

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA

FACULTATEA DE MEDICINĂ

**Departamentul IV – BIOCHIMIE ȘI
FARMACOLOGIE**

POPESCU ALEXANDRA IOANA



TEZĂ DE DOCTORAT

**NOI ORIZONTURI ÎN DIAGNOSTICUL ȘI TRATAMENTUL BOLII
ARTERIALE PERIFERICE A MEMBRELOR INFERIOARE**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DALIBORCA VLAD

Timișoara

2024

REZUMAT

CUPRINS

INTRODUCERE

PARTE GENERALĂ

1. BOALA ARTERIALĂ PERIFERICĂ

1.1 DEFINIȚIE ȘI EPIDEMIOLOGIE

1.2 CLASIFICARE

1.3 SIMPTOMATOLOGIE. INVESTIGAȚII CLINICE ȘI PARACLINICE

1.3.1 SIMPTOMATOLOGIE

1.3.2 INVESTIGAȚII CLINICE ȘI PARACLINICE

1.4 PRINCIPII DE TRATAMENT ÎN BOALA ARTERIALĂ PERIFERICĂ

1.4.1 MANAGEMENTUL FACTORILOR DE RISC

1.4.2 TRATAMENTUL ȚINTIT AL BOLII ARTERIALE PERIFERICE

2. MARKERI INFLAMATORI ÎN BOALA ARTERIALĂ PERIFERICĂ

3. miRNA ÎN BOALA ARTERIALĂ PERIFERICĂ

PARTEA SPECIALĂ

4. SCOP ȘI OBIECTIVE. ORGANIZAREA STUDIULUI

5. STUDIUL EPIDEMIOLOGIC ȘI AL FACTORILOR DE RISC ÎN ISCHEMIA CRITICĂ

5.1 CONTEXTUL ȘI SCOPUL STUDIULUI

5.2 MATERIAL ȘI METODE

5.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII. ELEMENTE DE CARACTERIZARE ANATOMO-CLINICĂ OBTINUTE PRIN STUDIU ANGIOGRAFIC

5.4 CONCLUZII

6. STUDIUL UNUI PROFIL DE BIOMARKERI ÎN BOALA ARTERIALĂ PERIFERICĂ

6.1 CONTEXTUL ȘI SCOPUL STUDIULUI

6.2 MATERIAL ȘI METODE

6.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII. CARACTERIZAREA PROFILULUI BIOMARKERILOR ÎN BOALA ARTERIALĂ PERIFERICĂ

6.4 CONCLUZII

7. STUDIUL miRNA ÎN BOALA ARTERIALĂ PERIFERICĂ

7.1 CONTEXTUL ȘI SCOPUL STUDIULUI

7.2 MATERIAL ȘI METODE

7.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII PENTRU STUDIUL miRNA ÎN DIAGNOSTICUL ȘI TRATAMENTUL BOLII ARTERIALE PERIFERICE

7.4 CONCLUZII

CONCLUZII AND CONTRIBUȚII PERSONALE

BIBLIOGRAFIE

INTRODUCERE

Boala arterială periferică (BAP) afectează peste 200 de milioane de adulți din întreaga lume, iar incidența BAP crește până la 20% la persoanele cu vârsta de peste 70 de ani. Deși BAP a fost percepută în mod tradițional ca o boală care afectează bărbații, prevalența BAP pare să fie egală în rândul bărbaților și femeilor în vârstă.

Subdiagnosticarea BAP în cadrul asistenței medicale primare poate fi o problemă semnificativă, deoarece majoritatea pacienților cu BAP nu prezintă simptomele stereotipice de claudicație descrise în manuale. Fumatul crește de patru ori riscul de apariție a BAP și are cel mai mare impact asupra severității bolii. Comparativ cu nefumătorii, fumătorii cu BAP au o durată de viață mai scurtă și evoluează mai frecvent către ischemia critică a membrelor și amputare. Factorii de risc suplimentari pentru PAD includ diabetul, hiperlipidemia, hipertensiunea arterială, rasa și etnia.

S-a observat o creștere cu 72% a prevalenței globale a BAP de la un număr estimat de 65.764.499 persoane în 1990 la 113.443.016 în 2019. Prevalența la 100.000 de persoane a crescut cu 13%, iar prevalența la 100.000 standardizată pe vârstă a scăzut cu 22%. Modele similare au fost observate pentru anii de viață pierduți, mortalitate, anii trăiți cu handicap și anii de viață ajustați în funcție de handicap. Prevalența și invaliditatea au fost mai mari în rândul femeilor, în timp ce mortalitatea și anii de viață pierduți au fost mai mari în rândul bărbaților. Povara bolii a crescut odată cu creșterea indicelui socio-demografic.

Aceste creșteri ale bolii arteriale periferice au fost în contrast cu tendințele globale privind povara globală a bolilor cardiace ischemice și a accidentelor vasculare cerebrale ischemice, care au înregistrat o scădere a prevalenței și a mortalității legate de boală în același interval de timp. În general, doar aproximativ 55% din povara bolii PAD a putut fi atribuită factorilor de risc identificați, consumul de tutun, diabetul și hipertensiunea arterială fiind cele trei contribuții majore în toate grupurile investigate.

Boala arterială periferică este o boală aterosclerotică strâns asociată cu morbiditate și mortalitate ridicate în cazul evenimentelor cardiace. Inflamația este esențială în ateroscleroză, atât la declanșare, cât și în progresie. Numeroși biomarkeri inflamatori [citokine, metaloproteinaze matriceale (MMP), selectină, molecula de adeziune intracelulară (ICAM), molecula de adeziune a celulelor vasculare (VCAM), proteina C reactivă (CRP), fibrinogen] au fost măsurați în bolile aterosclerotice, inclusiv BAP.

În ciuda progreselor recente, PAD continuă să fie o afecțiune subdiagnosticată și subtratată. Studii recente au explorat posibilitatea de a utiliza miARN-urile ca biomarkeri pentru PAD. Într-un studiu recent al pacienților cu ateroscleroză, miR-654-5p și miR-409-3p au fost identificate ca biomarkeri potențiali, iar modelele de regresie logistică bazate pe aceste 2 miARN-uri au diferențiat pacienții cu ateroscleroză de martori.

Mai mult, într-un studiu privind boala arterială periferică, miR-21, miR-130a, miR-27b, let-7f și miR-210 au fost toate semnificativ crescute, demonstrând faptul că miRNA pot fi utilizați ca markeri de prognostic și diagnostic, dar și de tratament în boala arterială periferică.

În consecință, PAD este adesea nediagnosticată și netratată, în special în stadiile incipiente ale patologiei sau la pacienții diabetici, prezentând rate de tăcere de aproximativ 50%, subliniind necesitatea unor markeri de diagnostic precoce și de prognostic, precum și a unor noi ținte terapeutice pentru PAD a membrelor inferioare.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Teza își propune să investigheze în detaliu atributele distincte ale bolii arteriale periferice:

1. Studiu epidemiologic și al factorilor de risc în ischemia critică
2. Un profil de biomarkeri pentru a prezice supraviețuirea fără amputație la pacienții cu ischemie critică
3. miRNA în diagnosticul și tratamentul ischemiei critice

Obiectivele științifice propuse au fost:

- Identificarea factorilor de risc și asocierea lor cu progresia bolii vasculare periferic în populația generală a României
- Identificarea unui panel de biomarkeri util în diagnosticul bolii arteriale periferice în general și a ischemiei critice în special
- Identificarea unor miRNA care să fie util în diagnosticul și tratamentul ischemiei critice și a bolii vasculare periferice
- Stabilirea unor noi direcții de cercetare științifică în diagnosticul și tratamentul bolii arteriale periferice

Partea generală are 3 capitole.

Primul capitol se referă la date clinice, paraclinice și epidemiologice legate de boala arterială periferică. Conține subcapitole legate de definiție și epidemiologie, clasificare, semne clinice, investigații clinice și paraclinice, managementul factorilor de risc, principii de tratament medicamentos, chirurgical și endovascular.

Al doilea capitol discută pe larg detalii legate de markerii inflamatori în boala arterială periferică. Boala arterială periferică este o boală aterosclerotică strâns asociată cu morbiditate și mortalitate ridicate în cazul evenimentelor cardiace. Inflamația este esențială în ateroscleroză, atât la declanșare, cât și în progresie. Numeroși biomarkeri inflamatori [citokine, metaloproteinaze matriceale (MMP), selectină, molecula de adeziune intracelulară (ICAM), molecula de adeziune a celulelor vasculare (VCAM), proteina C reactivă (CRP), fibrinogen] au

fost măsurați în bolile aterosclerotice, inclusiv BAP. Inflamația (I) este acum considerată fundamentală atât în declanșarea BAP, cât și în creșterea acesteia. Ea este strâns legată de leziunile endoteliale și de disfuncția endotelială. Lipsa de eliberare de oxid nitric derivat din endoteliu este simptomul cel mai probabil pentru inducerea disfuncției vasculare endoteliale vasodilatatoare endotelială și este o etapă crucială bine recunoscută în ateroscleroză. Mai mult decât atât, aceasta contribuie la dezarticularea pereților arteriali, la distensibilitatea arterială, rigiditate, vasomotație și vasomotilitate.

Noii markeri circulanți ar putea furniza informații suplimentare cu privire la riscul de apariție a PAD și ar putea adăuga informații prognostice dincolo de ceea ce este posibil prin măsurarea ABI, în special în ceea ce privește predicția evenimentelor cardiovasculare și a mortalității.

MicroARN-urile (miARN) au fost descoperite în 1993 și au avut de atunci un impact substanțial asupra studiului epigenetic de atunci. Capitolul 3 prezintă pe larg detalii legate de miRNA în boala arterială periferică și pregătește terenul pentru noile date ce vor fi descoperite în studiul din teză.

Dovezi considerabile susțin asocierea markerilor circulanți noi cu mai multe aspecte ale BAP, inclusiv: (1) riscul de a dezvolta PAD simptomatică sau asimptomatică; (2) progresia PAD; (3) afectarea funcțională; și (4) evenimentele cardiovasculare adverse și mortalitatea. Cu toate acestea, există în continuare lacune semnificative în cunoaștere. Având în vedere complexitatea bolii vasculare aterosclerotice, este puțin probabil ca un singur marker să ofere informații predictive sau prognostice semnificative, iar o abordare multimarker este mai probabil să fie utilă.

Partea specială, contribuțiile personale sunt menite să vină să răspundă la întrebările mai sus menționate:

- Un studiu epidemiologic și al factorilor de risc în ischemia critică
- Un profil de biomarkeri pentru a prezice supraviețuirea fără amputație la pacienții cu ischemie critică
- miRNA în diagnosticul și tratamentul ischemiei critice

Primul studiu este axat pe dovezile imagistice angiografice și corelarea lor cu factorii de risc specifici bolii arteriale periferice. Acest studiu a fost cuprins într-un proiect dezvoltat de Academia de Științe Medicale, care a generat primul registru de boală arterială periferică. Au fost incluse în studiu 7 spitale din România care tratează pacienți cu această patologie. În total au fost incluși un număr de 2859 pacienți, care au constituit un registru de boli vasculare periferice. În total, în registru până la acest moment au fost introduși un număr de 1745 pacienți. Analiza preliminară a datelor a reliefat o dublare a înregistrărilor aferente anumitor pacienți, astfel încât, s-a recurs la eliminarea acestora din analiză. După această etapă a rezultat un număr de 1528 de pacienți. Cei mai mulți dintre pacienți provin de la Spitalul Clinic Județean de Urgență "Pius Brinzeu" din Timișoara, urmat de Institutul de Urgență pentru Boli Cardiovasculare și Transplant din Târgu Mureș și Spitalul Județean de Urgență Sfântul Ioan cel Nou din Suceava. Spitalul Clinic Județean de Urgență din Buzău înregistrează un număr de pacienți mult mai redus, comparativ cu celelalte centre incluse în analiză. Vârsta pacienților este cuprinsă între 27 și 95 ani, cu o medie de 65.91 ani și o mediană de 66.00 ani. Rezultatele arată șansele ca o femeie să nu manifeste diabet zaharat de tip 2 echilibrat cu insulină sunt de 0.65 ori mai mici decât în cazul unui bărbat. Nu există diferențe semnificative între bărbați și femei în ceea ce privește hipertensiunea arterială elementară (p -value = 0.135), diabetul zaharat de tip 1 insulinodependent (p -value = 0.523), diabetul zaharat tip 2 echilibrat cu antidiabetice orale (p -value = 0.254), obezitate (p -value = 0.284), AVC în antecedente (p -value = 0.538), insuficiență cardiacă (p -value = 0.479), boala coronariană (p -value = 0.692) și insuficiență renală cronică (p -value = 0.789).

În ceea ce privește fumătorii, aceștia sunt mai prevalenți în rândul bărbaților. Totodată, șansele ca un bărbat să manifeste boală carotidiană sunt de 1.55 ori mai mari decât în cazul femeilor.

Pacienții cu hipertensiune arterială elementară au vârste mai mari decât cei fără, iar același rezultat se menține pentru alți trei factori de risc, AVC în antecedente, insuficiență cardiacă și insuficiență renală cronică, antecedente prezente preponderent la pacienții mai în vârstă. Fumătorii sunt însă mai tineri decât nefumătorii, cu o vârstă medie de 63.41 ani, față de vârstă medie a nefumătorilor, de 67.74 ani.

În continuare, s-a construit unui scor al factorilor de risc (antecedente) prezenți la un pacient. Acest scor de risc ia valori în intervalul 0 (niciun factor de risc/antecedent nu este prezent) și 11 (toți/toate factorii de risc/antecedentele sunt prezenți/te). Pentru a desfășura această procedură, s-au menținut doar observațiile complete aferente factorilor de risc analizați. Astfel, s-au analizat 880 de pacienți.

Analiza arborelui arterial al membrelor inferioare a reliefat următoarele aspecte:

- Ponderea persoanelor de gen masculin care prezintă ocluzie este excedentară ponderii persoanelor de gen feminin.
- Majoritatea pacienților analizați prezintă vas patent al arterelor analizate.
- Principalii factori de risc care conduc la apariția leziunilor arterelor inferioare sunt fumatul, obezitatea, antecedentele de insuficiență renală cronică și boală coronariană. Coeficientul de corelație V Cramer a indicat o asociere pozitivă între factorii de risc anterior prezentați și leziunile identificate. Cu toate acestea, asocierile individuale nu s-au dovedit a fi puternice, ceea ce denotă un element multifactorial al factorilor de risc care contribuie la leziunile arteriale ale membrelor inferioare

Dovezile au susținut factorii tradiționali de risc cardiovascular în PAD, cum ar fi diabetul, fumatul, dislipidemia și hipertensiunea arterială. Un stil de viață sedentar crește, de asemenea, riscul în dezvoltarea PAD. Studiul Edinburg a raportat că riscul de PAD este invers legat de activitatea fizică. Dintre acești factori de risc convenționali, diabetul și fumatul sunt legate în mod deosebit de dezvoltarea PAD.









Al doilea studiu se referă la crearea unui profil de biomarkeri relevanți în ischemia critică.

Criteriile de includere au fost: pacienți cu vârsta peste 18 ani, care au fost de acord să participe la studiu, confirmați cu ischemie critică în conformitate cu ghidurile ESVS actuale (durerea ischemică de repaus este de obicei descrisă ca afectând antepiciorul și de obicei agravată de poziția de decubit; pentru diagnostic, durerea

trebuie să fie prezentă de mai mult de 2 săptămâni și asociată cu unul sau mai mulți parametri anormali: indicele gleznă-braț < 0.4 , presiunea gleznei < 50 mmHg în valoare absolută, presiunea halucelui sub 30 mmHg în valoare absolută, o presiune transcutanată a oxigenului sub 30 mmHg și o curbă de undă plată sau slab pulsatorie (echivalentă ischemie gradul III în clasificarea Wifl).

Criteriile de excludere au fost pacienții sub 18 ani, pacienți care nu și-au dat consimțământul pentru participare, pacienții cu revascularizare anterioară (nu mai mult de 3 luni) pe piciorul index, pacienții cu medicație steroidică, sarcină, boală renală cronică, neoplazie activă, boală hepatică cronică Child Pugh B minim, trombofilie, alte boli autoimune, care ar putea afecta probele inflamatorii.

La acești pacienți s-au recoltat probe biologice pre și postoperator și s-au cuantificat următorii markeri:

-  Metoloproteinaza matricială 2
-  Metoloproteinaza matricială 9 -
-  Sintaza 3 endotelială a oxidului nitric Human eNOS/NOS3
-  Factorul de necroză tumorală –
-  Factorul de creștere transformator $\beta 1$ al citokinelor
-  Interleukina 12
-  Cystatin-C, Homocisteina, hsCRP, Lipoproteina A
-  IL-6

Cuantificarea markerilor de interes s-a efectuat după realizarea curbelor de calibrare (densitate optică vs. cantitate standard pentru Elisa, respectiv cycle threshold **Ct** vs. cantitate standard pentru QPCR), conform instrucțiunilor producătorului.

Rolul biomarkerilor inflamatori în procesul aterosclerotic a fost analizat extensiv, atât în studiile experimentale, cât și în cele clinice. Deși mediatorii inflamatori precum IL-6, TNF- α , proteina C reactivă (CRP) au fost identificați ca predictorii ai evenimentelor cardiovasculare majore

De asemenea, s-au constatat variații semnificativ statistice între valorile preoperatorii și postoperatorii ale acestor markeri, dar mai ales că la pacientul cu ischemie critică valorile sunt mult mai crescute față de valorile de bază ale acestora.

A treia direcție de studiu se referă la noi posibilități terapeutice care pot fi aplicate în stadiile incipiente ale procesului aterosclerotic. În numeroase studii bibliografice, miARN-urile au fost identificate ca markeri importanți ai aterosclerozei.

Studiul de față își propune să identifice expresia a 3 miARN - *miR-199a*, *miR-20a* și *miR-30c*- la pacienții cu ischemie cronică amenințătoare de membre în perioadele pre și post-revascularizare. Scopul studiului este de a identifica dacă acești 3 markeri joacă un rol în ischemia critică și dacă au potențial de utilizare viitoare în noi tratamente ale acestei patologii.

Am înrolat 21 de pacienți diagnosticați cu ischemie critică a membrelor (CLTI). Am colectat date cu 24 de ore înainte și după procedura de revascularizare, fie ea deschisă sau endovasculară. Criteriile de includere au fost: pacienți cu vârsta peste 18 ani care au fost de acord să participe la studiu, confirmați cu CLTI conform ghidurilor ESVS actuale (durerea ischemică de repaus este de obicei descrisă ca afectând antepiciorul și de obicei agravată de poziția de decubit; pentru diagnostic, durerea trebuie să fie prezentă de mai mult de 2 săptămâni și asociată cu unul sau mai mulți parametri anormali: indicele gleznă-brahial < 0.4, presiunea gleznei < 50 mmHg în valoare absolută, presiunea halucelui sub 30 mmHg în valoare absolută, o presiune transcutanată a oxigenului sub 30 mmHg și o curbă de undă plată sau slab pulsatorie (echivalentă cu gradul III de ischemie în clasificarea WIfI). Criteriile de excludere au fost pacienții sub 18 ani sau care nu și-au dat consimțământul pentru participare, pacienții cu revascularizare anterioară (nu mai mult de 3 luni) pe piciorul index, pacienții cu medicație steroidică, sarcina, boala renală cronică, neoplazia activă, boala hepatică cronică Child Pugh B minim, trombofilie, alte boli autoimune, care ar putea spori expresia microARN.

Probele de sânge au fost colectate meticulos în tuburi vacutainer standard, fiecare conținând EDTA, care acționează ca un anti-coagulant eficient pentru a preveni coagularea. Am investigat trei miARN-uri: *miR-199a*, *miR-20a*, *miR-30c*.

Studiul de față demonstrează importanța microARN-urilor în ischemia cronică care amenință membrele și potențialul lor ca biomarkeri. Dinamica expresiei lor în diferite situații pre- și post-revascularizare susține ipoteza că acestea pot avea, de asemenea, un rol important în tratamentul acestei patologii prin direcționarea reglării lor.

Studiul miARN este o preocupare nouă în ischemia cronică care amenință membrele. Prin urmare, diferiți markeri sunt încă identificați și este necesar să se demonstreze în continuare, în studii populaționale mai ample, care sunt cei mai relevanți pentru diagnostic și care pot avea un potențial în tratament.

Rezultatele din prezenta teză nu ar fi fost posibile fără o colaborare interdisciplinară între Disciplina de Farmacologie, Disciplina de Biologie Moleculară, Clinica de Chirurgie Vasculară, Clinica de Anestezie și Terapie Intensivă și Laboratorul Clinic din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență "Pius Brînzeu" Timișoara.

Considerăm că sunt necesare studii suplimentare pentru a identifica fezabilitatea ținută a utilizării markerilor inflamatori în diagnosticul, prognosticul și tratamentul ischemiei critice în practică.

Astfel, ar fi necesare studii pentru identificarea diferitelor clase de risc în funcție de valoarea markerilor, posibilitatea identificării prognosticului în funcție de evoluția acestor markeri, stadializarea clinică a bolii în faza post revascularizare, atât din punct de vedere al evenimentelor legate de membrul revascularizat, cât și din punct de vedere al evenimentelor cardiace majore legate de acești pacienți.

O atenție deosebită ar trebui acordată pacienților diabetici și celor cu boală renală cronică.

În cele din urmă, trebuie realizate protocoale medicale noi și originale care să abordeze acești markeri pentru a proteja împotriva procesului inflamator și a disfuncției endoteliale.

