

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
UNIVERSITATEA ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 616.1-08:577.2(043.3)

ABDUȘA DANIELA

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

162.02. – GENETICA OMULUI ȘI ANIMALELOR

Autoreferat al tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2017

**Teza a fost realizată în cadrul Centrului Genetică Funcțională
Universitatea Academiei de Științe a Moldovei (UnAȘM)**

Conducători științifici:

DUCA Maria, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

PALII Ina, doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

Referenți oficiali:

CUROCICHIN Ghenadie, doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

CEMORTAN Igor, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Membri ai Consiliului Științific Specializat:

PALII Andrei – *președinte*, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, membru corespondent al Academiei de Științe a Moldovei

PORT Angela – *secretar*, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

VATAMAN Eleonora, doctor habilitat în științe medicale, profesor cercetător

LUPAȘCU Galina, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

SACARA Victoria, doctor în științe medicale, conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la **14 septembrie 2017**, ora **14⁰⁰** în ședința Consiliului Științific Specializat **D 25. 162.02 – 01** la Universitatea Academiei de Științe a Moldovei.

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

Tel: (0373) 22 73-80-16, E-mail: personal.univer@asm.md

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală „A. Lupan” a Academiei de Științe a Moldovei (str. Academiei 5a, Chișinău, MD 2028, Republica Moldova) și pe pagina web a CNAA (www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expedit la **27 iulie 2017**.

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat,

PORT Angela, dr. șt. biol., conf. univ.

Conducători științifici:

DUCA Maria, dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad.

PALII Ina, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Autor

ABDUȘA Daniela

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei

Maladiile cardiovasculare (BCV) sunt patologii complexe, multifactoriale, impactul social al cărora se manifestă prin invaliditate și spitalizări, atât la nivelul populației vârstnice, cât și adulte, ceea ce contribuie în mod substanțial la creșterea costurilor din sistemul sanitar. Rapoartele europene arată că anual, 700 mii din cele peste 4 milioane de decese provocate de bolile cardiovasculare survin la o vârstă de până la 65 de ani [43]. În Republica Moldova 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 [30]. Astfel, bolile cardiovasculare 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 [44].

Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemei

Expresia genelor reprezintă un indicator al stării fiziologice a celulei și un caracter cantitativ cu înaltă ereditabilitate [10]. Rolul primordial în variabilitatea expresiei genelor revine *factorilor genetici* (variațiilor numărului de copii ADN [20] și locilor caracterelor cantitative [20], polimorfismelor uninucleotidice [20, 39] etc), *modificărilor epigenetice* [18, 37] și *evenimentelor stocastice* [5]. Unii dintre factorii menționați cauzează consecințe care nu se manifestă fenotipic [26], alții, în funcție de tipul și localizarea mutațiilor în structura genei, determină o expresie heterocronică [29] și ectopică [34] care poate provoca modificări în structura proteinei [6], afecta căile metabolice [19] și induce anumite procese patologice [23].

Studiile care se bazează pe profilul genetic al pacienților favorizează îmbunătățirea mijloacelor de predicție [42] și permit elucidarea variabilității individuale în răspunsul clinic la un anumit regim terapeutic [7], facilitând astfel practicarea medicinei personalizate. S-a stabilit un nivel de variabilitate al conținutului de transcripti mai mic în celulele stem embrionare comparativ cu cele expresate în celulele nediferențiate [3], precum și *pattern-uri* specifice, asociate cu sexul, diferențele fiind atribuite în cazul dat cromozomilor sexuali [47]. S-a relevat că variația *pattern*-ului de expresie la subiecții sănătoși este semnificativ mai mică comparativ cu variația la subiecții cu cancer sau infecții bacteriene [47]. Prin evaluarea modificărilor transcripționale ale genelor au fost definite unele subtipuri tumorale [2, 14], au fost identificați markeri moleculari [46] și au fost investigate noi terapii [7].

Expresia diferențiată a genelor în maladiile cardiovasculare constituie subiectul numeroaselor cercetări, care au permis identificarea unor gene asociate cu progresia insuficienței

cardiace [28] și dereglarea căilor metabolice asociate cu infarctul miocardic [41]. Pe baza expresiei genelor la nivel de ARN în sângele periferic, a fost elaborat un algoritm de diferențiere între persoane sănătoase, pacienți cu cardiopatie ischemică stabilă, angină instabilă și infarct miocardic [22] și de estimare a cardiopatiei ischemice obstructive la pacienții non-diabetici [40].

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.

Reieșind din cele menționate, **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, cardiomiopatii primare și stenoza aortică congenitală.

În planul de realizare al cercetării au fost propuse 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.

Metodologia cercetării științifice

Studiul calitativ al literaturii de specialitate și a bazelor de date (formularea de ipoteze), precum și experimentul științific (pentru confirmarea ipotezelor). În vederea identificării și evaluării expresiei genelor potențial implicate în BCV au fost utilizate metode de analiză exploratorie a datelor *microarray* (filtrarea, validarea rezultatelor obținute), metode biochimice, spectrofotometrice, moleculare (Real Time-PCR) și statistice de prelucrare a datelor.

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, 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-genetice 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 BCV. 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.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

- strategia de extragere și analiză a datelor de expresie *microarray* din NCBI-GEO a permis selectarea genelor cu rol prioritar și potențial implicate în patologiile cardiovasculare;
- expresia diferențiată în timp, relevantă în sângele periferic, printr-un nivel mai mare de transcripti la adulții sănătoși, comparativ cu copiii pentru 17 dintre cele 18 gene incluse în studiu;
- omogenitatea conținutului de transcripti (CV% adulți 3,18 – 25,31; copii 10,14 – 28,96) și intervalul de variație al expresiei genelor relativ mic (1,1 – 4,0 *ori* la adulți; 1,0 – 3,50 *ori* la copii) la subiecții sănătoși, date care pun în evidență homeostazia celulară și relevă limitele normei de reacție a organismului;
- eterogenitatea înaltă a expresiei genelor (CV% adulți 36,32 – 89,07; copii 36,12 – 100,01) și un nivel mai larg de variație (2,3 – 28,0 *ori* la adulți; 2,0 – 38,0 *ori* la copii) la subiecții cu patologii cardiovasculare, ceea ce relevă că modificările patologice sunt expresia fenotipică evidentă și excesivă a variabilității genetice;
- *pattern-uri* specifice de expresie a genelor, asociate cu bolile cardiovasculare, puse în evidență prin subexpresia genelor în cazul cardiopatiei ischemice cu (13 gene) și fără fibrilație atrială (14 gene), supraexpresia în stenoza aortică congenitală (10 dintre gene) și sub/supraexpresia (6/5 gene) în cardiomiopatiile primare.

Implementarea rezultatelor științifice

Metodologia bioinformatică 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 subiecți cu boli cardiovasculare sunt utilizați în cadrul CGF,

UnAȘM și sunt recomandați pentru cercetări genetico-moleculare ulterioare. *Pattern*-urile de expresie stabilite pentru maladiile cardiovasculare studiate pot fi recomandate în detectarea și stratificarea pacienților.

Aprobarea rezultatelor științifice

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 a colaboratorilor și studenților USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2012; Conferința științifică a studenților și masteranzilor „Viitorul începe acum”, Chișinău, 2012; Conferința Transfrontalieră a Tinerilor, Chișinău, 2013; Simpozionul Național cu Participare Internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, Chișinău, 2013; Conferința Națională de Genetică Medicală cu Participare Internațională, Sibiu-Paltiniș, 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”, 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.

Publicațiile la tema tezei

Materialele tezei au fost expuse în 19 lucrări științifice (inclusiv 11 publicații de monoautor), 2 capitole în culegere, 6 articole științifice, 11 comunicări la foruri internaționale și naționale.

Volumul și structura tezei

Teza de doctor este scrisă în limba română, 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 de referințe. Materialul ilustrativ include 28 de tabele, 29 de figuri și 18 anexe.

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

CONȚINUTUL TEZEI

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

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

Materialul expus în acest capitol cuprinde o sinteză a celor mai recente date din literatura de specialitate privind epidemiologia bolilor cardiovasculare 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 bolii, cunoașterea cărora ar contribui la elaborarea strategiilor eficiente de prevenire și control a pacienților cu patologii CV.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările au fost efectuate în cadrul Centrului Genetică Funcțională, UnAȘM pe parcursul anilor 2012-2015, iar materialul biologic a fost oferit cu amabilitate de dr. hab. șt. med., conf. univ. Ina PALII, șef de *Clinică Pediatrie și Cardiologie*, IMSP Institutul Mamei și Copilului și dr. hab. șt. med., prof. univ. Eleonora VATAMAN, șef al *Departamentului și Laboratorului Științific Insuficiență Cardiacă Cronică*, IMSP Institutul de Cardiologie.

Material biologic. Pentru identificarea genelor candidat, au fost utilizate profilurile de expresie a genelor în patologii cardiovasculare, stocate în baza de date *NCBI-GEO*, iar analizele moleculare privind evaluarea expresiei genelor s-au efectuat pe probe de sânge integral, recoltate și prelucrate conform metodelor standard [8], de la 69 de persoane originare din Republica Moldova, dintre care 55 de pacienți cu BCV au alcătuit lotul de studiu, iar 14 subiecți (7 copii și 7 adulți) fără afecțiuni CV au constituit lotul de referință. Studiul a inclus 28 de pacienți cu vârsta cuprinsă între 0 – 18 ani, divizați în grupul cardiomiopatii primare (CMP) și grupul stenoza aortică congenitală (SAo) și, respectiv, 27 de pacienți cu vârsta >40 de ani, divizați în grupul cardiopatie ischemică (CPI) și grupul cardiopatie ischemică în asociere cu fibrilația atrială (CPI-FiA). Acordul informat a fost semnat de către toții participanții în studiu, iar în cazul copiilor – de către părinți sau reprezentatul legal al acestora.

Metode de cercetare. Realizarea obiectivelor propuse s-a axat pe utilizarea metodelor molecular-genetice: extragerea ARN-ului total din sânge cu kit comercial (*Thermo Scientific*), cuantificarea ARN-ului prin spectrofotometrie, electroforeză în gel de agaroză, reverstrascriptie, PCR cantitativ [25]; instrumentelor bioinformatic: *Cytoscape*, *DisGeNET*, *NCBI/ Primer-BLAST* [11, 24, 33, 50] și metodelor statistice de prelucrare a datelor [4, 9, 45].

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

Identificarea genelor candidat în manifestarea bolilor cardiovasculare s-a realizat în baza metodologiei de analiză a metadatelor experiențelor *microarray* [11], fiind adaptată conform structurii și seturilor de interes selectate pentru studiul respectiv (Figura 3.1).

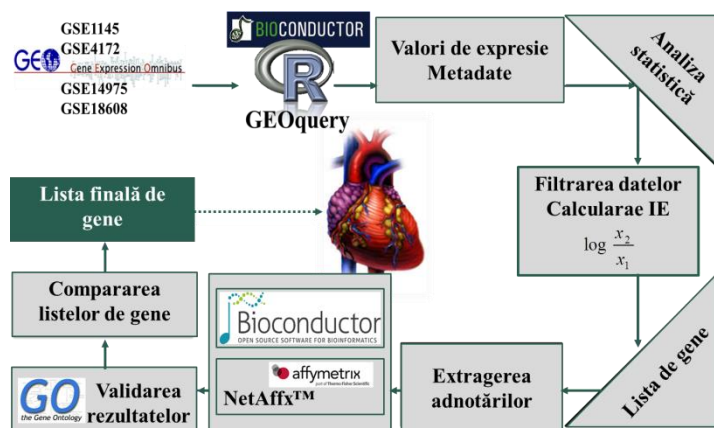


Fig. 3.1. Strategia de determinare a genelor candidat în producerea patologiilor cardiovasculare prin analiza metadatelor experiențelor *microarray* [24].

3.1. Identificarea genelor candidat în manifestarea patologiilor cardiovasculare

În baza de date NCBI-GEO au fost analizate peste 3400 platforme (GPL) referitoare la testele efectuate pentru *Homo sapiens*. Pentru studiul genelor implicate în bolile cardiovasculare au fost selectate două GPL 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. Aceste platforme includ peste 2400 seturi de date (GSE), dintre care, pentru studiul de față au fost selectate: GSE4172 – cardiomiopatie dilatativă, GSE18608 – cardiopatie ischemică, GSE14975 – fibrilație atrială, GSE1145 – stenoza aortică și cardiomiopatii (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1.
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	
GSE18608, GPL570, cardiopatia ischemică						
975	541	434	255	147	12	-3,14 – 2,23
GSE14975, GPL570, fibrilația atrială						
4542	2601	1941	1634	458	36	-3,93 – 4,77
GSE1145, GPL8300, stenoza aortică						
482	253	229	57	156	14	-2,89 – 3,93
GSE4172/1145, GPL570, cardiomiopatii						
89	62	89	62	14	1	-5,01 – 3,22
6088	3457	2663	2008	775	63	Total

Valorile de expresie pentru fiecare GSE au fost descărcate din baza de date NCBI-GEO cu ajutorul pachetului *GEOquery*. Genele diferit exprimate au fost identificate în baza $IE \geq 1$, care reprezintă logaritmul raportului dintre valoarea expresiei în patologie față de control și semnifică modificarea expresiei genei cel puțin de 2 ori. Codurile de adnotare ale genelor care au depășit pragul $IE \geq 1$, au fost extrase utilizând instrumentul *NetAffy Analysis Center* (Affymetrix) și *Bioconductor*. În calitate de identificator universal a fost utilizat codul unic de acces atribuit secvențelor din sistemul *Entrez* al Portalului *NCBI*. Pentru genele care nu au fost adnotate în bazele de date s-a utilizat codul probelor de pe cipul selectat.

S-a constatat că numărul de gene candidat în manifestarea BCV a fost de cel puțin 6000, dintre care 3457 sunt gene cu expresie diminuată și 2663 cu expresie sporită. Validarea implicării genelor în bolile cardiovasculare a fost realizată conform listelor de gene elaborate de *Cardiovascular Gene Ontology Annotation Initiative*. S-au evidențiat 775 gene cu rol potențial și 63 prioritar în CPI, CMP, SAo, FiA.

3.2. Stabilirea genelor cu expresie diferențiată în bolile cardiovasculare

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. Analiza comparativă a listelor de gene prioritare și potențiale, determinate pentru fiecare dintre seturile de date *microarray*, a permis stabilirea genelor cu expresie diferențiată între cardiopatia ischemică, fibrilația atrială, stenoza aortică și cardiomiopatii: 3 gene cu expresie diminuată și 2 gene cu expresie sporită pentru FiA/CMP; 6 gene cu expresie diminuată, 8 gene cu expresie sporită și 14 gene cu expresie diferențiată pentru FiA și SAo; o genă cu expresie diferențiată pentru SAo și CMP; o genă cu expresie diminuată, 2 gene cu expresie sporită și 2 gene cu expresie diferențiată pentru SAo și cardiopatie ischemică; 3 gene cu expresie sporită, 5 gene cu expresie diminuată și 7 gene cu expresie diferențiată pentru CPI/FiA; o genă cu expresie diferențiată pentru CPI și CMP; 6 gene cu manifestare nespecifică pentru aceste patologii.

Generalizând datele obținute, au fost identificate 55 gene, inclusiv 15 cu expresie diminuată, 15 cu expresie sporită și 25 gene cu expresie diferențiată între patologii analizate.

3.3. Selectarea genelor pentru studiul activității transcripționale

Utilizând *GeneCards* și *DAVID Bioinformatics Resources*, genele care au fost asociate, cât și unele neasociate anterior cu cel puțin una dintre afecțiunile cardiovasculare, au fost selectate pentru evaluarea activității transcripționale, inclusiv 5 gene prioritare și 14 potențiale în manifestarea acestor maladii (Tabelul 3.2). Reprezentarea datelor sub formă de rețele a permis evidențierea relațiilor dintre gene (Figura 3.2. A) și asocierea lor cu maladiile CV (Figura 3.2. B). S-a constatat că aceste gene prezintă interes pentru studierea activității transcripționale prin faptul că 7 dintre ele, inclusiv 3 prioritare, s-au asociat cu diferite patologii CV, printre care se enumeră cardiopatia ischemică, fibrilația atrială, cardiomiopatiile primare, boli ale valvelor inimii, malformații cardiace congenitale, ateroscleroza etc. (rețeaua A).

Tabelul 3.2.

Gene selectate pentru studiul expresiei lor în patologii cardiovasculare [1]

Simbolul genei	Nr. de acces Entrez	Denumirea genei
<i>CYP2C8</i> ¹	1558	cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8
<i>CYP4B1</i> ¹	1580	cytochrome P450 family 4 subfamily B member 1
<i>ELAVL1</i> ¹	1994	ELAV like RNA binding protein 1
<i>IL8/CXCL8</i> ¹	3576	C-X-C motif chemokine ligand 8
<i>INHBA</i> ¹	3624	inhibin beta A
<i>ITGB1</i> ¹	3688	integrin subunit beta 1
<i>ITGBL1</i> ¹	9358	integrin subunit beta like 1
<i>JAK2</i> ¹	3717	janus kinase 2
<i>SSPN</i> ¹	8082	Sarcospan
<i>TIMP1</i> ¹	7076	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
<i>TNFRSF11B</i> ¹	4982	tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b
<i>KRT19</i> ¹	3880	keratin 19
<i>HAS1</i> ¹	15116	hyaluronan synthase 1
<i>RGS1</i> ¹	5996	regulator of G-protein signaling 1
<i>ABCA1</i> ²	19	ATP binding cassette subfamily A member 1
<i>LPA</i> ²	4018	lipoprotein(a)
<i>NPPB</i> ² (BNP)	4879	natriuretic peptide B
<i>SCD</i> ²	6319	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
<i>THBS1</i> ²	7057	thrombospondin 1

Notă: ¹ – gene potențial implicate în BCV; ² – gene prioritar implicate în BCV.

Alte 12 gene formează subrețele în dependență de interacțiunile funcționale dintre ele, fiind implicate în transducția semnalelor, metabolismul lipidelor și comunicare intercelulară.

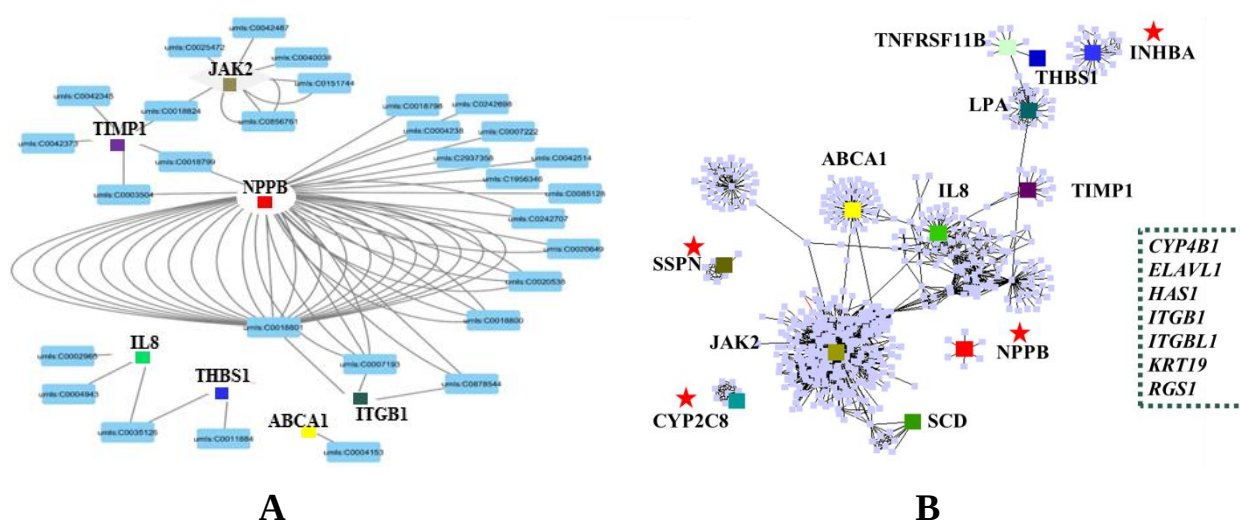


Fig. 3.2. Rețelele biologice de asociere dintre gene cu patologii cardiovasculare (A) și interacțiuni între genele de interes (B).

Notă: A: dreptunghi – codul patologiei, liniile reprezintă asocierile de tipul genă-patologie; B: genele marcate cu steluță formează clustere individuale, genele din boxă nu interacționează în rețea.

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 BCV, fiind incluse în studiul activității transcripționale la subiecți cu maladii cardiovasculare pentru prima dată (rețeaua B).

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

Investigațiile privind expresia genelor asociate cu starea de boală și utilitatea lor în programele de diagnostic, depinde de cunoașterea și înțelegerea variației în limita normei la/între indivizi, în dependență de: vârstă, sex, etnie, țesut, ciclu celular etc. [19]. În această ordine de idei, în lucrare a fost analizată variația nivelului relativ de expresie al genelor, luând în considerație vârsta subiecților (copii și adulți) și starea organismului (stare patologică și stare de sănătate, „de bine”).

4.1. Activitatea transcripțională a genelor la adulți și copii

Celulele corpului uman, indiferent de structura și funcția lor, posedă aceeași informație genetică, însă expresia genică este diferită, deoarece procesul de transcripție este reglat spațial (specific unor organe, țesuturi și celule) și temporal (în funcție de stadiile dezvoltării, diferențierii și ciclului celular), fiind adaptată la natura și intensitatea stimulilor extracelulari [27]. Studiile privind expresia genelor în raport cu vârsta sunt importante pentru înțelegerea și clarificarea mecanismelor de reglare a expresiei genelor, dezvoltarea strategiilor de prevenire a riscului și eficientizării tratamentului personalizat.

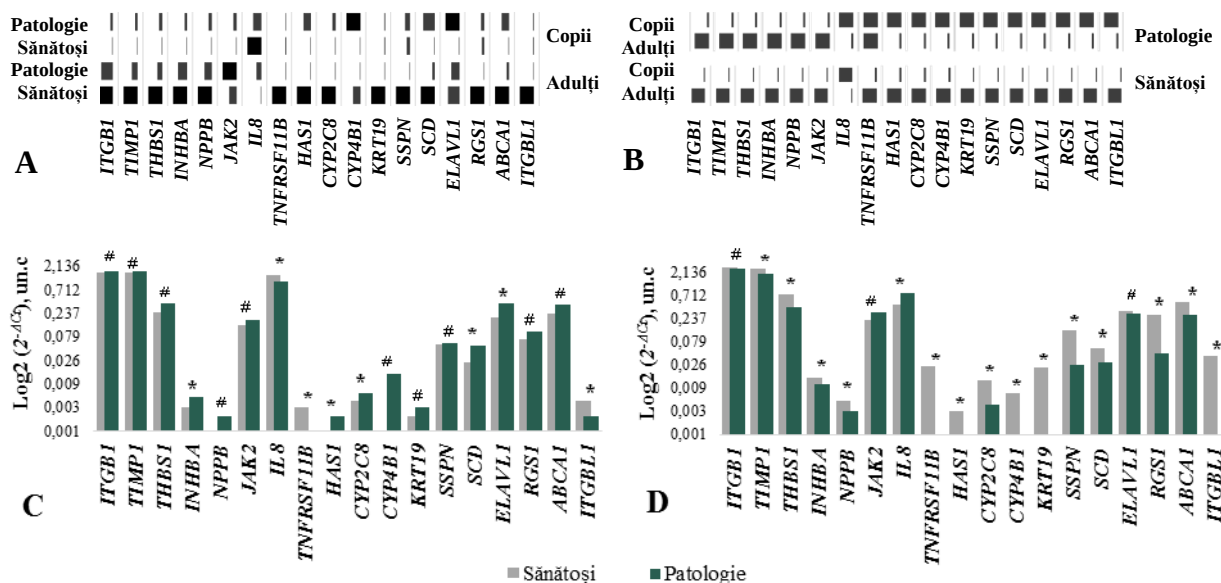


Fig. 4.1. Activitatea transcripțională a genelor la lotul de copii (C) și adulți (D) bolnavi față de sănătoși.

Notă: A, B – reprezentarea grafică a nivelului de expresie; un.c. – unități convenționale; # p>0,05; * p<0,05.

Analiza expresiei relative a genelor la lotul de adulți și copii sănătoși a relevat valori diferențiate pentru toate 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 și o singură genă (IL8) a prezentat un nivel mai mic comparativ cu lotul de copii (Figura 4.1. B). Rezultatele obținute demonstrează

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

S-a stabilit expresia diferită, între *adulți și copii bolnavi*, pentru 17 dintre genele analizate, dintre care 11 gene (*IL8*, *HAS1*, *CYP2C8*, *CYP4B1*, *KRT19*, *SSPN*, *SCD*, *ELAVL1*, *RGS1*, *ABCA1*, *ITGBL1*) au manifestat un nivel mai mic al expresiei și 6 gene (*ITGB1*, *TIMP1*, *THBS1*, *INHBA*, *NPPB*, *JAK2*) au prezentat valori mai mari la adulți față de copii, în timp ce în cazul genei *TNFRSF11B* nu s-au remarcat diferențe (Figura 4.1. B). Rezultatele obținute denotă că activitatea transcripțională a genelor analizate variază în funcție de fenotipul clinic.

Estimarea expresiei relative a genelor, între *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 (Figura 4.1. A).

Rezultatele privind analiza expresiei genelor la *lotul de copii bolnavi comparativ cu sănătoși*, au relevat 8 gene care au manifestat diferențe statistic semnificative, dintre care 5 gene (*INHBA*, *HAS1*, *CYP2C8*, *SCD*, *ELAVL1*) au indicat o concentrație de transcripti mai mare și 3 (*IL8*, *TNFRSF11B*, *ITGBL1*) valori mai mici la bolnavi față de subiecții sănătoși (Figura 4.1. C). Astfel, datele demonstrează că la copiii bolnavi, activitatea transcripțională a genelor crește comparativ cu cei sănătoși.

Studiul expresiei genelor de interes la *lotul adulți bolnavi comparativ cu sănătoși*, a pus în evidență diferențe semnificative statistic pentru 15 gene, dintre care 14 (*TIMP1*, *THBS1*, *INHBA*, *NPPB*, *TNFRSF11B*, *HAS1*, *CYP2C8*, *CYP4B1*, *KRT19*, *SSPN*, *SCD*, *RGS1*, *ABCA1*, *ITGBL1*) s-au remarcat printr-un nivel mai scăzut și una (*IL8*) prin expresie mai mare la bolnavi față de persoanele sănătoase. În acest aspect, datele demonstrează că la adulții bolnavi, nivelul expresiei genelor diminuează față de cei sănătoși (Figura 4.1. D).

Analiza comparativă a valorilor de expresie atât în lotului de adulți (bolnavi vs sănătoși), cât și față de lotul de copii demonstrează diminuarea nivelului de expresie a genelor la subiecții bolnavi comparativ cu cei sănătoși. Rezultatele obținute confirmă expresia diferită între grupe de vârstă distincte, fapt afirmat și de alți autori [17, 32, 38, 49].

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.

Întrucât cunoașterea variației expresiei genelor în țesutul sănătos este esențială pentru recunoașterea și interpretarea modificărilor asociate cu diferite maladii, în cadrul studiului a fost evaluată variabilitatea expresiei genelor la *subiecții sănătoși*, fiind constatate limite relativ mici atât la adulți, cât și la copii, intervalul de variație fiind cuprins între 1,1 și 4,0 *ori*, respectiv 1,0 și 3,5 *ori*.

Studiul variabilității expresiei genelor la *bolnavi*, spre deosebire de subiecții sănătoși, a pus în evidență limite largi de variație atât la adulți (2,3 – 28,0 ori), cât și la copii (2,0 – 38,0 ori).

Estimarea coeficientului de variație (CV) a expresiei genelor la *subiecții sănătoși* a relevat un nivel înalt de uniformitate a datelor pentru 17 gene la adulți (CV prezentând valori între 3,18 – 25,31%) și 16 gene la copii (CV cu valori între 10,14 – 31,17%, Figura 4.2. A, B).

La *subiecții cu patologie*, valorile determinate ale CV se situează între 36,32 – 89,07% pentru 14 gene la adulți și între 36,12 – 100,01% pentru 14 gene la copii, ceea ce relevă o variație înaltă a expresiei în condiții de boală (Figura 4.2. C, D).

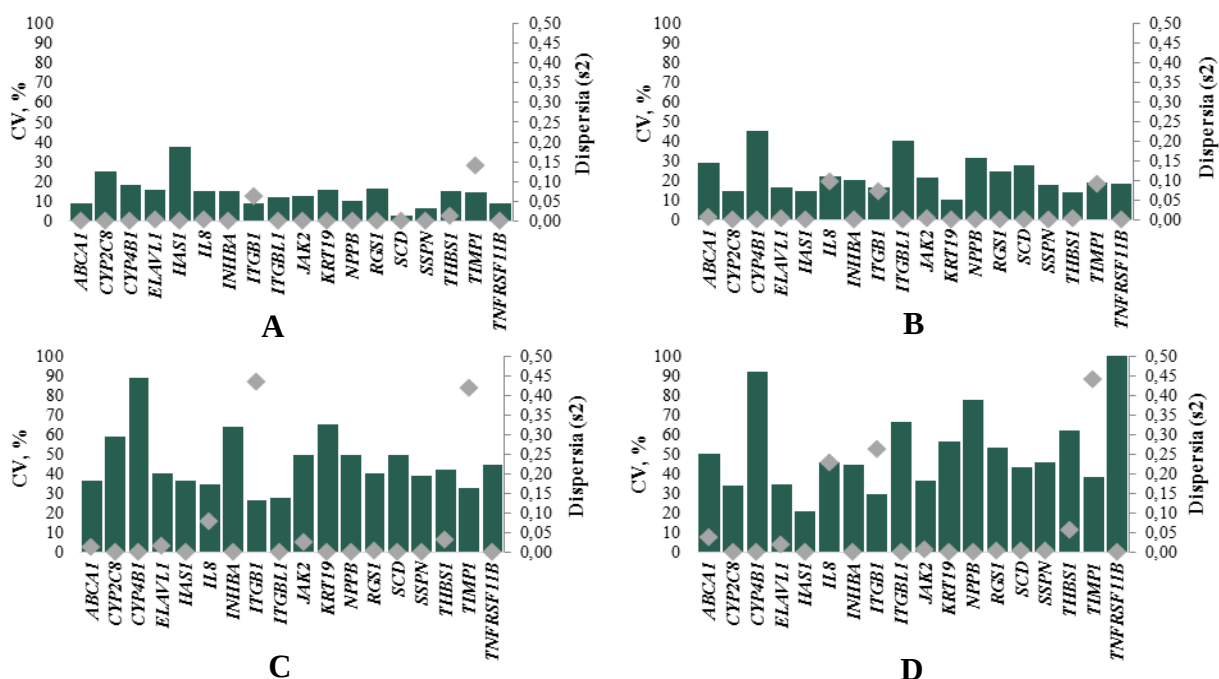


Fig. 4.2. Coeficientul de variație (CV) și dispersia (s^2) nivelului de expresie a genelor la adulți și copii, bolnavi vs sănătoși.

Notă: A – adulți sănătoși; B – copii sănătoși; C – adulți bolnavi; D – copii bolnavi.

Generalizând datele obținute, s-a constatat că atât estimarea coeficientului de variație, cât și intervalul de variație, au pus în evidență o variabilitate mai mare a expresiei genelor în rândul bolnavilor, față de subiecții sănătoși, copii și adulți. Intervalul relativ mic al variației expresiei genelor analizate la subiecții sănătoși relevă și un nivel mai înalt de omogenitate (Figura 4.2), 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. Astfel de variații sunt 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 [47], cancer [14, 47], leziuni traumatice grave [31] comparativ cu subiecții 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 [10], care determină manifestarea unui anumit caracter (normal sau patologic) la nivel de organism, fiind un indicator al stării fiziologice a celulei.

5.1. Analiza profilului de expresie al genelor asociate cu bolile cardiovasculare

Cardiopia ischemică asociată cu fibrilația atrială. Analiza profilului de expresie a genelor a pus în evidență valori care au variat între -89,096 și 2,271 ori. Cea mai pronunțată diminuare a expresiei a manifestat gena *ITGBL1* (-89,096 ori), iar activitatea transcripțională cea mai înaltă a fost atestată pentru gena *IL8* (2,271 ori). Datele obținute au pus în evidență 15 gene, care au manifestat diferențe statistic semnificative, dintre care 13 subexpresate și 2 supraexpresate (Figura 5.1. A).

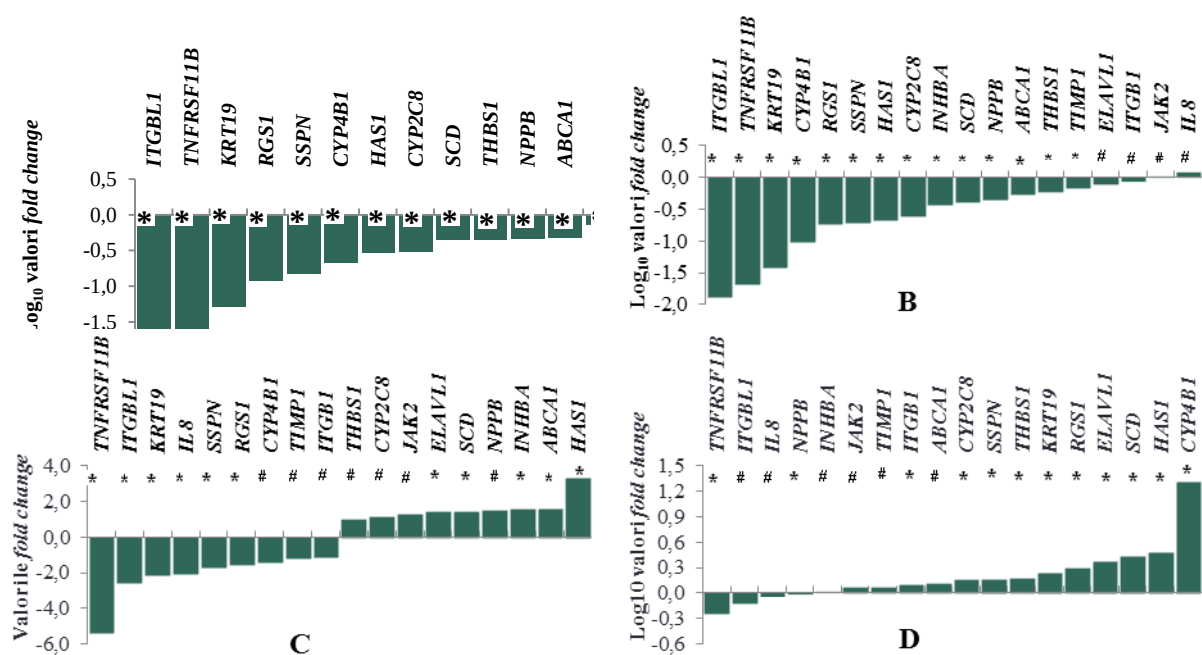


Fig. 5.1. Modificarea expresiei genelor de interes (*fold change*) în patologiile cardiovasculare față de lotul de referință.

Notă: A – cardiopia ischemică asociată cu fibrilația atrială; B – cardiopia ischemică; C – cardiomiopatii primare; D – stenoza aortică congenitală; # $p > 0,05$, * $p < 0,05$.

Cardiopia ischemică. Estimarea concentrației transcripților genelor de interes a relevat valori *fold change* care au variat între -75,608 și 1,191 ori. Gena *ITGBL1* (-75,608 ori) a manifestat cea mai pronunțată diminuare a expresiei, iar gena *IL8* (1,191 ori) s-a evidențiat prin cea mai crescută activitate transcripțională. S-a constatat că profilul de expresie al genelor în CPI prezintă subexpresie pentru 14 gene, care au manifestat diferențe statistic semnificative față de lotul de referință (Figura 5.1. B).

Cardiomiopatiile primare. Analiza profilului de expresie a genelor a atestat valori care au variat între -5,377 și 3,281 ori. Gena *TNFRSF11B* s-a evidențiat prin cea mai pronunțată diminuare a activității transcripționale (-5,377 ori), iar cele mai înalte valori *fold change* au fost înregistrate la gena *HAS1* (3,281 ori). Rezultatele analizei au arătat diferențe statistic semnificative pentru 11 gene, inclusiv, 5 supraexpresate și 6 gene subexpresate (Figura 5.1. C).

Stenoza aortică congenitală. Studiul expresiei genelor candidat a pus în evidență valori *fold change* ce variază între -1,743 și 20,283 ori (Figura 5.1. D). O expresie diminuată esențial s-a remarcat la gena *TNFRSF11B* (-1,743 ori), iar o activitate transcripțională sporită la gena *CYP4B1* (20,283 ori). În cele din urmă, profilul de expresie al genelor în SAo prezintă valori semnificative pentru 12 gene, dintre care 10 au manifestat supraexpresie, iar două gene subexpresie (Figura 5.1. D).

Astfel, rezultatele au pus în evidență gene supraexpresate, respectiv subexpresate, în dependență de fenotipul clinic. În funcție de modificarea expresiei genelor în patologie comparativ cu cea din lotul de referință s-a constatat că în cazul cardiopatiei ischemice cu și fără fibrilație atrială activitatea majorității genelor este diminuată (13, respectiv 14 gene), iar în cazul stenozei aortice congenitale – sporită (10 dintre gene), în timp ce în cardiomiopatiile primare 6 gene au manifestat expresie diminuată și 5 – sporită. S-a constatat că expresia genelor în CPI-FiA și CPI este aproape similară, diferența fiind marcată de gena *INHBA* care a prezentat subexpresie în CPI și de genele *IL8*, *JAK2* pentru care a fost stabilită o activitate transcripțională sporită în CPI-FiA.

Din totalul variantelor analizate (72=18 gene și 4 fenotipuri), în 52 dintre cazuri modificarea expresiei genelor a prezentat valori statistic 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.

Tabelul 5.1.

Clasificarea genelor implicate în producerea BCV în funcție de activitatea transcripțională, conform modelului propus de Xu și colab. [48]

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

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

Pe de altă parte, valorile activității transcripționale a genelor sunt distincte, ceea ce denotă un grad de asociere diferit cu patologiiile studiate. Aplicând la BCV modelul propus de Xu și colaboratorii [48] 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 5.1).

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

5.2. Aspecte privind expresia genelor în maladii cardiovasculare

Analiza expresiei diferențiate a celor 18 gene, comparativ cu datele identificate în profilurile *microarray* demonstrează modificarea similară în *patologie față de subiecții fără afecțiuni cardiovasculare* la 11 dintre genele incluse în studiu, cele mai multe cazuri fiind confirmate în experiment și analiza bioinformatică în cazul CPI-FiA (22%). Genele prioritare *NPPB*, *THBS1* și potențiale *IL8*, *JAK2*, *TIMP1*, care s-au regăsit în ambele rețele elaborate (Capitolul III), precum și genele *ITGB1*, *CYP2C8*, *HAS1*, *RGS1*, *KRT19*, *TNFRSF11B* au manifestat aceeași direcție de modificare a expresiei conform qPCR și *microarray* în cel puțin una dintre patologii (Tabelul 5.2).

Tabelul 5.2.
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
Gene prioritare implicate în bolile cardiovasculare								
<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	-
Gene potențial implicate în bolile cardiovasculare								
<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 nesemnificative statistic; FC – fold change; IE – indice de expresie.

Analiza comparativă între patologii a datelor Real Time-PCR și *microarray* a permis evidențierea genei prioritare SCD și a celor potențiale HAS1, RGS1, KRT19, CYP2C8 care au manifestat aceeași direcție a modificării expresiei. Genele pentru care nu au fost disponibile date *microarray* au fost investigate experimental, fiind pusă în evidență pentru prima dată expresia lor la nivel sangvin la pacienți cu CPI, CPI-FiA, CMP, SAo (Figura 5.2).

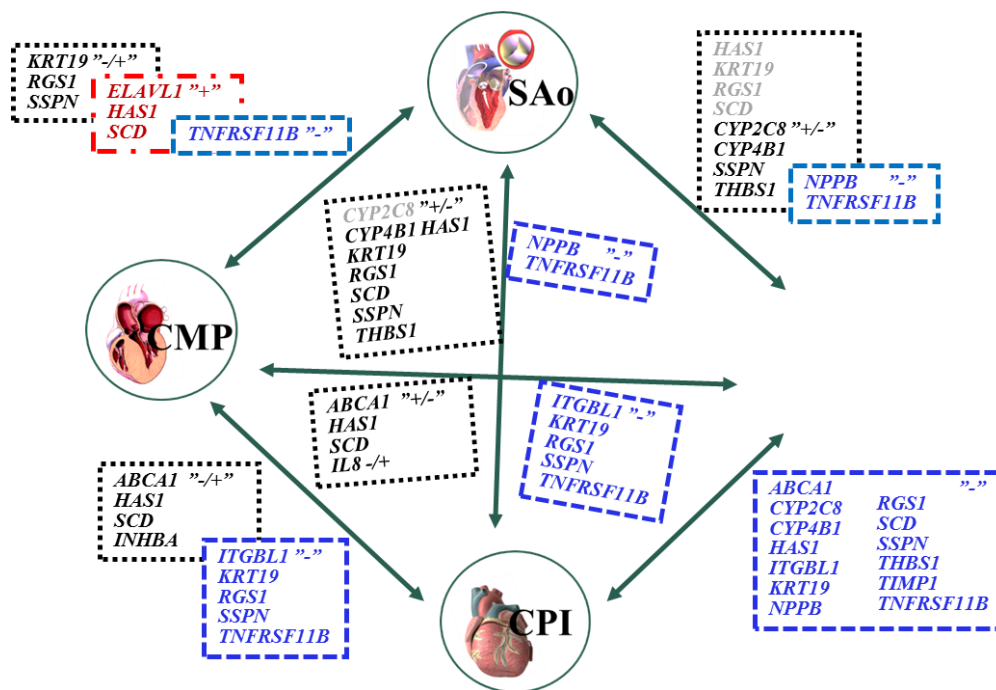


Fig. 5.2. Genele cu expresie modificată în patologii cardiovasculare, conform datelor *qPCR*.

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*.

Examinarea modificărilor transcripționale individuale ale genelor de interes în raport cu patologii studiate a permis asocierea lor cu cardiopatia ischemică cu și fără fibrilație atrială, cardiomiopatiile primare și stenoza aortică congenitală. Compararea expresiei genelor 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 (*ITGB1*, *THBS1*, *CYP2C8*, *CYP4B1*, *SSPN*, *RGS1*, *KRT19*, *ABCA1*, *INHBA*, *JAK2*, *IL8*, *INHBA*). Două clase de gene au manifestat sub/sau supraexpresie în două patologii (*ELAVL1*, *SCD*, *HAS1*, *TIMP1*, *ABCA1*, *THBS1*, *SCD*, *CYP2C8*, *HAS1*, *CYP4B1*). Alte două gene au manifestat subexpresie în 3 patologii (*SSPN*, *RGS1*, *KRT19*, *ITGBL1*, *NPPB*) și gena *TNFRSF11B* a manifestat subexpresie în toate cele patru patologii CV, ultimul rezultat demonstrând posibila implicare a acestuia în mecanisme generale de răspuns.

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 5.3). 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*).

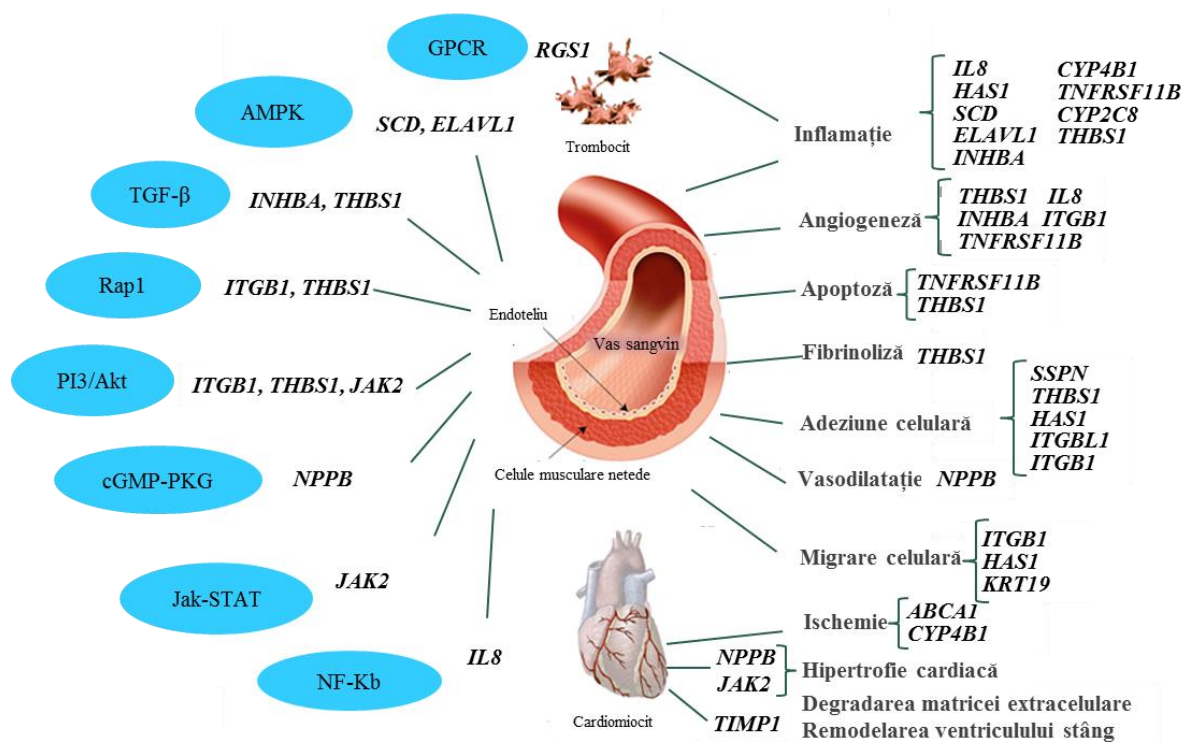


Fig. 5.3. Model ipotetic de implicare a genelor analizate în procesele biologice ce stau la baza patogenezei bolilor cardiovasculare [36].

Notă: figuri ovale – căi de semnalizare.

S-a relevat 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 [35]. *CYP2C8* și *SCD* sunt implicate în metabolismul acidului arahidonic, derivații căruia sunt mediatori ai inflamației [36]; 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 [16]. 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 [21].

CONCLUZII GENERALE

1. A fost elaborată strategia de extragere și analiză a datelor *microarray* din NCBI-GEO [24], 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, cardiomiopatii primare și stenoza aortică congenitală [1]. 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 patologii 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 copii, 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 [13].

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 de fapt expresia fenotipică evidentă și excesivă a variabilității genetice [12].

4. Investigarea profilului de expresie a genelor în patologie comparativ cu lotul de referință a demonstrat *pattern*-uri specifice pentru fiecare dintre fenotipurile clinice evaluate. S-a constatat că activitatea transcripțională pentru majoritatea genelor este diminuată în cazul cardiopatiei ischemice cu și fără fibrilație atrială (13, respectiv 14 gene), crescută 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, cardiomiopatii 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, cardiomiopatii 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. **Abdusa D.** Identification of genes involved in cardiovascular diseases. In: Collection of academic papers "Factors in Experimental Evolution of Organisms", Odessa, Ukraine, 2016, p. 243-246.
2. Alizadeh A.A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. In: Nature, 2000, vol. 403, p. 503-511.
3. Ando T., Kato R., Honda H. Differential variability and correlation of gene expression identifies key genes involved in neuronal differentiation. In: BMC Systems Biology., 2015, vol. 9:82.
4. 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).
5. Bajikar S.S. et al. Parameterizing cell-to-cell regulatory heterogeneities via stochastic transcriptional profiles. In: Proceedings of the Nat Acad of Scien of the USA, 2014, vol. 111(5), p. E626-35.
6. Braun J. and Hüttelmaier S. Pathogenic mechanisms of deregulated microRNA expression in thyroid carcinomas of follicular origin. In: Thyroid Research., 2011, vol. 4 (Suppl 1):S1.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Dermitzakis E.T. From gene expression to disease risk. In: Nat. Genet., 2008, vol. 40: 492-493.
11. 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.
12. Duca Maria, Palii Ina, **Abdușa D.** Variabilitatea expresiei unor gene asociate cu patologiiile cardiovasculare. In: Akademos, 2017, Nr. 2, p. 60-65.
13. Duca Maria, Palii Ina, **Abdușa D.** Expresia unor gene în bolile cardiovasculare la copii și adulți. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2017, Nr. 1 (331), p. 59-66.
14. Ecker S. et al. Higher gene expression variability in the more aggressive subtype of chronic lymphocytic leukemia. In: Genome Med., 2015, vol. 7:8.
15. 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.
16. 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.
17. Glass D. et al. Gene expression changes with age in skin, adipose tissue, blood and brain. In: Genome Biol., 2013, vol. 14 :R75.
18. 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.
19. 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.
20. Hulse A.M., Cai J.J. Genetic variants contribute to gene expression variability in humans. In: Genetics, 2013, vol. 193, p. 95-108.
21. 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.
22. 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.
23. Knight J.C. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. In: J Mol Med., 2005, p. 83:97-109.
24. 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.
25. 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, nr. 4, p. 402-408.

26. 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.
27. Lui J.C.K. et al. Spatial and Temporal Regulation of Gene Expression in the Mammalian Growth Plate. In: *Bone.*, 2010, vol. 46(5), p. 1380-1390.
28. 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.
29. 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.
30. Obreja G., Țurcanu G. Prevenirea și controlul bolilor netransmisibile în viziunea politicilor nutriționale și de activitate fizică. Centrul pentru Politici și Analize în Sănătate. Chișinău: Centrul PAS, 2012, 33 p.
31. 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.
32. Peters M.J. et al. The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. In: *Nat. Commun.*, 2015, vol. 6, p. 8570.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Shahabi P. et al. Human cytochrome P450 epoxigenases: variability in expression and role in inflammation-related disorders. In: *Pharmacol. Ther.*, 2014, vol. 144(2), p. 134–161.
37. Simone Ecker et al. Genome-wide analysis of differential transcriptional and epigenetic variability across human immune cell types. In: *Genome Biology*, 2017, vol. 18:18.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Townsend N. et al. Cardiovascular disease in Europe - epidemiological update 2015. In: *Eur Heart J.*, 2015, vol. 36(40), p. 2696–705.
44. Vasan R.S. Biomarkers of cardiovascular disease: Molecular basis and practical considerations. In: *Circulation* 2006, vol. 113, p. 2335-2362.
45. Wang K., Vijay V., Fuscoe J.C. Stably Expressed Genes Involved in Basic Cellular Functions. In: *PLoS ONE*, 2017, vol. 12(1): e0170813.
46. 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.
47. 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.
48. Xu L.L. et al. Quantitative expression profile of PSGR in prostate cancer. In: *Prostate Cancer Prost. Dis.*, 2006, vol. 9, p. 56–61.
49. Yang J. et al. Synchronized age-related gene expression change sacross multiple tissues in human and the link to complex diseases. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5:15145.
50. Ye J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: *BMC Bioinformatics* 2012, 13:134.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

Capitole în culegeri

1. Levițchi A., **Abdușa D.** Utilizarea UDaCoT pentru diverse domenii / Boli cardiovasculare. Cap. 4, 6. În: UDaCoT (UnASM Data Collecting Tool): Principii de căutare și utilizare a informațiilor din bazele de date bioinformatică. Chișinău: Tipografia "T-PAR" SRL, 2012, 148 p. ISBN978-9975-4280-0. **0,9 c.a.**

Articole în reviste științifice naționale

Categoria B

2. 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. **0,51 c.a.**

Categoria C

3. 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, 2012, vol. 3, p.57-62. **0,39 c.a.**

Articole în culegeri de lucrări ale conferințelor naționale

4. **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. **0,38 c.a.**

5. **Abdușa D.** Identifying genes hypothetically associated to cardiovascular disease. În: Materialele Conferinței Științifice a Doctoranzilor (cu participare internațională) „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei”. Ediția a V-a, Volumul II. 25 mai, 2016. p. 110-11. **0,26 c.a.**

6. **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. **0,53 c.a.**

Articole în reviste din străinătate recunoscute

7. **Abdușa D.** Identification of genes involved in cardiovascular diseases. In: Collection of academic papers „Factors in Experimental Evolution of Organisms”, Odessa, Ukraine, 2016, p. 243-246. **0,26 c.a.**

Teze ale comunicărilor științifice la conferințe internaționale (peste hotare)

8. **Abdușa D.**, Palii I. The study of genes potential involved in cardiovascular diseases. In: Abstracts book of the International Pushchino School Conference of Young Scientists „Biology – the science of the XXI century”, Pushchino, Russia, 2016, p. 301. **0,06 c.a.**

9. **Abdușa D.** Biomedical research in Republic of Moldova. In: Abstracts book of the XI Intern. Scientific Conf. for Students and PhD Students „Youth and Progress of Biology”. Lviv, Ukraine, 2015, p. 433-434. **0,09 c.a.**

10. **Abdușa D.** Bioinformatic analysis in identification of potentially involved in CVD genes. In: Abstract book of the VII-th Conf. of Med. Genetics with Inter. Participation. Sibiu-Paltinis, Romania, 2013, p. 13-14. **0,04 c.a.**

11. **Abdușa D.** Exploratory analysis of microarray data of genes potentially involved in cardiovascular pathologies. In: Abstract book of the Ukrainian Student Medical Journal „Hyst”. Ukraine, 2013, nr. 15, Seria KB №392, p. 185. **0,06 c.a.**

Teze ale comunicărilor științifice la conferințe internaționale în republică

12. Duca M., **Abdușa D.**, Mereuta A. A brief introduction in pharmacogenetics. In: Abstract book of the International Conference „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community”. Chisinau, 2016, p. 77. **0,07 c.a.**

13. **Abdușa D.**, Sidoroff M.E. Blood cell gene expression profiling. In: Abstract book of the Xth International Congress of Geneticists and Breeders. Chisinau 2015, p. 28. **0,13 c.a.**

14. **Abdușa D.** Perspective noi în studierea bolilor cardiovasculare. În: Tezele Conferinței Științifice Internaționale a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei”. Chișinău, 2015, p 57. **0,05 c.a.**

15. **Abdușa D.** Identificarea genelor cu expresie diferențiată în boli cardiovasculare. Tezele Conferinței Științifice Internaționale a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”. Chișinău, 2014, p. 29. **0,05 c.a.**

16. Levițchi A., **Abdușa D.** Explorative analysis of the functions of genes involved in cardiovascular diseases. In: Abstract book of the Xth Intern. Conf. of Young Researchers. Chișinău, 2012, p. 17. **0,09 c.a.**

Teze ale comunicărilor științifice la conferințe cu participare internațională

17. **Abdușa D.** Molecular diagnostic methods for cardiovascular diseases. În: Tezele Simp. Național cu part. inter. „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”. Chișinău, 2013, p. 30. **0,09 c.a.**

Teze ale comunicărilor științifice la conferințe naționale

18. **Abdușa D.** Analiza explorativă a funcțiilor unor gene implicate în bolile cardiovasculare. În: Tezele Conferinței Științ. a Studenților și masteranzilor „Viitorul începe acum”. Chișinău, 2012, p. 8. **0,07 c.a.**

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 genetice 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 subiecți cu boli cardiovasculare sunt utilizați în cadrul CGF al UnAȘM și sunt recomandați pentru cercetări genetico-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 источника, 159 страниц общего объема, 29 рисунков и 28 таблиц. Полученные результаты отражены в 18 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 заболеваний у детей и взрослых; выявление вариативности 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 у 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, coronary artery 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 coronary artery disease 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, coronary artery disease 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.

ABDUȘA DANIELA

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

162.02. – GENETICA OMULUI ȘI ANIMALELOR

**Autoreferatul
tezei de doctor în științe biologice**

Aprobat spre tipar: 7 iulie 2017

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Hârtie offset. Tipar offset.

Tiraj 100 ex.

Coli de tipar: 2,0

Comanda nr.14

„ArtPoligraf”, str. A. Pușchin 8, Chișinău, MD-2009.