (de la una la douăzeci și patru) căi metabolice.

Până la momentul de față, pentru 6 din genele de interes (*CYP4B1*, *ITGBL1*, *SSPN*, *KRT19*, *HASI*, *RGS1*) în baza de date KEGG nu au fost descrise căi metabolice în care acestea să fie implicate.

Rezultatele încadrează genele în următoarele clase *KEGG*:

- metabolism (*SCD*, *CYP2C8*);

- procesarea informațiilor legate de mediul înconjurător (*SCD, JAK2, ABCA1, IL8, TIMP1, LPA, TNFRSF11B, THBS1, NPPB, INHBA, ELAVL1, ITGB1*);
- sisteme de organe (*ITGB1, INHBA, JAK2, LPA, THBS1*);
- procese celulare (*SCD, JAK2, ABCA1, IL8, LPA, TNFRSF11B, CYP2C8, ITGB1*);
- boli (*JAK2, IL8, LPA, THBS1, CYP2C8, ITGB1*), dintre care gena *ITGB1* implicată nemijlocit în bolile cardiovasculare.

Grupul cu cele mai multe rezultate se referă la clasa *Procesarea informațiilor legate de mediul înconjurător*, acesta include 12 gene care au fost identificate în 23 căi KEGG. Analiza căilor identificate descrie încadrarea lor în 2 categorii de bază ale acestei clase: transducția semnalului biologic și molecule de semnalizare celulară.

Cele mai frecvente căi metabolice în care se regăsesc genele de interes sunt: *Cytokine-cytokine receptor interaction, Chemokine signaling pathway, Phagosome, PI3K-Akt signaling pathway, AMPK signaling pathway, TGF-beta signaling pathway, Focal adhesion, ECM-receptor interaction, Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells*.

Având în vedere că reprezentarea datelor sub formă de rețele contribuie la elucidarea mecanismelor moleculare ce determină fenotipul și permite formularea de noi ipoteze care urmează a fi confirmate experimental, au fost elaborate rețele biologice de interacțiune între genele de interes (Figura 3.8) și, respectiv, dintre gene și bolile cardiovasculare (Figura 3.9).

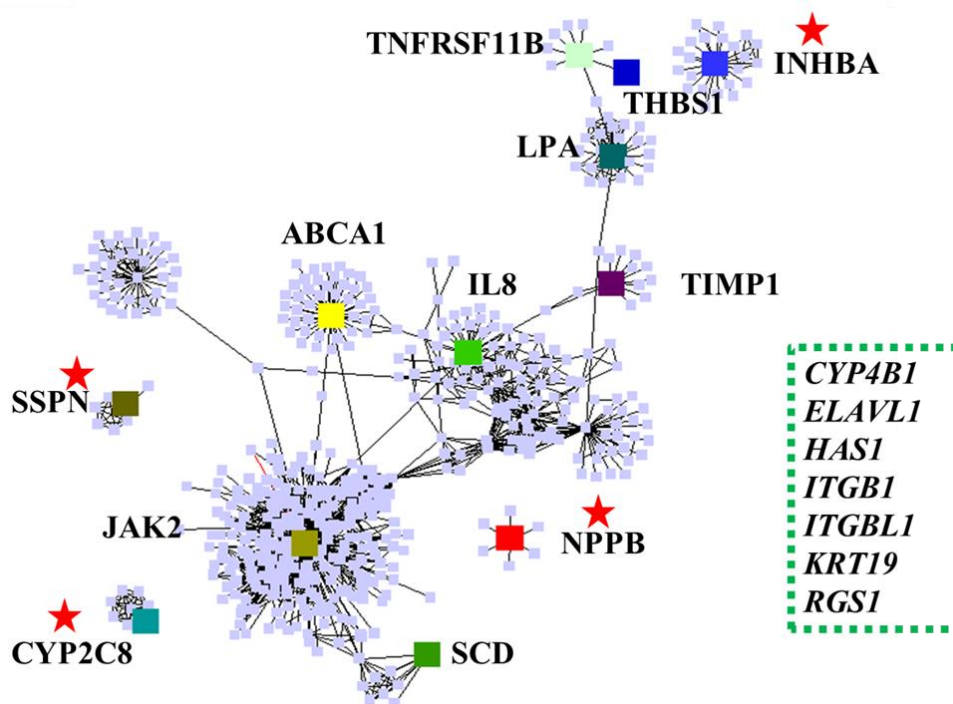


Fig. 3.8. Rețea biologică de interacțiune dintre genele de interes.

Notă: Genele marcate cu *steluță* formează clusterse individuale; genele din *boxă* nu interacționează în rețea.

În primul caz, utilizând programul *Cytoscape* (versiunea 3.4.0) a fost generată o rețea cu 5 clustere: 8 gene (*SCD*, *JAK2*, *ABCA1*, *IL8*, *TIMP1*, *LPA*, *TNFRSF11B* și *THBS1*), dintre care trei sunt prioritare în manifestarea BCV, s-au grupat într-un singur cluster, 4 gene (*SSPN*, *CYP2C8*, *NPPB* și *INHBA*), dintre care două prioritare, au creat clustere individuale, iar 7 (*CYP4B1*, *ELAVL1*, *HAS1*, *ITGB1*, *ITGBL1*, *KRT19* și *RGS1*) nu se regăsesc în cadrul rețelei.

Majoritatea genelor care interacționează în cadrul rețelei, dar și cele care formează clustere individuale sunt implicate în procesarea informațiilor legate de mediul înconjurător și participă în transducția semnalelor biologice.

În baza de date *KEGG*, pentru genele care nu se regăsesc în cadrul rețelei, sunt descrise căi metabolice doar pentru gena *ELAVL1* implicată în calea de semnalizare mediată de AMPK și gena *ITGB1* care intervine în căile biologice de apariție și dezvoltare a diferitor tipuri de cardiomiopatii.

În al doilea caz, rețeaua de asociere a genelor cu bolile sistemului circulator a fost construită prin utilizarea aplicației *DisGeNET* (versiunea 4.0) [299], funcția *Gene Diseases Network*, opțiunile: *CURATED source* (surse de încredere), *any associated type*, *cardiovascular diseases class*, iar vizualizarea acestuia s-a efectuat în programul *Cytoscape* (versiunea 3.4.0).

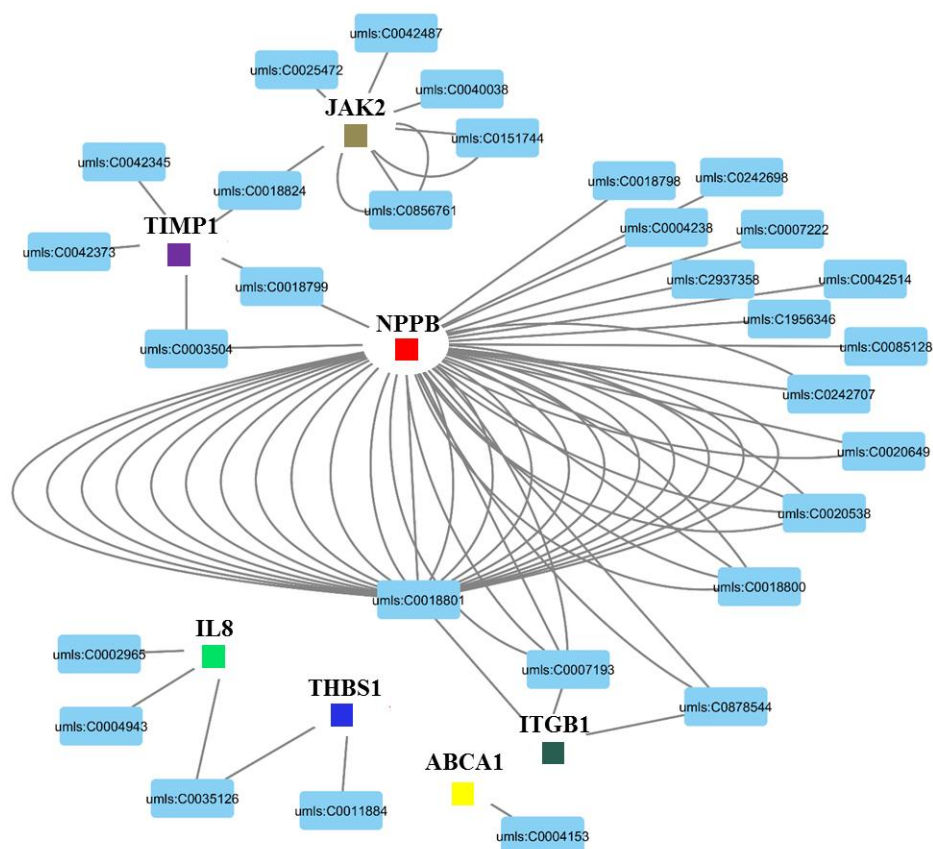


Fig. 3.9. Rețea biologică de asociere dintre genele de interes și patologii cardiovasculare.

Notă: *dreptunghi* – codul patologiei; *liniile* reprezintă asocierile de tipul genă-patologie.

Rezultatele au generat o rețea din 7 noduri și 37 de conexiuni, care în cele din urmă a fost supusă analizei în vederea evidențierii genelor implicate în patologiile cardiovasculare și identificării maladiilor puternic interconectate cu genele de interes (Tabelul 3.10).

Tabelul 3.10.

Genele de interes și patologiile cardiovasculare identificate în cadrul rețelei moleculare

Entrez ID	Simbolul genei	Codul patologiei		
4879	<b><i>NPPB</i></b> (17)	uums:C0020649	Hipotensiune	
		uums:C1956346	Cardiopatia ischemică	
		uums:C2937358	Hemoragie cerebrală	
		uums:C0242707	Disfuncția ventriculului drept	
		uums:C0018800	Cardiomegalie	
		uums:C0020538	Boală hipertensivă	
		uums:C0242698	Disfuncția ventriculului stâng	
		uums:C0004238	Fibrilația atrială	
		uums:C0007222	Boli cardiovasculare	
		uums:C0018798	Malformații cardiace congenitale	
		uums:C0085128	Debit cardiac, crescut	
		uums:C0042514	Tahicardia ventriculară	
		uums:C0018801	Insuficiența cardiacă	<i>ITGB1</i> *
		uums:C0878544	Cardiomiopatii	<i>ITGB1</i> *
uums:C0007193	Cardiomiopatie dilatativă	<i>ITGB1</i> *		
uums:C0003504	Insuficiența valvei aortice	<i>TIMP1</i> *		
uums:C0018799	Boli ale inimii	<i>TIMP1</i> *		
3717	<b><i>JAK2</i></b> (6)	uums:C0040038	Tromboembolism	
		uums:C0151744	Ischemie miocardică	
		uums:C0042487	Tromboza venoasă	
		uums:C0025472	Ischemia mezenterică	
		uums:C0856761	Sindromul Budd-Chiari	
uums:C0018824	Boli ale valvelor inimii	<i>TIMP1</i> *		
7076	<b><i>TIMP1</i></b> (5)	uums:C0042345	Varicele (varicoza)	
		uums:C0042373	Boli vasculare	
		uums:C0018824	Boli ale valvelor inimii	<i>JAK2</i> *
		uums:C0003504	Insuficiența valvei aortice	<i>NPPB</i> *
uums:C0018799	Boli ale inimii	<i>NPPB</i> *		
3688	<b><i>ITGB1</i></b> (3)	uums:C0018801	Insuficiența cardiacă	<i>NPPB</i> *
		uums:C0878544	Cardiomiopatii	<i>NPPB</i> *
		uums:C0007193	Cardiomiopatie dilatativă	<i>NPPB</i> *
3576	<b><i>IL8/ CXCL8</i></b> (3)	uums:C0002965	Angina pectorala instabilă	
		uums:C0004943	Sindromul Behcet	
		uums:C0035126	Leziune de ischemic/reperfuzie miocardica	<i>THBS1</i> *
7057	<b><i>THBS1</i></b> (2)	uums:C0011884	Retinopatia diabetică	
		uums:C0035126	Leziune de ischemie/reperfuzie miocardica	
19	<b><i>ABCA1</i></b> (1)	uums:C0004153	Ateroscleroza	

Notă: **uums:Cxxxxxx** – identificator unic pentru fiecare boală conform *Unified Medical Language System* (UMLS); în paranteze rotunde ( ) este indicat numărul de conexiuni în rețea pentru gena respectivă; **Entrez ID** – numărul de acces al genei; \*gene comune asociate cu patologia cardiovasculară.

Din numărul total de 18 gene de interes au fost identificate 7 (prioritare *NPPB*, *THBS1*, *ABCA1*, potențiale *IL8*, *JAK2*, *TIMP1*, *ITGB1*) aflate la baza unor noduri de legătură cu 30 de maladii cardiovasculare, printre care: cardiopatia ischemică, fibrilația atrială, cardiomiopatii, boli



ale valvelor inimii, malformații cardiace congenitale, ateroscleroza etc. Printre genele asociate cu maladiile cardiovasculare se enumeră: 2 molecule de semnalizare – *NPPB*, *IL8 (CXCL8)*; o kinază implicată în semnalizarea intracelulară – *JAK2*; un modulator al activității enzimatică – *TIMPI*; două molecule de adeziune – *ITGB1*, *THBS1*; un membru al familiei de gene transportoare ABC implicată în controlul fluxului de colesterol: *ABCA1*. Cu o frecvență înaltă, în rețeaua descrisă, este relevantă gena *NPPB*, legată cu 17 maladii cardiovasculare, inclusiv: cardiopatia ischemică, fibrilația atrială, insuficiența valvei aortice, malformații cardiace congenitale etc.

Pe fluxul de publicații *PubMed*, *OMIM*, *Mendeley*, *SpringerLink*, *Portalul WorldWideScience*, studiile privind implicarea acestor gene în bolile cardiovasculare, pe baza nivelului de activitate transcripțională sunt relativ puține, pentru unele dintre aceste gene fiind găsite doar studii pe modele animale. Astfel, aceste rezultate facilitează integrarea și sistematizarea cunoștințelor referitoare la factorii genetici, ceea ce a permis de a constata că genele selectate prezintă interes pentru studierea activității transcripționale prin faptul că 7 dintre ele, inclusiv 3 prioritare s-au asociat cu diferite patologii CV, 12 gene formează subrețele în dependență de interacțiunile funcționale dintre ele, majoritatea fiind implicate în transducția semnalelor biologice, metabolismul lipidelor, comunicarea intercelulară. Genele *KRT19*, *HAS1*, *ITGBL1*, *RGS1*, *CYP4B1*, care nu se regăsesc în cadrul celor două rețele, dar și gena *SSPN* sunt lipsite de dovezi concludente privind rolul lor în bolile cardiovasculare, fiind incluse în studiul activității transcripționale la subiecți cu maladii cardiovasculare pentru prima dată.

### **3.4. Concluzii la capitolul 3**

1. Analiza exploratorie a profilurilor de expresie *microarray*, stocate în baza de date NCBI-GEO, axată pe selectarea unor instrumente statistice potrivite și strategii de filtrare a datelor a permis de a identifica, din 66 mii de gene de pe platformele *microarray* GPL8300/570, a 6088 gene candidat implicate în manifestarea bolilor cardiovasculare, dintre care 3457 sunt gene cu expresie diminuată și 2663 cu expresie sporită.

2. Validarea genelor candidat conform listelor de gene prioritar și, respectiv, potențial implicate în bolile cardiovasculare, propuse de *Cardiovascular GO Annotation Initiative* a pus în evidență 775 gene potențial și 63 gene prioritar implicate în aceste maladii.

3. Compararea listelor de gene potențiale, între fibrilația atrială, cardiopatia ischemică, stenoza aortică, cardiomiopatii, a pus în evidență 55 de gene, inclusiv 15 cu expresie diminuată, 15 cu expresie sporită și 25 gene cu expresie diferențiată pentru patologiile studiate.

4. Utilizarea instrumentelor bioinformaticice a permis selectarea a 19 gene, dintre care 5 prioritare și 14 potențiale, în vederea evaluării activității transcripționale pe un eșantion de bolnavi cu maladii cardiovasculare din Republica Moldova.

5. Analiza rețelelor biologice, privind genele selectate pentru evaluarea conținutului de transcripți, a pus în evidență genele *TNFRSF11B*, *ITGBL1*, *IL8*, *TIMP1*, *THBS1*, *JAK2*, *ELAVL1*, *SCD*, *NPPB*, *INHBA*, *ABCA1*, *CYP2C8* care se regăsesc atât în cadrul rețelei de interacțiune dintre factorii ereditari, cât și de asociere cu patologiile cardiovasculare, dovadă a rolului potențial în patogeneza acestor maladii, iar genele *KRT19*, *HAS1*, *ITGBL1*, *RGS1*, *CYP4B1*, *SSPN*, care nu s-au regăsit în aceste rețele, denotă faptul că sunt mai puțin studiate și de asemenea prezintă interes pentru cercetare.

#### **4. VARIABILITATEA NIVELULUI DE EXPRESIE AL GENELOR CANDIDAT ÎN MANIFESTAREA BOLILOR CARDIOVASCULARE**

Investigațiile privind expresia genelor asociate cu starea de boală și aplicabilitatea acestora în programele de diagnostic, depinde de cunoașterea și înțelegerea variației normale în cadrul și între indivizi, în funcție de diferiți factori: vârstă, gen, etnie, țesut, ciclul celular etc. [160]. Determinarea activității transcripționale în celulele bolnave comparativ cu cele sănătoase este utilă pentru identificarea genelor implicate în maladii și clarificarea mecanismelor moleculare ale acestora, ceea ce poate oferi indicii în privința unei intervenții terapeutice eficiente.

În această ordine de idei, în lucrare a fost analizată variația nivelului relativ de expresie al genelor, având în vedere vârsta subiecților (copii și adulți) și starea organismului (stare patologică și stare de sănătate, „*de bine*”). Expresia relativă a genelor de interes pentru fiecare subiect din cadrul acestor grupe este prezentată în rubrica *ANEXE* (1-18).

##### **4.1. Activitatea transcripțională a genelor la adulți și copii**

Expresia informației genetice se realizează în toate celulele pe baza unui flux informațional, unidirecțional și universal, care se conformează dogmei centrale a geneticii: ADN → ARNm → polipeptid (proteină). Indiferent de structura și funcția lor, celulele corpului uman posedă aceeași informație genetică, însă expresia genică este diferită. Unele gene sunt exprimate continuu (gene *housekeeping*), în toate tipurile de celule, alte gene au o expresie specific tisulară sau celulară, iar o parte dintre ele sunt complet și permanent inactivate [48, 227]. Prin urmare, expresia genelor este adaptată la natura și intensitatea stimulilor extracelulari, prezintă o limitare spațială – specifică unor organe, țesuturi și celule [48, 227] și temporală – în funcție de stadiile dezvoltării, diferențierii și ciclului celular [24, 48], ceea ce presupune intervenția unor mecanisme complexe de control a procesului de transcripție.

Spre deosebire de mecanismele de reglare ale expresiei genelor la procariote, bazate pe celebrul model al operonului, la eucariote, inclusiv la om, acest proces este mult mai dificil din cauza dimensiunii enorme a genomului nuclear și compactării în fibre de cromatină. Din aceste considerente, la fiecare etapă a expresiei genelor acționează mecanisme de reglare, care ajustează viteza și intensitatea reacției la diferiți factori [24].

Etapa principală de reglare a expresiei se desfășoară în toate celulele la nivelul inițierii transcripției ADN-ului și implică interacțiunea unor factori trans-reglatori [205] cu secvențele specifice de pe ADN (elemente cis-reglatoare), care determină transcripția specifică a anumitor gene, într-un anumit moment, pentru a produce o cantitate adecvată de proteină.

Mecanismele de reglare a expresiei genelor, care intervin post-transcripțional, modifică calitativ sau cantitativ formarea ARNm matur prin *splicing* sau poliadenilare alternativă [263], astfel încât o singură genă codifică mai multe proteine.

Totodată, controlul expresiei genice poate fi influențat de modificările epigenetice – reglare pretranscripțională [145, 275] și de mecanisme de reglare la distanță prin structura cromatinei. În acest context, studiile privind activitatea transcripțională în raport cu vârsta sunt importante pentru înțelegerea și edificarea mecanismelor de reglare a expresiei genelor, dezvoltarea strategiilor de prevenire a riscului și eficientizării tratamentului personalizat.

### Expresia genelor la lotul de adulți și copii

Analiza expresiei relative a genelor la lotul de adulți și copii *sănătoși* a relevat valori diferențiate pentru toate cele 18 gene analizate, dintre care 17 (*ITGB1*, *TIMP1*, *THBS1*, *INHBA*, *NPPB*, *JAK2*, *TNFRSF11B*, *HAS1*, *CYP2C8*, *CYP4B1*, *KRT19*, *SSPN*, *SCD*, *ELAVL1*, *RGS1*, *ABCA1*, *ITGBL1*) au manifestat o expresie mai mare la adulți comparativ cu lotul de copii și o singură genă (*IL8*) a prezentat un nivel mai mic (Tabelul 4.1. A).

Tabelul 4.1.  
Nivelul de expresie a genelor la adulți și copii

GENE	A SĂNĂTOȘI		B PATOLOGIE	
	Adulți	Copii	Adulți	Copii
<i>ITGB1</i>	■	▬	■	▬
<i>TIMP1</i>	■	▬	■	▬
<i>THBS1</i>	■	▬	■	▬
<i>INHBA</i>	■	▬	■	▬
<i>NPPB</i>	■	▬	■	▬
<i>JAK2</i>	■	▬	■	▬
<i>IL8</i>	▬	■	▬	■
<i>TNFRSF11B</i>	■	▬	■	▬
<i>HAS1</i>	■	▬	▬	■
<i>CYP2C8</i>	■	▬	▬	■
<i>CYP4B1</i>	■	▬	▬	■
<i>KRT19</i>	■	▬	▬	■
<i>SSPN</i>	■	▬	▬	■
<i>SCD</i>	■	▬	▬	■
<i>ELAVL1</i>	■	▬	▬	■
<i>RGS1</i>	■	▬	▬	■
<i>ABCA1</i>	■	▬	▬	■
<i>ITGBL1</i>	■	▬	▬	■

Notă:

Expresie

▬ Diminuată

■ Sporită

Rezultatele obținute demonstrează că la adulții sănătoși activitatea genelor este mai mare comparativ cu copiii, ceea ce denotă o expresie diferențiată temporal.

La adulții și copiii *bolnavi* s-a stabilit expresia diferită a 17 dintre genele analizate, dintre care 11 (*IL8*, *HAS1*, *CYP2C8*, *CYP4B1*, *KRT19*, *SSPN*, *SCD*, *ELAVLI*, *RGS1*, *ABCA1*, *ITGBL1*) au manifestat un nivel mai scăzut al expresiei la adulți față de copii, 6 gene (*ITGB1*, *TIMP1*, *THBS1*, *INHBA*, *NPPB*, *JAK2*) au prezentat valori mai înalte, iar pentru gena *TNFRSF11B* nu s-au remarcat diferențe. Conform datelor obținute se constată că activitatea transcripțională a genelor analizate variază în funcție de fenotipul clinic (Tabelul 4.1. B).

Estimarea comparativă a expresiei relative a genelor, la adulți și copii, *indiferent de starea organismului*, a demonstrat valori diferite pentru 7 gene, dintre care 6 (*ITGB1*, *TIMP1*, *THBS1*, *INHBA*, *NPPB*, *JAK2*) au prezentat indici mai înalți și o genă (*IL8*) s-a evidențiat prin expresie mai mică la adulți față de copii (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2.  
Nivelul de expresie a genelor potențial asociate maladiilor cardiovasculare, *un.c.*

GENA	LOTUL ADULȚI		LOTUL COPII		Adulți		Copii	
	Sănătoși (S)	Patologie (P)	Sănătoși (S)	Patologie (P)	S	P	S	P
<i>ITGB1</i>	2,656±0,250	2,499±0,659	1,621±0,264	1,749±0,512	█	█	—	—
<i>TIMP1</i>	2,547±0,375	1,974±0,645	1,583±0,299	1,729±0,663	█	█	—	—
<i>THBS1</i>	0,766±0,117	0,421±0,176	0,258±0,036	0,382±0,237	█	█	—	—
<i>INHBA</i>	0,015±0,002	0,011±0,007	0,003±0,001	0,005±0,002	█	█	—	—
<i>NPPB</i>	0,005±0,001	0,003±0,001	0,001±0,000	0,002±0,001	█	█	—	—
<i>JAK2</i>	0,225±0,028	0,317±0,157	0,136±0,029	0,178±0,064	█	█	—	—
<i>IL8</i>	0,460±0,071	0,803±0,278	1,405±0,308	1,043±0,476	—	—	█	█
<i>TNFRSF11B</i>	0,026±0,002	0,001±0,000	0,003±0,001	0,001±0,001	█	—	—	—
<i>HAS1</i>	0,003±0,001	0,001±0,000	0,001±0,000	0,002±0,000	█	—	—	█
<i>CYP2C8</i>	0,013±0,003	0,004±0,002	0,004±0,001	0,006±0,002	█	—	—	█
<i>CYP4B1</i>	0,007±0,001	0,001±0,001	0,001±0,001	0,014±0,013	█	—	—	█
<i>KRT19</i>	0,024±0,004	0,001±0,001	0,002±0,000	0,003±0,002	█	—	—	—
<i>SSPN</i>	0,136±0,009	0,027±0,010	0,057±0,010	0,059±0,027	█	—	█	█
<i>SCD</i>	0,061±0,002	0,031±0,015	0,025±0,007	0,055±0,024	█	█	—	█
<i>ELAVLI</i>	0,353±0,057	0,304±0,121	0,199±0,033	0,389±0,134	█	█	—	█
<i>RGS1</i>	0,285±0,047	0,046±0,018	0,074±0,018	0,102±0,054	█	—	—	—
<i>ABCA1</i>	0,521±0,049	0,288±0,105	0,245±0,071	0,372±0,187	█	—	—	█
<i>ITGBL1</i>	0,041±0,005	0,001±0,000	0,004±0,002	0,002±0,002	█	—	—	—

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); valoarea expresiei relative calculată după formula  $2^{\wedge}-\Delta Ct$ , în unități convenționale (*un.c.*).

### Expresia genelor la lotul de adulți

Studiul expresiei genelor de interes la lotul adulți *bolnavi comparativ cu sănătoși*, a pus în evidență 16 gene (*NPPB*, *ABCA1*, *THBS1*, *SCD*, *ELAVLI*, *INHBA*, *TIMP1*, *TNFRSF11B*, *SSPN*,

*ITGB1*, *ITGBL1*, *CYP2C8*, *HAS1*, *CYP4B1*, *KRT19* și *RGS1*) care au manifestat un nivel al expresiei mai mic și 2 (*IL8* și *JAK2*) un nivel mai mare la bolnavi față de cei sănătoși. Diferențe semnificative statistic privind expresia genelor la adulții bolnavi comparativ cu cei sănătoși au demonstrat 15 gene, dintre care 14 s-au remarcat printr-un nivel mai scăzut (*NPPB*, *ABCA1*, *THBS1*, *SCD*, *INHBA*, *TIMP1*, *TNFRSF11B*, *SSPN*, *ITGBL1*, *CYP2C8*, *HAS1*, *CYP4B1*, *KRT19* și *RGS1*) și una (*IL8*) printr-un nivel mai înalt al expresiei.

Astfel, datele demonstrează că la adulții bolnavi, nivelul expresiei genelor analizate diminuează comparativ cu cei sănătoși (Figura 4.1).

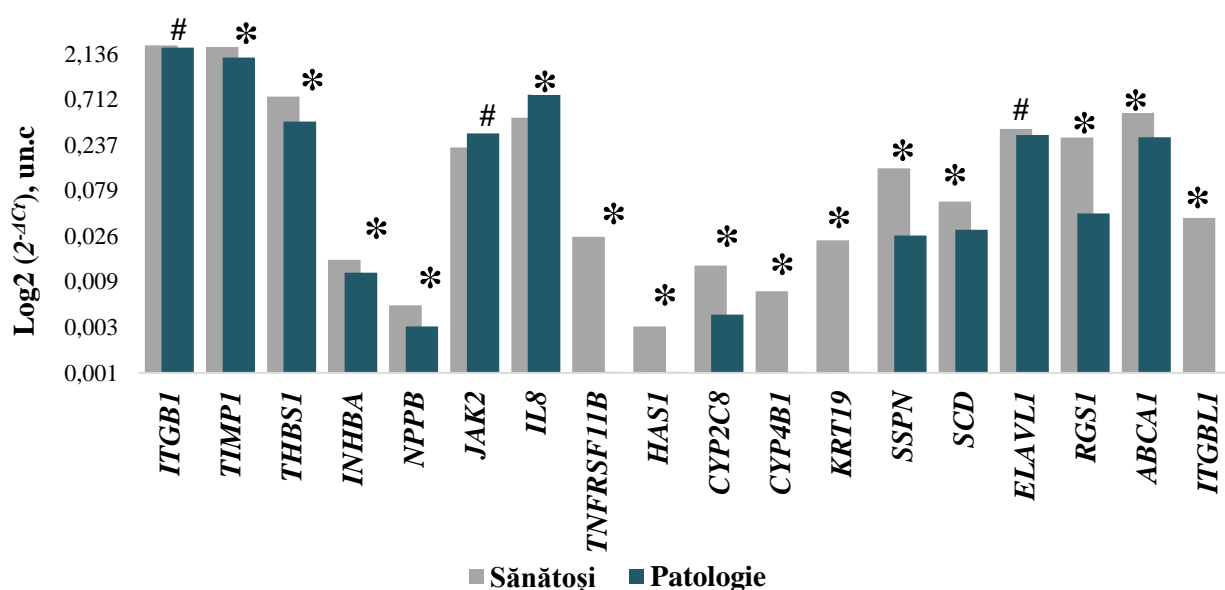


Fig. 4.1. Activitatea transcripțională a genelor la lotul de adulți bolnavi față de cei sănătoși.

*un.c.* – unități convenționale; #  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ .

### Expresia genelor la lotul de copii

Rezultatele privind analiza expresiei genelor la lotul de copii *bolnavi comparativ cu sănătoși*, au pus în evidență 15 gene (*NPPB*, *ABCA1*, *THBS1*, *SCD*, *ELAVL1*, *INHBA*, *JAK2*, *TIMP1*, *CYP2C8*, *SSPN*, *ITGB1*, *HAS1*, *CYP4B1*, *KRT19* și *RGS1*) cu o concentrație de transcripți mai mare și 3 (*IL8*, *TNFRSF11B* și *ITGBL1*) cu o concentrație mai mică la bolnavi față de subiecții sănătoși. S-au remarcat 8 gene, care au manifestat diferențe statistic semnificative, dintre care 5 (*INHBA*, *HAS1*, *CYP2C8*, *SCD*, *ELAVL1*) au indicat valori mai înalte și 3 (*IL8*, *TNFRSF11B*, *ITGBL1*) valori mai mici la copiii bolnavi față de cei sănătoși. Astfel, s-a relevat că la copiii bolnavi activitatea transcripțională a genelor crește comparativ cu cei sănătoși (Figura 4.2).

Generalizând datele expresiei genelor la loturile de studiu s-a constatat că activitatea genelor este diferită la adulți și copii, fiind puse în evidență 3 gene la lotul adulți (*ITGB1*,

*ELAVL1*, *JAK2*) și 10 la lotul copii (*NPPB*, *ABCA1*, *THBS1*, *TIMP1*, *CYP4B1*, *KRT19*, *RGS1*, *JAK2*, *ITGB1*, *SSPN*) care nu au manifestat diferențe semnificative ale expresiei în patologie comparativ cu lotul de referință.

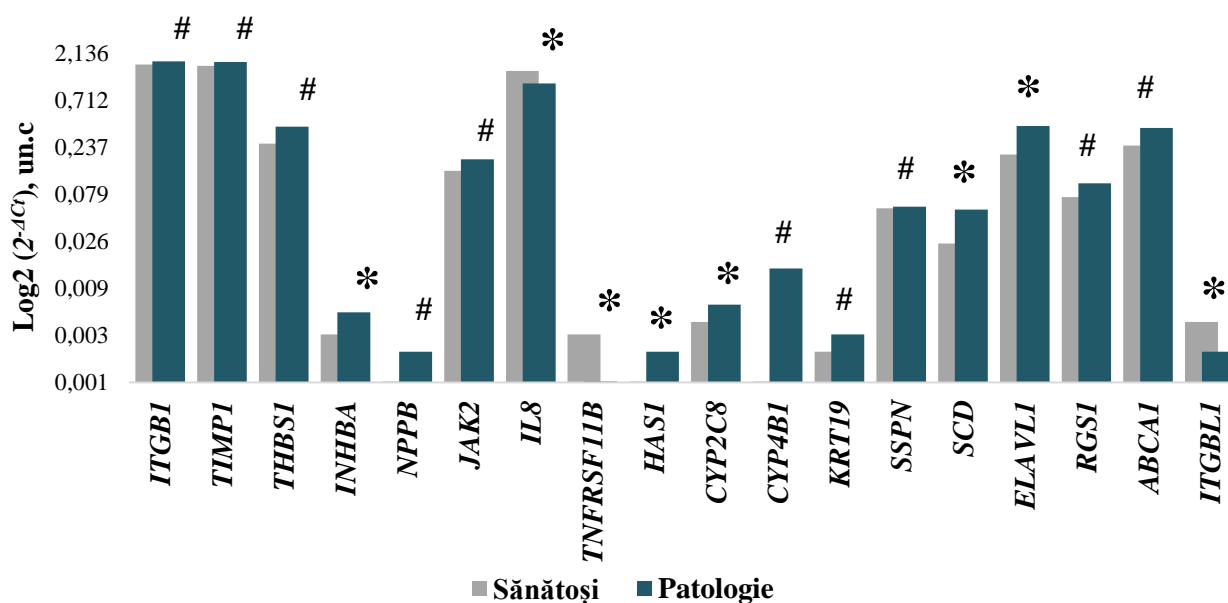


Fig. 4.2. Activitatea transcripțională a genelor la lotul de copii cu patologie față de cei sănătoși.  
*un.c.* – unități convenționale; #  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ .

Genele *JAK2* și *ITGB1* au prezentat diferențe ne semnificative atât la lotul de adulți, cât și la copii. În cazul *SCD*, *INHBA*, *CYP2C8* și *HAS1* s-a înregistrat creșterea expresiei la lotul de copii și diminuarea acestora la adulți, de rând cu genele *CYP4B1*, *RGS1*, *KRT19*, *NPPB*, *ABCA1*, *THBS1*, *TIMP1*, *SSPN*.

Expresia genei *SCD* a sporit la lotul de copii bolnavi față de sănătoși, ceea ce constituie un efect invers celui observat la grupul de adulți. *TNFRSF11B* și *ITGBL1* au manifestat expresie scăzută în patologie, atât la lotul de adulți, cât și la copii. Rezultatele enunțate sugerează rolul bine conturat al acestor gene în mecanismele moleculare ale procesului patologic, dat fiind faptul că expresia este diminuată în loturile cu tulburări patogenice ale organismului.

La rândul său, gena *ELAVL1* s-a caracterizat prin creșterea statistic semnificativă a expresiei la lotul de copii și a prezentat valori ne semnificative la adulți, iar gena *IL8* a manifestat valori semnificativ mai mari la lotul de adulți și mai mici la copii.

Nivelul de transcripți mai mare constatat la adulții sănătoși comparativ cu copiii relevă că activitatea transcripțională este diferențiată în timp, rezultate ce vin în concordanță cu datele din literatură conform cărora expresia genelor variază în funcție de vârstă [134, 295, 355, 414].

Studiile *microarray* ce au avut ca obiect de analiză omul, dar și alte organisme, au pus în evidență o expresie diferită a genelor în țesuturile prelevate de la tineri și adulți [104], iar

diminuarea activității transcripționale a genelor odată cu înaintarea în vârstă a fost asociată cu dereglarea procesului de transcripție și translație [295].

#### **4.2. Variabilitatea expresiei unor gene asociate cu patologiile cardiovasculare**

Variabilitatea *pattern*-ului de expresie a genelor umane constituie subiectul numeroaselor cercetări, care au drept scop identificarea diferențelor dintre tipurile de celule și țesuturi, procesele fiziologice și patologii etc.

Transcripția, ca proces de bază prin care informația codificată în genom este convertită în caractere morfologice și fiziologice [313], relevă o expresie diferențiată a genelor atât la nivel intra- [171, 204, 220, 363], cât și inter- populațional [204, 322, 363], și reflectă variația fiziologică și cea intrinsecă interindividuală [404].

Se presupune că 85 – 95% dintre variațiile genetice umane se datorează diferențelor între indivizii unei populații, iar 5 – 15% pot fi atribuite celor constatate între populații [322, 363], date confirmate de variabilitatea transcriptomului placentar (33,2%, 58,9% și 7,8%) în cadrul indivizilor, în rândul indivizilor și între grupurile umane analizate (americani -africani, -europeni, din Asia de Sud și din Asia de Est) [166] și de variabilitatea (4,3 – 362 *ori*) expresiei genelor la clonele de pin [286]. Pe de altă parte studiul expresiei a 5 gene în celulele limfoblastoide umane relevă că cel mai mic nivel de variabilitate se manifestă la gemenii monoziгоți, o variabilitate intermediară – la frații din aceeași familie și cea mai mare variabilitate – la indivizii neînruđiți [73].

Experimentele *in vitro* la persoanele sănătoase au constatat modificarea activității de transcripție a genelor exprimate periodic în ciclul celular [403], în diverse căi de semnalizare [97] și în răspunsul celulelor la diferiți stimuli [45], inclusiv la stresul oxidativ – între 3-500 *ori* în condiții normale și de la 85 la 1500 *ori* în condiții de stres [217].

Prin studii *in vivo* s-a demonstrat că profilurile de expresie a genelor sunt utile în definirea proceselor biologice complexe asociate cu starea de sănătate și boală. Astfel, utilizând analiza modelelor de expresie a genelor au fost determinate unele subtipuri tumorale [102], au fost identificați markeri moleculari [401] și au fost investigate noi terapii [69].

#### **Expresia genelor la subiecții sănătoși**

Întrucât cunoașterea variației expresiei genelor în țesutul sănătos este esențială pentru recunoașterea și interpretarea modificărilor acestor gene asociate cu diferite maladii, a fost evaluată variabilitatea conținutului de transcripți la *subiecții sănătoși*. S-a constatat că la lotul de



subiecți *adulți* sănătoși cantitatea medie de transcripti a genelor a variat în limitele  $0,003 \pm 0,001$  (*HASI*) și  $2,656 \pm 0,250$  (*ITGB1*) unități convenționale. Valorile înregistrate au permis evidențierea genei *ITGB1* cu cea mai înaltă activitate transcripțională, urmată de gena *TIMP1*.

Valoarea minimă a expresiei a fost înregistrată la gena *HASI* (0,001 un.c), iar cea maximă la *TIMP1* (2,953 un.c). S-a constatat că intervalul de variație a expresiei genelor este cuprins între 1,086 *ori* (*SCD*) și 4,000 *ori* (*HASI*), de precizat însă, că 17 gene din cele 18 analizate se încadrează în diapazonul 1-2 (Tabelul 4.3).

Tabelul 4.3.  
Variabilitatea expresiei genelor la lotul de adulți sănătoși

Gena	LOTUL DE SUBIECTI ADULTI SANATOȘI						
	$2^{-\Delta Ct}, un.c$	$X_{max} / X_{min}$	$A_x$	CV, %	$s^2$	CI (99%)	
<i>ABCA1</i>	(0,472) 0,521±0,049 (0,598)	1,3	0,126	9,40	2,40E-03	0,473-0,569	
<i>CYP2C8</i>	(0,008) 0,013±0,003 (0,017)	2,1	0,009	25,31	1,06E-05	0,010-0,016	
<i>CYP4B1</i>	(0,005) 0,007±0,001 (0,009)	1,8	0,004	18,38	1,79E-06	0,006-0,008	
<i>ELAVL1</i>	(0,289) 0,353±0,057 (0,438)	1,5	0,149	16,05	3,21E-03	0,298-0,408	
<i>HASI</i>	(0,001) 0,003±0,001 (0,004)	4,0	0,003	37,49	9,35E-07	0,002-0,004	
<i>IL8</i>	(0,362) 0,46±0,0710 (0,526)	1,5	0,164	15,35	4,98E-03	0,391-0,529	
<i>INHBA</i>	(0,012) 0,015±0,002 (0,018)	1,5	0,006	15,56	5,44E-06	0,013-0,017	
<i>ITGB1</i>	(2,213) 2,656±0,250 (2,905)	1,3	0,692	9,42	6,26E-02	2,413-2,899	
<i>ITGBL1</i>	(0,035) 0,041±0,005 (0,048)	1,4	0,013	12,00	2,38E-05	0,036-0,046	
<i>JAK2</i>	(0,199) 0,225±0,028 (0,275)	1,4	0,076	12,68	8,11E-04	0,198-0,252	
<i>KRT19</i>	(0,020) 0,024±0,004 (0,030)	1,5	0,010	16,15	1,52E-05	0,020-0,028	
<i>NPPB</i>	(0,005) 0,005±0,001 (0,006)	1,2	0,001	10,55	2,65E-07	0,004-0,006	
<i>RGS1</i>	(0,201) 0,285±0,047 (0,335)	1,7	0,134	16,37	2,17E-03	0,239-0,331	
<i>SCD</i>	(0,058) 0,061±0,002 (0,063)	1,1	0,005	3,18	3,77E-06	0,059-0,063	
<i>SSPN</i>	(0,128) 0,136±0,009 (0,151)	1,2	0,023	6,62	8,08E-05	0,127-0,145	
<i>THBS1</i>	(0,537) 0,766±0,117 (0,872)	1,6	0,335	15,33	1,38E-02	0,652-0,880	
<i>TIMP1</i>	(2,068) 2,547±0,375 (2,953)	1,4	0,885	14,72	1,41E-01	2,182-2,912	
<i>TNFRSF11B</i>	(0,022) 0,026±0,002 (0,029)	1,3	0,007	9,40	6,19E-06	0,024-0,028	

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului);  $2^{-\Delta Ct}$  – valoarea expresiei relative, în unități convenționale; în paranteze este indicată valoarea minimă ( $X_{min}$ ) și maximă ( $X_{max}$ ) a expresiei relative a genei în cadrul eșantionului; CV - coeficientul de variație;  $s^2$  - dispersia eșantionului;  $A_x$  – amplitudinea absolută a variației; CI – limitele intervalului de încredere de 99%.

Analiza rezultatelor obținute a indicat că la lotul de *copii* sănătoși, media conținutului de transcripti a variat între 0,001 un.c. și 1,621 un.c. Cea mai înaltă valoare medie a fost remarcată la gena *ITGB1* ( $1,621 \pm 0,264$  un.c.), urmată de *TIMP1* ( $1,583 \pm 0,299$  un.c.) și *IL8* ( $1,405 \pm 0,308$  un.c.), iar cel mai scăzut nivel de expresie au manifestat genele *HASI* ( $0,001 \pm 0,000$  un.c.), *NPPB* ( $0,001 \pm 0,000$  un.c.) și *CYP4B1* ( $0,001 \pm 0,001$  un.c.).

Gena *HAS1* s-a caracterizat prin cea mai mică valoare a expresiei între subiecți (0,0004 un.c), la fel ca și în cazul adulților sănătoși, în timp ce gena *TIMP1* a înregistrat un nivel maxim (1,890 un.c), ceea ce a pus în evidență un interval de variație a expresiei genelor cuprins între 1,000 *ori* (*NPPB*) și 3,500 *ori* (*ITGBL1*, Tabelul 4.4).

Tabelul 4.4.  
Variabilitatea expresiei genelor la lotul de copii sănătoși

Gena	LOTUL DE SUBIECTI COPII SĂNĂTOȘI						
	$2^{-\Delta Ct}$ , un.c	$X_{max} / X_{min}$	$A_x$	CV, %	$s^2$	CI (99%)	
<i>ABCA1</i>	(0,154) 0,245±0,071 (0,332)	2,2	0,178	28,96	5,02E-03	0,176-0,314	
<i>CYP2C8</i>	(0,004) 0,004±0,001 (0,005)	1,3	0,001	14,38	4,13E-07	0,003-0,005	
<i>CYP4B1</i>	(0,001) 0,001±0,001 (0,002)	2,0	0,001	44,85	3,67E-07	0,000-0,002	
<i>ELAVL1</i>	(0,158) 0,199±0,033 (0,241)	1,5	0,083	16,41	1,07E-03	0,167-0,231	
<i>HAS1</i>	(0,0004) 0,001±0,000 (0,001)	2,5	0,001	14,33	5,55E-09	0,001-0,001	
<i>IL8</i>	(1,073) 1,405±0,308 (1,831)	1,7	0,758	21,89	9,46E-02	1,105-1,705	
<i>INHBA</i>	(0,003) 0,003±0,001 (0,004)	1,3	0,001	19,82	4,48E-07	0,002-0,004	
<i>ITGB1</i>	(1,097) 1,621±0,264 (1,875)	1,7	0,778	16,26	6,95E-02	1,364-1,878	
<i>ITGBL1</i>	(0,002) 0,004±0,002 (0,007)	3,5	0,005	39,92	2,47E-06	0,002-0,006	
<i>JAK2</i>	(0,102) 0,136±0,029 (0,178)	1,7	0,076	21,32	8,46E-04	0,108-0,164	
<i>KRT19</i>	(0,002) 0,002±0,000 (0,003)	1,5	0,001	10,14	5,66E-08	0,002-0,002	
<i>NPPB</i>	(0,001) 0,001±0,000 (0,001)	1,0	0,000	31,17	1,31E-07	0,001-0,001	
<i>RGS1</i>	(0,046) 0,074±0,018 (0,093)	2,0	0,047	24,51	3,33E-04	0,056-0,092	
<i>SCD</i>	(0,016) 0,025±0,007 (0,033)	2,1	0,017	27,35	4,63E-05	0,018-0,032	
<i>SSPN</i>	(0,046) 0,057±0,010 (0,072)	1,6	0,026	17,49	9,88E-05	0,047-0,067	
<i>THBS1</i>	(0,205) 0,258±0,036 (0,291)	1,4	0,086	13,83	1,28E-03	0,223-0,293	
<i>TIMP1</i>	(1,138) 1,583±0,299 (1,890)	1,7	0,752	18,85	8,91E-02	1,292-1,874	
<i>TNFRSF11B</i>	(0,003) 0,003±0,001 (0,004)	1,3	0,001	17,93	3,06E-07	0,002-0,004	

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului);  $2^{-\Delta Ct}$  – valoarea expresiei relative, în unități convenționale; în paranteze este indicată valoarea minimă ( $X_{min}$ ) și maximă ( $X_{max}$ ) a expresiei relative a genei în cadrul eșantionului; CV - coeficientul de variație;  $s^2$  - dispersia eșantionului;  $A_x$  – amplitudinea absolută a variației; CI – limitele intervalului de încredere de 99%.

Un alt indicator de apreciere a gradului de variabilitate a nivelului de expresie a genelor este coeficientul de variație (CV), care ia valori în intervalul 0 – 100%. Valorile mari (aproape de limita superioară) ale indicatorului indică o serie eterogenă (variabilă), iar un coeficient de variație mai mic atestă un grad bun de omogenitate a colectivității și, respectiv, de reprezentativitate a valorii medii.

Estimarea coeficientului de variație a expresiei genelor la *subiecții sănătoși* a relevat un nivel înalt de omogenitate a datelor pentru 17 gene la adulți (CV luând valori între 3,18 – 25,31%, *ABCA1*, *CYP2C8*, *CYP4B1*, *HAS1*, *IL8*, *INHBA*, *ITGB1*, *ITGBL1*, *ELAVL1*, *JAK2*, *KRT19*, *NPPB*, *RGS1*, *SCD*, *SSPN*, *THBS1*, *TIMP1*, *TNFRSF11B*) și 16 la copii (CV cu valori

între 10,14 – 31,17%, *ABCA1*, *CYP2C8*, *ELAVL1*, *HAS1*, *IL8*, *INHBA*, *ITGB1*, *JAK2*, *KRT19*, *NPPB*, *RGS1*, *SCD*, *SSPN*, *THBS1*, *TIMP1*, *TNFRSF11B*).

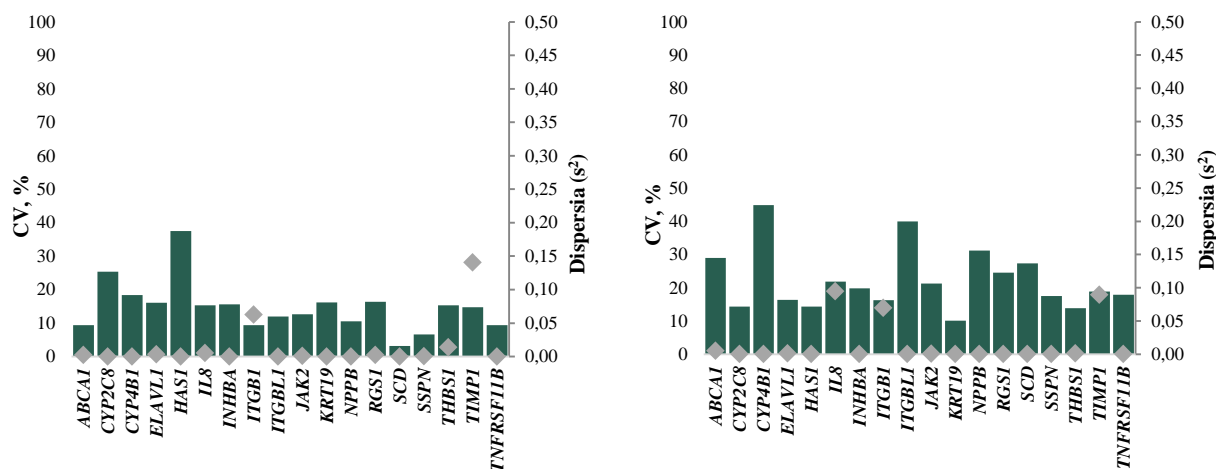


Fig. 4.3. Coeficientul de variație (CV) și dispersia ( $s^2$ ) nivelului de expresie a genelor la adulți (stânga) și copii (dreapta) sănătoși.

Gena (*HAS1*) la adulți și genele *CYP4B1* și *ITGBL1* la copii au înregistrat valori  $>35\%$ , ceea ce indică eterogenitatea datelor de expresie (Figura 4.3).

### Expresia genelor la pacienții cu patologii cardiovasculare

Estimarea expresiei relative a genelor de interes la lotul de *adulți* bolnavi a pus în evidență genele *ITGB1* ( $2,249 \pm 0,659$  un.c.) și *TIMP1* ( $1,974 \pm 0,645$  un.c.) cu un nivel înalt de transcripți, și genele *HAS1*, *ITGBL1*, *TNFRSF11B*, *KRT19*, *CYP4B1* ( $0,001$  un.c.) caracterizate prin cea mai redusă activitate transcripțională.

Valoarea minimă a expresiei genelor între adulții bolnavi a fost înregistrată pentru gena *TNFRSF11B* ( $0,0002$  un.c.), iar cea maximă la *ITGB1* ( $3,773$  un.c.). S-a constatat că intervalul de variație a expresiei genelor este cuprins între  $2,329$  ori (*ITGB1*) și  $28,000$  ori (*INHBA*), majoritatea genelor încadrându-se între 2 și 9 (Tabelul 4.5).

Cantitatea medie de transcripți a genelor de interes la lotul de *copii* bolnavi a variat în limitele  $0,001 \pm 0,001$  un.c. și  $1,749 \pm 0,512$  un.c. Cea mai înaltă activitate transcripțională a manifestat gena *ITGB1* ( $1,749$  un.c.), urmată de *TIMP1* ( $1,729 \pm 0,663$  un.c.) și *IL8* ( $1,043 \pm 0,476$  un.c.).

Genele *TNFRSF11B* ( $0,001 \pm 0,001$  un.c.), *HAS1* ( $0,002 \pm 0,000$  un.c.), *NPPB* ( $0,002 \pm 0,001$  un.c.) și *ITGBL1* ( $0,002 \pm 0,002$  un.c.) au manifestat cel mai mic conținut de transcripți la lotul de copii bolnavi.

Tabelul 4.5.  
Variabilitatea expresiei genelor la lotul de adulți bolnavi

Gena	LOTUL DE SUBIECȚI ADULȚI CU PATOLOGIE						
	$2^{-\Delta Ct}$ , un.c	$X_{max}/X_{min}$	$A_x$	CV, %	$s^2$	CI (99%)	
<i>ABCA1</i>	(0,161) 0,288±0,105 (0,521)	3,2	0,360	36,45	1,10E-02	0,236-0,340	
<i>CYP2C8</i>	(0,001) 0,004±0,002 (0,009)	9,0	0,008	58,67	5,95E-06	0,003-0,005	
<i>CYP4B1</i>	(0,001) 0,001±0,001 (0,005)	5,0	0,004	89,07	1,43E-06	0,001-0,001	
<i>ELAVL1</i>	(0,101) 0,304±0,121 (0,512)	5,1	0,411	39,78	1,46E-02	0,244-0,364	
<i>HAS1</i>	(0,0003) 0,001±0,000 (0,001)	3,3	0,001	36,32	4,00E-08	0,001-0,001	
<i>IL8</i>	(0,318) 0,803±0,278 (1,245)	3,9	0,927	34,63	7,73E-02	0,665-0,941	
<i>INHBA</i>	(0,001) 0,011±0,007 (0,028)	28,0	0,027	64,03	5,23E-05	0,008-0,014	
<i>ITGB1</i>	(1,620) 2,499±0,659 (3,773)	2,3	2,153	26,37	4,34E-01	2,172-2,826	
<i>ITGBL1</i>	(0,0004) 0,001±0,000 (0,001)	2,5	0,0006	27,36	1,88E-08	0,001-0,001	
<i>JAK2</i>	(0,106) 0,317±0,157 (0,777)	7,3	0,671	49,43	2,46E-02	0,239-0,395	
<i>KRT19</i>	(0,001) 0,001±0,001 (0,004)	4,0	0,003	64,80	8,10E-07	0,001-0,001	
<i>NPPB</i>	(0,001) 0,003±0,001 (0,005)	5,0	0,004	49,47	1,59E-06	0,003-0,003	
<i>RGS1</i>	(0,018) 0,046±0,018 (0,084)	4,7	0,066	39,94	3,35E-04	0,037-0,055	
<i>SCD</i>	(0,009) 0,031±0,015 (0,066)	7,3	0,057	49,37	2,27E-04	0,024-0,038	
<i>SSPN</i>	(0,006) 0,027±0,010 (0,047)	7,8	0,041	38,71	1,09E-04	0,022-0,032	
<i>THBS1</i>	(0,248) 0,421±0,176 (0,864)	3,5	0,616	41,86	3,10E-02	0,334-0,508	
<i>TIMPI</i>	(1,062) 1,974±0,645 (2,914)	2,7	1,852	32,69	4,16E-01	1,654-2,294	
<i>TNFRSF11B</i>	(0,0002) 0,001±0,000 (0,001)	5,0	0,001	44,15	6,69E-08	0,001-0,001	

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului);  $2^{-\Delta Ct}$  – valoarea expresiei relative, în unități convenționale; în paranteze este indicată valoarea minimă ( $X_{min}$ ) și maximă ( $X_{max}$ ) a expresiei relative a genei în cadrul eșantionului; CV - coeficientul de variație;  $s^2$  - dispersia eșantionului;  $A_x$  – amplitudinea absolută a variației; CI – limitele intervalului de încredere de 99%.

Valoarea minimă a expresiei genelor între copiii bolnavi a înregistrat gena *TNFRSF11B* (0,0002 un.c), iar valoarea maximă a fost evidențiată la *TIMPI* (2,880 un.c). Intervalul de variație a expresiei genelor este cuprins între 2,000 *ori* (*HAS1*) și 38,000 *ori* (*CYP4B1*), majoritatea fiind încadrate între 2 și 5 (Tabelul 4.6).

Evaluarea nivelului de variabilitate, pe baza expresiei genelor, exprimată în unități convenționale, la *subiecții cu patologie* a relevat că coeficientul de variație s-a încadrat în limitele 26,37% (*ITGB1*) – 89,07% (*CYP4B1*) la adulți și între 20,67% (*HAS1*) și 100,01% (*TNFRSF11B*) la copii.

Valorile determinate ale CV se situează peste valoarea de 35% pentru 14 gene la copii (*ABCA1*, *CYP4B1*, *IL8*, *INHBA*, *ITGBL1*, *JAK2*, *KRT19*, *NPPB*, *RGS1*, *SCD*, *SSPN*, *THBS1*, *TIMPI*, *TNFRSF11B*) și 14 la adulți (*ABCA1*, *CYP2C8*, *CYP4B1*, *HAS1*, *INHBA*, *ELAVL1*, *JAK2*, *KRT19*, *NPPB*, *RGS1*, *SCD*, *SSPN*, *THBS1*, *TNFRSF11B*), ceea ce denotă o variație înaltă a expresiei în condiții de boală.

Tabelul 4.6.

Variabilitatea expresiei genelor la lotul de copii bolnavi

Gena	LOTUL DE SUBIEȚI COPII CU PATOLOGIE						
	$2^{-\Delta Ct}$ , un.c	$X_{max} / X_{min}$	$A_x$	CV, %	$s^2$	CI (99%)	
<i>ABCA1</i>	(0,152) 0,372±0,187 (0,848)	5,6	0,696	50,25	3,49E-02	0,281-0,463	
<i>CYP2C8</i>	(0,003) 0,006±0,002 (0,009)	3,0	0,006	34,11	4,45E-06	0,005-0,007	
<i>CYP4B1</i>	(0,001) 0,014±0,013 (0,038)	38,0	0,037	92,11	1,65E-04	0,008-0,020	
<i>ELAVL1</i>	(0,154) 0,389±0,134 (0,588)	3,8	0,434	34,43	1,79E-02	0,324-0,454	
<i>HAS1</i>	(0,001) 0,002±0,000 (0,002)	2,0	0,001	20,67	1,01E-07	0,002-0,002	
<i>IL8</i>	(0,321) 1,043±0,476 (1,927)	6,0	1,606	45,64	2,27E-01	0,811-1,275	
<i>INHBA</i>	(0,002) 0,005±0,002 (0,009)	4,5	0,007	44,31	4,39E-06	0,004-0,006	
<i>ITGB1</i>	(0,953) 1,749±0,512 (2,774)	2,9	1,821	29,25	2,62E-01	1,500-1,998	
<i>ITGBL1</i>	(0,001) 0,002±0,002 (0,007)	7,0	0,006	66,34	2,49E-06	0,001-0,003	
<i>JAK2</i>	(0,096) 0,178±0,064 (0,295)	3,1	0,199	36,12	4,12E-03	0,147-0,209	
<i>KRT19</i>	(0,001) 0,003±0,002 (0,005)	5,0	0,004	56,62	2,46E-06	0,002-0,004	
<i>NPPB</i>	(0,001) 0,002±0,001 (0,005)	5,0	0,004	77,66	1,72E-06	0,002-0,002	
<i>RGS1</i>	(0,027) 0,102±0,054 (0,193)	7,1	0,166	53,12	2,93E-03	0,076-0,128	
<i>SCD</i>	(0,022) 0,055±0,024 (0,093)	4,2	0,071	43,15	5,70E-04	0,043-0,067	
<i>SSPN</i>	(0,021) 0,059±0,027 (0,095)	4,5	0,074	45,81	7,34E-04	0,046-0,072	
<i>THBS1</i>	(0,112) 0,382±0,237 (0,937)	8,4	0,825	61,94	5,60E-02	0,267-0,497	
<i>TIMP1</i>	(0,821) 1,729±0,663 (2,880)	3,5	2,059	38,36	4,40E-01	1,406-2,052	
<i>TNFRSF11B</i>	(0,0002) 0,001±0,001 (0,007)	35,0	0,007	100,01	2,15E-06	0,001-0,002	

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului);  $2^{-\Delta Ct}$  – valoarea expresiei relative, în unități convenționale; în paranteze este indicată valoarea minimă ( $X_{min}$ ) și maximă ( $X_{max}$ ) a expresiei relative a genei în cadrul eșantionului; CV - coeficientul de variație;  $s^2$  - dispersia eșantionului;  $A_x$  – amplitudinea absolută a variației; CI – limitele intervalului de încredere de 99%.

Genele *IL8*, *ITGB1*, *ITGBL1* și *TIMP1* la adulți și *CYP2C8*, *ELAVL1*, *HAS1* și *ITGB1* la copii au înregistrat valori <35%, ceea ce indică uniformitatea datelor de expresie (Figura 4.4).

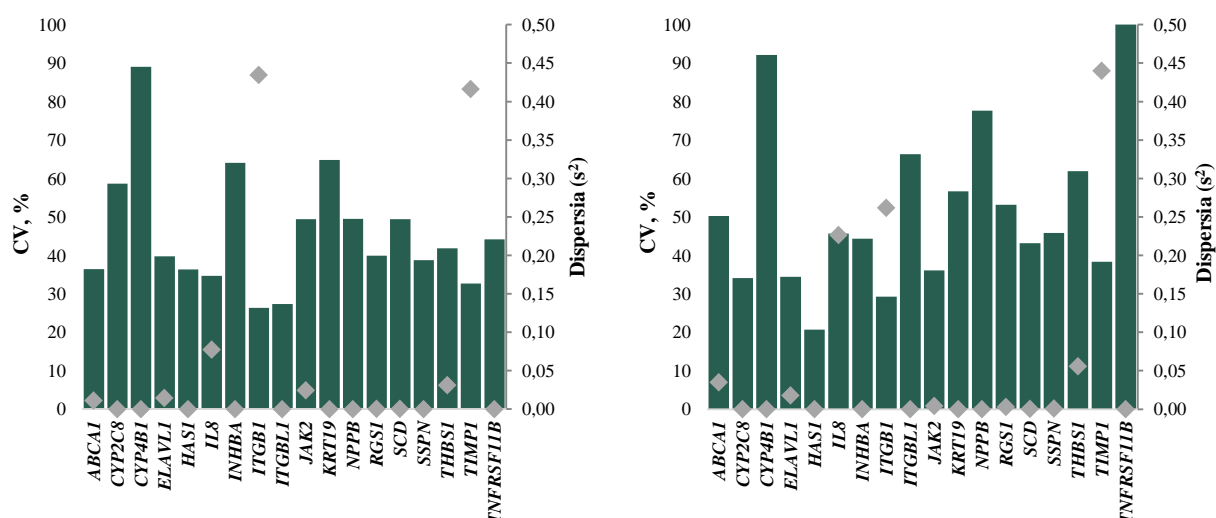


Fig. 4.4. Coeficientul de variație (CV) și dispersia ( $s^2$ ) nivelului de expresie a genelor la adulți (dreapta) și copii (stânga) bolnavi.

Generalizând datele obținute, s-a constatat că atât coeficientul de variație, cât și intervalul de variație, pun în evidență o variabilitate mai mare a expresiei genelor în rândul bolnavilor, față de subiecții sănătoși, copiii și adulți (Figura 4.5).

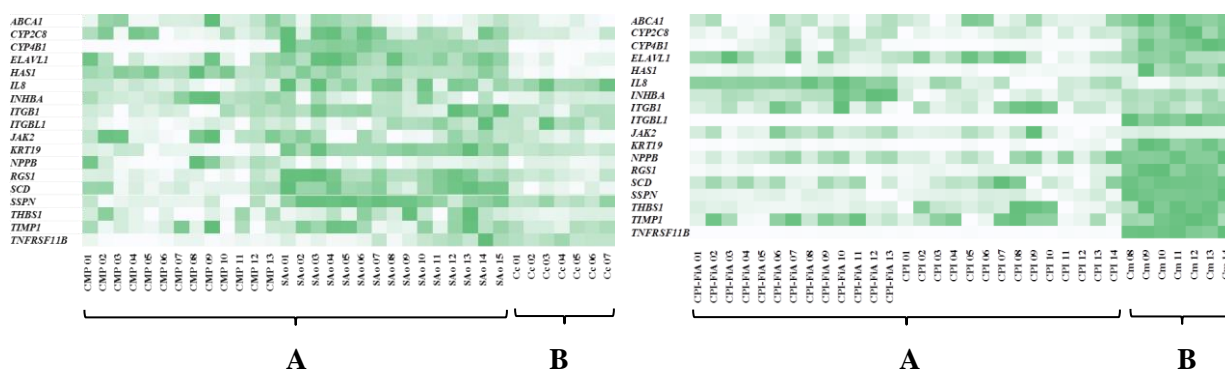


Fig. 4.5. *Pattern-ul individual de expresie a genelor la lotul de copii (stânga) și adulți (dreapta), bolnavi (A) vs sănătoși (B).*

*Notă: CMP 01 – CMP 13, SAo 1 – SAo 15, CPI-FiA 01 – CPI-FiA 13, CPI 1 – CPI 14 – subiecți cu patologie; Cc 01 – Cc 07, Cm 08 – Cm 14 – subiecți sănătoși; intensitatea culorii indică nivelul de expresie.*

Intervalul relativ mic al variației expresiei genelor analizate la subiecții sănătoși indică și un nivel mai înalt de omogenitate, asigurat de variațiile fenotipice (ale morfologiei și fiziologiei organismului, ale comportamentului și personalității individului, ale răspunsului său la factorii externi) în limitele normei de reacție determinate genetic și reflectă mecanismele de autoreglare care mențin echilibrul homeostatic al parametrilor celulari.

Limitele largi de variație și eterogenitatea înaltă, constatate la subiecții bolnavi, relevă că modificările patologice sunt de fapt expresia fenotipică evidentă și excesivă a variabilității genetice, rezultate ce vin în concordanță cu datele din literatură care au constatat modificarea sporită a conținutului de transcripți la pacienții cu infecții bacteriene [404], cancer [102, 404], leziuni traumatice grave [292] comparativ cu subiecții sănătoși.

Cercetările noastre au arătat o variabilitate mai mare a nivelului de expresie a genelor la copiii cu patologii cardiovasculare comparativ cu adulții. În literatura de specialitate sunt diferite rezultate și opinii privind variabilitatea expresiei genelor în dependență de vârstă. Unele studii au demonstrat că atât la om [354], cât și la șobolani [36, 354] expresia genelor devine mai eterogenă cu înaintarea în vârstă, însă un alt studiu, a reliefat că la nivelul creierului 50% dintre gene au arătat o variație a expresiei crescută la vârstnici (61 – 70 ani), iar alte 50% – la tineri și adulți (20-60 ani, [59]. În acest context, elucidarea variabilității expresiei genelor în dependență de vârstă necesită mari eforturi experimentale și analiză, deoarece cunoștințele privind variația expresiei genelor atât la subiecții sănătoși, cât și bolnavi sunt de o importanță fundamentală în cercetarea biomedicală [204, 363], având ca urmare optimizarea programele de diagnostic,

dezvoltarea și eficientizarea unor algoritmi de evaluare a riscului bazat pe factorii clinici și expresia genelor.

### 4.3. Concluzii la capitolul 4

1. Analiza variabilității expresiei relative a factorilor genetici, în baza estimării coeficientului de variație denotă uniformitatea conținutului de transcripti a genelor studiate (CV% adulți 3,18 – 25,31; copii 10,14 – 28,96) la subiecții sănătoși și eterogenitatea înaltă a expresiei genelor la subiecții cu patologii cardiovasculare (CV% adulți 36,32 – 89,07; copii 36,12 – 100,01).

2. Intervalul de variație relativ mic (1,1 – 4,0 *ori* la adulți; 1,0 – 3,5 *ori* la copii) la subiecții sănătoși pune în evidență homeostazia celulară și relevă limitele normei de reacție a organismului și, respectiv, limitele largi de variație a expresiei genelor în rândul bolnavilor (2,3 – 28,0 *ori* la adulți; 2,0 – 38,0 *ori* la copii) relevă că modificările patologice sunt expresia fenotipică evidentă și extremă a variabilității genetice.

3. Nivelul mai mare de transcripti la adulții sănătoși comparativ cu copiii relevă activitatea transcripțională diferențiată în timp pentru 17 dintre cele 18 gene incluse în studiu.

4. La adulți față de copiii bolnavi conținutul de transcripti pentru 11 gene este mai mic, iar pentru 6 gene mai mare, ceea ce relevă expresia diferită între copii și adulți și denotă că fenotipul clinic depinde de activitatea transcripțională a genelor analizate.

5. Indiferent de starea organismului, 6 gene au prezentat valori mai mari și o genă s-a evidențiat prin expresie mai mică la adulți față de copii.

6. La lotul de copii bolnavi comparativ cu sănătoși, diferențe statistic semnificative au manifestat 5 gene cu un nivel al expresiei mai mare și 3 cu valori mai mici, ceea ce relevă că la copiii bolnavi activitatea transcripțională a genelor crește comparativ cu cei sănătoși.

7. La lotul adulți bolnavi comparativ cu sănătoși, diferențe semnificative statistic au manifestat 14 gene cu valori mai mici și una cu expresie mai mare, ceea ce demonstrează că la adulții bolnavi, nivelul expresiei genelor diminuează față de cei sănătoși.

## 5. DETERMINISMUL GENETIC AL DIFERITOR PATOLOGII CARDIOVASCULARE

Caracterele ereditare normale sau anormale se caracterizează prin determinism monogenic, poligenic sau multifactorial, determinate de interacțiunea genotip – factori de mediu. S-a constatat că însăși expresia genelor reprezintă un caracter cantitativ, cu înaltă ereditabilitate [92], care determină manifestarea unui anumit caracter (normal sau patologic) la nivel de organism, fiind un indicator al stării fiziologice a celulei.

În lucrarea de față s-a propus studierea expresiei ARNm a unor gene candidat pentru a obține profilul de exprimare în patologiile cardiovasculare. În acest context s-a urmărit cantitatea relativă de exprimare a genelor în BCV, care a fost interpretată în comparație cu lotul de referință. Analiza datelor a fost efectuată prin metoda  $\Delta\Delta Ct$ . Au fost considerate de interes toate genele cu un nivel de expresie  $\pm 1.0$ .

Valoarea *fold change* a fiecărei genă de interes (GI) comparativ cu aceeași genă din grupul de referință este dată de valoarea lui  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ , supraexpresia reprezentând o valoare supraunitară, în timp ce o valoare subunitară indică subexpresia genică. În practică, fiind vorba de fenomene biologice, se preferă utilizarea expresiei *fold regulation* care se exprimă prin valori pozitive sau negative, valoarea lui  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  rămânând aceeași pentru genele supraexprimate, în timp ce pentru genele subexprimate devine  $(-2^{(\Delta\Delta Ct)})$ .

### 5.1. Analiza profilului de expresie a genelor în bolile cardiovasculare

Pentru determinarea profilului de expresie s-a efectuat Real-Time PCR a unor probe provenind de la pacienți cu SAo, CPI-FiA, CPI, CMP și, respectiv, lotul de referință. În acest scop s-au recoltat probe de sânge de la 14 voluntari reprezentând lotul de referință și 55 pacienți cu BCV. Pentru cuantificarea ARN-ului există mai multe metode, însă metoda RT-PCR rămâne „standardul de aur”, fiind o metodă rapidă, sensibilă, și cu un cost redus. Cunoașterea expresiei genelor în diferite condiții permite monitorizarea stării de sănătate și oferă perspective pentru dezvoltarea medicinei personalizate.

#### Profilul de expresie al genelor în cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială

Analiza profilului de expresie a genelor ipotetic implicate în CPI-FiA față de lotul de referință a pus în evidență valori *fold change* ce variază între  $-89,096 - 2,271$  ori (Tabelul 5.1, Figura 5.1). Cea mai pronunțată diminuare a expresiei a manifestat gena *ITGBL1* ( $-89,096$  ori), activitatea transcripțională maximală fiind atestată pentru *IL8* ( $2,271$  ori). Intervalul de valori



*fold change* pentru genele care au demonstrat activitate transcripțională redusă (15 gene, *NPPB*, *SCD*, *ABCA1*, *THBS1*, *ELAVL1*, *TIMP1*, *TNFRSF11B*, *SSPN*, *ITGB1*, *ITGBL1*, *CYP2C8*, *HAS1*, *CYP4B1*, *KRT19*, *RGS1*) este cuprins între -1,109 – -89,096 ori.

Dintre acestea, 13 gene (*NPPB*, *SCD*, *ABCA1*, *THBS1*, *TNFRSF11B*, *SSPN*, *ITGBL1*, *CYP2C8*, *TIMP1*, *HAS1*, *CYP4B1*, *KRT19*, *RGS1*) au prezentat diferențe semnificative ale expresiei din punct de vedere statistic la pacienții cu fibrilația atrială asociată cu cardiopatia ischemică față de grupul de referință.

Tabelul 5.1.

Evaluarea profilului de expresie a genelor de interes în fibrilația atrială asociată cu CPI

Gena	$\Delta Ct$ (patologie)	$\Delta Ct$ (referință)	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$	Valoarea p
<i>IL8</i>	-0,036±0,109	1,148±0,228	-1,184±0,253	2,271	<0,001*
<i>JAK2</i>	1,662±0,581	2,171±0,176	-0,510±0,607	1,424	0,010*
<i>INHBA</i>	6,082±0,560	6,124±0,247	-0,042±0,612	1,029	0,361#
<i>ITGB1</i>	-1,241±0,348	-1,39±0,155	0,149±0,380	-1,109	0,125#
<i>ELAVL1</i>	1,844±0,541	1,557±0,213	0,286±0,582	-1,220	0,125#
<i>TIMP1</i>	-0,923±0,476	-1,324±0,215	0,401±0,522	-1,320	0,050*
<i>ABCA1</i>	2,008±0,509	0,981±0,132	1,027±0,526	-2,037	<0,001*
<i>NPPB</i>	8,782±0,682	7,719±0,157	1,063±0,700	-2,089	<0,001*
<i>THBS1</i>	1,595±0,137	0,467±0,237	1,128±0,274	-2,186	<0,001*
<i>SCD</i>	5,228±0,660	4,095±0,115	1,133±0,670	-2,193	<0,001*
<i>CYP2C8</i>	8,079±0,999	6,381±0,397	1,699±1,075	-3,246	<0,001*
<i>HAS1</i>	10,690±0,485	8,967±0,706	1,723±0,856	-3,301	<0,001*
<i>CYP4B1</i>	9,374±1,115	7,190±0,266	2,184±1,146	-4,544	<0,001*
<i>SSPN</i>	5,577±0,796	2,910±0,088	2,667±0,801	-6,353	<0,001*
<i>RGS1</i>	4,945±0,448	1,914±0,199	3,031±0,490	-8,171	<0,001*
<i>KRT19</i>	9,633±0,759	5,405±0,222	4,229±0,791	-18,747	<0,001*
<i>TNFRSF11B</i>	11,082±0,946	5,286±0,169	5,796±0,961	-55,574	<0,001*
<i>ITGBL1</i>	11,149±0,308	4,671±0,175	6,477±0,354	-89,096	<0,001*

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu grupul de referință (*Testul U Mann-Whitney*), #p>0,05, \*p<0,05;  $\Delta Ct = \bar{x}Ct_{(gena\ de\ interes)} - \bar{x}Ct_{(gena\ de\ referință)}$ ;  $\Delta \Delta Ct = \bar{x}\Delta Ct_{(grup\ patologie)} - \bar{x}\Delta Ct_{(grup\ de\ referință)}$ ;  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  – valoarea *fold change*, în unități convenționale.

Genele *INHBA*, *IL8* și *JAK2* au manifestat activitate transcripțională crescută, cu valori *fold change* ce variază de la 1,029 până la 2,271 ori, însă doar valorile expresiei genelor *IL8* și *JAK2* au fost semnificativ crescute în CPI-FiA față de lotul de referință. Diferențe semnificative statistic nu au fost observate în cazul genelor *ELAVL1*, *ITGB1* și *INHBA*.

Rezultatele analizei au pus în evidență 15 gene subexprimate și 3 supraexprimate la pacienții cu CPI-FiA față de subiecții sănătoși, dintre care 15 (13 subexprimate și 2 supraexprimate) au manifestat diferențe semnificative statistic.

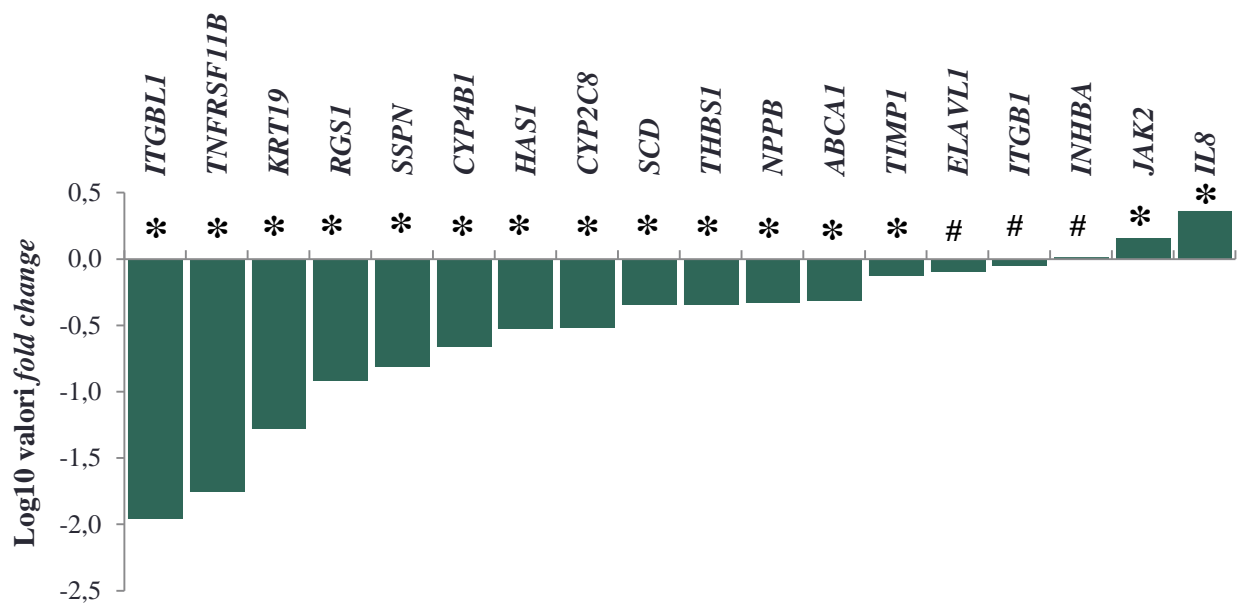


Fig. 5.1. Modificarea expresiei genelor de interes (*fold change*) în cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială față de lotul de referință.

Clasificarea genelor în baza rezultatelor obținute, a relevat că în cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială, genele *ITGBL1* și *TNFRSF11B* au corespuns nivelului -4 de activitate transcripțională, având *fold change* -89,096 un.c. și, respectiv, -55,574 un.c., ceea ce semnifică că genele sunt foarte puternic subexprimate; gena *KRT19* s-a încadrat în nivelul -3 de activitate transcripțională, cu valoarea *fold change* de -18,747 un.c., fiind puternic subexprimată; genele *RGS1* și *SSPN* au corespuns nivelului -2, având valoarea *fold change* -8,171, respectiv -6,353, ceea ce semnifică subexprimare moderată; iar genele *CYP4B1* (-4,544 un.c.), *CYP2C8* (-3,248 un.c.), *HAS1* (-3,301 un.c.), *THBS1* (-2,186 un.c.), *SCD* (-2,193 un.c.), *NPPB* (-2,089 un.c.), *ABCA1* (-2,037 un.c.) și *TIMP1* (-1,320 un.c.) au corespuns nivelului -1, fiind gene slab subexprimate. Doar genele *IL8* (2,271 un.c.) și *JAK2* (1,424 un.c.) s-au încadrat în nivelul +1, fiind slab supraexprimate.

### Profilul de expresie al genelor în cardiopatia ischemică

Estimarea concentrației transcripților genelor de interes la grupul CPI a relevat valori *fold change* ce variază între -75,608 – 1,191. Cea mai pronunțată diminuare a expresiei s-a remarcat la gena *ITGBL1* (-75,608 *ori*), iar activitatea transcripțională crescută a fost atestată la gena *IL8* (1,191 *ori*). Valorile *fold change* pentru 16 gene care au demonstrat activitate transcripțională redusă (*NPPB*, *SCD*, *ABCA1*, *THBS1*, *ELAVL1*, *INHBA*, *TIMP1*, *TNFRSF11B*, *SSPN*, *ITGB1*, *ITGBL1*, *CYP2C8*, *HAS1*, *CYP4B1*, *KRT19*, *RGS1*) variază între -1,132 – -75,608 *ori* (Tabelul 5.2, Figura 5.2).

Tabelul 5.2.

Evaluarea profilului de expresie a genelor de interes în cardiopatia ischemică

Gena	$\Delta Ct$ (patologie)	$\Delta Ct$ (referință)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Valoarea p
<i>IL8</i>	0,895±0,535	1,148±0,228	-0,252±0,582	1,191	0,132#
<i>JAK2</i>	2,100±0,738	2,171±0,176	-0,071±0,759	1,051	0,355#
<i>ITGB1</i>	-1,212±0,395	-1,39±0,155	0,179±0,424	-1,132	0,148#
<i>ELAVL1</i>	1,905±0,698	1,557±0,213	0,348±0,730	-1,272	0,132#
<i>TIMP1</i>	-0,788±0,515	-1,324±0,215	0,536±0,558	-1,450	0,026*
<i>THBS1</i>	1,181±0,624	0,467±0,237	0,714±0,668	-1,641	0,010*
<i>ABCA1</i>	1,871±0,503	0,981±0,132	0,890±0,520	-1,854	0,001*
<i>NPPB</i>	8,879±0,931	7,719±0,157	1,160±0,944	-2,234	<0,001*
<i>SCD</i>	5,338±0,946	4,095±0,115	1,243±0,953	-2,367	0,001*
<i>INHBA</i>	7,548±0,889	6,124±0,247	1,424±0,922	-2,683	<0,001*
<i>CYP2C8</i>	8,376±0,869	6,381±0,397	1,995±0,955	-3,987	<0,001*
<i>HAS1</i>	11,183±0,491	8,967±0,706	2,217±0,860	-4,648	<0,001*
<i>SSPN</i>	5,260±0,679	2,910±0,088	2,350±0,685	-5,098	<0,001*
<i>RGS1</i>	4,336±0,539	1,914±0,199	2,421±0,575	-5,357	<0,001*
<i>CYP4B1</i>	10,517±0,303	7,190±0,266	3,326±0,404	-10,030	<0,001*
<i>KRT19</i>	10,062±1,125	5,405±0,222	4,657±1,106	-25,231	<0,001*
<i>TNFRSF11B</i>	10,848±0,601	5,286±0,169	5,562±0,624	-47,239	<0,001*
<i>ITGBL1</i>	10,912±0,368	4,671±0,175	6,240±0,407	-75,608	<0,001*

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu grupul de referință (Testul U Mann-Whitney), #p>0,05, \*p<0,05;  $\Delta Ct = \bar{x}Ct_{(gena\ de\ interes)} - \bar{x}Ct_{(gena\ de\ referință)}$ ;  $\Delta\Delta Ct = \bar{x}\Delta Ct_{(grup\ patologie)} - \bar{x}\Delta Ct_{(grup\ de\ referință)}$ ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  – valoarea fold change, în unități convenționale.

Dintre acestea, 14 gene (*NPPB*, *SCD*, *ABCA1*, *THBS1*, *INHBA*, *TIMP1*, *TNFRSF11B*, *SSPN*, *ITGBL1*, *CYP2C8*, *HAS1*, *CYP4B1*, *KRT19*, *RGS1*) au manifestat valori ale expresiei semnificative statistic la pacienții cu CPI față de cei sănătoși, excepție constituind genele *ITGB1* și *ELAVL1*.

Activitate transcripțională crescută au prezentat genele *IL8* și *JAK2*, cu valori fold change de 1,191 și, respectiv, 1,051 ori, ele fiind, însă, ne semnificative statistic.

Rezultatele analizei au pus în evidență 16 gene subexprimate și 2 gene supraexprimate la pacienții cu CPI, dintre acestea 14 manifestând diferențe semnificative statistic față de grupul de referință. În cele din urmă, profilul de expresie a genelor în cardiopatia ischemică prezintă subexpresie pentru 14 gene.

În ceea ce privește clasificarea genelor exprimate semnificativ statistic în cardiopatia ischemică, genele *ITGBL1* (-75,608 un.c.), *TNFRSF11B* (-47,239 un.c.) și *KRT19* (-25,231 un.c.) au corespuns nivelului -4 de activitate transcripțională, ceea ce semnifică că genele sunt foarte puternic subexprimate.

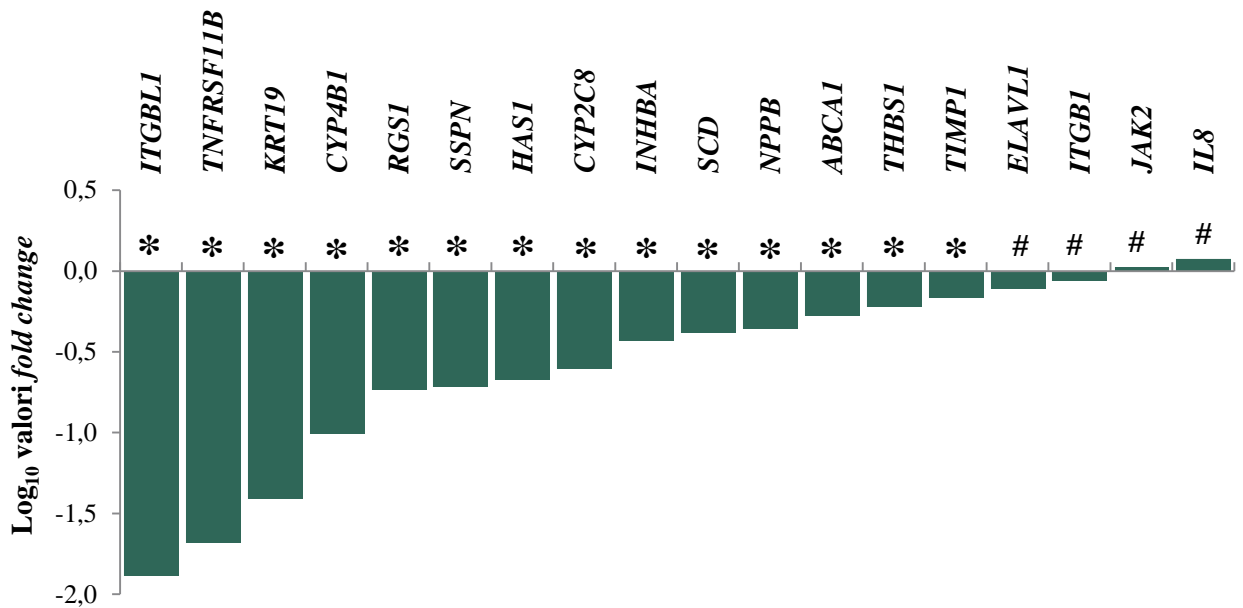


Fig. 5.2. Modificarea expresiei genelor de interes (*fold change*) în cardiopatia ischemică față de lotul de referință.

Genele *CYP4B1* (-10,030 un.c.), *RGS1* (-5,357 un.c.) și *SSPN* (-5,098 un.c.) s-au încadrat în nivelul -2 privind activitatea transcripțională, reprezentând gene moderat subexprimate, iar genele *HAS1* (-4,648 un.c.), *INHBA* (-2,683 un.c.), *SCD* (-2,367 un.c.), *NPPB* (-2,234 un.c.), *ABCA1* (-1,854 un.c.), *THBS1* (-1, 641 un.c.) și *TIMP1* (-1,450 un.c.) au corespuns nivelului -1, fiind slab subexprimate.

### Profilul de expresie al genelor în cardiomiopatiile primare

Analiza profilului de expresie în cardiomiopatiile primare față de lotul de referință a pus în evidență expresie diferențiată pentru genele de interes, valorile cărora variază între -5,377 – 3,281 *ori*. Cea mai pronunțată diminuare a expresiei a fost manifestată de gena *TNFRSF11B* (-5,377 *ori*), iar cele mai înalte valori *fold change* – de gena *HAS1* (3,281 *ori*).

Intervalul de valori *fold change* pentru 9 gene care au demonstrat activitate transcripțională redusă (*TNFRSF11B*, *ITGBL1*, *KRT19*, *IL8*, *SSPN*, *RGS1*, *CYP4B1*, *TIMP1*, *ITGB1*) este cuprins între -1,123 – -5,377 *ori*. Dintre acestea, 6 gene (*TNFRSF11B*, *ITGBL1*, *KRT19*, *IL8*, *SSPN*, *RGS1*) au indicat diferențe statistice semnificative între pacienții cu cardiomiopatii primare față de subiecții sănătoși (Tabelul 5.3, Figura 5.3).

Genele *THBS1*, *CYP2C8*, *JAK2*, *ELAVL1*, *SCD*, *NPPB*, *INHBA*, *ABCA1*, *HAS1* au manifestat creșterea expresiei în CMP față de lotul de referință cu valori *fold change* cuprinse între -1,001 – 3,281 *ori*, dintre care 5 (*ELAVL1*, *SCD*, *INHBA*, *ABCA1*, *HAS1*) au prezentat diferențe statistic semnificative în cardiomiopatiile primare comparative cu grupul de referință.

Nu a fost observată nici o diferență semnificativă statistic privind expresia relativă a genelor *CYP2C8*, *CYP4B1*, *ITGB1*, *JAK2*, *NPPB*, *TIMP1* și *THBS1* la pacienții cu CMP.

Tabelul 5.3.

Evaluarea profilului de expresie a genelor de interes în cardiomiopatiile primare

Gena	$\Delta Ct$ (patologie)	$\Delta Ct$ (referință)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Valoarea p
<i>HAS1</i>	9,305±0,313	11,019±0,233	-1,714±0,390	3,281	<0,001*
<i>ABCA1</i>	1,482±0,711	2,157±0,391	-0,675±0,811	1,597	0,044*
<i>INHBA</i>	7,585±0,469	8,238±0,288	-0,653±0,550	1,573	0,004*
<i>NPPB</i>	9,279±1,234	9,871±0,552	-0,592±1,352	1,507	0,203#
<i>SCD</i>	4,918±0,569	5,410±0,439	-0,492±0,718	1,406	0,050*
<i>ELAVL1</i>	1,908±0,582	2,386±0,271	-0,478±0,641	1,393	0,050*
<i>JAK2</i>	2,556±0,599	2,914±0,307	-0,358±0,673	1,282	0,071#
<i>CYP2C8</i>	7,669±0,524	7,829±0,210	-0,159±0,564	1,117	0,303#
<i>THBS1</i>	1,990±0,900	1,990±0,203	-0,001±0,923	1,001	0,421#
<i>ITGB1</i>	-0,462±0,341	-0,629±0,246	0,167±0,421	-1,123	0,083#
<i>TIMP1</i>	-0,382±0,591	-0,576±0,252	0,194±0,642	-1,144	0,203#
<i>CYP4B1</i>	10,223±0,805	9,733±0,601	0,490±1,005	-1,404	0,096#
<i>RGS1</i>	4,423±0,515	3,838±0,389	0,585±0,646	-1,500	0,015*
<i>SSPN</i>	4,979±0,401	4,219±0,240	0,760±0,468	-1,694	<0,001*
<i>IL8</i>	0,597±0,472	-0,433±0,321	1,031±0,571	-2,043	<0,001*
<i>KRT19</i>	9,833±0,652	8,748±0,149	1,086±0,669	-2,122	0,004*
<i>ITGBL1</i>	9,564±0,760	8,238±0,492	1,326±0,905	-2,507	<0,001*
<i>TNFRSF11B</i>	10,908±0,797	8,481±0,246	2,427±0,834	-5,377	<0,001*

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu grupul de referință (*Testul U Mann-Whitney*), #p>0,05, \*p<0,05;  $\Delta Ct = \bar{x}Ct_{(gena\ de\ interes)} - \bar{x}Ct_{(gena\ de\ referință)}$ ;  $\Delta\Delta Ct = \bar{x}\Delta Ct_{(grup\ patologie)} - \bar{x}\Delta Ct_{(grup\ de\ referință)}$ ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  – valoarea *fold change*, în unități convenționale.

Rezultatele analizei au pus în evidență 9 gene subexprimate și 9 supraexprimate la pacienții cu CMP față de lotul de referință, dintre care 11 au manifestat diferențe semnificative statistic, iar 7 gene au manifestat schimbări ale expresiei ne semnificative din punct de vedere statistic.

Așadar, profilul de expresie a genelor în cardiomiopatiile primare prezintă supraexpresie pentru 5 gene și subexpresie pentru 6 gene.

Referitor la genele semnificativ statistic exprimate în cardiomiopatiile primare, clasificarea conform nivelului de activitate transcripțională a conturat următorul tablou: gena *TNFRSF11B* a corespuns nivelului -2, având valoarea *fold change* -5,377, ceea ce semnifică subexpresie moderată; genele *ITGBL1* (-2,507 un.c.), *KRT19* (-2,122 un.c.), *IL8* (-2,043 un.c.), *SSPN* (-1,694 un.c.) și *RGS1* (-1,500 un.c.) au corespuns nivelului -1 de activitate transcripțională, fiind gene slab subexprimate.

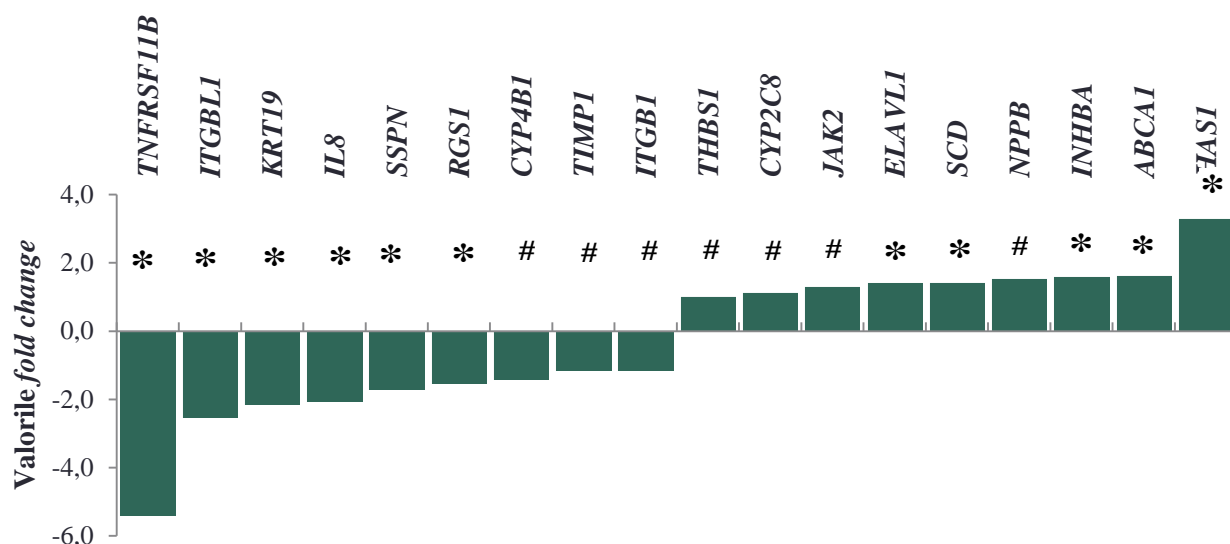


Fig. 5.3. Modificarea expresiei genelor de interes (*fold change*) în cardiomiopatiile primare față de lotul de referință.

Genele *HAS1* ( 3,281 un.c), *ABCA1* (1,597 un.c), *INHBA* (1,573 un.c), *SCD* (1,406 un.c) și *ELAVLI* (1,393 un.c) s-au încadrat în nivelul +1, reprezentând gene slab supraexprimate.

#### Profilul de expresie al genelor în stenoza aortică congenitală

Studiul expresiei genelor candidat în SAo a pus în evidență valori *fold change* ce variază între -1,743 – 20,283. Cel mai diminuat nivel al expresiei a marcat gena *TNFRSF11B* (-1,743 *ori*), iar valoarea cea mai înaltă a fost atestată pentru gena *CYP4B1* (20,283 *ori*).

Valorile *fold change* pentru genele care au demonstrat activitate transcripțională redusă (*TNFRSF11B*, *ITGBL1*, *IL8*, *NPPB*) variază între -1,743 – -1,022 *ori*, diferențe semnificative statistic între pacienții cu SAo față de subiecții sănătoși remarcându-se pentru genele *TNFRSF11B* și *NPPB* (Tabelul 5.4, Figura 5.4).

Genele *INHBA*, *JAK2*, *TIMP1*, *ITGB1*, *ABCA1*, *CYP2C8*, *SSPN*, *THBS1*, *KRT19*, *RGS1*, *ELAVLI*, *SCD*, *HAS1*, *CYP4B1* au manifestat creșterea expresiei cu valori *fold change* cuprinse între 1,013 – 20,283 *ori*.

În cazul genelor supraexprimate, diferențele constatate între pacienții cu SAo comparativ cu grupul de referință au fost semnificative statistic pentru *CYP2C8*, *CYP4B1*, *ELAVLI*, *HAS1*, *ITGB1*, *KRT19*, *RGS1*, *SCD*, *SSPN* și *THBS1*.

Nu a fost observată nici o diferență semnificativă statistic privind expresia relativă a genelor *ABCA1*, *IL8*, *INHBA*, *ITGBL1*, *JAK2* și *TIMP1* la pacienții cu SAo față de subiecții sănătoși.

Tabelul 5.4.

Evaluarea profilului de expresie a genelor de interes în stenoza aortică congenitală

Gena	$\Delta Ct$ (patologie)	$\Delta Ct$ (referință)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Valoarea p
<i>CYP4B1</i>	5,391±0,269	9,733±0,601	-4,342±0,659	20,283	<0,001*
<i>HAS1</i>	9,458±0,243	11,019±0,233	-1,561±0,337	2,951	<0,001*
<i>SCD</i>	3,967±0,239	5,410±0,439	-1,443±0,500	2,719	<0,001*
<i>ELAVL1</i>	1,171±0,289	2,386±0,271	-1,215±0,396	2,321	<0,001*
<i>RGS1</i>	2,887±0,357	3,838±0,389	-0,951±0,528	1,934	<0,001*
<i>KRT19</i>	7,962±0,320	8,748±0,149	-0,785±0,353	1,724	<0,001*
<i>THBS1</i>	1,433±0,446	1,990±0,203	-0,557±0,490	1,471	0,022*
<i>SSPN</i>	3,687±0,157	4,219±0,240	-0,532±0,287	1,446	0,001*
<i>CYP2C8</i>	7,327±0,565	7,829±0,210	-0,502±0,603	1,416	0,008*
<i>ABCA1</i>	1,793±0,638	2,157±0,391	-0,364±0,748	1,287	0,137#
<i>ITGB1</i>	-0,944±0,201	-0,629±0,246	-0,316±0,318	1,245	0,022*
<i>TIMP1</i>	-0,798±0,385	-0,576±0,252	-0,222±0,460	1,166	0,096#
<i>JAK2</i>	2,700±0,609	2,914±0,307	-0,214±0,682	1,160	0,109#
<i>INHBA</i>	8,220±0,853	8,238±0,288	-0,018±0,900	1,013	0,275#
<i>NPPB</i>	9,902±0,776	9,871±0,552	0,031±0,952	-1,022	0,042*
<i>IL8</i>	-0,313±0,471	-0,433±0,321	0,120±0,570	-1,087	0,376#
<i>ITGBL1</i>	8,640±0,752	8,238±0,492	0,402±0,898	-1,321	0,122#
<i>TNFRSF11B</i>	9,282±0,703	8,481±0,246	0,801±0,744	-1,743	0,026*

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu grupul de referință (Testul U Mann-Whitney), #p>0,05, \*p<0,05;  $\Delta Ct = \bar{x} Ct_{(gena\ de\ interes)} - \bar{x} Ct_{(gena\ de\ referință)}$ ;  $\Delta\Delta Ct = \bar{x} \Delta Ct_{(grup\ patologie)} - \bar{x} \Delta Ct_{(grup\ de\ referință)}$ ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  – valoarea fold change, în unități convenționale.

Rezultatele analizei au pus în evidență 4 gene subexpresate și 14 supraexpresate la pacienții cu SAo, dintre care 12 au manifestat diferențe semnificative statistic. Respectiv, profilul de expresie al genelor în SAo prezintă 10 gene supraexpresate și 2 subexpresate.

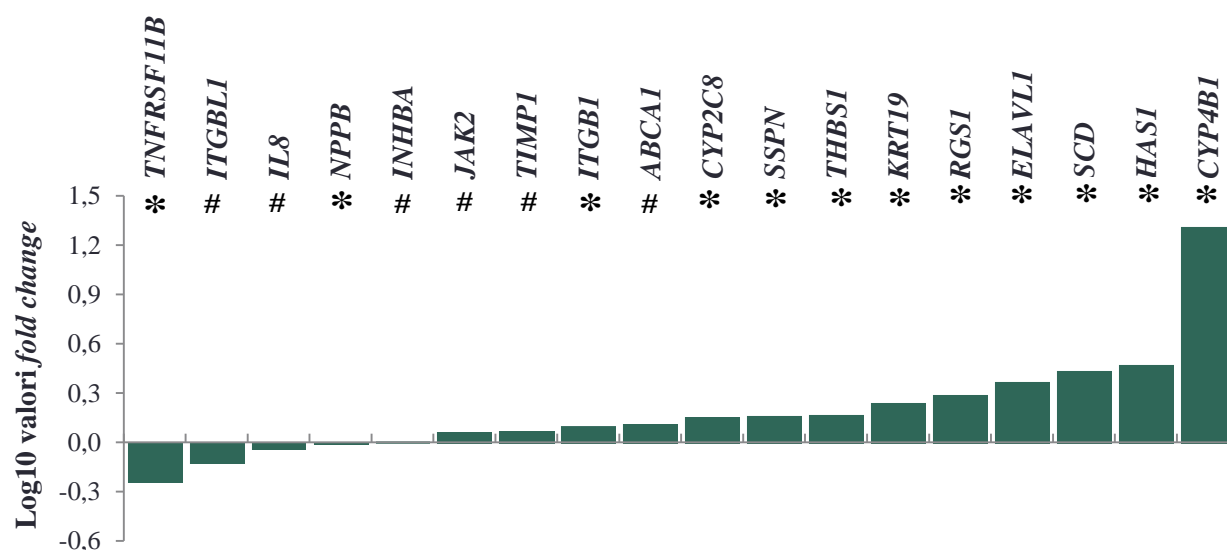


Fig. 5.4. Modificarea expresiei genelor de interes (fold change) în stenoza aortică congenitală față de grupul de referință.

În cazul stenozei aortice congenitale, genele s-au clasificat în dependență de activitatea transcripțională după cum urmează: gena *CYP4B1*, cu valoarea *fold change* 20,283 a corespuns nivelului +4, ceea ce semnifică genă foarte puternic supraexprimată, aceasta fiind unica de acest fel între toate patologiiile studiate; genele *HAS1* (2,951 un.c.), *SCD* (2,719 un.c.), *ELAVL1* (2,321 un.c.), *RGS1* (1,934 un.c.), *KRT19* (1,724 un.c.), *THBS1* (1,471 un.c.), *SSPN* (1,446 un.c.), *CYP2C8* (1,416 un.c.) și *ITGB1* (1,245 un.c.) au corespuns nivelului +1, ceea ce semnifică gene slab supraexprimate; iar genele *TNFRSF11B* și *NPPB* au corespuns nivelului -1, având valoarea *fold change* -1,743, respectiv -1,022, fiind atribuite la gene slab subexprimate.

## 5.2. Aspecte privind expresia genelor în maladiile cardiovasculare

Evaluarea expresiei diferențiate a celor 18 gene, obținută prin Real-Time PCR comparativ cu datele identificate în profilurile *microarray*, demonstrează modificări similare în patologii față de subiecții fără afecțiuni cardiovasculare la 11 dintre genele incluse în studiu, cele mai multe cazuri fiind confirmate experimental și prin analiza bioinformatică pentru CPI-FiA (22%).

Tabelul 5.5.

Direcția de modificare a expresiei genelor candidat în producerea BCV, cuantificată prin Real-Time PCR și *microarray*

Simbolul genei	CMP		CPI		CPI-FiA		SAo	
	FC	IE	FC	IE	FC	IE	FC	IE
<b>Gene prioritar implicate în bolile cardiovasculare</b>								
<i>ABCA1</i>	+, slab	NA	-, slab	+	-, slab	+	+, #	NA
<i>NPPB</i>	+, #	NA	-, slab	NA	-, slab	-	-, slab	+
<i>THBS1</i>	+, #	-	-, slab	+	-, slab	-	+, slab	NA
<i>SCD</i>	+, slab	NA	-, slab	NA	-, slab	+	+, slab	-
<b>Gene potențial implicate în bolile cardiovasculare</b>								
<i>IL8 / CXCL8</i>	-, slab	-	+, #	NA	+, slab	-	-, #	NA
<i>JAK2</i>	+, #	NA	+, #	NA	+, slab	+	+, #	+
<i>INHBA</i>	+, slab	NA	-, slab	+	+, #	-	+, #	NA
<i>ITGB1</i>	-, #	NA	-, #	+	-, #	-	+, slab	NA
<i>ELAVL1</i>	+, slab	NA	-, #	+	-, #	NA	+, slab	-
<i>TIMP1</i>	-, #	NA	-, slab	NA	-, slab	-	+, #	+
<i>CYP2C8</i>	+, #	NA	-, slab	-	-, slab	NA	+, slab	+
<i>HAS1</i>	+, slab	NA	-, slab	NA	-, slab	-	+, slab	+
<i>CYP4B1</i>	-, #	NA	-, moderat	NA	-, slab	+	+, f puternic	-
<i>SSPN</i>	-, slab	+	-, moderat	NA	-, moderat	+	+, slab	NA
<i>RGS1</i>	-, slab	NA	-, moderat	NA	-, moderat	-	+, slab	+
<i>KRT19</i>	-, slab	NA	-, f puternic	NA	-, puternic	-	+, slab	+
<i>TNFRSF11B</i>	-, moderat	-	-, f puternic	NA	-, f puternic	NA	-, slab	+
<i>ITGBL1</i>	-, slab	+	-, f puternic	NA	-, f puternic	+	-, #	NA

Notă: NA – datele de expresie lipsesc; *celule colorate* – gene care au manifestat aceeași direcție de modificare a expresiei în experimentul qPCR și *microarray*; # – date ne semnificative statistic; FC – *fold change*; IE – indice de expresie.

Genele prioritare *NPPB*, *THBS1* și potențialele *IL8*, *JAK2* și *TIMP1* care s-au regăsit în ambele rețele elaborate (Capitolul III), precum și genele *ITGB1*, *CYP2C8*, *HAS1*, *RGS1*, *KRT19* și *TNFRSF11B* au manifestat aceeași direcție de modificare a expresiei conform qPCR și *microarray* în cel puțin una dintre patologii (Tabelul 5.5).



Analiza comparativă între patologii a datelor RT-PCR și *microarray* a permis evidențierea genei prioritare SCD și a celor potențiale HAS1, RGS1, KRT19, CYP2C8 care au manifestat modificări analoage ale expresiei. Genele pentru care nu au fost disponibile date *microarray* au fost investigate experimental, pentru prima dată, fiind relevată expresia lor la nivel sangvin la pacienți cu CPI, CPI-FiA, CMP, SAo (Figura 5.5).

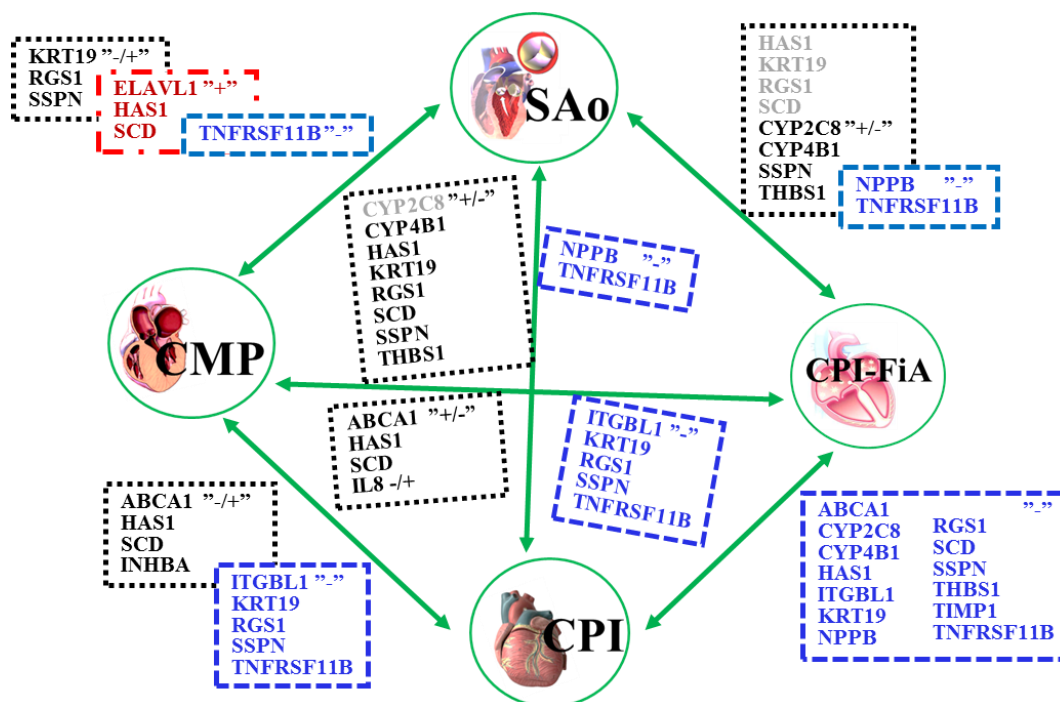


Fig. 5.5. Genele cu expresie modificată în patologii cardiovasculare, conform datelor *qPCR*.

Notă: **albastru** - gene subexpresate; **roșu** - gene supraexpresate; **negru** - gene cu expresie diferită între maladii; **sur** - gene care au manifestat aceeași direcție a modificării expresiei potrivit datelor *microarray* și *qPCR*.

Din totalul variantelor analizate (72=18 gene și 4 fenotipuri), în 52 dintre cazuri modificarea expresiei genelor a prezentat valori statistice semnificative și doar în 20 dintre acestea, modificările au fost nesemnificative. Aceste date confirmă ipoteza de la care am pornit – genele identificate prin analiza exploratorie a profilurilor *microarray* sunt asociate cu patologii cardiovasculare incluse în studiu.

Pe de altă parte, valorile activității transcripționale a genelor sunt variate, ceea ce denotă un grad diferit de asociere cu patologii studiate. Aplicând la BCV modelul propus de Xu și colaboratorii [411] pentru maladiile canceroase se constată o reacție de răspuns *foarte puternic*, *puternic*, *moderat* și *slab* influențată în contextul diferitor afecțiuni cardiovasculare. Astfel, au fost relevate genele *TNFRSF11B* și *ITGBL1* foarte puternic subexpresate în CPI și CPI-FiA, genele *ITGBL1*, *TNFRSF11B* și *KRT19* subexpresate foarte puternic în CPI, în timp ce gena *CYP4B1* a manifestat supraexpresie foarte puternică în SAo (Tabelul 5.6).

Tabelul 5.6.

Clasificarea genelor implicate în producerea BCV în funcție de activitatea transcripțională conform modelului propus de Xu și colab.[411]

	-1 slabă	-2 moderată	-3 puternică	-4 /foarte puternică	+1 slabă	+4 /foarte puternică
<b>CPI- FiA</b>	<i>CYP4B1, CYP2C8, HAS1, THBS1, SCD, NPPB, ABCA1, TIMP1</i>	<i>RGS1 SSPN</i>	<i>KRT19</i>	<i>ITGBL1 TNFRSF11B</i>	<i>IL8 JAK2</i>	
<b>CPI</b>	<i>INHBA, CYP2C8, HAS1, THBS1, SCD, NPPB, ABCA1, TIMP1</i>	<i>CYP4B1 RGS1 SSPN</i>	-	<i>ITGBL1 TNFRSF11B KRT19</i>	-	-
<b>CMP</b>	<i>ITGBL1, KRT19, IL8, SSPN, RGS1</i>	<i>TNFRSF11B</i>	-	-	<i>HAS1, ABCA1, INHBA, SCD, ELAVL1</i>	-
<b>SAo</b>	<i>TNFRSF11B NPPB</i>	-	-	-	<i>HAS1, SCD, ELAVL1, RGS1 KRT19, THBS1 SSPN, CYP2C8, ITGB1</i>	<i>CYP4B1</i>

Notă: **P** – patologie; **R** – referință; „+” – supraexpresie (P>R); „-” – subexpresie (P<R).

Pentru genele potențiale *ITGBL1*, *CYP4B1* și *KRT19* care au manifestat activitate transcripțională puternic și, respectiv, foarte puternic modificată, precum și pentru genele *HAS1*, *RGS1* și *SSPN* cu activitate slabă și moderată, studii care să confirme rolul lor în producerea BCV lipsesc. În acest context, datele de expresie a genelor date în BCV reprezintă o premieră.

Examinarea modificărilor transcripționale semnificative din punct de vedere statistic ale genelor de interes la grupurile cu *patologii în raport* cu lotul de *referință*, a pus în evidență profiluri specifice de expresie în funcție de fenotipul clinic: cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatii primare și stenoza aortică congenitală.

Prin urmare, s-a constatat că profilul de expresie a genelor prezintă în: cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială, supraexpresie pentru 2 gene și subexpresie pentru 13 gene; cardiopatia ischemică, 14 gene subexpresate; cardiomiopatii primare, supraexpresie pentru 5 gene și subexpresie pentru 6 gene; stenoza aortică congenitală 10 gene supraexpresate și 2 gene subexpresate (Tabelul 5.7, Figura 5.6).

S-a determinat că expresia genelor în CPI-FiA și CPI este aproape similară, diferența fiind marcată de gena *INHBA* care a manifestat subexpresie în CPI și de genele *IL8*, *JAK2* pentru care a fost stabilită o activitate transcripțională sporită în CPI-FiA. *INHBA* este un ligand al factorului de creștere și transformare beta (TGF-beta) [29]. De asemenea, stimulează angiogeneza și inflamația prin creșterea nivelului factorului de creștere vascular endotelial (VEGF) [125].

Profilurile de expresie a genelor în diferite patologii cardiovasculare

Gena	SAo	CMP	CPI	CPI-FiA
<i>ABCA1</i>	sur	roșu	albastru	albastru
<i>CYP2C8</i>	roșu	sur	albastru	albastru
<i>CYP4B1</i>	roșu	sur	albastru	albastru
<i>ELAVL1</i>	roșu	roșu	sur	sur
<i>HAS1</i>	roșu	roșu	albastru	albastru
<i>IL8</i>	sur	albastru	sur	roșu
<i>INHBA</i>	sur	roșu	albastru	sur
<i>ITGB1</i>	roșu	sur	sur	sur
<i>ITGBL1</i>	sur	albastru	albastru	albastru
<i>JAK2</i>	sur	sur	sur	roșu
<i>KRT19</i>	roșu	albastru	albastru	albastru
<i>NPPB</i>	albastru	sur	albastru	albastru
<i>RGS1</i>	roșu	albastru	albastru	albastru
<i>SCD</i>	roșu	roșu	albastru	albastru
<i>SSPN</i>	roșu	albastru	albastru	albastru
<i>THBS1</i>	roșu	sur	albastru	albastru
<i>TIMP1</i>	sur	sur	albastru	albastru
<i>TNFRSF11B</i>	albastru	albastru	albastru	albastru

Notă: *albastru* – subexpresie; *roșu* – supraexpresie genică; *sur* – gene cu expresie statistic nesemnificativă.

Analiza comparativă a expresiei genelor între CPI, CPI-FiA, CMP și SAo a permis gruparea factorilor ereditari evaluați în 10 clase, care includ între 1 și 7 gene și se referă la cel puțin una dintre patologii (Figura 5.6):

– 5 clase - gene care au manifestat *sub/ sau supraexpresie doar în una* dintre cele patru patologii cardiovasculare studiate (*ITGB1*, *THBS1*, *CYP2C8*, *CYP4B1*, *SSPN*, *RGS1*, *KRT19*, *ABCA1*, *INHBA*, *JAK2*, *IL8*, *INHBA*);

– 2 clase - gene care au manifestat *sub/ sau supraexpresie în două patologii* (*ELAVL1*, *SCD*, *HAS1*, *TIMP1*, *ABCA1*, *THBS1*, *SCD*, *CYP2C8*, *HAS1*, *CYP4B1*);

– 2 clase - gene care au manifestat *subexpresie în 3 patologii* (*SSPN*, *RGS1*, *KRT19*, *ITGBL1*, *NPPB*)

– 1 clasă - gene care au manifestat *subexpresie în toate cele patru patologii CV* (*TNFRSF11B*).

Rezultatele cercetărilor au demonstrat o activitate transcripțională slab diminuată a genei *CYP2C8* în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială și supraexpresie slabă în stenoza aortică congenitală. Studiile de specialitate, au relatat asocierea acestei gene cu infarctul miocardic [196], ateroscleroza și cardiopatia ischemică [91], fiind implicată în sinteza

colesterolului, steroizilor și a unor lipide [265]. Reactivitatea arterelor coronariene mediată prin flux este afectată prin inhibarea citocromului P450, fapt ce demonstrează implicarea peroxidului de hidrogen în dilatarea vaselor inimii [254], reglarea tonusului vascular, sinteza mediatorilor și a reglatorilor proceselor biologice [135].

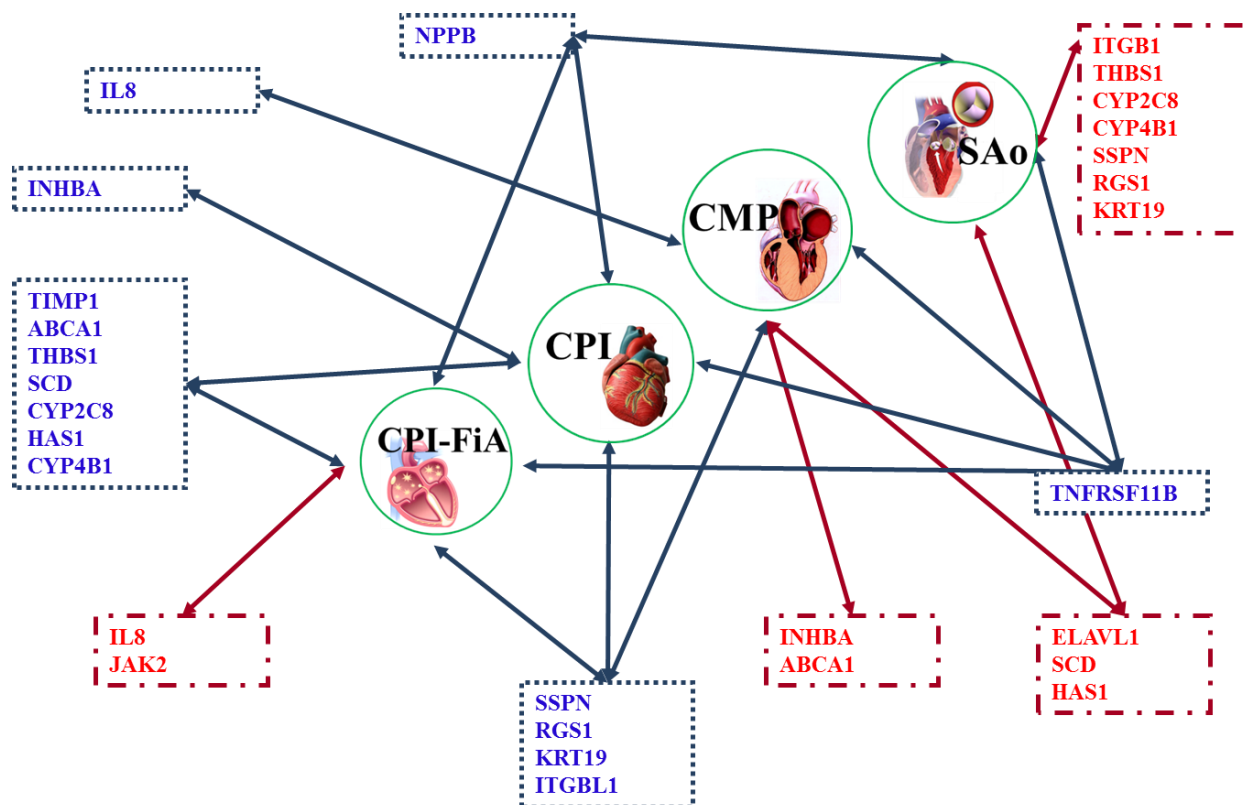


Fig. 5.6. Schema profilului molecular de expresie a genelor de interes în patologiile cardiovasculare.

Notă: *albastru* - gene subexpresate; *roșu* - gene supraexpresate, *CPI* - cardiopatia ischemică; *CPI-FiA* - cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; *CMP* - cardiomiopatii; *SAo* - stenoza aortică congenitală.

Gena *CYP4B1* care codifică o proteină din familia de enzime citocrom P450, implicată în hidroxilarea acizilor grași [319] este subexpresată în CPI-FiA (slab) și cardiopatia ischemică (moderat) și supraexpresată în stenoza aortică congenitală (foarte puternic). Aceste rezultate denotă implicarea genei în metabolismul lipidic și vin în susținerea ipotezei privind rolul important al genei în reglarea fluxului sanguin și proceselor inflamatorii în afecțiunile ischemice ale cordului [135].

Gena *ITGB1*, implicată în transducția semnalelor, adeziune, comunicare, diferențiere și migrare celulară [173] a manifestat supraexpresie slabă în stenoza aortică congenitală, în care turbulența fluxului sangvin, cauzat de arhitectura alterată a valvelor, traumatizează foițele valvulare și determină fibroză, rigiditate crescută și calcificarea acestora [110]. Prin urmare, *ITGB1*, poate avea un rol major în SAo, deoarece integritatea are funcție de receptor pentru

fibronectina care participă în depozitarea lipoproteinelor aterogene în peretele vascular și în placa fibroasă [12].

Gena **THBS1** care codifică trombospondina 1 (TSP1), glicoproteină multifuncțională și componentă majoră a granulelor trombocitelor [54] este slab diminuată în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială și slab supraexpresată în stenoza aortică congenitală, ceea ce sugerează rolul important al acesteia în agregarea plachetară, favorizând conexiunea între trombocite și determinând formarea trombului [235], astfel fiind argumetate și funcțiile de adeziune celulară, fibrinoliză, apoptoză, angiogeneză.

**SSPN** codifică proteina membranară sarcospan [240] care facilitează interacțiunea dintre proteinele transmembranare a mușchilor cardiaci și se asociază cu distrofina și integrina  $\alpha7\beta1$  [241, 287]. În acest studiu expresia genei **SSPN** a fost diminuată moderat în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, slab – în cardiomiopatiile primare și supraexpresată slab în stenoza aortică congenitală. Deși rolul direct al genei **SSPN** în anumite căi metabolice nu este cunoscut, funcțional aceasta a fost asociată cu adeziunea celulară și contracția musculară [133].

Gena **KRT19** implicată în migrarea celulară, codifică un membru al familiei keratinelor cu rol de susținere și formare a citoscheletului celular [327]. Activitatea transcripțională a genei **KRT19** a fost diminuată puternic în cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială, foarte puternic – în CPI, slab – în cardiomiopatiile primare și sporită slab în stenoza aortică congenitală, ceea ce sugerează implicarea genei în menținerea integrității structurale a celulelor epiteliale, frecvent afectată în patologiile CV [122].

Gena **RGS1** codifică proteine de tip G, fixate pe fața internă a membranei celulare care reglează transferul de semnale biologice de la receptorii membranari spre mecanismele efectoare din interiorul celulei [360]. Dereglarea funcțională a acestor proteine a fost atestată în hipertensiunea arterială și ateroscleroză [288]. În cadrul cercetărilor, gena **RGS1** a manifestat subexpresie moderată în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilația atrială, expresie diminuată slab în cardiomiopatiile primare și supraexpresie slabă în stenoza aortică congenitală, date ce denotă implicarea genei în căile de transducție a semnalelor la nivelul celulelor *pacemaker* din miocard. Rezultatele obținute de alți autori, de asemenea indică diminuarea expresiei genei respective la subiecți cu cardiopatie ischemică [352].

Expresia genei **ABCA1**, implicată în procesarea informațiilor de mediu este indusă de steroli, receptori nucleari hormonal, oxisteroli și acizi biliari [394]. Mutațiile la nivelul genei **ABCA1** au fost asociate cu ischemia cardiacă și riscul crescut de BCV [366]. În grupul de subiecți cu cardiomiopatii primare, expresia genei a fost slab sporită, iar în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială slab diminuată, ceea ce susține rolul **ABCA1** în calitate de reglator al

fluxului de colesterol, prin membrana fosfolipidică către apolipoproteine, nivelul cărora corelează cu severitatea și extinderea afectării cardiovasculare [324]. Datele unui studiu ce a vizat profilul de expresie al genelor relevă că creșterea severității bolii la pacienții cu afecțiuni cardiovasculare este asociată cu expresia diminuată a genelor implicate în transportul colesterolului [368]. Diminuarea expresiei genei *ABCA1* la subiecți cu cardiopatie ischemică a fost atestată și în studiile efectuate de către alți cercetători [352].

Gena *TNFRSF11B* care codifică glicoproteina osteoprotegerina (OPG), membru al superfamiliei factorilor de creștere TNF, implicată în transducția semnalelor și în calea metabolică de interacțiune a citokinelor, apoptoză, angiogeneză, răspunsul la medicamente [47] a manifestat o diminuare foarte puternică în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, date care sugerează implicarea genei în calcificarea vasculară, deoarece OPG este frecvent întâlnită în leziunile aterosclerotice avansate. De asemenea, această genă a manifestat expresie diminuată moderat în cardiomiopatiile primare și slab în stenoza aortică congenitală. În plăcile calcificate din aorta umană au fost identificate celule asemănătoare osteoclastelor, activarea lor fiind inhibată de osteoprotegerină și reglată de *proteina matrix Gla* (MGP) activată [47]. În literatura de specialitate, subexpresia genei *TNFRSF11B* a fost observată în cardiomiopatia dilatativă, atât ischemică, cât și non-ischemică [190], din punct de vedere funcțional fiind asociată cu afecțiuni ale arterelor coronare [337]. Nivelul seric al OPG s-a dovedit a avea o valoare de prognostic în insuficiența cardiacă după infarctul miocardic acut la pacienții afectați de anevrism aortic abdominal și boala arterelor periferice [47], iar la pacienții atât diabetici, cât și non-diabetici afectați de boala arterelor coronare, datele experimentale au demonstrat un nivel crescut semnificativ care corelează puternic cu severitatea cardiopatiei ischemice [52]. Remarcabil este că două polimorfisme genetice OPG au fost asociate cu un risc crescut de CPI la bărbații caucazieni, iar nivelul seric OPG a corelat cu una dintre aceste polimorfisme [356, 365].

Gena *INHBA* (inhibina  $\beta$ -A) codifică o glicoproteină ligand al factorului de creștere și transformare  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [29], stimulează angiogeneza și inflamația prin creșterea nivelului factorului de creștere vascular endotelial (VEGF) [125]. Analiza datele obținute a relevat expresia slab diminuată a genei *INHBA* în cardiopatia ischemică și supraexpresia slabă în cardiomiopatiile primare. Rolul genei *INHBA* în dezvoltarea și progresia BCV nu este cunoscut. Faptul că formarea plăcii de aterom mature are la bază eliberarea de către macrofage și celulele endoteliale a factorului de creștere și transformare  $\beta$  [301], sprijină ipoteza că gena *INHBA* ar avea un rol important în patogeneza aterosclerozei.

Gena *JAK2* a prezentat expresie slab sporită în cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială. Creșterea activității genei *JAK2* a fost asociată cu hipertrofia cardiacă, menținută prin

calea de semnalizare *JAK-STAT* – transductor al semnalului și activator al transcripției [129]. Întrucât activitatea funcțională a acestei gene este asociată cu procesarea informațiilor de mediu, prin intermediul citokinelor și a altor factori de creștere [259], devine evident că activitatea optimă a *JAK* kinazelor este critică pentru transmiterea semnalului, integrând componentele din diverse căi de semnalizare intracelulară (*RAS/MAPK*, *PI3K-AKT*, *STAT*, *RTK*).

Gena *IL8* codifică o proteină care aparține familiei  $\alpha$  de chemokine, implicată în mecanismele inflamației [383]. Activitatea transcripțională slab sporită a genei *IL8* a fost constatată în cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială, în timp ce diminuarea slabă a expresiei s-a relevat în cardiomiopatiile primare. Expresia *IL-8* este crescută la nivelul celulelor endoteliale din vecinătatea situsului inflamator [32], ceea ce indică asupra faptului că în cadrul răspunsului inflamator al organismului interleukina 8 induce acumularea neutrofilelor în regiunile lezate, formează un gradient chemotactic în interiorul țesuturilor și ghidează leucocitele activate către zonele inflamate. Traversarea endoteliului de către leucocitele activate, de asemenea este facilitată de *IL8* care alterează expresia integrinelor [199].

Gena *ITGBL1* codifică o glicoproteină transmembranară de adeziune – integrina *beta-like1*, care aparține familiei de proteine EGF, implicată în comunicarea intercelulară, calea metabolică mediată de integrine, inițierea și reglarea proceselor de adeziune celulară [124]. Analiza datele obținute a relevat expresia genei *ITGBL1* diminuată foarte puternic în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, iar în cardiomiopatiile primare o activitate transcripțională slab diminuată. Rolul integrinelor în sistemul cardiovascular este apreciat prin inhibarea agregării trombocitelor după administrarea medicamentelor [174], fapt ce denotă că o expresie diminuată a genei *ITGBL1* favorizează agregarea plachetară, cu formarea striatiunilor lipidice și mai apoi a plăcilor de aterom mature.

Gena *NPPB*, implicată în transducția semnalelor [184], codifică peptidul natriuretic de tip B (BNP), inhibă axul renina – angiotensina – aldosteron și acționează ca vasodilatatori. Expresia crescută a genei a fost asociată cu hipertrofie [51]. În studiul de față, gena *NPPB* a manifestat o expresie slab diminuată atât în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cât și în stenoza aortică congenitală, ceea ce sugerează că efectele biologice ale peptidelor natriuretice, mediate de legarea acestora la receptori specifici de membrană, determină insuficiență cardiacă și disfuncție ventriculară.

Gena *TIMPI*, inhibitor tisular al metaloproteinazelor matriciale (MMP), implicată în transducția semnalelor [80], degradarea matricei extracelulare, repararea și remodelarea ventriculului stâng [156] a prezentat expresie slab diminuată în CPI-FiA și CPI, ceea ce denotă rolul genei în fibroza și disfuncția cardiacă.

Gena *HAS1* codifică proteina hialuronan sintetaza, implicată în polimerizarea acidului hialuronic [113, 137], inflamație, proliferare, aderare, migrare și diferențiere celulară [350]. Lipsa acidului hialuronic este asociată cu prolapsul valvei mitrale al inimii [78]. În studiul de față, expresia diminuată slab a genei *HAS1* a fost evidențiată în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială și supraexpresia slabă în CMP și SAo.

Gena *ELAVL1* care codifică un membru al familiei ELAVL, cu rol în reglarea expresiei genelor, transducția semnalelor, progresia inflamației etc. [178], atestă în cadrul prezentei analize o supraexpresie slabă în cardiomiopatiile primare și în stenoza aortică congenitală, date care sugerează implicarea sa în insuficiența cardiacă.

Gena *SCD* care codifică proteina *stearoil-CoA desaturaza 1*, implicată în procese de oxido-reducere, biosinteza acizilor grași și în căile de transducție a semnalelor AMPK și PPAR [187] a relevat o expresie diminuată slab în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială și supraexpresie slabă în cardiomiopatiile primare și stenoza aortică congenitală. Aceste rezultate sugerează rolul posibil al genei în metabolismul lipidic și declanșarea proceselor inflamatorii. Studiile de specialitate au indicat asocierea *SCD* cu diabetul zaharat tip 2, sindromul metabolic și inflamația [218, 330].

În aspect funcțional, analiza rezultatelor obținute în cadrul studiului, îmbinate cu cunoștințele disponibile în literatura de specialitate a permis elaborarea unui model ipotetic, privind patogeneza BCV care implică o serie de căi de semnalizare și procese biologice (Figura 5.7).

S-a constatat asocierea factorilor ereditari cu inflamația (*IL8*, *TNFRSF11B*, *CYP2C8*, *SCD*, *CYP4B1*, *INHBA*, *THBS1*, *HAS1*, *ELAVL1*), angiogeneza (*TNFRSF11B*, *THBS1*, *INHBA*, *IL8*, *ITGB1*), adeziunea celulară (*SSPN*, *THBS1*, *HAS1*, *ITGBL1*, *ITGB1*), migrarea celulară (*ITGB1*, *HAS1*, *KRT19*), apoptoza (*TNFRSF11B*, *THBS1*), ischemia (*ABCA1*, *CYP4B1*), fibrinoliza (*THBS1*), vasodilatarea (*NPPB*), hipertrofia cardiacă (*NPPB*, *JAK2*), remodelarea ventriculului stâng și degradarea matricei celulare (*TIMP1*), căile de semnalizare și transducția semnalului biologic PI3/Akt (*ITGB1*, *THBS1*, *JAK2*), AMPK (*SCD*, *ELAVL1*), TGF-β (*INHBA*, *THBS1*), Rap1 (*ITGB1*, *THBS1*), GPCR (*RGS1*), cGMP-PKG (*NPPB*), Jak-STAT (*JAK2*), NF-Kb (*IL8*).

Prin generalizarea rezultatelor, remarcăm că majoritatea genelor investigate sunt asociate cu procesele inflamatorii care sunt direct implicate în inițierea și progresia bolilor cardiovasculare, de la stadiul incipient asimptomatic de injurie vasculară, la manifestările clinice de disfuncție și remodelare vasculară. Genele potențiale *IL8* și *TNFRSF11B* sunt factori lezionali ai disfuncției endoteliale, prima inducând acumularea neutrofilelor în regiunile lezate, iar a doua fiind întâlnită în leziunile aterosclerotice avansate [337].



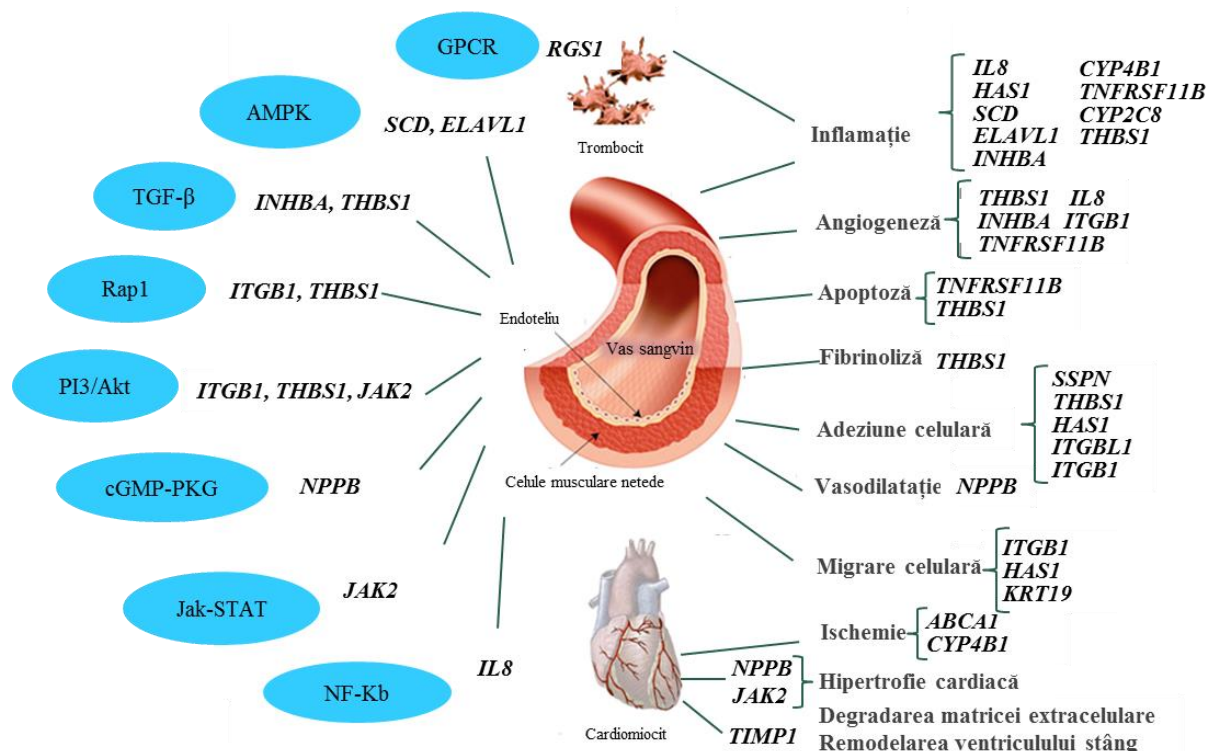


Fig. 5.7. Model ipotetic de implicare a genelor analizate în procesele biologice ce stau la baza patogenezei bolilor cardiovasculare [340, *modificat*]. *Notă: figuri ovale* – căi de semnalizare.

*CYP2C8* și *SCD* sunt implicate în metabolismul acidului arahidonic, derivații căruia sunt mediatori ai inflamației [340]; gena *CYP4B1* catalizează sinteza leucotrienilor cu efect chemotactic pentru macrofage, celule cu rol cheie în inflamație, gena *INHBA* reglează nivelul factorului de creștere vascular endotelial [125]. Alte două gene, *THBS1* și *HAS1* reglează adeziunea și migrarea celulară, inflamația fiind asociată cu alterarea ratei de renovare a acidului hialuronic, iar *ELAVL1* mediază migrarea celulară și transcripția genelor în celulele fagocitare ale sistemului imunitar [178].

### 5.3. Concluzii la capitolul 5

1. Prin analiza *pattern*-ului de expresie a genelor în patologii comparativ cu lotul de referință, s-a relevat că în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială activitatea majorității genelor este diminuată (13 gene/și 2 supraexpresate, respectiv 14 gene), iar în cazul stenozei aortice congenitale – sporită (10 gene/și 2 subexpresate), în timp ce în cardiomiopatiile primare 6 gene au manifestat expresie diminuată și 5 – sporită.

2. Expresia genelor în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială este aproape similară, diferența fiind marcată de gena *INHBA* care a prezentat subexpresie în CPI și de genele *IL8* și *JAK2* pentru care a fost stabilită o activitate transcripțională sporită în CPI-FiA.

3. Clasificarea genelor în dependență de nivelul de expresie în patologiile cardiovasculare a permis evidențierea genelor *TNFRSF11B* și *ITGBL1* foarte puternic subexpresate în CPI și CPI-FiA și a genelor *ITGBL1*, *TNFRSF11B* și *KRT19* – în CPI, în timp ce gena *CYP4B1* a manifestat supraexpresie foarte puternică în SAo.

4. Rolul genelor potențiale *ITGBL1*, *CYP4B1* și *KRT19*, care au manifestat în acest studiu activitate transcripțională puternic și, respectiv, foarte puternic modificată, precum și a genelor *HAS1*, *RGS1* și *SSPN* cu activitate slabă și moderată în patologii cardiovasculare nu este elucidat în studiile de specialitate, datele de expresie a acestor gene prezentând interes științific semnificativ.

5. Compararea expresiei genelor de interes în raport cu patologiile studiate a permis gruparea factorilor ereditari incluși în studiu în 10 clase, ce conțin între 1 și 7 gene și se referă la cel puțin una dintre patologii. Astfel, 5 clase includ genele, care au manifestat sub/ sau supraexpresie doar în una dintre cele patru patologii cardiovasculare studiate; două clase de gene au manifestat sub/sau supraexpresie în două patologii; alte două gene au manifestat subexpresie în 3 patologii și una a manifestat subexpresie în toate cele patru patologii CV, ultimul rezultat demonstrând posibila implicare a acestora în mecanismele generale de răspuns.

6. Analiza rezultatelor în aspect funcțional a permis elaborarea unui model ipotetic, privind patogeneza BCV. S-a constatat asocierea factorilor ereditari cu o serie de procese biologice (inflamația, angiogeneza, adeziunea celulară, migrarea celulară, apoptoza, ischemia, fibrinoliza, vasodilatarea, hipertrofia cardiacă, remodelarea ventriculului stâng și degradarea matricei celulare) și căi de semnalizare și transducție a semnalului biologic PI3/Akt, AMPK, TGF- $\beta$ , Rap1, GPCR, cGMP-PKG, Jak-STAT, NF-Kb.

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. A fost elaborată strategia de extragere și analiză a datelor *microarray* [202], care a permis identificarea și selectarea a 18 gene (din 66 de mii) prioritar sau potențial implicate în cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatiile primare și stenoza aortică congenitală [19]. Analiza rețelelor biologice, elaborate în baza acestora, a pus în evidență genele *TNFRSF11B*, *ITGBL1*, *IL8*, *TIMP1*, *THBS1*, *JAK2*, *ELAVL1*, *SCD*, *NPPB*, *INHBA*, *ABCA1*, *CYP2C8* care se regăsesc atât în cadrul interacțiunii dintre factorii ereditari, cât și de asociere cu patologiile cardiovasculare, dovadă a rolului potențial în patogeneză.

2. S-a constatat că la subiecții sănătoși expresia relativă a genelor este mai mare la adulți, comparativ cu copiii, date care relevă activitatea transcripțională diferențiată în timp pentru 17 dintre cele 18 gene incluse în studiu, iar la subiecții cu patologii CV, fenotipul clinic depinde de activitatea genelor [6].

3. La subiecții sănătoși a fost pus în evidență un interval de variație al expresiei genelor relativ mic (1,1 – 4,0 *ori* la adulți; 1,0 – 3,50 *ori* la copii) și omogenitatea conținutului de transcripti (CV% adulți 3,18 – 25,31; copii 10,14 – 28,96), date care denotă homeostazia celulară și limitele normei de reacție a organismului. La subiecții cu patologii cardiovasculare s-a constatat un nivel mai larg de variație (2,3 – 28,0 *ori* la adulți; 2,0 – 38,0 *ori* la copii) și eterogenitatea înaltă a expresiei genelor (CV% adulți 36,32 – 89,07; copii 36,12 – 100,01), ceea ce relevă că modificările patologice sunt expresia fenotipică evidentă și excesivă a variabilității genetice [7].

4. Investigarea profilului de expresie a genelor în patologie comparativ cu lotul de referință a demonstrat *pattern*-uri specifice pentru fiecare din fenotipurile clinice evaluate. S-a constatat că activitatea transcripțională pentru majoritatea genelor este diminuată în cazul cardiopatiei ischemice cu (13 gene) și fără fibrilație atrială (14 gene), sporită în stenoza aortică congenitală (10 dintre gene), în timp ce în cardiomiopatiile primare genele au manifestat diminuarea expresiei pentru 6 gene și sporirea concentrației de transcripti pentru 5 dintre ele.

5. Datele obținute în urma investigațiilor privind modificarea expresiei genelor în aspect funcțional au demonstrat asocierea factorilor ereditari cu cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatiile primare și stenoza aortică congenitală. S-au stabilit 10 clase, care cuprind între 1 și 7 gene, a căror activitate transcripțională este afectată ca răspuns al organismului la cel puțin una dintre patologii.

6. A fost elaborat un model ipotetic care ilustrează asocierea genelor studiate cu o serie de căi de semnalizare și procese biologice, ceea ce sugerează că aceste gene, probabil acționează ca factori de risc și nu ca o cauză propriu-zisă, participând de rând cu alți factori de mediu și/sau alți factori genetici în patogeneză maladiilor cardiovasculare.

## RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Strategia de extragere și analiză a datelor de expresie *microarray* poate fi aplicată în identificarea genelor cu rol potențial în diferite procese biologice, atât în domeniul geneticii umane, cât și geneticii vegetale.

2. *Pattern*-urile de expresie pot fi recomandate pentru detectarea cardiopatiei ischemice cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatiilor primare și stenoza aortică congenitală.

3. Datele obținute și prezentate în această lucrare sunt recomandate pentru a fi implementate în curriculumul universitar pentru studii superioare de licență (ciclul I) la disciplina *Biologie moleculară și Metode genetice de analiză* la Catedra Biologie a Facultății Științe ale Naturii, Universitatea Academiei de Științe Moldovei.

4. Primerii elaborați pentru determinarea nivelului de expresiei a genelor potențial implicate în bolile cardiovasculare se recomandă spre utilizare în cercetări genetico-moleculare.

## BIBLIOGRAFIE

1. **Abdușa D.** „De la biologie la bioinformatică”. În: Culegere de lucrări a Conferinței Transfrontaliere a Tinerilor: „Tinerii Politicieni, Juriști, Economiști, Jurnaliști, Artiști, Filologi vis-a-vis de extinderea UE”, ediția a X-a. Chișinău, 2013, p.13-23.
2. **Abdușa D.** Bolile cardiovasculare – problemă majoră de sănătate publică. În: Culegere de lucrări a Conferinței științifice cu participare internațională ”Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice”. Chișinău, 2016. p. 332-335.
3. Caproș N., Istrati V., Popescu V. ș.a. Estimarea impactului markerilor polimorfi ai genelor ce determină metabolismul apolipoproteinelor B, E și perturbările lipidice la pacienții cu cardiopatie ischemică. În: Anale șt. ale USMF „N. Testemițanu”. Chișinău, 2012, vol. 3, p.49-56.
4. Ciubotaru A. și Gudumac E. Importanța socioeconomică a tratamentului chirurgical al malformațiilor cardiace congenitale. În: Buletinul AȘM. Științe Med., 2006, Nr. 5(9), p. 21-28.
5. Duca M., Levițchi A., Martea R., **Abdușa D.**, Dragomir L. Metodologia de utilizare a metadatelor experiențelor *microarray* în elaborarea ipotezelor științifice pentru cercetarea *Arabidopsis thaliana*. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții. 2012, Nr. 3 (318), p.105-112.
6. Duca Maria, Paliu Ina, **Abdușa Daniela.** Expresia unor gene în bolile cardiovasculare la copii și adulți. În: Buletinul AȘM. Științele Vieții, 2017, Nr. 1 (331), p. 59-66.
7. Duca Maria, Paliu Ina, **Abdușa Daniela.** Variabilitatea intrapopulațională a unor gene asociate cu patologia cardiovasculară. In: Akademos, 2017, Nr. 2, p. 60-65.
8. Ginghina C. Mic tratat de cardiologie. București: Academia Română, 2010. 894 p.
9. Grecu M. Progrese în diagnosticul și managementul cardiomiopatiei hipertrofice. În: Progrese în cardiologie, 2009, p. 56-66.
10. Ignat R., et al, Curocichin Gh. Caracteristica factorilor convenționali de risc cardiovascular la populația tânără din Republica Moldova: studiu transversal. În: Revista de Științe ale Sănătății din Moldova, 2017, nr. 1(11) / 2017, p. 33-43.
11. Istrati V., Manea D., Barbacar N. et al. Corelația unor markeri polimorfi ai genelor enzimei de conversie a angiotensinei 1 și a receptorilor tip 1 ai angiotensinei 2 cu extinderea procesului aterosclerotic în arterele coronariene. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale, 2006, vol. 1(5), p. 64-69.
12. Munteanu I. Tratat de Obstetrică. București: Academia Română, 2006, 1440 p.
13. Obreja G., Țurcanu G. Prevenirea și controlul bolilor netransmisibile în viziunea politicilor nutriționale și de activitate fizică. Chișinău: Centrul PAS, 2012, 33 p.
14. Pomohaci Cr., Pârlea D. Analiza datelor. Ediția II. București: Fundației România de mâine, 2008. 183 p.

15. Prevalența Factorilor de Risc pentru Bolile Netransmisibile în Republica Moldova. STEPS 2013”. Agenția Elvețiană pentru Dezvoltare și Cooperare, Organizația Mondială a Sănătății, Publicație a WHO Regional Office for Europe, 2014. 221p.
16. Steclari T., Rudi M., Paliu I. Malformații congenitale cardiace. Vol. 1. Epidemiologie. Etiologie. Semiologie. Forme clinice. Diagnostic. Chișinău: Tipogr. Centrală, 2008. 317 p.
17. Strategia Națională de Sănătate Publică pentru anii 2014 – 2020. Aprobata prin hotărârea Guvernului nr.1032 din 20 decembrie 2013, 240 p.
18. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва: Колос, 1979. 414 с.
19. **Abdusa D.** Identification of genes involved in cardiovascular diseases. In: Collection of academic papers ”Factors in Experim Evolut of Organisms”, Odessa, Ukraine, 2016, p. 243-246.
20. Adam O. et al. Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation. In: JAC Cardiol., 2010, vol. 55, nr. 5, p. 469-80.
21. Adi L.T., Roberto R., Sorin D. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. In: Am J of Obstetrics and Gynecology, 2006, vol. 195, nr. 2, p. 373-388.
22. Aguirre L.A. et al. Long-range regulatory interactions at the 4q25 atrial fibrillation risk locus involve *PITX2c* and *ENPEP*. In: BMC Biol., 2015, vol. 13:26.
23. Ahmad F., Seidman J.G., Seidman C.E. The genetic basis for cardiac remodeling. In: Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006, vol. 6, p. 185-216.
24. Alberts B. et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Chapter 7, Control of Gene Expression. New York: Garland Science, 2002.
25. Allen A.M., Oncken C., Hatsukami D. Women and Smoking: The Effect of Gender on the Epidemiology, Health Effects, and Cessation of Smoking. In: Curr Addict Rep., 2014, vol. 1(1), p. 53-60.
26. Andersen L., Ibarra J., Andersen R. Current familial hypercholesterolemia diagnostic criteria underdiagnose APOB mutations: Lessons from the Amish community. In: J Clin Lipidol., 2016, vol. 10, nr. 2, p. 443-4.
27. Andersen P.S. et al. Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. In: Hum Mutat, 2009, vol. 30, p. 363-370.
28. Ando T., Kato R., Honda H. Differential variability and correlation of gene expression identifies key genes involved in neuronal differentiation. In: BMC Syst Biol., 2015, vol. 9:82.
29. Andreasen P.A., Egelund R. and Petersen H.H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. In: Cell Mol Life Sci 2000, vol. 57, p. 25-40.
30. Arppe A., Milin R.P., Baayen H. Package Naive Discriminative Learning Version 0.1.1, 2011. <https://cran.r-project.org/web/packages/ndl/ndl.pdf> (vizitat 12.03.2012)

31. Artz A., Butz S., Vestweber D. GDF-15 inhibits integrin activation and mouse neutrophil recruitment through the ALK-5/TGF- $\beta$ RII heterodimer. In: *Blood*, 2016, vol. 128, p. 529–541.
32. Arvind P. et al. Understanding gene expression in coronary artery disease through global profiling, network analysis and independent validation of key candidate genes. In: *J Genet.*, 2015, vol. 94, nr. 4, p. 601-10.
33. Aulin J. et al. Interleukin-6 and C-reactive protein and risk for death and cardiovascular events in patients with atrial fibrillation. In: *Am Heart J.*, 2015, vol. 170, p. 1151– 60.
34. Baayen H.R. Data sets and functions with “Analyzing Linguistic Data: A practical introduction to statistics”. Cambridge University Press. 2011. <http://cran.r-project.org/web/packages/languageR/languageR.pdf> (vizitat 29.04.2012).
35. Badimon L., Padró T., Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. In: *Eur Heart J: Acute Cardiovascular Care*, 2012, vol. 1, p. 60-74.
36. Bahar R. et al. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature*, 2006, vol. 441, p. 1011–1014.
37. Bain G. et al. Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of AM103, a Novel Inhibitor of 5-Lipoxygenase-Activating Protein (FLAP). In: *Clin Pharmacol Ther.*, 2010, vol. 87, nr. 4, p. 437-444.
38. Bajikar S.S. et al. Parameterizing cell-to-cell regulatory heterogeneities via stochastic transcriptional profiles. In: *Proc. Nat Acad of Scien of the USA*, 2014, vol. 111(5), p. E626–35.
39. Bangalore S. et al. Blood pressure targets in patients with coronary artery disease: observations from traditional and Bayesian random effects meta-analysis of randomised trials. In: *Heart*, 2013, vol. 99(9), p. 601-13.
40. Barbalic M. et al. Large-scale genomic studies reveal centralrole of ABO in sP-selectin and sICAM-1levels. In: *Hum Mol Genet*, 2010, vol. 19, p. 1863-1872.
41. Barrans D.B., Liew C.C. “Chiping away at Heart Failure. In: Kearns-Jonker M ed. *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 126: Congenital Heart Disease: Molecular Diagnostics, Humana Press Inc., Totowa NJ, 2006, p. 157-169.
42. Barrans J.D. et al. Global gene expression of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. In: *Am J Pathol*, 2002, vol. 160, p. 2035-2043.
43. Barrans J.D., Stamatiou D., Liew C. Construction of a human cardiovascular cDNA microarray: portrait of the failing heart. In: *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, vol. 280, p. 964-969.
44. Barrett T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. In: *Nucleic Acids Res.*, 2013, vol. 41, p. 991–5.

45. Belcher C.E. et al. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. In: PNAS of the USA, 2000, vol. 97, nr. 25, p. 13847-13852.
46. Berezin A.E. Circulating Vascular Endothelial Growth Factor-1 in Cardiovascular Disease. Biomarkers in CVD. In: Biomarkers in CVD: Springer, 2016. p. 341-357.
47. Bernardi S. et al. Roles and Clinical Applications of OPG and TRAIL as Biomarkers in Cardiovascular Disease. In: BioMed Research International, 2016, vol. 2016:1752854.
48. Berndt A.J.E. et al. Gene Regulatory Mechanisms Underlying the Spatial and Temporal Regulation of Target-Dependent Gene Expression in *Drosophila* Neurons. In: PLoS Genet., 2015, vol. 11(12): e1005754.
49. Bielecka-Dabrowa A. et al. The multi-biomarker approach for heart failure in patients with hypertension. In: Int J Mol Sci., 2015, vol. 16, p. 10715-33.
50. Bis J.C. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE consortium identifies common variants associated with carotid intima media thickness and plaque. In: Nat Genet., 2011, vol. 43, p. 940-7.
51. Bittel D.C. et al. Gene expression in cardiac tissues from infants with idiopathic conotruncal defects. In: BMC Medical Genomics, 2011, vol. 4:1.
52. Bjerre M. Osteoprotegerin (OPG) as a biomarker for diabetic cardiovascular complications. In: SpringerPlus, 2013, vol. 2:658.
53. Blair E. et al. Mutations in the gamma (2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. In: Hum Mol Genet, 2001, vol. 10, p. 1215-1235.
54. Bodner-Adler B. et al. Expression of thrombospondin 1 (TSP 1) in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical study. In: Gynecologic Oncology, 2006, vol. 103, nr. 1, p. 186–189.
55. Bosse Y., et al. Genomics: the next step to elucidate the etiology of calcific aortic valve stenosis. In: J Am Coll Cardiol., 2008, vol. 51, p. 1327-1336.
56. Brønne I. et al. Prediction of causal candidate genes in coronary artery disease loci. In: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2015, vol. 35(10):2207-2217.
57. Braun J. and Hüttelmaier S. Pathogenic mechanisms of deregulated microRNA expression in thyroid carcinomas of follicular origin. In: Thyroid Res., 2011, vol. 4(Suppl 1):S1.
58. Braverman A.C. The bicuspid aortic valve and associated aortic disease. In: Otto CM, Bonow RO, eds. Valvular heart disease. Philadelphia. In: Elsevier, 2013, p. 179-218.
59. Brinkmeyer-Langford C.L. et al. Aging Shapes the Population-Mean and -Dispersion of Gene Expression in Human Brains. In: Front. Aging Neurosci., 2016, vol. 8:183.



60. Brook R.D. et al. Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease: An Update to the Scientific Statement From the AHA. In: *Circulation*, 2010, vol. 121, p. 2331-2378.
61. Buraczynska M. et al. Effect of G(-174)C polymorphism in interleukin-6 gene on cardiovascular disease in type 2 diabetes patients. In: *Cytokine*, 2016, vol. 79, p. 7-11.
62. Burczynski M.E., Dorner A.J. Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. In: *Pharmacogenomics*, 2006, vol. 7, p. 187-202.
63. Bustin S.A., Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. In: *Clin Sci*, 2005, vol. 109, p. 365-379.
64. Campuzano O. et al. Genetics of channelopathies associated with sudden cardiac death. In: *Global Cardiology Science & Practice*, 2015, vol. 2015(3):39.
65. Cankar K. et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. In: *BMC Biotechnol*, 2006, vol. 6, p. 37-52.
66. Cannon C.P. Cardiovascular disease and modifiable cardiometabolic risk factors. In: *Clin Cornerstone*, 2007, vol. 8, nr. 3, p. 11-28.
67. Cao X.L. et al. Chromosome 9p21 and ABCA1 Genetic Variants and Their Interactions on Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke in a Chinese Han Population. In: *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, nr. 4:586.
68. Carstensen B. Introduction, in *Comparing Clinical Measurement Methods: A Practical Guide*. Ch. 9, Repeatability, Reproducibility and Coefficient of Variation. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2010, p. 107-114.
69. Chang B-D. et al. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. In: *PNAS of the USA*, 2002, vol. 99, nr.1, p. 389-394.
70. Chao S., Cheng C., Liew C-C. Mining the Dynamic Genome: A Method for Identifying Multiple Disease Signatures Using Quantitative RNA Expression Analysis of a Single Blood Sample. In: *Microarrays*, 2015, vol. 4(4), p. 671-689.
71. Chen H.H. and Stewart A.F. Transcriptomic Signature of Atherosclerosis in the Peripheral Blood: Fact or Fiction? In: *Curr Atheroscler Rep.*, 2016, vol. 18(12):77.
72. Chen-long Chu et al. Identification and Validation of Gene Expression Patterns in Cystitis Glandularis Patients and Controls. In: *SLAS Discovery*, 2017, p. 1-8.
73. Cheung V.G. et al. Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. In: *Nat Gen.*, 2003, vol. 33, p. 422-425.
74. Christopher J.D., Elizabeth G.N. Genomics of Cardiovascular Disease. In: *N Engl J Med.*, 2011, vol. 365, p. 2098-109.
75. Christophersen I.E., Ellinor P.T. Genetics of atrial fibrillation: From families to genomes. In: *J Hum Genet.*, 2015, vol. 61, p. 61-70.

76. Chu H. et al. Tumor necrosis factor-alpha G-308 A polymorphism and risk of coronary heart disease and myocardial infarction: A case-control study and meta-analysis. In: *Journal of Cardiovascular Disease Research*, 2012, vol. 3(2), p. 84-90.
77. Chuang S.C. et al. Cellular immune activity biomarker neopterin is associated hyperlipidemia: results from a large population-based study. In: *Immunity & Ageing: I & A.*, 2016, vol. 13:5.
78. Connell P.S., Han R.I., Grande-Allen K.J. Differentiating the aging of the mitral valve from human and canine myxomatous degeneration. In: *J Veter Card.*, 2012, vol. 14(1), p. 31-45.
79. Cunnington M.S. et al. Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression. In: *PLoS Genet*, 2010, vol. 6. p. 1-17.
80. D'Angelo R.C. et al. TIMP-1 via TWIST1 Induces EMT Phenotypes in Human Breast Epithelial Cells. In: *Molecular cancer research: MCR*, 2014, vol. 12(9), p. 1324-1333.
81. Dagur P.K., McCoy J.P. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. In: *Current protocols in cytometry*, 2015, vol. 73, pag. 5.1.1-5.1.16.
82. David D.M. and Jane E.F. MicroRNAs in platelet function and cardiovascular disease. In: *Nature Reviews Cardiology*, 2015, vol. 12, p. 711–717.
83. David S., Geoffrey S.G., Pascal J.G. Gene Expression Analysis of Cardiovascular Diseases: Novel Insights Into Biology and Clinical Applications. In: *J Am Coll Cardiol*, 2006, vol. 48, p. 227-235.
84. Davis S., Meltzer P.S. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. In: *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, nr. 14, p. 1846-1847.
85. Davis S.K. et al. Social determinants of cardiovascular health among black and white women residing in Stroke Belt and Buckle regions of the South. In: *Ethn Dis.*, 2014, vol. 24(2), p. 133-43.
86. De Faria A.P., Modolo R., Moreno H. Plasma 8-Isoprostane as a Biomarker and Applications to Cardiovascular Disease. In: *Biomarkers in Cardiovascular Disease*, Springer, 2016. p. 467-488.
87. De Neve J. et al. An extension of the Wilcoxon-Mann-Whitney test for analyzing RT-qPCR data. In: *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2013, vol. 12, nr. 3, p. 333-346.
88. De Vienne D. et al. Genetic variability of proteome expression and metabolic control. In: *Plant Physiol. Biochem.*, 2001, vol. 39, p. 271–283.
89. De Vries F.M. et al. Primary prevention of major cardiovascular and cerebrovascular events with statins in diabetic patients: a metaanalysis. In: *Drugs*, 2012, vol. 72(18), p. 2365-73.
90. Dellefave L., McNally E.M. The genetics of dilated cardiomyopathy. In: *Curr Opin Cardiol*, 2010, vol. 25, nr. 3, p. 198-204.

91. DeLozier T.C. et al. Detection of Human CYP2C8, CYP2C9 and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues. In: *Drug Metab Dispos.*, 2007, vol. 35(4), p. 682-688.
92. Dermitzakis E.T. From gene expression to disease risk. In: *Nat. Genet.*, 2008, vol. 40: 492–493.
93. Derveaux S., Vandesompele J., Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. In: *Methods*, 2010, vol. 50, nr. 4, p. 227-230.
94. Dhana K. et al. Trajectories of body mass index before the diagnosis of cardiovascular disease: a latent class trajectory analysis. In: *Eur J Epidemiol*, 2016, vol. 31:583.
95. Di Giuseppe R., et al. Plasma osteoprotegerin, its correlates, and risk of heart failure: a prospective cohort study. In: *European Journal of Epidemiology*, 2016, p. 1-11.
96. Diaz-Beltran L., Esteban F.J., Wall D.P. A common molecular signature in ASD gene expression: following Root 66 to autism. In: *Translational Psychiatry*, 2016, vol. 6(1):e705.
97. Diehn M. et al. Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. In: *PNAS of the USA*, 2002, vol. 99, nr. 18, p. 11796-11801.
98. Drenos F., Whittaker J., Humphries S. The use meta-analysis risk estimates for candidate genes in combination to predict coronary heart disease risk. In: *Ann Human Genetics*, 2007, vol. 71, p. 611-619.
99. Ducharme V. et al. NOTCH1 genetic variants in patients with tricuspid calcific aortic valve stenosis. In: *J Heart Valve Dis.*, 2013, vol. 22, p. 142–149.
100. Dworatzek E., Mahmoodzadeh S. Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system. In: *Pharmacological Research.*, 2017, vol. 119, p. 27-35.
101. Ebrahimi-Mamaeghani M., et al. Adiponectin as a potential biomarker of vascular disease. In: *Vasc Health Risk Manag.*, 2015, vol. 11, p. 55-70.
102. Ecker S. et al. Higher gene expression variability in the more aggressive subtype of chronic lymphocytic leukemia. In: *Genome Med.*, 2015, vol. 7:8.
103. Ecker Simone et al. Genome-wide analysis of differential transcriptional and epigenetic variability across human immune cell types. In: *Genome Biology*, 2017, vol. 18:18.
104. Edwards M.G. et al. Gene expression profiling of aging reveals activation of a p53-mediated transcriptional program. In: *BMC Genomics*, 2007, vol. 8 p. 80.
105. Ek W.E. et al. Genome-wide DNA methylation study identifies genes associated with the cardiovascular biomarker GDF-15. In: *Hum Mol Genet.*, 2016, vol. 25, p. 817-27.
106. Elashoff M.R. et al. Development of a blood-based gene expression algorithm for assessment of obstructive coronary artery disease in non-diabetic patients. In: *BMC Medical Genomics*, 2011, vol. 4:26.

107. Elliott P. et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. In: *Eur Heart J.*, 2008, vol. 29, p. 270–276.
108. Elliott P. et al. Genetic loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease. In: *JAMA*, 2009, vol. 302, p. 37-48.
109. Elliott P.M. et al. ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the ESC. In: *Eur Heart J.*, 2014, vol. 35, p. 2733-79.
110. Elsherif L. et al. Combined deficiency of dystrophin and beta1 integrin in the cardiac myocyte causes myocardial dysfunction, fibrosis and calcification. In: *Circ Res.*, 2008, vol. 102, p. 1109–1117.
111. EUROASPIRE II. Study Group. Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries; principal results from EUROASPIRE II Euro Heart Survey Programme. In: *Eur Heart J.*, 2001, vol. 22(7), p. 554–72.
112. Fahed A.C. et al. Variable expressivity and co-occurrence of LDLR and LDLRAP1 mutations in familial hypercholesterolemia: failure of the dominant and recessive dichotomy. In: *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2016, vol. 4, nr. 3, p. 283-291.
113. Farage M.A., Miller K.W., Maibach H.I. *Textbook of Aging Skin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 1220 p.
114. Feistritz H.J. et al. Novel biomarkers predicting cardiac function after acute myocardial infarction. In: *Br Med Bull.*, 2016, vol. 119, p. 63–74.
115. Feistritz H.J., Reinstadler S.J. et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide is associated with aortic stiffness in patients presenting with acute myocardial infarction. In: *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2016, vol. 5(8), p. 560-567.
116. Flowers E., Froelicher E.S., Aouizerat B.E. Gene-Environment Interactions in Cardiovascular Disease. In: *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2012, vol. 11(4), p. 472-478.
117. Foffa I. et al. Sequencing of *NOTCH1*, *GATA5*, *TGFBR1* and *TGFBR2* genes in familial cases of bicuspid aortic valve. In: *BMC Med Genet.*, 2013, vol. 14:44.
118. Folsom A.R. Classical and novel biomarkers for cardiovascular risk prediction in the United States. In: *Journal of Epidemiology*, 2013, vol. 23(3), p. 158-162.
119. Foroughmand A.M. et al. Association of *MEF2A* gene polymorphisms with coronary artery disease. In: *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 2014, vol. 16, nr. 8:e13533.
120. Fuchs F., Martyn D.A. Length-dependent Ca (2+) activation in cardiac muscle: some remaining questions. In: *J Muscle Res, Cell Motil*, 2005, vol. 26, p. 199-212.
121. Fujio Y. et al. Glycoprotein 130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases. In: *J Pharmacol Sci.*, 2011, vol. 117(4), p. 213-22.

122. Gaia F. et al. Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. In: BioMed Research International, 2014, vol. 2014, 28 p.
123. Galougahi K.K. et al. Redox biomarkers in cardiovascular medicine. In: Eur Heart J., 2015, vol. 36, p. 1576–82.
124. Ganguly KK, Pal S, Moulik S, Chatterjee A. Integrins and metastasis. In: Cell Adhesion & Migration, 2013, vol. 7(3), p. 251-261.
125. Gao S. et al. Epigenetic alterations of the SERPINE1 gene in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. In: Genes Chromosomes Cancer 2010, vol. 49, p. 526-538.
126. Garg P.K. et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and incident peripheral arterial disease in older adults: The Cardiovascular Health Study. In: Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2016, vol. 36, p. 750–6.
127. Gehmlich K. et al. Decreased interactions of mutant muscle LIM protein (MLP) with N-RAP and alpha-actinin and their implication for hypertrophic cardiomyopathy. In: Cell Tissue Res, 2004, vol. 317, p. 129-136.
128. Geisterfer-Lowrance A.A. et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. In: Cell, 1990, vol. 62, p. 999–1006.
129. Genneback N. et al. Transcriptional regulation of cardiac genes balance pro- and anti-hypertrophic mechanisms in hypertrophic cardiomyopathy In: Cardiogen., 2012, vol. 2, nr 1:e5.
130. Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. In: Genome Biol., 2004, vol. 5, nr. 10, p. 80.
131. Gerd Baldenhofer et al. Mid-regional pro-adrenomedullin (MR-proADM) and mid-regional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) in severe aortic valve stenosis: association with outcome after transcatheter aortic valve implantation (TAVI). In: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2017, vol. 55(2), p. 275–283.
132. Gerval M.O., Stevenson J.C. Establishing the risk related to hormone replacement therapy and cardiovascular disease in women. In: Clinical Pharmacist, 2017. Available online 10 January 2017.
133. Gibbs E.M. et al. High levels of sarcospan are well tolerated and act as a sarcolemmal stabilizer to address skeletal muscle and pulmonary dysfunction in DMD. In: *Human Molecular Genetics*, 2016, vol. 25(24), p. 5395-5406.
134. Glass D. et al. Gene expression changes with age in skin, adipose tissue, blood and brain. In: Genome Biol., 2013, vol. 14 :R75.
135. Gotlieb R.A. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. In: Arch Biochem Biophys, 2003, vol. 420, p. 6812-6817.

136. Graham I. et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). In: *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.*, 2007, vol. 14(Suppl 2):E1–40.
137. Greco T.M., Antunes M.B., Yellin S.A. Injectable fillers for volume replacement in the aging face. In: *Facial Plast Surg*, 2012, vol. 28, nr. 1, p. 8-20.
138. Green D. et al. Association of the von Willebrand Factor-ADAMTS13 ratio with incident cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease. In: *Clin Appl Thromb Hemost.*, 2016, p. 1-7.
139. Green M.R., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New-York: CSH Press, 2012, 3 v., 2028 p.
140. Griffin B., Topol E. *Manual of Cardiovascular Medicine 2009: ed 3*. Lippincot Williams-Wilkins; 874-886.
141. Gucuk Ipek E. et al. Evaluation of galectin-3 levels in acute coronary syndrome. In: *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*, 2016, vol. 65, p. 26-30.
142. Gudbjartsson D., Amar D., Helgadóttir A. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. In: *Nature*, 2007, vol. 448, p. 353-357.
143. Guenard F. et al. Use of Blood as a Surrogate Model for the Assessment of Visceral Adipose Tissue Methylation Profiles Associated with the Metabolic Syndrome in Men. In: *J Mol Genet Med.*, 2016, vol. 10:198.
144. Haider A. et al. Men with testosterone deficiency and a history of cardiovascular diseases benefit from long-term testosterone therapy: observational, real-life data from a registry study. In: *Vasc Health Risk Manag.*, 2016, vol. 12, p. 251-61
145. Handy D.E., Castro R., Loscalzo J. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. In: *Circulation*, 2011, vol. 123(19), p. 2145-2156.
146. Hansson G.K, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. In: *Nat Rev Immunol*, 2006, vol. 6, p. 508–519.
147. Harsimran S. et al. Pathophysiology of Cardiomyopathies. In: *Cellular and molecular pathobiology of cardiovascular disease*. Harsimran Saini et al., (Ed.). In: Elsevier, 2014. p. 101-119.
148. Hartley L. et al. Increased consumption of fruit and vegetables for the primary prevention of cardiovascular diseases. In: *Cochrane Database Syst Rev.*, 2013, vol. 6:CD009874.
149. Hayashi T. et al. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. In: *J Am Coll Cardiol*, 2004, vol. 44, p. 2192-2201.

150. Hazarika S., Annex B.H. Biomarkers and Genetics in Peripheral Artery Disease. In: *Clin Chem.*, 2017, vol. 63(1), p. 236-244.
151. Hebert Jeffrey J. et al. The Prospective Association of Organized Sports Participation With Cardiovascular Disease Risk in Children (the CHAMPS Study-DK). In: *Mayo Clinic Proceedings*, 2017, vol. 92, nr. 1, p. 57 – 65.
152. Hepgul N. et al. Depression pathogenesis and treatment: what can we learn from blood mRNA expression? In: *BMC Med*, 2013, vol. 11:28.
153. Herder C., Karakas M., Koenig W. Biomarkers for the Prediction of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. In: *Clin Pharmacol Ther*, 2011, vol. 90, p. 52–66.
154. Herman D.S. et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. In: *N Engl J Med*, 2012, vol. 366, p. 619-628.
155. Hess O.M., McKenna W., Schultheiss HP. Myocardial Disease. In: *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine*, ed. Camm AJ., Luscher TF., Serruys PW Second edition. Oxford University Press, 2009, p. 665-715.
156. Heymans S. et al. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. In: *Circulation*, 2005, vol. 112, nr. 8, p. 1136–44.
157. Hijazi Z. et al. Efficacy and safety of apixaban compared with warfarin in patients with atrial fibrillation in relation to renal function over time: insights from the ARISTOTLE randomized clinical trial. In: *JAMA Cardiol.*, 2016, vol. 1, p. 451– 60.
158. Hijazi Z., Oldgren J. et al. Application of Biomarkers for Risk Stratification in Patients with Atrial Fibrillation. In: *Clin Chem.*, 2017, vol. 63(1), p. 152-164.
159. Ho C.Y. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. In: *Circulation*, 2010, vol. 122, nr. 23, p. 2430-2440.
160. Ho J.W.K. et al. Differential variability analysis of gene expression and its application to human diseases. In: *Bioinformatics*, 2008, vol. 24(13):i390-i398.
161. Hogas, S. et al. Potential novel biomarkers of cardiovascular dysfunction and disease: cardiotrophin-1, adipokines and galectin-3. In: *Arch Med Sci.*, 2016, p. 1-17.
162. Hori H. et al. Blood-based gene expression signatures of medication-free outpatients with major depressive disorder: integrative genome-wide and candidate gene analyses. In: *Scientific Reports*, 2016, vol. 6:18776.
163. Hrdlickova R., Toloue M., Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2017, vol. 8(1), p. 1-17.
164. Hu Y.F. et al. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation. In: *Nat. Rev. Cardiol.*, 2015, vol. 12, p. 230–243.

165. Huan T., et al. A Meta-analysis of Gene Expression Signatures of Blood Pressure and Hypertension. In: PLoS Genetics, 2015, vol. 11(3):e1005035.
166. Hughes D.A. et al. Evaluating intra- and inter-individual variation in the human placental transcriptome. In: Genome Biology, 2015, vol. 16:54.
167. Hulse A.M., Cai J.J. Genetic variants contribute to gene expression variability in humans. In: Genetics, 2013, vol. 193, p. 95–108.
168. Humphries S.E. et al. ApoE4 increases the risk of coronary heart disease in middle-aged men who smoke: Second Northwick Park Heart Study. In: Lancet, 2001, vol. 358, p. 115-119.
169. Hwang D.M. et al. A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: Towards a compendium of cardiovascular genes. In: Circulation, 1997, vol. 96, p. 4146-4203.
170. Hwang J.J. et al. Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure. In: Physiol Genomics, 2002, vol. 10, p. 31-44.
171. Idaghdour Y., Awadalla P. Exploiting Gene Expression Variation to Capture Gene-Environment Interactions for Disease. In: Frontiers in Genetics, 2012, vol. 3:228.
172. Ilie M., Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? In: Translational Lung Cancer Research, 2016, vol. 5(4), p. 420-423.
173. Ip J.E. et al. Mesenchymal Stem Cells Use Integrin  $\beta 1$  Not CXC Chemokine Receptor 4 for Myocardial Migration and Engraftment. Assoian R, ed. In: Molecular Biology of the Cell, 2007, vol. 18(8), p. 2873-2882.
174. Israeli-Rosenberg S. et al. Integrins and Integrin-Associated Proteins in the Cardiac Myocyte. In: Circulation research, 2014, vol. 114, nr. 3, p. 572-586.
175. Iyer R.P., Jung M., Lindsey M.L. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. In: Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2016, vol. 311, p. 190–198.
176. January C.T. et al. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. In: Circulation, 2014, vol. 130, p. 2071-104.
177. Jefferies J.L. Towbin J.A. Dilated cardiomyopath. In: Lancet, 2010, vol. 375, p. 752-62.
178. Jeyabal P. et al. MicroRNA-9 inhibits hyperglycemia induced cardiac pyroptosis in human ventricular cardiomyocytes by targeting ELAVL1. In: Biochemical and biophysical research communications, 2016, vol. 471, nr. 4, p. 423-429
179. Jinhee K. et al. Gene expression profiles associated with acute myocardial infarction and risk of cardiovascular death. In: Gen. Med., 2014, vol. 6(5):40.
180. Joehanes R. et al. Gene Expression Signatures of Coronary Heart Disease. In: Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, vol. 33(6), p. 1418-1426.



181. Jones Buie J.N. et al. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors. In: *Atherosclerosis*, 2016, vol. 254, p. 271 – 281.
182. Joosten M.M. et al.  $\beta$ 2-Microglobulin, Cystatin C, and Creatinine and Risk of Symptomatic Peripheral Artery Disease. In: *J American Heart Association: Cardiovas and Cerebrovas Disease*, 2014, vol. 3(4):e000803.
183. Kazmi N., Gaunt T.R. Diagnosis of Coronary Heart Diseases Using Gene Expression Profiling; Stable Coronary Artery Disease, Cardiac Ischemia with and without Myocardial Necrosis. In: *PLoS ONE*, 2016, vol. 11(3):e0149475.
184. Kerkelä R, Ulvila J, Magga J. Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. In: *J Am Heart Assoc.*, 2015, vol. 4(10):e002423.
185. Kessler C. et al. The apolipoprotein E and the beta-fibrinogen G/A-455 gene polymorphisms are associated with ischaemic stroke and large-vessel disease. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, vol. 17, p. 2880-2884.
186. Kiliszek M. et al. Altered gene expression pattern in peripheral blood mononuclear cells in patients with acute myocardial infarction. In: *PLoS One*, 2012, vol. 7(11):e50054.
187. Kim E. et al. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase1 activates AMPK and exhibits beneficial lipid metabolic effects in vitro. In: *Eur J Pharmacol.*, 2011, 672, p. 38–44.
188. Kimura A. Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. In: *Journal of Human Genetics*, 2010, vol. 55, p. 81-90.
189. Kimura A. Molecular genetics and pathogenesis of Cardiomyopathy. In: *Journal of Human Genetics*, 2016, vol. 61, p. 41-50.
190. Kittleson M.M. et al. Gene expression analysis of ischemic and nonischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure. In: *Physiol. Genomics*, 2005, vol. 21, p. 299–307.
191. Kittleson M.M., Hare J.M. Molecular signature analysis: using the myocardial transcriptome as a biomarker in cardiovascular disease. In: *Trends Card Med.*, 2005, vol. 15, p. 130–138.
192. Knight J.C. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. In: *J Mol Med.*, 2005, p. 83:97–109.
193. Ko J.M. Genetic Syndromes associated with Congenital Heart Disease. In: *Korean Circulation Journal*, 2015, vol. 45, nr. 5, p. 357-361.
194. Kotseva K. et al. EUROASPIRE Study Group. EUROASPIRE III: a survey on the lifestyle, risk factors and use of cardio protective drug therapies in coronary patients from 22 European countries. In: *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.*, 2009, vol. 16(2), p. 121–37.

195. Kraus W.E. et al. Metabolomic Quantitative Trait Loci (mQTL) Mapping Implicates the Ubiquitin Proteasome System in Cardiovascular Disease Pathogenesis. In: PLoS Genet., 2015, vol. 11, nr.11: e1005553.
196. Kumar A.S.A. et al. Association of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2J2 gene polymorphisms with myocardial infarction in South Indian population. In: Pharmacol Rep., 2015, vol. 67, p. 97–101.
197. Lambert C. et al. Gene Expression Pattern of Cells From Inflamed and Normal Areas of Osteoarthritis Synovial Membrane. In: Arthritis and Rheumat., 2014, vol. 66(4), p. 960-968.
198. Lander E.S. et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. In: Nature, 2001, vol. 409, p. 860-921.
199. Lee C.Y. et al. IL-8 increases integrin expression and cell motility in human chondrosarcoma cells. In: J Cell Biochem, 2011, vol. 112(9), p. 2549–2557.
200. Lee P.N. et al. Environmental Tobacco Smoke Exposure and Risk of Stroke in Never Smokers: An Updated Review with Meta-Analysis. In: J Stroke Cerebrovasc Dis., 2017, vol. 26(1), p. 204-216.
201. Lekva T. et al. Leptin and adiponectin as predictors of cardiovascular risk after gestational diabetes mellitus. In: Cardiovascular Diabetology, 2017, vol. 16:5.
202. Levițchi A., **Abdușa D.**, Duca M. Exploratory analysis of gene microarray datasets for molecular diagnosis. In: Scientific annals of the „Nicolae Testemițanu” State University of Medicine Pharmacy. XIIIth edition, Chișinău, 2012, vol. 3, p. 57-62.
203. Lewin M.B., Otto C.M. The Bicuspid Aortic Valve: Adverse Outcomes From Infancy to Old Age. In: Circulation, 2005, vol. 111, p. 832-834.
204. Li J. et al. Gene expression variability within and between human populations and implications toward disease susceptibility. In: PLoS Comput Biol., 2010, vol. 6:e1000910
205. Li X. et al. Modulation of gene expression regulated by the transcription factor NF-kappaB/RelA. In: J. Biol. Chem., 2014, vol. 289, p. 11927–11944.
206. Libby P. et al. Heart Disease, 2008, ed. 8, p. 111-123.
207. Libby P., Ridker P.M. and Göran K. Hansson. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. In: Nature, 2011, vol. 473, p. 317–325.
208. Lievens D., Von Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis. In: Thromb Haemost, 2011, vol. 106, p. 827–838.
209. Liew C.C. et al. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. In: J Lab Clin Med., 2006, vol. 147(3), p. 126-132.
210. Liew C.C. Expressed genome molecular signatures of heart failure. In: Clin Chem Lab Med., 2005, vol. 43, p. 462–469.

211. Lin H. et al. Whole Blood Gene Expression and Atrial Fibrillation: The Framingham Heart Study. In: PLoS ONE, 2014, vol. 9(5):e96794.
212. Lindman B.R., Bonow R.O., Otto C.M. Current management of calcific aortic stenosis. In: *Circ Res.*, 2013, vol.113, p. 223–37.
213. Lippi G. Biomarkers: Novel troponin immunoassay for early ACS rule-out. In: *Nat Rev Cardiol.*, 2016, vol. 13, p. 9-10.
214. Lippi G., Cervellin G. Risk assessment of post-infarction heart failure. Systematic review on the role of emerging biomarkers. In: *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 2014, vol. 51, p. 13-29.
215. Lippi G., Sanchis-Gomar F., Cervellin G. Cardiac troponins and mortality in type 1 and 2 myocardial infarction. In: *Clin Chem Lab Med.*, 2017, vol. 55(2), p. 181-188.
216. Liu D. et al. Transcriptional profiling of CD133(+) cells in coronary artery disease and effects of exercise on gene expression. In: *Cytotherapy*, 2011, vol. 13 nr. 2, p. 227-36.
217. Liu F et al. Gene expression profiles deciphering rice phenotypic variation between Nipponbare (Japonica) and 93-11 (Indica) during oxidative stress. In: PLoS ONE, 2010, vol. 5(1):e8632.
218. Liu X., Strable M.S., Ntambi J.M. Stearoyl CoA Desaturase 1: Role in Cellular Inflammation and Stress. In: *Advances in Nutrition*, 2011, vol. 2(1), p. 15-22.
219. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods*, 2001, vol. 25, p. 402-408.
220. Lloyd S.P. et al. Variability among individuals is generated at the gene expression level. In: *Ecology*, 2015, vol. 96(7), p. 2004–2014.
221. Lloyd-Jones L.R. et al. The Genetic Architecture of Gene Expression in Peripheral Blood. In: *The American Journal of Human Genetics*, 2017, vol. 100(2):371.
222. Loewe L, Hill W.G. The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2010, vol. 365(1544), p. 1153-1167.
223. Lok A. et al. The one-carbon-cycle and methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) C677T polymorphism in recurrent major depressive disorder; influence of antidepressant use and depressive state? In: *J. Affect. Disord.*, 2014, vol. 166, p. 115-123.
224. Lopes L.R. et al. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. In: *J Med Genet.*, 2013, vol. 50, p. 228–239.
225. Lopes L.R., Rahman M.S., Elliott P.M. A systematic review and meta-analysis of genotype-phenotype associations in patients with hypertrophic cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations. In: *Heart*, 2013, vol. 99, p. 1800–1811.
226. Lozano R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. In: *Lancet*, 2012, vol. 380, p. 2095-2128.

227. Lui J.C.K. et al. Spatial and Temporal Regulation of Gene Expression in the Mammalian Growth Plate. *Bone.*, 2010, vol. 46(5), p. 1380-1390.
228. Luo X. et al. MicroRNAs and atrial fibrillation: mechanisms and translational potential. In: *Nat. Rev. Cardiol.*, 2015, vol. 12, p. 80–90.
229. Luscher T.F. Frontiers of valvular heart disease: from aortic stenosis to the tricuspid valve and congenital anomalies. In: *Eur Heart J.*, 2017, vol. 38, nr. 9, p. 611-614.
230. Lusis A.J. Genetics of Atherosclerosis. In: *Trends in Gen.*, 2012, vol. 28, nr. 6, p. 267-275.
231. Ma D. et al. Characterization of a novel *KCNQ1* mutation for type 1 long QT syndrome and assessment of the therapeutic potential of a novel IKs activator using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. In: *Stem Cell Research & Therapy*, 2015, vol. 6, nr. 1:39.
232. Maciejak A. et al. Gene expression profiling reveals potential prognostic biomarkers associated with the progression of heart failure. In: *Genome Medicine*, 2015, vol. 7(1):26.
233. Maganti K. et al. Valvular Heart Disease: Diagnosis and Management. In: *Mayo Clinic Proceedings*, 2010, vol. 85, nr. 5, p. 483–500.
234. Mahmood S.S. et al. The Framing-ham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. In: *Lancet*, 2014, vol. 383(9921), p. 999-1008.
235. Maier K.G. et al. Thrombospondin-1 differentially regulates microRNAs in vascular smooth muscle cells. In: *Mol Cell Biochem*, 2016, vol. 412, p. 111–117.
236. Malarstig A. et al. Identification of ZNF366 and PTPRD as novel determinants of plasma homocysteine in a family-based genome-wide association study. In: *Blood*, 2009, vol. 114, p. 1417-22.
237. Marian A.J.. Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. In: *Eur J Clin Invest*, 2010, vol. 40, nr. 4, p. 360-369.
238. Maron B.J. Distinguishing hypertrophic cardiomyopathy from athlete’s heart: a clinical problem of increasing magnitude and significance. In: *Heart*, 2005, vol. 91, p. 1380-1382.
239. Maron B.J. et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. In: *Circulation*, 2006, vol. 113, p. 1807-1816.
240. Marshall J.L. et al. The potential of sarcospan in adhesion complex replacement therapeutics for the treatment of muscular dystrophy. In: *FEBS J*, 2013, vol. 280, p. 4210-4229.
241. Marshall J.L., Crosbie-Watson R.H. Sarcospan: a small protein with large potential for Duchenne muscular dystrophy. In: *Skelet Muscle*, 2013, vol. 3, p. 1-13.
242. Martin R.I., Babaei M.S., Choy M.K. Genetic variants associated with risk of atrial fibrillation regulate expression of *PITX2*, *CAVI*, *MYOZ1*, *C9ORF3* and *FANCC*. In: *J Mol Cell Cardiol.*, 2015, vol. 85, p. 207–214.

243. Martín-Navarro A. et al. Machine learning classifier for identification of damaging missense mutations exclusive to human mitochondrial DNA-encoded polypeptides. In: *BMC Bioinformatics*, 2017, vol. 18(1):158.
244. Marzolla Vincenzo et al. Essential role of ICAM-1 in aldosterone-induced atherosclerosis. In: *International Journal of Cardiology*, 2017, vol. 232, p. 233–242.
245. Matkovich S.J. Transcriptome analysis in heart failure. In: *Curr Opin Cardiol.*, 2016, vol. 31(3), p. 242-248.
246. Maton A. *Human Biology and Health*. New Jersey: Pre. Hall, Engl. Cliffs, 1993, 256 p.
247. Matsukura M. et al. Genome-wide association study of peripheral arterial disease in a Japanese population. In: *PLoS One*, 2015, vol. 10:e0139262.
248. McDermott M.M. et al. Changes in D-dimer and inflammatory biomarkers before ischemic events in patients with peripheral artery disease: The BRAVO Study. In: *Vasc Med.*, 2016, vol. 21, p. 12–20.
249. McHale C.M. et al. Analysis of the transcriptome in molecular epidemiology studies. In: *Environmental and molecular mutagenesis*, 2013, vol. 54(7), p. 500-517.
250. McMurray J.J. et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. In: *European Heart Journal*, 2012, vol. 33, p. 1787–1847.
251. McNally E.M., Golbus J.R., Puckelwartz M.J. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. In: *J Clin Invest*, 2013, vol. 123, nr. 1, p. 19-26.
252. Medrano M.J. et al. Effect of cardiovascular prevention strategies on incident coronary disease hospitalisation rates in Spain; an ecological time series analysis. In: *BMJ Open*, 2014, vol. 4(2):e004257.
253. Mina E. et al. Common disease signatures from gene expression analysis in Huntington's disease human blood and brain. In: *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2016, vol. 11:97.
254. Miura H. et al. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. In: *Circ Res*, 2003, vol. 92, p. 31-40.
255. Mogensen J. et al. Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy. In: *J Am Coll Cardiol*, 2004, vol. 44, p. 2315-2325.
256. Mohapatra B. et al. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. In: *Mol Genet Metab*, 2003, vol. 80, p. 207-215.

257. Mohr S., Liew C.C. Cardiovascular Genetics and Genomics for the Cardiologist. The potential of blood-based gene profiling for disease assessment. Chapter 12. New York: Blackwell Futura, 2007. p. 277-299.
258. Mohr S., Liew C.C. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. In: Trends in Molecular Medicine, 2007, vol. 13(10), p. 422–432.
259. Moraga I. et al. Synthekines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers. Rath S, ed. *eLife.*, 2017, vol. 6:e22882.
260. Morrow T. Blood test can replace invasive heart biopsy. In: Manag Care, 2010, vol. 19, p. 46–7.
261. Myers G.L. et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines: emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease. In: Clin Chem., 2009, vol. 55, p. 378–384.
262. Napoli C. et al. Microarray analysis: a novel research tool for cardiovascular scientists and physicians. In: Heart, 2003, vol. 89, p. 597-604.
263. Narendra Wajapeyee, Romi Gupta. Eukaryotic Transcriptional and Post-Transcriptional Gene Expression Regulation. In: Methods in Molecular Biology, 2017, vol. 1507.
264. Navickas R. et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. In: Cardiovascular Research, 2016, vol. 111(4), p. 322-337.
265. Nebert D.W. and Russell D.W. Clinical importance of the cytochromes P450. In: Lancet, 2002, vol. 360, p. 1155-1162.
266. Nemezc M. et al. Role of MicroRNA in Endothelial Dysfunction and Hypertension. In: Curr Hypertens Rep., 2016, vol. 18(12):87.
267. Neumann J.T. et al. Association of MR-proadrenomedullin with cardiovascular risk factors and subclinical cardiovascular disease. In: Atheroscler., 2013, vol. 228(2), p. 451–459.
268. Nichols M. et al. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. In: European Heart Journal, 2014, vol. 35, nr. 42, p. 2950-2959.
269. Nicholson A.C. et al. Exploration of neuroendocrine and immune gene expression in peripheral blood mononuclear cells. In: Brain Res Mol Brain Res., 2004, vol. 129, p. 193–197.
270. Nigam V., Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. In: J Mol Cell Cardiol., 2009, vol. 47, nr. 6, p. 828-34.
271. Nugent A.W. et al. Clinical features and outcomes of childhood hypertrophic cardiomyopathy: results from a national population-based study. In: Circulation, 2005, vol. 112, p. 1332–1338.
272. Nuhrenberg T.G. et al. Transcriptome analysis in patients with progressive coronary artery disease: identification of differential gene expression in peripheral blood. In: J Cardio Transl Res., 2012, vol. 6(1), p. 81-93.

273. O'Malley R.G. et al. Prognostic performance of multiple biomarkers in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: analysis from the MERLIN-TIMI 36 trial (Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes-Thrombolysis In Myocardial Infarction 36). In: *J Am Coll Cardiol.*, 2014, vol. 63, p. 1644–1653.
274. O'Donovan G., Hamer M. and Stamatakis E. Relationships between exercise, smoking habit and mortality in more than 100,000 adults. In: *Int. J. Cancer*, 2017, vol. 140, nr. 8, p.1819-1827.
275. Oh G. et al. Epigenetic assimilation in the aging human brain. In: *Genome Biol.*, 2016, vol. 17, p. 76.
276. Okada S. et al. A novel de novo mutation of  $\beta$ -cardiac myosin heavy chain gene found in a twelve-year-old boy with hypertrophic cardiomyopathy. In: *J Genet*, 2014, vol. 93, p. 557-560.
277. Olivotto I. et al. Microvascular function is selectively impaired in patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomere myofilament gene mutations. In: *J Am Coll Cardiol.*, 2011, vol. 58, p. 839–848.
278. Olson T.M. et al. Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. In: *J Mol Cell Cardiol*, 2000, vol. 32, p. 1687-1694.
279. Orlicka-Płocka M. et al. Circulating microRNAs in Cardiovascular Diseases. In: *Acta Biochim Pol.*, 2016, vol. 63(4), p. 725-729.
280. Osio A. et al. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. In: *Circ Res*, 2007, vol. 100, p. 766-768.
281. Otto C.M., Bonow R.O. Aortic Stenosis. In: *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 8th ed., 2007, p. 1635-1644.
282. Owczarzy R. et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. In: *Nucleic Acids Research*, 2008, vol. 36, p. 163-169.
283. Ozaki S. et al. Plasma thrombin-cleaved osteopontin as a potential biomarker of acute atherothrombotic ischemic stroke. In: *Hypertension Research*, 2017, vol. 40(1), p. 61-66.
284. Pacileo M. et al. The role of neopterin in cardiovascular disease. In: *Monaldi Archives for Chest Disease*, 2016, vol. 68(2).
285. Padang R. et al. The genetic and molecular basis of bicuspid aortic valve associated thoracic aortopathy: a link to phenotype heterogeneity. In: *Annals of Cardiothoracic Surgery*. 2013, vol. 2, nr. 1, p. 83-91.
286. Palle S.R. et al. Natural variation in expression of genes involved in xylem development in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). In: *Tree Genetics & Genomes*, 2011, vol. 7, nr.1, p. 193–206.

287. Parvatiyar M.S. et al. Sarcospan Regulates Cardiac Isoproterenol Response and Prevents Duchenne Muscular Dystrophy-Associated Cardiomyopathy. In: *J Am Heart Assoc.*, 2015, vol. 4, nr. 12, p. 1-19.
288. Patel J, Channon K.M, McNeill E. The Downstream Regulation of Chemokine Receptor Signalling: Implications for Atherosclerosis. In: *Mediators of Inflammation*, 2013, vol. 2013:459520.
289. Pedrotty D.M., Morley M.P, Cappola T.P. Transcriptomic Biomarkers of Cardiovascular Disease. In: *Progress in cardiovascular diseases*, 2012, vol. 55(1), p. 64-69.
290. Perisic L. et al. Gene expression signatures, pathways and networks in carotid atherosclerosis. In: *J InternMed.*, 2016, vol. 279(3), p. 293–308.
291. Perk J. et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on CVD Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). In: *Eur Heart J.*, 2012, vol. 33, p. 1635–1701.
292. Perren Cobb J., et al. Application of genome-wide expression analysis to human health and disease. In: *PNAS*, 2005, vol. 102 (13), p. 4801-4806.
293. Perrot N. et al. Ideal cardiovascular health influences cardiovascular disease risk associated with high lipoprotein(a) levels and genotype: The EPIC-Norfolk prospective population study. In: *Atherosclerosis*, 2017, vol. 256, p. 47–52.
294. Perteau M., Salzberg S.L. Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. In: *Genome Biol.*, 2010, vol. 11(5):206.
295. Peters M.J. et al. The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. In: *Nat. Commun.*, 2015, vol. 6, p. 8570.
296. Petrov P.D. et al. Whole Blood RNA as a Source of Transcript-Based Nutrition- and Metabolic Health-Related Biomarkers. In: *PLoS ONE*, 2016, vol. 11(5):e0155361.
297. Pfaffl Michael W. Quantification strategies in real-time PCR. Chapter 3. A-Z of Quantitative PCR. Bustin S.A (Ed.). In: *IUL Press, CA, USA*, 2004, p. 87 – 112.
298. Piepoli M.F. et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. In: *Eur Heart J.*, 2016, vol. 37, p. 2315–2381.
299. Pinero J. et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. In: *Nucleic Acids Research*, 2017, vol. 45, p. D833-D839.
300. Pirie K. et al. Million Women Study Collaborators. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. In: *Lancet*, 2013, vol. 381(9861), p. 133-41.



301. Poniatowski Ł.A. et al. Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. In: *Mediators of Inflammation*, 2015, vol. 2015:137823.
302. Prabhu S.D., Frangogiannis N.G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. In: *Circ Res.*, 2016, vol. 119, p. 91–112.
303. Priori S. et al. ESC Textbook of Cardiovascular Diseases. In: *Genetics of Cardiovascular Diseases*, 2009, ed. 2, Oxford University Press, p. 281-312.
304. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Version 2.11.1 (2010-05-31).
305. Reeb J. et al. Predicted Molecular Effects of Sequence Variants Link to System Level of Disease. In: *PLoS Comput Biol.*, 2016, vol. 18;12(8):e1005047.
306. Rees K. et al. "Mediterranean" dietary pattern for the primary prevention of cardiovascular disease. In: *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, vol. 8:CD009825.
307. Regitz-Zagrosek V, Kararigas G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. In: *Physiol Rev.*, 2017, vol. 97, p. 1–37.
308. Reinstadler S.J. et al. High-sensitivity troponin T for prediction of left ventricular function and infarct size one year following ST-elevation myocardial infarction. In: *Int J Cardiol.*, 2016, vol. 202, p. 188–93.
309. Repas T.B., Tanner J.R. Preventing Early Cardiovascular Death in Patients With Familial Hypercholesterolemia. In: *J of the American Osteopathic Association*, 2014, vol. 114, p. 99-108.
310. Reyes M.R. et al. Plasma Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1, n-Terminal Fragment of Brain Natriuretic Peptide and Calcidiol Are Independently Associated with the Complexity of Coronary Artery Disease. In: *PLoS ONE*, 2016, vol. 11(5): e0152816.
311. Richard P. et al. The Genetic Bases of Cardiomyopathies. In: *J Am Coll Cardiol*, 2006, vol. 48, p. 79-89.
312. Ridker P.M. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection. In: *Circ Res.*, 2016, vol. 118, p. 145–156.
313. Rifkin S.A., Kim J., White K.P. Evolution of gene expression in the *Drosophila melanogaster* subgroup. In: *Nat Genet.*, 2003, vol. 33,, p. 138–144.
314. Riyaz S.P., Shu Ye. Genetic determinants of coronary heart disease: new discoveries and insights from genome-wide association studies. In: *Heart*, 2011, vol. 97, p. 1463-1473.
315. Roberts J., Gollob M. Impact of genetic discoveries on the classification of lone atrial fibrillation. In: *J Am Cardiol.*, 2010, vol. 55, p. 705-12.

316. Roberts R. Genetics of Coronary Artery Disease: An Update. In: *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*. 2014, vol. 10, nr. 1, p. 7-12.
317. Roberts W.C., Ko J.M. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis with or without associated aortic regurgitation. In: *Circulation*, 2005, vol. 111, p.920-925.
318. Rodemoyer A. et al. A tissue-specific gene expression template portrays heart development and pathology. In: *Human Genomics*, 2014, vol. 8(1):6.
319. Roellecke K. et al. Optimized human CYP4B1 in combination with the alkylator prodrug 4-ipomeanol serves as a novel suicide gene system for adoptive T-cell therapies. In: *Gene Therapy*, 2016, vol. **23**, p. 615-626.
320. Roldan V. et al. Usefulness of N-terminal proB-type natriuretic peptide levels for stroke risk prediction in anticoagulated patients with atrial fibrillation. In: *Stroke*, 2014, vol. 45, p. 696–701.
321. Rosano G.M., Vitale C., Fini M. Testosterone in men with hypogonadism and high cardiovascular risk. In: *Pros. Endocrine*, 2015, vol. 50(2), p. 320-5.
322. Rosenberg N.A. et al. Genetic structure of human populations. In: *Science*, 2002, vol. 298, p. 2381–2385.
323. Rosenberg S. et al. Multicenter validation of the diagnostic accuracy of a blood-based gene expression test for assessing obstructive coronary artery disease in nondiabetic patients. In: *Annals of internal medicine*, 2010, vol. 153, p. 425–434.
324. Rosenson R.S. et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. In: *Nat Rev Cardiol*, 2016, vol. 13, p. 48–60.
325. Roth G.A. et al. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. In: *New England Journal of Medicine*, 2015, vol. 372 (14), p. 1333-1341.
326. Ruwanpathirana T., Owen A., Reid C.M. Review on cardiovascular risk prediction. In: *Cardiovasc Ther.*, 2015, vol. 33, p. 62–70.
327. Saha S.K. et al. KRT19 directly interacts with  $\beta$ -catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties. In: *Oncogene*. 2017, vol. 36(3), p. 332-349.
328. Salo P.P. et al. Genetic Variants on Chromosome 1p13.3 Are Associated with Non-ST Elevation Myocardial Infarction and the Expression of DRAM2 in the Finnish Population. In: *PLoS ONE*, 2015, vol. 10(10): e0140576.
329. Salvagno G.L, Pavan C. Prognostic biomarkers in acute coronary syndrome. In: *Annals of Translational Medicine*, 2016, vol 4(13), p. 258.
330. Sampath H., Ntambi J.M. The role of stearyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. In: *Annals New York Acad Sci.*, 2011, vol. 12431, p. 47–53.

331. Sanders P. and Han S.L. Soluble CD40 Ligand in Atrial Fibrillation: Time and Other Confounding Factors. In: JACC: Clinical Electrophysiology, 2016, vol. 2(5), p. 633–635.
332. Santos R.D. et al. Familial hypercholesterolaemia: PCSK9 inhibitors are coming. In: The Lancet, 2014, vol. 385, nr. 9965, 307 – 310.
333. Satoh M. et al. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. In: Biochem Biophys Res Commun, 1999, vol. 262, p. 411-417.
334. Savelyeva Anna V. et al. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions. In: BioMed Research International, 2017, vol. 2017:7404912.
335. Sayed-Tabatabaei F., Oostra B., Isaacs A. ACE Polymorphisms. In: Circulation Research, 2006, vol. 98, p. 1123-1133.
336. Schmidt E.P. et al. Adhesion Molecules: Master Controllers of the Circulatory System. Comprehensive Physiology. In: Compr Physiol., 2016, vol. 6(2), p. 945-73.
337. Secchiero P. et al. An increased osteoprotegerin (OPG) serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and may contribute to endothelial cell dysfunction. In: Am J Pathol., 2006, vol. 169, p. 2236-2244.
338. Seidman C.E., Seidman J.G. Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. In: Circ Res, 2011, vol. 108, p. 743-750.
339. Seiler P.U. et al. Real-time RT-PCR for gene expression profiling in blood of heart failure patients: a pilot study: gene expression in blood of heart failure patients. In: Basic Res Cardiol., 2004, vol. 99, p. 230–238.
340. Shahabi P. et al. Human cytochrome P450 epoxygenases: variability in expression and role in inflammation-related disorders. In: Pharmacol. Ther., 2014, vol. 144(2), p. 134–161.
341. Shaima C., Vinayaga M.P., Kutty S.N. Cardiovascular diseases: Traditional and non-traditional risk factors. In: J Med Allied Sci., 2016, vol. 6(2), p. 46-51.
342. Shalhoub J. et al. Systems Biology of Human Atherosclerosis. In: Vasc. Endovascular Surg., 2014, vol. 48, p. 5–17.
343. Shehadeh L.A., Hare J.M. RNA Biomarkers for Heart Failure: Is There a Correlation Between Heart and Blood Transcriptomics? In: JACC Heart failure, 2013, vol. 1(6), p. 477-479.
344. Shlipak M.G. et al. Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. In: N Engl J Med., 2013, vol. 369, p. 932– 43.
345. Sidorenkov G. et al. Do treatment quality indicators predict cardiovascular outcomes in patients with diabetes? In: PLoS One, 2013, vol. 8(10):e78821.
346. Siegbahn A. et al. D-dimer and factor VIIA in atrial fibrillation-prognostic values for cardiovascular events and effects of anticoagulation therapy. ARE-LY substudy. In: Thromb Haemost., 2016, vol. 115(5), p. 921-30.

347. Siemelink M.A., Zeller T. Biomarkers of coronary artery disease: the promise of the transcriptome. In: *Curr Cardiol Rep.*, 2014, vol. 16:513.
348. Signorelli S.S. et al. Circulating miR-130a, miR-27b, and miR-210 in patients with peripheral artery disease and their potential relationship with oxidative stress: a pilot study. In: *Angiology*, 2016, vol. 67, p. 945–50.
349. Signorelli S.S. et al. Plasma heme oxygenase-1 is decreased in peripheral artery disease patients. In: *Mol Med Rep.*, 2016, vol. 14, p. 3459–63.
350. Siiskonen H. et al. Hyaluronan Synthase 1: A Mysterious Enzyme with Unexpected Functions. In: *Frontiers in Immunology*, 2015, vol. 6:43.
351. Singh G.M. et al. The age-specific quantitative effects of metabolic risk factors on cardiovascular diseases and diabetes: a pooled analysis. In: *PLoS One*, 2013, vol. 8(7):e65174.
352. Sivapalaratnam S. et al. Monocyte Gene Expression Signature of Patients with Early Onset Coronary Artery Disease. Federici M, ed. In: *PLoS ONE*, 2012, vol. 7(2):e32166.
353. Smih F. et al. Blood Signature of Pre-Heart Failure: A Microarrays Study. In: *PLoS ONE*, 2011, vol. 6(6):e20414.
354. Somel M. et al. Gene expression becomes heterogeneous with age. In: *Current Biology*, 2006, vol. 16:R359-R360.
355. Sood S. et al. A novel multi-tissue RNA diagnostic of healthy ageing relates to cognitive health status. In: *Genome Biol.*, 2015, vol. 16, p. 185.
356. Soufi M. et al. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. In: *J Clin Endocrinol Metab.*, 2004, vol. 89, p. 3764–3768.
357. Speliotes E.K. et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. In: *Nat Genet.*, 2010, vol. 42, p. 937-48.
358. Spirito P., Autore C. Management of hypertrophic cardiomyopathy. In: *BMJ*, 2006, vol. 332, p. 1251- 1255.
359. Stephens J.W., Humphries S.E. The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. In: *Journal of Internal Medicine*, 2003, vol. 253, p. 120-127.
360. Stewart A., Huang J., Fisher R.A. RGS Proteins in Heart: Brakes on the Vagus. In: *Frontiers in Physiology*, 2012, vol. 3:95.
361. Stewart J., Manmathan G., Wilkinson P. Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. In: *Journal of the Royal Society of Medicine Cardiovascular Disease*, 2017, vol. 6, p. 1–9.
362. Stone N.J. et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. In: *Circulation*, 2014, vol. 129(25 Suppl 2):S1-S45.

363. Storey J.D. et al. Gene-expression variation within and among human populations. In: *American journal of human genetics*, 2007, vol. 80(3), p. 502–9.
364. Stoynev N. et al. Gene expression in peripheral blood of patients with hypertension and patients with type 2 diabetes. In: *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2014, vol. 15(9), p. 702–709.
365. Straface G. et al. Assessment of the genetic effects of polymorphisms in the osteoprotegerin gene, TNFRSF11B, on serum osteoprotegerin levels and carotid plaque vulnerability. In: *Stroke*. 2011, vol. 42, nr. 11, p. 3022-8.
366. Strang A.C. et al. The genetics of high-density lipoprotein metabolism: clinical relevance for therapeutic approaches. In: *Am J Cardiol.*, 2009, vol. 104:22E–31E.
367. Strassburger K., Bretz Frank. Compatible simultaneous lower confidence bounds for the Holm procedure and other Bonferroni-based closed tests. In: *Statistics in Medicine*, 2008, vol. 27, nr. 24, p. 4914–4927.
368. Suresh R. et al. Transcriptome from circulating cells suggests dysregulated pathways associated with long-term recurrent events following first-time myocardial infarction. In: *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2014, vol. 74, p. 13-21.
369. Tabassum S. et al. Microalbumin: Urinary Biomarker of Cardiovascular Risk Assessment. *BIRDEM Medical Journal*, 2015, vol. 5(2), p. 98-103.
370. Tacconelli S., Capone M.L, Patrignani P. Measurement of 8-iso-prostaglandin F2alpha in biological fluids as a measure of lipid peroxidation. In: *Methods Mol Biol.*, 2010, vol. 644, p. 165–178.
371. Tada H., Melander O., Louie J.Z. et al. Risk prediction by genetic risk scores for coronary heart disease is independent of self-reported family history. In: *European Heart Journal*, 2016, vol. 37, nr. 6, p. 561- 567.
372. Tao L. et al. Crucial role of miR-433 in regulating cardiac fibrosis. In: *Theranostics.*, 2016, vol. 6(12), p. 2068–2083.
373. Tasevska I. et al Copeptin predicts coronary artery disease cardiovascular and total mortality. In: *Heart*, 2016, vol. 102, p. 127-132.
374. Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. In: *British Heart J.*, 1958, vol. 20, p. 1-8.
375. Teekakirikul P. et al. Inherited cardiomyopathies. In: *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2013, vol. 15, nr. 2, p. 158-170.
376. Teslovich T.M. et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. In: *Nature*, 2010, vol. 466, p. 707-13.
377. The International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies. Genetic Variants in Novel Pathways Influence Blood Pressure and Cardiovascular Disease Risk. In: *Nature*, 2011, vol. 478(7367), p. 103-109.

378. The Tobacco and Genetics Consortium. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. In: *Nature Genetics*, 2010, vol. 42(5), p. 441-447.
379. Thomas M.R. and Lip G.Y.H. Novel Risk Markers and Risk Assessments for Cardiovascular Disease. In: *Circulation Research*, 2017, vol. 120, p. 133-149.
380. Tofler G.H. et al. Plasminogen activator inhibitor and the risk of cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. In: *Thrombosis Res.*, 2016, vol. 140, p. 30-35.
381. Townsend N. et al. Cardiovascular disease in Europe - epidemiological update 2015. In: *Eur Heart J.*, 2015, vol. 36(40), p. 2696–705.
382. Tukey J.W. *Exploratory Data Analysis*. Reading, MA: Addison-Wesley, 1977. 688 p.
383. Turner M.D. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. In: *Biochim. Biophys. Acta.*, 2014, vol. 1843(11), p. 2563–2582.
384. Upadhyay R.K. Emerging Risk Biomarkers in Cardiovascular Diseases and Disorders. In: *Journal of Lipids*, 2015, vol. 2015, p. 971453.
385. Van Geel P.P. et al. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. In: *Hypertension*, 2009, vol. 35, p. 717-721.
386. Van Hoorn F. et al. SCN5A Mutations in Brugada Syndrome Are Associated with Increased Cardiac Dimensions and Reduced Contractility. Gaetano C, ed. In: *PLoS ONE*, 2012, vol. 7(8):e42037.
387. Varret M. Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. In: *Clin Genet*, 2008, vol. 73, p. 1-13.
388. Vasan R.S. Biomarkers of cardiovascular disease: Molecular basis and practical considerations. In: *Circulation* 2006, vol. 113, p. 2335-2362.
389. Vasile V.C. et al. A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy. In: *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, vol. 345, nr. 3, p. 998-1003.
390. Voight B.F. et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. In: *Nat Genet.* 2010, vol. 42, p. 579-89.
391. Wang K., Vijay V., Fuscoe J.C. Stably Expressed Genes Involved in Basic Cellular Functions. In: *PLoS ONE*, 2017, vol. 12(1): e0170813.
392. Wang L. et al. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. In: *Science*, 2003, vol. 302, p. 1578-1581.
393. Wang Q. Molecular genetics of coronary artery disease. In: *Curr Opin Card.*, 2005, vol. 20, (3):182-188.
394. Wang S., Smith J.D. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. In: *BioFactors (Oxford, England)*, 2014, vol. 40(6), p. 547-554.

395. Warnes C.A. et al. ACC/AHA 2008 guidelines. 2008, vol. 52:e1-121.
396. Warren T.Y. et al. Sedentary Behaviors Increase Risk of Cardiovascular Disease Mortality in Men. In: *Med. and Science in Sports and Exercise*, 2010, vol. 42(5), p. 879–885.
397. Wassel C.L. et al. Association of genomic loci from a cardiovascular gene SNP array with fibrinogen levels in European Americans and African-Americans from six cohort studies: the Candidate Gene Association Resource (CARE). In: *Blood*, 2011, vol. 117, nr. 1, p. 268-275.
398. Wassel C.L. et al. Soluble P-selectin predicts lower extremity peripheral artery disease incidence and change in the ankle brachial index: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). In: *Atherosclerosis*, 2015, vol. 239, p. 405–11.
399. Watkins H. et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. In: *N Engl J Med.*, 1995, vol. 332, p. 1058-64.
400. Watkins H. et al. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. In: *N Engl J Med*, 1992, vol. 326, p. 1108-1014.
401. Welsh J.B. et al. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. In: *PNAS of the USA*, 2001, vol. 98, nr. 3, p. 1176-1181.
402. Whelton S.P. et al. Association between resting heart rate and inflammatory biomarkers (high-sensitivity c-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen) (from the multi-ethnic study of atherosclerosis). In: *The American Journal of Cardiology*, 2014, vol. 113, nr. 4, p. 644–649.
403. Whitfield M.L. et al. Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. Solomon MJ, ed. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, vol. 13, nr. 6, p. 1977-2000.
404. Whitney A.R. et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, p. 1896-1901.
405. Wise I.A., Charchar F.J. Epigenetic Modifications in Essential Hypertension. In: *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17(4):451.
406. Wittchen F. et al. Genomic expression profiling of human inflammatory cardiomyopathy (DCMi) suggests novel therapeutic targets. In: *J Mol Med (Berl.)*, 2007, vol. 85, nr. 3, p.257-71.
407. Wollert K.C., Kempf T., Wallentin L. Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. In: *Clin Chem.*, 2017, vol. 63(1), p. 140-151.
408. Wood D.A. EUROASPIRE I and II Group. European Action on Secondary Prevention by Intervention to Reduce Events. Clinical reality of coronary prevention programmes: a comparison of EUROASPIRE I & II in 9 countries. In: *Lancet*, 2001, vol. 357, p. 995-1001.

409. World Health Organisation. Global Health Observatory (GHO) data. NCD mortality and morbidity [http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/en/](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/) (vizitat 19.08.2016).
410. World Health Organisation. Media centre, Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet. September 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (vizitat 19.08.2016).
411. Xu L.L. et al. Quantitative expression profile of PSGR in prostate cancer. In: Prostate Cancer Prostatic Dis., 2006, vol. 9, p. 56–61.
412. Xu M. et al. Apolipoprotein E Gene Variants and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis. In: BioMed Research International., 2016, vol. 2016:3912175.
413. Yanez-Mo M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. In: J Extracell Vesicles, 2015, vol. 4:27066.
414. Yang J. et al. Synchronized age-related gene expression change sacross multiple tissues in human and the link to complex diseases. In: Sci. Rep., 2015, vol. 5:15145.
415. Yascara G.L.S. et al. PCSK9 R46L, lower LDL, and cardiovascular disease risk in familial hypercholesterolemia: a cross-sectional cohort study. In: Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2014, vol. 34, p. 2700-2705.
416. Ye J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: BMC Bioinformatics 2012, 13:134.
417. Ye Z. et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-aolysys of 66 I 55 cases aod 91307 controls. In: Lancet, 2006, vol. 367 nr. 9511, p. 65 î -658.
418. Yusuf Salim et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. In: Lancet, 2004, vol. 364, nr. 9438, p. 937 – 952.
419. Zeller R. et al. Large-scale mutation screening in patients with dilated or hypertrophic cardiomyopathy: a pilot study using DGGE. In: J Mol Med, 2006, vol. 83, p. 682-691.
420. Zeng R. et al. Association of leptin levels with pathogenetic risk of coronary heart disease and stroke: a meta-analysis. In: Arq Bras Endocrinol Metab., 2014, vol. 58, p. 817-23.
421. Zhang M. et al. Circulating MicroRNA-145 is Associated with Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. In: Chin Med J., 2017, vol. 130(1), p. 51-56
422. Zhang RuYou et al. Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (*ALOX5AP*) gene rs4073259 polymorphism not associated with ischemic stroke in the Northeastern Chinese Han population. In: Clinical Neurology and Neurosurgery, 2014, vol. 119, p. 64 – 69.
423. Zhao S. et al. Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. In: PLoS ONE, 2014, vol. 9(1):e78644.
424. Zhuang P. et al. Dynamic changes in plasma tissue plasminogen activator, plasmino-gen activator inhibitor-1 and beta- thromboglobulin content in ischemic stroke. In: J Clin Neurosci., 2015, vol. 22(7), p. 1123-1127.



425. Zuk O. et al. The mystery of missing heritability: genetic interactions create phantom heritability. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, vol. 109, p. 1193-1198.
426. [http://wiki.geneontology.org/index.php/Priority\\_Cardiovascular\\_genes](http://wiki.geneontology.org/index.php/Priority_Cardiovascular_genes)(vizitat 21.01.2012)
427. <http://www.statistica.md/newsview.php?l=ro&idc=168&id=5198> (vizitat 15.07.2016).
428. <https://www.affymetrix.com/analysis/index.affx> (vizitat 21.11.2012)
429. <http://www.ucl.ac.uk/cardiovasculargeneontology/> (vizitat 16.01.2012)
430. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (vizitat 17.01.2012)
431. <http://www.ebi.ac.uk/GOA/CVI> (vizitat 21.01.2012)
432. [www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org) (vizitat 04.04.2012)
433. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/> (vizitat 12.04.2013)
434. <http://www.genenames.org/> (vizitat 23.08.2013)
435. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (vizitat 17.02.2014)
436. <http://david.abcc.ncifcrf.gov/> (vizitat 04.03.2014)
437. <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (vizitat 25.03.2014)
438. <http://www.genome.jp/kegg/> (vizitat 14.05.2015)
439. <http://www.statistica.md/> (vizitat 16.05.2016)
440. <http://www.who.int/en/> (vizitat 17.05.2016)
441. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar> (vizitat 17.12.2016)

## ANEXE

Anexa 4.1.

Expresia relativă a genei *NPPB*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,001±0,000	CMP 01	0,005±0,001
CPI-FiA 02	0,002±0,000	CMP 02	0,002±0,000
CPI-FiA 03	0,001±0,000	CMP 03	0,001±0,000
CPI-FiA 04	0,002±0,000	CMP 04	0,001±0,000
CPI-FiA 05	0,002±0,001	CMP 05	0,001±0,000
CPI-FiA 06	0,003±0,001	CMP 06	0,001±0,000
CPI-FiA 07	0,004±0,001	CMP 07	0,001±0,000
CPI-FiA 08	0,002±0,001	CMP 08	0,005±0,001
CPI-FiA 09	0,003±0,001	CMP 09	0,004±0,000
CPI-FiA 10	0,004±0,000	CMP 10	0,002±0,001
CPI-FiA 11	0,002±0,000	CMP 11	0,001±0,000
CPI-FiA 12	0,003±0,001	CMP 12	0,003±0,002
CPI-FiA 13	0,004±0,001	CMP 13	0,003±0,001
CPI 01	0,002±0,000	SAo 01	0,002±0,001
CPI 02	0,002±0,000	SAo 02	0,001±0,000
CPI 03	0,001±0,000	SAo 03	0,002±0,001
CPI 04	0,002±0,000	SAo 04	0,001±0,000
CPI 05	0,003±0,001	SAo 05	0,001±0,000
CPI 06	0,002±0,000	SAo 06	0,001±0,000
CPI 07	0,001±0,000	SAo 07	0,002±0,000
CPI 08	0,004±0,000	SAo 08	0,001±0,000
CPI 09	0,005±0,001	SAo 09	0,001±0,000
CPI 10	0,002±0,000	SAo 10	0,002±0,001
CPI 11	0,004±0,002	SAo 11	0,001±0,000
CPI 12	0,001±0,001	SAo 12	0,001±0,000
CPI 13	0,003±0,000	SAo 13	0,001±0,001
CPI 14	0,005±0,001	SAo 14	0,002±0,001
		SAo 15	0,002±0,001
<b>Media pe grup</b>	<b>0,003±0,001</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,002±0,001</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,005±0,001	Cc 01	0,001±0,000
Cm 09	0,005±0,001	Cc 02	0,001±0,000
Cm 10	0,005±0,001	Cc 03	0,001±0,000
Cm 11	0,005±0,001	Cc 04	0,001±0,000
Cm 12	0,005±0,002	Cc 05	0,001±0,000
Cm 13	0,005±0,001	Cc 06	0,001±0,000
Cm 14	0,006±0,001	Cc 07	0,001±0,001
<b>Media pe grup</b>	<b>0,005±0,001</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,000</b>

*Notă:* valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *ABCA1*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,309±0,036	CMP 01	0,285±0,109
CPI-FiA 02	0,391±0,065	CMP 02	0,611±0,127
CPI-FiA 03	0,166±0,023	CMP 03	0,647±0,067
CPI-FiA 04	0,177±0,012	CMP 04	0,202±0,110
CPI-FiA 05	0,169±0,044	CMP 05	0,197±0,040
CPI-FiA 06	0,407±0,028	CMP 06	0,317±0,044
CPI-FiA 07	0,296±0,095	CMP 07	0,309±0,088
CPI-FiA 08	0,348±0,052	CMP 08	0,321±0,105
CPI-FiA 09	0,200±0,135	CMP 09	0,848±0,208
CPI-FiA 10	0,244±0,095	CMP 10	0,289±0,040
CPI-FiA 11	0,162±0,024	CMP 11	0,304±0,052
CPI-FiA 12	0,296±0,148	CMP 12	0,426±0,204
CPI-FiA 13	0,373±0,213	CMP 13	0,662±0,177
CPI 01	0,302±0,091	SAo 01	0,471±0,143
CPI 02	0,260±0,053	SAo 02	0,212±0,108
CPI 03	0,161±0,039	SAo 03	0,604±0,343
CPI 04	0,228±0,019	SAo 04	0,589±0,217
CPI 05	0,521±0,171	SAo 05	0,490±0,051
CPI 06	0,494±0,147	SAo 06	0,507±0,154
CPI 07	0,199±0,021	SAo 07	0,210±0,039
CPI 08	0,266±0,088	SAo 08	0,196±0,058
CPI 09	0,421±0,248	SAo 09	0,152±0,023
CPI 10	0,256±0,094	SAo 10	0,237±0,078
CPI 11	0,218±0,058	SAo 11	0,163±0,028
CPI 12	0,226±0,046	SAo 12	0,174±0,055
CPI 13	0,235±0,111	SAo 13	0,258±0,113
CPI 14	0,454±0,232	SAo 14	0,338±0,117
		SAo 15	0,449±0,145
<b>Media pe grup</b>	<b>0,288±0,105</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,372±0,187</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,508±0,225	Cc 01	0,332±0,211
Cm 09	0,598±0,204	Cc 02	0,325±0,049
Cm 10	0,478±0,019	Cc 03	0,199±0,021
Cm 11	0,581±0,101	Cc 04	0,210±0,067
Cm 12	0,498±0,118	Cc 05	0,294±0,162
Cm 13	0,472±0,090	Cc 06	0,199±0,016
Cm 14	0,515±0,072	Cc 07	0,154±0,059
<b>Media pe grup</b>	<b>0,521±0,049</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,245±0,071</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media=deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *THBS1*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,393±0,080	CMP 01	0,331±0,095
CPI-FiA 02	0,354±0,025	CMP 02	0,718±0,315
CPI-FiA 03	0,374±0,064	CMP 03	0,331±0,095
CPI-FiA 04	0,316±0,034	CMP 04	0,226±0,046
CPI-FiA 05	0,306±0,064	CMP 05	0,113±0,026
CPI-FiA 06	0,300±0,073	CMP 06	0,267±0,113
CPI-FiA 07	0,301±0,108	CMP 07	0,112±0,016
CPI-FiA 08	0,325±0,048	CMP 08	0,115±0,017
CPI-FiA 09	0,330±0,084	CMP 09	0,260±0,053
CPI-FiA 10	0,316±0,087	CMP 10	0,173±0,007
CPI-FiA 11	0,376±0,172	CMP 11	0,619±0,077
CPI-FiA 12	0,348±0,052	CMP 12	0,199±0,021
CPI-FiA 13	0,383±0,167	CMP 13	0,558±0,130
CPI 01	0,251±0,072	SAo 01	0,198±0,048
CPI 02	0,727±0,260	SAo 02	0,251±0,159
CPI 03	0,479±0,131	SAo 03	0,295±0,032
CPI 04	0,443±0,145	SAo 04	0,478±0,343
CPI 05	0,380±0,145	SAo 05	0,211±0,072
CPI 06	0,440±0,077	SAo 06	0,705±0,262
CPI 07	0,397±0,143	SAo 07	0,451±0,085
CPI 08	0,864±0,188	SAo 08	0,297±0,052
CPI 09	0,848±0,208	SAo 09	0,926±0,201
CPI 10	0,801±0,229	SAo 10	0,372±0,111
CPI 11	0,248±0,054	SAo 11	0,123±0,019
CPI 12	0,301±0,117	SAo 12	0,647±0,067
CPI 13	0,312±0,065	SAo 13	0,937±0,108
CPI 14	0,446±0,035	SAo 14	0,446±0,035
		SAo 15	0,338±0,014
<b>Media pe grup</b>	<b>0,421±0,176</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,382±0,237</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,537±0,037	Cc 01	0,281±0,023
Cm 09	0,872±0,060	Cc 02	0,248±0,052
Cm 10	0,748±0,223	Cc 03	0,205±0,036
Cm 11	0,858±0,130	Cc 04	0,216±0,045
Cm 12	0,797±0,238	Cc 05	0,277±0,049
Cm 13	0,844±0,529	Cc 06	0,289±0,040
Cm 14	0,708±0,180	Cc 07	0,291±0,112
<b>Media pe grup</b>	<b>0,766±0,117</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,258±0,036</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media=deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *SCD*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,027±0,021	CMP 01	0,065±0,025
CPI-FiA 02	0,043±0,002	CMP 02	0,066±0,038
CPI-FiA 03	0,030±0,008	CMP 03	0,022±0,007
CPI-FiA 04	0,044±0,003	CMP 04	0,033±0,013
CPI-FiA 05	0,027±0,015	CMP 05	0,022±0,005
CPI-FiA 06	0,041±0,009	CMP 06	0,031±0,009
CPI-FiA 07	0,018±0,010	CMP 07	0,038±0,017
CPI-FiA 08	0,016±0,003	CMP 08	0,024±0,009
CPI-FiA 09	0,042±0,022	CMP 09	0,028±0,011
CPI-FiA 10	0,032±0,023	CMP 10	0,027±0,012
CPI-FiA 11	0,043±0,013	CMP 11	0,027±0,010
CPI-FiA 12	0,011±0,004	CMP 12	0,052±0,013
CPI-FiA 13	0,026±0,010	CMP 13	0,053±0,004
CPI 01	0,013±0,004	SAo 01	0,093±0,014
CPI 02	0,015±0,001	SAo 02	0,065±0,016
CPI 03	0,027±0,001	SAo 03	0,066±0,007
CPI 04	0,034±0,006	SAo 04	0,084±0,061
CPI 05	0,031±0,006	SAo 05	0,061±0,006
CPI 06	0,047±0,010	SAo 06	0,064±0,018
CPI 07	0,066±0,014	SAo 07	0,074±0,010
CPI 08	0,056±0,013	SAo 08	0,040±0,023
CPI 09	0,009±0,001	SAo 09	0,030±0,008
CPI 10	0,028±0,010	SAo 10	0,061±0,029
CPI 11	0,019±0,011	SAo 11	0,077±0,009
CPI 12	0,009±0,003	SAo 12	0,086±0,017
CPI 13	0,021±0,003	SAo 13	0,092±0,029
CPI 14	0,051±0,007	SAo 14	0,083±0,046
		SAo 15	0,084±0,057
<b>Media pe grup</b>	<b>0,031±0,015</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,055±0,024</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,063±0,018	Cc 01	0,032±0,003
Cm 09	0,058±0,012	Cc 02	0,016±0,007
Cm 10	0,062±0,015	Cc 03	0,029±0,008
Cm 11	0,061±0,006	Cc 04	0,024±0,003
Cm 12	0,061±0,037	Cc 05	0,018±0,005
Cm 13	0,059±0,012	Cc 06	0,033±0,010
Cm 14	0,063±0,012	Cc 07	0,023±0,002
<b>Media pe grup</b>	<b>0,061±0,002</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,025±0,007</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media=deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *ELAVL1*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,338±0,014	CMP 01	0,549±0,336
CPI-FiA 02	0,352±0,161	CMP 02	0,354±0,025
CPI-FiA 03	0,512±0,021	CMP 03	0,159±0,022
CPI-FiA 04	0,358±0,068	CMP 04	0,286±0,142
CPI-FiA 05	0,222±0,052	CMP 05	0,195±0,027
CPI-FiA 06	0,230±0,034	CMP 06	0,213±0,022
CPI-FiA 07	0,473±0,247	CMP 07	0,218±0,063
CPI-FiA 08	0,155±0,021	CMP 08	0,275±0,030
CPI-FiA 09	0,417±0,045	CMP 09	0,549±0,202
CPI-FiA 10	0,264±0,045	CMP 10	0,227±0,089
CPI-FiA 11	0,182±0,050	CMP 11	0,154±0,043
CPI-FiA 12	0,190±0,051	CMP 12	0,341±0,238
CPI-FiA 13	0,267±0,099	CMP 13	0,445±0,236
CPI 01	0,285±0,059	SAo 01	0,478±0,019
CPI 02	0,436±0,030	SAo 02	0,354±0,000
CPI 03	0,229±0,024	SAo 03	0,576±0,165
CPI 04	0,310±0,043	SAo 04	0,588±0,024
CPI 05	0,488±0,200	SAo 05	0,529±0,158
CPI 06	0,366±0,142	SAo 06	0,406±0,113
CPI 07	0,502±0,144	SAo 07	0,361±0,094
CPI 08	0,465±0,173	SAo 08	0,563±0,059
CPI 09	0,230±0,035	SAo 09	0,420±0,248
CPI 10	0,101±0,037	SAo 10	0,397±0,016
CPI 11	0,165±0,063	SAo 11	0,463±0,154
CPI 12	0,137±0,006	SAo 12	0,355±0,044
CPI 13	0,258±0,036	SAo 13	0,456±0,018
CPI 14	0,269±0,072	SAo 14	0,530±0,203
		SAo 15	0,452±0,092
<b>Media pe grup</b>	<b>0,304±0,121</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,389±0,134</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,352±0,084	Cc 01	0,219±0,027
Cm 09	0,399±0,178	Cc 02	0,178±0,025
Cm 10	0,385±0,169	Cc 03	0,241±0,043
Cm 11	0,438±0,061	Cc 04	0,158±0,043
Cm 12	0,305±0,066	Cc 05	0,162±0,079
Cm 13	0,303±0,045	Cc 06	0,214±0,033
Cm 14	0,289±0,040	Cc 07	0,223±0,082
<b>Media pe grup</b>	<b>0,353±0,057</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,199±0,033</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *IL8*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	1,000±0,000	CMP 01	0,935±0,065
CPI-FiA 02	1,018±0,226	CMP 02	0,939±0,130
CPI-FiA 03	0,976±0,236	CMP 03	0,685±0,139
CPI-FiA 04	1,005±0,125	CMP 04	0,891±0,036
CPI-FiA 05	0,979±0,080	CMP 05	0,732±0,240
CPI-FiA 06	1,024±0,041	CMP 06	0,589±0,162
CPI-FiA 07	0,978±0,039	CMP 07	0,789±0,309
CPI-FiA 08	1,198±0,393	CMP 08	0,528±0,080
CPI-FiA 09	1,014±0,210	CMP 09	0,321±0,079
CPI-FiA 10	1,245±0,237	CMP 10	0,436±0,121
CPI-FiA 11	1,099±0,086	CMP 11	0,787±0,160
CPI-FiA 12	0,965±0,170	CMP 12	0,902±0,169
CPI-FiA 13	1,000±0,000	CMP 13	0,608±0,104
CPI 01	0,521±0,122	SAo 01	1,927±0,321
CPI 02	0,461±0,138	SAo 02	0,919±0,140
CPI 03	0,891±0,036	SAo 03	1,917±0,206
CPI 04	0,817±0,113	SAo 04	1,144±0,272
CPI 05	0,478±0,019	SAo 05	1,457±0,203
CPI 06	0,501±0,035	SAo 06	1,020±0,241
CPI 07	0,738±0,181	SAo 07	1,632±0,202
CPI 08	0,332±0,046	SAo 08	1,705±0,139
CPI 09	0,318±0,169	SAo 09	0,854±0,089
CPI 10	0,327±0,071	SAo 10	1,789±0,192
CPI 11	0,594±0,105	SAo 11	0,514±0,055
CPI 12	0,562±0,022	SAo 12	1,625±0,000
CPI 13	0,781±0,418	SAo 13	1,521±0,407
CPI 14	0,853±0,070	SAo 14	0,720±0,160
		SAo 15	1,322±0,092
<b>Media pe grup</b>	<b>0,803±0,278</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>1,043±0,476</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,506±0,174	Cc 01	1,073±0,442
Cm 09	0,362±0,015	Cc 02	1,351±0,055
Cm 10	0,363±0,028	Cc 03	1,831±0,547
Cm 11	0,526±0,055	Cc 04	1,174±0,304
Cm 12	0,467±0,032	Cc 05	1,213±0,184
Cm 13	0,469±0,054	Cc 06	1,362±0,227
Cm 14	0,525±0,043	Cc 07	1,830±0,190
<b>Media pe grup</b>	<b>0,460±0,071</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>1,405±0,308</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *INHBA*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,010±0,003	CMP 01	0,006±0,000
CPI-FiA 02	0,010±0,002	CMP 02	0,004±0,000
CPI-FiA 03	0,015±0,001	CMP 03	0,004±0,000
CPI-FiA 04	0,014±0,004	CMP 04	0,003±0,000
CPI-FiA 05	0,011±0,004	CMP 05	0,004±0,000
CPI-FiA 06	0,010±0,002	CMP 06	0,004±0,000
CPI-FiA 07	0,011±0,002	CMP 07	0,007±0,001
CPI-FiA 08	0,014±0,002	CMP 08	0,009±0,001
CPI-FiA 09	0,014±0,001	CMP 09	0,009±0,000
CPI-FiA 10	0,026±0,015	CMP 10	0,005±0,000
CPI-FiA 11	0,022±0,008	CMP 11	0,005±0,002
CPI-FiA 12	0,028±0,005	CMP 12	0,006±0,003
CPI-FiA 13	0,028±0,005	CMP 13	0,007±0,004
CPI 01	0,008±0,003	SAo 01	0,006±0,002
CPI 02	0,002±0,000	SAo 02	0,002±0,001
CPI 03	0,003±0,001	SAo 03	0,006±0,002
CPI 04	0,009±0,004	SAo 04	0,003±0,002
CPI 05	0,009±0,001	SAo 05	0,003±0,001
CPI 06	0,006±0,002	SAo 06	0,002±0,000
CPI 07	0,001±0,000	SAo 07	0,005±0,000
CPI 08	0,006±0,005	SAo 08	0,005±0,001
CPI 09	0,009±0,000	SAo 09	0,003±0,001
CPI 10	0,004±0,001	SAo 10	0,008±0,002
CPI 11	0,009±0,004	SAo 11	0,004±0,001
CPI 12	0,006±0,003	SAo 12	0,003±0,001
CPI 13	0,008±0,003	SAo 13	0,002±0,000
CPI 14	0,009±0,001	SAo 14	0,005±0,001
		SAo 15	0,002±0,001
<b>Media pe grup</b>	<b>0,011±0,007</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,005±0,002</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,016±0,004	Cc 01	0,003±0,000
Cm 09	0,014±0,007	Cc 02	0,003±0,000
Cm 10	0,015±0,006	Cc 03	0,004±0,000
Cm 11	0,018±0,003	Cc 04	0,003±0,000
Cm 12	0,013±0,002	Cc 05	0,004±0,000
Cm 13	0,018±0,002	Cc 06	0,003±0,000
Cm 14	0,012±0,002	Cc 07	0,004±0,001
<b>Media pe grup</b>	<b>0,015±0,002</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,003±0,001</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.



Expresia relativă a genei *JAK2*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,280±0,115	CMP 01	0,173±0,080
CPI-FiA 02	0,434±0,183	CMP 02	0,283±0,048
CPI-FiA 03	0,153±0,070	CMP 03	0,277±0,049
CPI-FiA 04	0,230±0,072	CMP 04	0,121±0,041
CPI-FiA 05	0,200±0,073	CMP 05	0,124±0,026
CPI-FiA 06	0,626±0,329	CMP 06	0,106±0,004
CPI-FiA 07	0,445±0,236	CMP 07	0,098±0,017
CPI-FiA 08	0,366±0,256	CMP 08	0,262±0,178
CPI-FiA 09	0,510±0,130	CMP 09	0,295±0,032
CPI-FiA 10	0,277±0,121	CMP 10	0,104±0,011
CPI-FiA 11	0,313±0,111	CMP 11	0,180±0,064
CPI-FiA 12	0,381±0,047	CMP 12	0,184±0,043
CPI-FiA 13	0,471±0,143	CMP 13	0,256±0,010
CPI 01	0,248±0,141	SAo 01	0,214±0,032
CPI 02	0,207±0,107	SAo 02	0,246±0,127
CPI 03	0,228±0,009	SAo 03	0,203±0,154
CPI 04	0,241±0,043	SAo 04	0,099±0,034
CPI 05	0,436±0,030	SAo 05	0,096±0,021
CPI 06	0,337±0,086	SAo 06	0,215±0,037
CPI 07	0,198±0,065	SAo 07	0,168±0,037
CPI 08	0,366±0,142	SAo 08	0,098±0,016
CPI 09	0,777±0,213	SAo 09	0,114±0,012
CPI 10	0,236±0,045	SAo 10	0,110±0,019
CPI 11	0,138±0,041	SAo 11	0,154±0,039
CPI 12	0,106±0,025	SAo 12	0,226±0,072
CPI 13	0,150±0,058	SAo 13	0,185±0,045
CPI 14	0,214±0,122	SAo 14	0,213±0,022
		SAo 15	0,169±0,018
<b>Media pe grup</b>	<b>0,317±0,157</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,178±0,064</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,238±0,053	Cc 01	0,178±0,025
Cm 09	0,275±0,021	Cc 02	0,161±0,039
Cm 10	0,244±0,01	Cc 03	0,137±0,011
Cm 11	0,208±0,016	Cc 04	0,120±0,020
Cm 12	0,205±0,036	Cc 05	0,152±0,032
Cm 13	0,203±0,000	Cc 06	0,104±0,011
Cm 14	0,199±0,008	Cc 07	0,102±0,007
<b>Media pe grup</b>	<b>0,225±0,028</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,136±0,029</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media=deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *TIMP1*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	1,377±0,338	CMP 01	1,931±0,634
CPI-FiA 02	2,793±0,834	CMP 02	1,001±0,278
CPI-FiA 03	2,088±0,513	CMP 03	1,383±0,662
CPI-FiA 04	1,176±0,048	CMP 04	1,117±0,367
CPI-FiA 05	1,127±0,336	CMP 05	1,027±0,667
CPI-FiA 06	2,405±0,933	CMP 06	1,330±0,627
CPI-FiA 07	2,869±0,593	CMP 07	2,504±0,821
CPI-FiA 08	1,705±0,457	CMP 08	1,140±0,238
CPI-FiA 09	2,584±0,211	CMP 09	2,880±1,021
CPI-FiA 10	2,284±1,205	CMP 10	0,821±0,143
CPI-FiA 11	2,842±0,352	CMP 11	1,859±0,784
CPI-FiA 12	1,523±0,176	CMP 12	0,842±0,426
CPI-FiA 13	1,792±0,491	CMP 13	1,496±0,256
CPI 01	1,396±0,238	SAo 01	1,524±0,966
CPI 02	1,705±0,457	SAo 02	2,449±1,606
CPI 03	2,403±0,581	SAo 03	2,082±0,486
CPI 04	2,618±0,569	SAo 04	2,751±1,627
CPI 05	1,062±0,223	SAo 05	2,702±0,109
CPI 06	1,269±0,526	SAo 06	1,974±0,337
CPI 07	2,762±1,469	SAo 07	1,002±0,069
CPI 08	2,914±0,406	SAo 08	1,186±0,198
CPI 09	2,408±1,153	SAo 09	1,101±0,118
CPI 10	2,398±1,226	SAo 10	2,250±0,184
CPI 11	1,191±0,223	SAo 11	1,132±0,172
CPI 12	1,290±0,618	SAo 12	2,195±0,089
CPI 13	2,112±0,321	SAo 13	2,833±0,196
CPI 14	1,196±0,279	SAo 14	1,740±0,699
		SAo 15	2,166±1,499
<b>Media pe grup</b>	<b>1,974±0,645</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>1,729±0,663</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	2,246±0,089	Cc 01	1,822±0,824
Cm 09	2,154±0,267	Cc 02	1,346±0,342
Cm 10	2,735±0,513	Cc 03	1,351±0,055
Cm 11	2,847±0,394	Cc 04	1,138±0,239
Cm 12	2,953±0,725	Cc 05	1,827±0,149
Cm 13	2,828±0,000	Cc 06	1,709±0,970
Cm 14	2,068±0,365	Cc 07	1,890±0,988
<b>Media pe grup</b>	<b>2,547±0,375</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>1,583±0,299</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *TNFRSF11B*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,0004±0,0001	CMP 01	0,0009±0,0002
CPI-FiA 02	0,0003±0,0000	CMP 02	0,0004±0,0000
CPI-FiA 03	0,0002±0,0001	CMP 03	0,0002±0,0000
CPI-FiA 04	0,0002±0,0000	CMP 04	0,0003±0,0002
CPI-FiA 05	0,0002±0,0001	CMP 05	0,0003±0,0002
CPI-FiA 06	0,0006±0,0001	CMP 06	0,0005±0,0003
CPI-FiA 07	0,0007±0,0001	CMP 07	0,0009±0,0001
CPI-FiA 08	0,0006±0,0002	CMP 08	0,0009±0,0000
CPI-FiA 09	0,0009±0,0005	CMP 09	0,0004±0,0002
CPI-FiA 10	0,0009±0,0001	CMP 10	0,0006±0,0003
CPI-FiA 11	0,0009±0,0001	CMP 11	0,0009±0,0002
CPI-FiA 12	0,0009±0,0002	CMP 12	0,0007±0,0001
CPI-FiA 13	0,0006±0,0000	CMP 13	0,0009±0,0001
CPI 01	0,0008±0,0003	SAo 01	0,0017±0,0005
CPI 02	0,0005±0,0001	SAo 02	0,0006±0,0001
CPI 03	0,0004±0,0001	SAo 03	0,0012±0,0002
CPI 04	0,0004±0,0002	SAo 04	0,0006±0,0002
CPI 05	0,0008±0,0005	SAo 05	0,0007±0,0004
CPI 06	0,0004±0,0001	SAo 06	0,0010±0,0006
CPI 07	0,0005±0,0002	SAo 07	0,0027±0,0003
CPI 08	0,0004±0,0001	SAo 08	0,0006±0,0001
CPI 09	0,0006±0,0003	SAo 09	0,0016±0,0005
CPI 10	0,0002±0,0001	SAo 10	0,0026±0,0010
CPI 11	0,0009±0,0001	SAo 11	0,0031±0,0003
CPI 12	0,0007±0,0001	SAo 12	0,0036±0,0016
CPI 13	0,0009±0,0002	SAo 13	0,0025±0,0005
CPI 14	0,0008±0,0002	SAo 14	0,0068±0,0023
		SAo 15	0,0037±0,0023
<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,000</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,001</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,0275±0,0109	Cc 01	0,0032±0,0020
Cm 09	0,0281±0,0090	Cc 02	0,0026±0,0015
Cm 10	0,0266±0,0011	Cc 03	0,0033±0,0016
Cm 11	0,0279±0,0011	Cc 04	0,0042±0,0017
Cm 12	0,0237±0,0090	Cc 05	0,0027±0,0004
Cm 13	0,0224±0,0097	Cc 06	0,0028±0,0014
Cm 14	0,0292±0,0000	Cc 07	0,0028±0,0015
<b>Media pe grup</b>	<b>0,026±0,002</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,003±0,001</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *SSPN*, unități convenționale

SUBIECȚI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,029±0,003	CMP 01	0,049±0,005
CPI-FiA 02	0,027±0,004	CMP 02	0,024±0,002
CPI-FiA 03	0,024±0,008	CMP 03	0,030±0,005
CPI-FiA 04	0,021±0,005	CMP 04	0,034±0,009
CPI-FiA 05	0,031±0,011	CMP 05	0,034±0,015
CPI-FiA 06	0,035±0,011	CMP 06	0,030±0,007
CPI-FiA 07	0,020±0,010	CMP 07	0,031±0,005
CPI-FiA 08	0,035±0,012	CMP 08	0,030±0,005
CPI-FiA 09	0,031±0,009	CMP 09	0,044±0,012
CPI-FiA 10	0,021±0,006	CMP 10	0,023±0,005
CPI-FiA 11	0,029±0,012	CMP 11	0,021±0,002
CPI-FiA 12	0,007±0,003	CMP 12	0,056±0,024
CPI-FiA 13	0,006±0,000	CMP 13	0,030±0,002
CPI 01	0,021±0,007	SAo 01	0,071±0,015
CPI 02	0,028±0,009	SAo 02	0,092±0,022
CPI 03	0,030±0,005	SAo 03	0,093±0,036
CPI 04	0,033±0,012	SAo 04	0,091±0,013
CPI 05	0,029±0,009	SAo 05	0,095±0,044
CPI 06	0,041±0,023	SAo 06	0,086±0,041
CPI 07	0,040±0,013	SAo 07	0,093±0,004
CPI 08	0,046±0,008	SAo 08	0,089±0,016
CPI 09	0,024±0,005	SAo 09	0,088±0,041
CPI 10	0,008±0,003	SAo 10	0,080±0,020
CPI 11	0,021±0,003	SAo 11	0,069±0,012
CPI 12	0,029±0,011	SAo 12	0,043±0,014
CPI 13	0,047±0,022	SAo 13	0,071±0,010
CPI 14	0,017±0,006	SAo 14	0,074±0,003
		SAo 15	0,084±0,025
<b>Media pe grup</b>	<b>0,027±0,010</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,059±0,027</b>
SUBIECȚI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,146±0,064	Cc 01	0,052±0,011
Cm 09	0,135±0,024	Cc 02	0,054±0,031
Cm 10	0,128±0,014	Cc 03	0,069±0,012
Cm 11	0,128±0,005	Cc 04	0,049±0,007
Cm 12	0,132±0,040	Cc 05	0,056±0,022
Cm 13	0,130±0,032	Cc 06	0,046±0,002
Cm 14	0,151±0,016	Cc 07	0,072±0,033
<b>Media pe grup</b>	<b>0,136±0,009</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,057±0,010</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *ITGB1*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	2,096±0,083	CMP 01	1,496±0,256
CPI-FiA 02	2,269±0,677	CMP 02	1,383±0,055
CPI-FiA 03	2,656±0,367	CMP 03	0,953±0,247
CPI-FiA 04	2,007±0,537	CMP 04	1,421±0,164
CPI-FiA 05	2,247±0,877	CMP 05	1,265±0,136
CPI-FiA 06	3,513±1,067	CMP 06	1,472±0,344
CPI-FiA 07	3,119±0,854	CMP 07	1,385±0,113
CPI-FiA 08	2,023±0,879	CMP 08	0,958±0,103
CPI-FiA 09	2,282±0,758	CMP 09	1,006±0,139
CPI-FiA 10	3,773±0,658	CMP 10	1,929±0,341
CPI-FiA 11	2,003±0,139	CMP 11	1,643±0,313
CPI-FiA 12	2,776±1,101	CMP 12	1,920±0,801
CPI-FiA 13	1,758±0,695	CMP 13	1,786±0,139
CPI 01	1,620±0,601	SAo 01	2,009±0,232
CPI 02	2,806±0,610	SAo 02	1,768±0,776
CPI 03	1,971±0,565	SAo 03	2,512±0,638
CPI 04	2,131±1,125	SAo 04	2,051±0,160
CPI 05	2,366±1,185	SAo 05	2,117±0,632
CPI 06	1,828±0,490	SAo 06	2,202±0,237
CPI 07	3,034±0,841	SAo 07	1,752±0,242
CPI 08	3,582±1,472	SAo 08	1,779±0,461
CPI 09	3,721±2,030	SAo 09	1,395±0,438
CPI 10	3,469±0,824	SAo 10	1,338±0,463
CPI 11	1,727±0,375	SAo 11	1,253±0,445
CPI 12	2,386±0,486	SAo 12	2,774±0,288
CPI 13	2,367±0,330	SAo 13	2,526±0,694
CPI 14	1,952±0,472	SAo 14	2,128±0,444
		SAo 15	2,755±0,677
<b>Media pe grup</b>	<b>2,499±0,659</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>1,749±0,512</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	2,668±0,465	Cc 01	1,673±0,838
Cm 09	2,529±0,272	Cc 02	1,672±0,458
Cm 10	2,896±0,117	Cc 03	1,489±0,450
Cm 11	2,546±0,450	Cc 04	1,097±0,044
Cm 12	2,213±0,712	Cc 05	1,691±0,395
Cm 13	2,833±0,196	Cc 06	1,875±0,217
Cm 14	2,905±0,312	Cc 07	1,846±0,807
<b>Media pe grup</b>	<b>2,656±0,250</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>1,621±0,264</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *ITGBL1*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,0004±0,0000	CMP 01	0,002±0,000
CPI-FiA 02	0,0004±0,0001	CMP 02	0,001±0,000
CPI-FiA 03	0,0004±0,0001	CMP 03	0,001±0,000
CPI-FiA 04	0,0004±0,0001	CMP 04	0,001±0,000
CPI-FiA 05	0,0004±0,0000	CMP 05	0,001±0,001
CPI-FiA 06	0,0004±0,0001	CMP 06	0,001±0,000
CPI-FiA 07	0,0004±0,0001	CMP 07	0,001±0,000
CPI-FiA 08	0,0006±0,0001	CMP 08	0,001±0,000
CPI-FiA 09	0,0004±0,0001	CMP 09	0,002±0,000
CPI-FiA 10	0,0008±0,0001	CMP 10	0,002±0,001
CPI-FiA 11	0,0005±0,0000	CMP 11	0,001±0,000
CPI-FiA 12	0,0005±0,0001	CMP 12	0,003±0,000
CPI-FiA 13	0,0004±0,0000	CMP 13	0,002±0,001
CPI 01	0,0005±0,0001	SAo 01	0,003±0,001
CPI 02	0,0005±0,0002	SAo 02	0,001±0,000
CPI 03	0,0004±0,0001	SAo 03	0,003±0,001
CPI 04	0,0005±0,0001	SAo 04	0,001±0,000
CPI 05	0,0006±0,0001	SAo 05	0,002±0,000
CPI 06	0,0004±0,0000	SAo 06	0,001±0,000
CPI 07	0,0004±0,0000	SAo 07	0,002±0,001
CPI 08	0,0005±0,0001	SAo 08	0,004±0,001
CPI 09	0,0006±0,0002	SAo 09	0,004±0,002
CPI 10	0,0005±0,0001	SAo 10	0,004±0,001
CPI 11	0,0006±0,0001	SAo 11	0,005±0,001
CPI 12	0,0008±0,0002	SAo 12	0,004±0,001
CPI 13	0,0008±0,0002	SAo 13	0,003±0,001
CPI 14	0,0006±0,0001	SAo 14	0,007±0,002
		SAo 15	0,003±0,001
<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,000</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,002±0,002</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,048±0,018	Cc 01	0,003±0,001
Cm 09	0,035±0,013	Cc 02	0,002±0,001
Cm 10	0,041±0,009	Cc 03	0,007±0,006
Cm 11	0,037±0,012	Cc 04	0,004±0,003
Cm 12	0,047±0,007	Cc 05	0,005±0,003
Cm 13	0,039±0,012	Cc 06	0,003±0,001
Cm 14	0,039±0,005	Cc 07	0,004±0,002
<b>Media pe grup</b>	<b>0,041±0,005</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,004±0,002</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *CYP2C8*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,003±0,003	CMP 01	0,006±0,001
CPI-FiA 02	0,002±0,000	CMP 02	0,008±0,003
CPI-FiA 03	0,004±0,002	CMP 03	0,003±0,001
CPI-FiA 04	0,002±0,001	CMP 04	0,009±0,001
CPI-FiA 05	0,002±0,001	CMP 05	0,008±0,004
CPI-FiA 06	0,005±0,001	CMP 06	0,003±0,001
CPI-FiA 07	0,007±0,002	CMP 07	0,004±0,001
CPI-FiA 08	0,002±0,001	CMP 08	0,003±0,000
CPI-FiA 09	0,006±0,002	CMP 09	0,004±0,001
CPI-FiA 10	0,009±0,002	CMP 10	0,006±0,000
CPI-FiA 11	0,002±0,000	CMP 11	0,004±0,000
CPI-FiA 12	0,008±0,002	CMP 12	0,005±0,002
CPI-FiA 13	0,009±0,001	CMP 13	0,007±0,003
CPI 01	0,001±0,000	SAo 01	0,009±0,000
CPI 02	0,003±0,000	SAo 02	0,004±0,002
CPI 03	0,002±0,001	SAo 03	0,009±0,005
CPI 04	0,003±0,001	SAo 04	0,009±0,004
CPI 05	0,002±0,001	SAo 05	0,007±0,003
CPI 06	0,003±0,000	SAo 06	0,009±0,003
CPI 07	0,005±0,003	SAo 07	0,008±0,001
CPI 08	0,006±0,003	SAo 08	0,005±0,001
CPI 09	0,005±0,002	SAo 09	0,004±0,001
CPI 10	0,001±0,000	SAo 10	0,007±0,002
CPI 11	0,005±0,001	SAo 11	0,006±0,002
CPI 12	0,002±0,001	SAo 12	0,006±0,003
CPI 13	0,006±0,002	SAo 13	0,004±0,001
CPI 14	0,006±0,000	SAo 14	0,009±0,003
		SAo 15	0,007±0,004
<b>Media pe grup</b>	<b>0,004±0,002</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,006±0,002</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,008±0,004	Cc 01	0,005±0,000
Cm 09	0,013±0,002	Cc 02	0,005±0,001
Cm 10	0,011±0,001	Cc 03	0,004±0,001
Cm 11	0,016±0,002	Cc 04	0,005±0,001
Cm 12	0,017±0,009	Cc 05	0,004±0,000
Cm 13	0,011±0,005	Cc 06	0,004±0,000
Cm 14	0,015±0,004	Cc 07	0,005±0,001
<b>Media pe grup</b>	<b>0,013±0,003</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,004±0,001</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *CYP4B1*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,001±0,000	CMP 01	0,001±0,000
CPI-FiA 02	0,001±0,000	CMP 02	0,001±0,000
CPI-FiA 03	0,001±0,000	CMP 03	0,001±0,000
CPI-FiA 04	0,002±0,000	CMP 04	0,001±0,000
CPI-FiA 05	0,002±0,000	CMP 05	0,001±0,000
CPI-FiA 06	0,002±0,001	CMP 06	0,001±0,000
CPI-FiA 07	0,005±0,001	CMP 07	0,001±0,000
CPI-FiA 08	0,001±0,000	CMP 08	0,001±0,000
CPI-FiA 09	0,001±0,000	CMP 09	0,001±0,000
CPI-FiA 10	0,004±0,001	CMP 10	0,001±0,000
CPI-FiA 11	0,004±0,001	CMP 11	0,001±0,000
CPI-FiA 12	0,003±0,000	CMP 12	0,002±0,001
CPI-FiA 13	0,001±0,000	CMP 13	0,002±0,001
CPI 01	0,001±0,000	SAo 01	0,038±0,008
CPI 02	0,001±0,000	SAo 02	0,025±0,009
CPI 03	0,001±0,000	SAo 03	0,027±0,018
CPI 04	0,001±0,000	SAo 04	0,029±0,016
CPI 05	0,001±0,000	SAo 05	0,028±0,006
CPI 06	0,001±0,000	SAo 06	0,032±0,004
CPI 07	0,001±0,000	SAo 07	0,026±0,003
CPI 08	0,001±0,000	SAo 08	0,024±0,006
CPI 09	0,001±0,000	SAo 09	0,021±0,005
CPI 10	0,001±0,000	SAo 10	0,022±0,006
CPI 11	0,001±0,000	SAo 11	0,022±0,003
CPI 12	0,001±0,000	SAo 12	0,024±0,005
CPI 13	0,001±0,000	SAo 13	0,021±0,002
CPI 14	0,001±0,000	SAo 14	0,018±0,006
		SAo 15	0,019±0,009
<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,001</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,014±0,013</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,005±0,002	Cc 01	0,001±0,000
Cm 09	0,008±0,004	Cc 02	0,001±0,000
Cm 10	0,006±0,002	Cc 03	0,002±0,001
Cm 11	0,007±0,000	Cc 04	0,001±0,001
Cm 12	0,008±0,004	Cc 05	0,001±0,001
Cm 13	0,009±0,004	Cc 06	0,001±0,001
Cm 14	0,008±0,001	Cc 07	0,002±0,001
<b>Media pe grup</b>	<b>0,007±0,001</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,001</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.



## Expresia relativă a genei HAS1, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,0006±0,0001	CMP 01	0,0016±0,0002
CPI-FiA 02	0,0005±0,0001	CMP 02	0,0014±0,0002
CPI-FiA 03	0,0006±0,0002	CMP 03	0,0019±0,0001
CPI-FiA 04	0,0009±0,0002	CMP 04	0,0017±0,0001
CPI-FiA 05	0,0006±0,0002	CMP 05	0,0021±0,0012
CPI-FiA 06	0,0006±0,0002	CMP 06	0,0013±0,0001
CPI-FiA 07	0,0003±0,0000	CMP 07	0,0014±0,0003
CPI-FiA 08	0,0007±0,0001	CMP 08	0,0024±0,0002
CPI-FiA 09	0,0009±0,0001	CMP 09	0,0016±0,0001
CPI-FiA 10	0,0007±0,0002	CMP 10	0,002 ± 0,0002
CPI-FiA 11	0,0005±0,0000	CMP 11	0,0012±0,0001
CPI-FiA 12	0,0006±0,0001	CMP 12	0,0012±0,0002
CPI-FiA 13	0,0009±0,0000	CMP 13	0,0016±0,0001
CPI 01	0,0004±0,0001	SAo 01	0,0013±0,0002
CPI 02	0,0004±0,0000	SAo 02	0,002±0,00000
CPI 03	0,0004±0,0000	SAo 03	0,0015±0,0002
CPI 04	0,0004±0,0000	SAo 04	0,0018±0,0003
CPI 05	0,0005±0,0001	SAo 05	0,0014±0,0002
CPI 06	0,0003±0,0000	SAo 06	0,0013±0,0000
CPI 07	0,0003±0,0000	SAo 07	0,0012±0,0001
CPI 08	0,0006±0,0001	SAo 08	0,0015±0,0001
CPI 09	0,0004±0,0001	SAo 09	0,0012±0,0002
CPI 10	0,0005±0,0003	SAo 10	0,0013±0,0001
CPI 11	0,0005±0,0002	SAo 11	0,0013±0,0001
CPI 12	0,0004±0,0001	SAo 12	0,0013±0,0002
CPI 13	0,0007±0,0000	SAo 13	0,0014±0,0000
CPI 14	0,0008±0,0002	SAo 14	0,0019±0,0002
		SAo 15	0,0015±0,0002
<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,000</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,002±0,000</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,0008±0,0003	Cc 01	0,0006±0,0003
Cm 09	0,0038±0,0018	Cc 02	0,0005±0,0001
Cm 10	0,0021±0,0023	Cc 03	0,0006±0,0000
Cm 11	0,0026±0,0016	Cc 04	0,0004±0,0002
Cm 12	0,0029±0,0012	Cc 05	0,0006±0,0003
Cm 13	0,0023±0,0011	Cc 06	0,0005±0,0003
Cm 14	0,0034±0,0034	Cc 07	0,0005±0,0002
<b>Media pe grup</b>	<b>0,003±0,001</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,000</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *KRT19*, unități convenționale

SUBIECTI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,001±0,000	CMP 01	0,002±0,001
CPI-FiA 02	0,001±0,000	CMP 02	0,001±0,001
CPI-FiA 03	0,001±0,000	CMP 03	0,002±0,000
CPI-FiA 04	0,001±0,000	CMP 04	0,002±0,000
CPI-FiA 05	0,002±0,000	CMP 05	0,001±0,000
CPI-FiA 06	0,002±0,000	CMP 06	0,001±0,001
CPI-FiA 07	0,003±0,000	CMP 07	0,001±0,000
CPI-FiA 08	0,001±0,000	CMP 08	0,001±0,001
CPI-FiA 09	0,002±0,000	CMP 09	0,001±0,000
CPI-FiA 10	0,001±0,000	CMP 10	0,001±0,000
CPI-FiA 11	0,002±0,000	CMP 11	0,001±0,000
CPI-FiA 12	0,002±0,000	CMP 12	0,002±0,001
CPI-FiA 13	0,001±0,000	CMP 13	0,001±0,000
CPI 01	0,001±0,001	SAo 01	0,005±0,000
CPI 02	0,001±0,001	SAo 02	0,003±0,000
CPI 03	0,001±0,000	SAo 03	0,005±0,001
CPI 04	0,001±0,000	SAo 04	0,004±0,000
CPI 05	0,002±0,000	SAo 05	0,003±0,000
CPI 06	0,001±0,000	SAo 06	0,003±0,000
CPI 07	0,001±0,000	SAo 07	0,004±0,000
CPI 08	0,003±0,001	SAo 08	0,004±0,000
CPI 09	0,001±0,000	SAo 09	0,004±0,000
CPI 10	0,001±0,000	SAo 10	0,004±0,000
CPI 11	0,001±0,001	SAo 11	0,004±0,000
CPI 12	0,003±0,001	SAo 12	0,004±0,001
CPI 13	0,004±0,001	SAo 13	0,005±0,001
CPI 14	0,001±0,001	SAo 14	0,004±0,001
		SAo 15	0,004±0,001
<b>Media pe grup</b>	<b>0,001±0,001</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,003±0,002</b>
SUBIECTI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,021±0,004	Cc 01	0,002±0,000
Cm 09	0,030±0,009	Cc 02	0,002±0,000
Cm 10	0,028±0,001	Cc 03	0,003±0,000
Cm 11	0,020±0,002	Cc 04	0,002±0,000
Cm 12	0,023±0,004	Cc 05	0,002±0,001
Cm 13	0,027±0,006	Cc 06	0,002±0,000
Cm 14	0,021±0,004	Cc 07	0,002±0,000
<b>Media pe grup</b>	<b>0,024±0,004</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,002±0,000</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media±deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

Expresia relativă a genei *RGS1*, unități convenționale

SUBIECȚI CU PATOLOGIE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
CPI-FiA 01	0,031±0,003	CMP 01	0,064±0,029
CPI-FiA 02	0,048±0,011	CMP 02	0,066±0,032
CPI-FiA 03	0,037±0,001	CMP 03	0,037±0,018
CPI-FiA 04	0,046±0,015	CMP 04	0,060±0,011
CPI-FiA 05	0,023±0,007	CMP 05	0,046±0,019
CPI-FiA 06	0,032±0,010	CMP 06	0,036±0,015
CPI-FiA 07	0,034±0,014	CMP 07	0,062±0,015
CPI-FiA 08	0,034±0,025	CMP 08	0,059±0,044
CPI-FiA 09	0,039±0,021	CMP 09	0,028±0,007
CPI-FiA 10	0,048±0,013	CMP 10	0,044±0,009
CPI-FiA 11	0,018±0,010	CMP 11	0,027±0,006
CPI-FiA 12	0,028±0,010	CMP 12	0,091±0,016
CPI-FiA 13	0,045±0,021	CMP 13	0,069±0,051
CPI 01	0,037±0,010	SAo 01	0,188±0,041
CPI 02	0,051±0,028	SAo 02	0,190±0,051
CPI 03	0,058±0,013	SAo 03	0,193±0,130
CPI 04	0,04±0,0120	SAo 04	0,166±0,051
CPI 05	0,048±0,011	SAo 05	0,106±0,033
CPI 06	0,077±0,005	SAo 06	0,102±0,014
CPI 07	0,078±0,050	SAo 07	0,145±0,020
CPI 08	0,064±0,005	SAo 08	0,104±0,024
CPI 09	0,064±0,039	SAo 09	0,102±0,014
CPI 10	0,027±0,003	SAo 10	0,128±0,047
CPI 11	0,040±0,004	SAo 11	0,159±0,047
CPI 12	0,027±0,008	SAo 12	0,180±0,043
CPI 13	0,079±0,040	SAo 13	0,161±0,077
CPI 14	0,084±0,025	SAo 14	0,111±0,025
		SAo 15	0,128±0,030
<b>Media pe grup</b>	<b>0,046±0,018</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,102±0,054</b>
SUBIECȚI FĂRĂ AFECȚIUNI CARDIOVASCULARE			
ADULȚI		COPII	
Cod pacient	$\bar{x} \pm S$	Cod pacient	$\bar{x} \pm S$
Cm 08	0,283±0,042	Cc 01	0,093±0,028
Cm 09	0,332±0,179	Cc 02	0,077±0,021
Cm 10	0,335±0,174	Cc 03	0,088±0,018
Cm 11	0,252±0,035	Cc 04	0,068±0,016
Cm 12	0,300±0,130	Cc 05	0,057±0,019
Cm 13	0,291±0,101	Cc 06	0,046±0,018
Cm 14	0,201±0,044	Cc 07	0,093±0,044
<b>Media pe grup</b>	<b>0,285±0,047</b>	<b>Media pe grup</b>	<b>0,074±0,018</b>

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm S$  (media=deviația standard a eșantionului); **CPI** – cardiopatia ischemică; **CPI-FiA** – cardiopatia ischemică asociată cu fibrilația atrială; **CMP** – cardiomiopatii primare; **SAo** – stenoza aortică congenitală; **Cc** – lotul de comparație pentru copii; **Cm** – lotul de comparație pentru adulți.

## DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez, că în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

**Abdușa Daniela**

**Semnătura** \_\_\_\_\_

**Data** \_\_\_\_\_ **2017**

## CURRICULUM VITAE

**ABDUȘA DANIELA**

### Informații personale

📍 Bădrăgii-Vechi, Edineț MD-4613, Republica Moldova.

☎ + 373 79693631

✉ [abdusadaniela@yahoo.com](mailto:abdusadaniela@yahoo.com)

Data nașterii: 14 aprilie 1988



### Studii superioare:

– 2012-2015 – *studii de doctorat*, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, specialitatea 162.02. – Genetica omului și animalelor.

– 2010-2012 – *studii de masterat*, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, specialitatea 421 – Biologie moleculară. Diplomă de Master în Științe ale Naturii – seria AMC000004544.

– 2007-2010 – *studii de licență*, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie și Pedologie, specialitatea științifică 421.1 – Biologie. Diplomă de Licență în Științe ale Naturii – seria ALII000039749.

### Stagii:

#### 2016

– 15-19 decembrie – Curs de formare continuă: „Practici de cercetare”, realizat în cadrul proiectului Consolidarea cadrului instituțional al Republicii Moldova în domeniul migrației și dezvoltării”, UnAȘM. *Certificat de participare 3 credite SECTS*,

– 14-21 iunie – Stagiul: „Înșușirea noilor metode de cercetare, familiarizarea cu direcțiile de cercetare, stabilirea noilor relații de colaborare”. Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași, România.

– 1 iulie – Training: „Implementarea instrumentelor TIC în cercetare”, UnAȘM. (*Certificat de participare*).

– 26-27 mai – Curs de formare continuă: „Accesarea și managementul financiar al proiectelor Horizont 2020”, Chișinău, Republica Moldova. *Certificat de participare*.

#### 2015

– 11-15 octombrie – Stagiul de practică în Departamentul de Bioinformatică din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, București, Romania. „Biostatistica în R”. *Adeverință de participare*.

– 11-16 octombrie – Stagiul realizat la Institutului Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Științe Biologice și la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, București, Romania.

– 2-3 iulie – Training: „Tehnici de cercetare în biologia moleculară”, UnAȘM în colaborare cu Institutul de Fitotehnie N.I. Vavilov, Federația Rusă. *Certificat de participare, 5 credite*.

– 22-23 aprilie – Training: „Scrierea proiectelor internaționale”. Universitatea AȘM în colaborare cu Centrul Proiecte Internaționale al AȘM, Chișinău, Republica Moldova.

#### 2014

– 16-20 iunie – Curs de formare continuă: „Metode de determinare a activității antioxidante”, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, Laboratorului de Ficobiotehnologie, Chișinău, Republica Moldova. *Certificate de participare, 15 SECTS*.

– 26 iunie 2014 – Seminar: „Etapile elaborării unei hărți în GIS”, UnAȘM, Chișinău, Republica Moldova. *Adeverință de participare*.

– 8-22 septembrie – Stagiul de documentare și schimb de experiență în domeniul tehnicilor de biologie moleculară cu aplicație în patologia cardiovasculară. Laboratorul de Imunologie și Genetică din Spitalul Clinic „Sf. Spiridon”, Iași, România.

#### 2013

– 15-22 iulie – Școala de vară: „Genetica Moleculară”, Karolinska Institut, Suedia – UnAȘM, Chișinău, Republica Moldova. *Certificate of excellence in genetic engineering and molecular genetics, 5 ECTS*.

– 17-20 septembrie – Training: „Tehnici de analiză moleculară”, Laboratorul Genomică, Centrul universitar de Biologie Moleculară, UnAȘM, Chișinău, Moldova. *Certificat de participare, 15 credite*.

#### 2012

– 17 ianuarie – Seminar: „Information sources in Biotechnology”, organizat în cadrul proiectului „Serving Life-science Information for the Next-Generation (SLING)”, Chișinău, Republica Moldova.

– 3 martie – Training: „Utilizarea bazei de date Springer” Biblioteca Științifică Centrală „Andrei Lupan” a AȘM, Chișinău, Republica Moldova.

– 24-26 octombrie – „FP7 Marie Curie Workshop”, MOLD-ERA proiect, Biblioteca Științifică Centrală „Andrei Lupan” a AȘM, Chișinău, Republica Moldova. *Grant agreement no. 266515.*

– 24-26 ianuarie – Seminar: „Mecanismul de schimb de informații privind biosecuritatea (BCH)”, organizat în cadrul Proiectului UNEP-GEF DELC BCH II, Chișinău, Republica Moldova.

#### **2011**

– 7.02.2011-14.03.2012 – Cursuri de formare la specialitatea „Psihopedagogia învățământului universitar”. USM, Chișinău, Republica Moldova. *Certificat nr. 084547, seria CRP.*

– 15 septembrie, 2011-15 mai, 2012 – Studii avansate în Nano-bioinginerie, biomateriale și biocompatibilitate, Universitatea Tehnică a Moldovei, Centrul de Formare Continuă, FP7 proiect MOLD-ERA, Chișinău, Republica Moldova. *Certificat nr. 089248, seria ACR / grand agreement no 266515.*

– 3-7 iulie – Școala de vară: „Nano-Bioinginerie-2011” organizată în cadrul proiectului FP7 MOLD-ERA, UTM, Chișinău, Republica Moldova. *Grant agreement no. 266515.*

– 1-5 august – Training anual pentru tinerii cercetători: „Statistics and Econometrics in R”, Institutul de Economie, Finanțe și Statistică al AȘM, Chișinău, Republica Moldova. *Certificat.*

#### **Domeniile de interes științific:**

Biologie și genetică moleculară, biomedicină, bioinformatica.

#### **Activitatea profesională:**

– martie 2017-prezent – *secretar științific* al Senatului UnAȘM.

– 01.09.2016-prezent – *lector universitar*, Catedra Biologie, Facultatea Științe ale Naturii, UnAȘM.

– 02.01.2014-prezent – *cercetător științific*, Centrul universitar Biologie Moleculară, CBM (actualmente Centrul universitar Genetică Funcțională, CGF), UnAȘM.

– 02.09.2013-31.05.2016 – *asistent universitar*, Catedra Biologie, Facultatea Științe ale Naturii, UnAȘM

– 15.03.2011-31.12.2013 – *cercetător științific stagiar*, CBM (CGF), UnAȘM.

#### **Participări în proiecte științifice naționale și internaționale:**

– *Proiecte instituționale:*

15.817.05.03F „Rezistența florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.) la lupoai (*Orobanche cumana* Wallr.): mecanisme genetico-moleculare și fiziologice”, 2015 – 2018, din planul de cercetare al instituției;

11.817.04.19F „Aspecte funcționale și genetico-moleculare ale genomului la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”, 2011 – 2014, din planul de cercetare al instituției în calitate de executant.

– *Proiecte internaționale:*

16.80013.5107.20/Ro, „Evaluarea unor hibrizi de floarea soarelui, privind rezistența la stresul hidric și termic, în România și Republica Moldova”, proiect bilateral moldo-român;

Grant de cercetare internațională nr. 06/CE din 1 mai 2015, „Asocierea la infrastructura europeană de cercetare în domeniul biologiei”, 2015-2016.

– *Proiecte pentru tineri cercetători:*

11.819.09.15A „UDaCoT- Instrument de colectare a datelor biologice elaborat în cadrul UnAȘM”, 2011 – 2012, în calitate de executant.

– *Proiecte pentru procurarea echipamentului științific:*

11.220.10.05A „Investigarea potențialului de rezistență la stresul biotic a diferitor genotipuri de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”, 2011, în calitate de executant.

#### **Participări la foruri științifice (naționale și internaționale):**

##### **2016**

– V-a ediție a Conferinței Științifice (cu participare internațională) a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători” dedicată aniversării a 70-a de la crearea primelor institute de cercetare și a 55-a de la fondarea Academiei de Științe a Moldovei, 25 mai, 2016. *Poster, articol.*

– Conferința Științifică cu participare internațională „Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice”. 25 noiembrie 2016. *Articol.*

– International Scientific Conference ”Factors in Experimental Evolution of Organisms”, Odessa, Ukraine, 2016. *Articol.*

– The 20th International Pushchino school conference of young scientists “Biology – the science of the XXI century, Пушчино, Россия, 18 – 22 апреля 2016 г. *Teză.*

– Conferința Internațională dedicată celor 70 ani de la fondarea primelor Institute ale Academia de Științe a Moldovei „Științele Vieții în Dialogul Generațiilor: Conexiuni Dintre Mediul Academic, Universitar și de Afaceri”, 25 martie 2016, Chișinău, Republica Moldova. *Teză*.

#### 2015

– Conferința Internațională: „Biologia Moleculară - Aspecte Curente și Perspective”, Cluj-Napoca, România, 6-8 noiembrie 2015. *Certificate of attendance, 14 EMC*.

– Congresul Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, Ediția a X-a, 28 iunie-1 iulie, 2015, Chișinău, Republica Moldova. *Teză, raport oral*.

– XIth International Scientific Conference for Students and PhD Students „Youth and Progress of Biology”, Lviv, Ukraine, April 20-24, 2015. *Teză*.

– Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători”, Ediția a IV, UnAȘM, 10 martie, 2015, Chișinău, Republica Moldova. *Poster, teză*.

#### 2014

– Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători”, UnAȘM, 10 martie, 2014, Chișinău, Republica Moldova. *Raport oral, teză*.

#### 2013

– X-th International Medical and Pharmaceutical Conference of Students and Young Scientists "Actual Problems of Medicine and Pharmacy", Bukovinian State Medical University, March 27 – 28, 2013, Chernivtsi, Ukraine. *Teză*.

– Conferința Națională de Genetică Medicală cu Participare Internațională, 26-28 septembrie, 2013, Sibiu-Pălteniș, România. *Raport oral, teză, diplomă de participare, 18 credite EMC, Seria A, Nr. 52*.

– Al III Simpozion National cu Participare Internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, 24-25 octombrie, 2013, Chișinău, Republica Moldova. *Raport oral, teză*.

– Conferința Transfrontalieră a Tinerilor: „Tinerii Politicieni, Juriști, Economisti, Jurnaliști, Artiști, Filologi vis-a-vis de extinderea UE”, ediția a X-a, UnAȘM, 20 - 21 decembrie 2013, Chișinău, Republica Moldova. *Raport oral, articol, certificat de participare, revista*.

#### 2012

– Conferința științifică a studenților și masteranzilor „Viitorul începe acum”, UnAȘM, 27 aprilie, 2012, Chișinău, Republica Moldova. *Teză*.

– Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților USMF „Nicolae Testemițanu”, 17-19 octombrie, 2012, Chișinău, Republica Moldova. *Articol*.

– International Conference of Young Researchers, X-th edition, Free International University of Moldova, November 23, 2012, Chisinau, Republic of Moldova. *Raport oral, teză, certificate of attendance*.

#### 2011

– Conferința științifică „Genetica și fiziologia rezistenței plantelor”, În memoriam acad. Anatolie Jacotă, IFFP, 21 Iunie, 2011, Chișinău, Republica Moldova. *Teză*.

– The International Moscow Conference on Computational Molecular Biology. July 21-24, 2011, Moscow, Rusia. *Teză*.

– Conferința științifică internațională „Nanotehnologii și bioinginerie medicală” ICNBME-2011, 7-8 Iulie, 2011, Chișinău, Republica Moldova. *Certificat de participare*.

#### **Lucrări științifice și științifico-metodice publicate:**

două capitole în culegere și 17 lucrări științifice (inclusiv 11 publicații de monoautor): 6 articole științifice, 11 comunicări la foruri internaționale și naționale.

#### **Premii, mențiuni, distincții, titluri onorifice etc.**

2014 – **Bursa de excelență a Guvernului** pentru doctoranzi.

Publicat : 31.12.2013 în Monitorul Oficial Nr. 315-319 art. Nr. 1193.

2015 – **Bursa Federației Mondiale a Savanților** (Geneva).

#### **Cunoașterea limbilor:**

limba română – limba maternă, limba rusă – mediu, limba engleză – bine, limba franceză – mediu.

#### **Date de contact de serviciu**

Centrul universitar de Genetică Funcțională

Universitatea Academiei de Științe a Moldovei

str. Academiei, 3/2, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova

e-mail: [personal.univer@asm.md](mailto:personal.univer@asm.md)

tel.: (+373 22) 738016