



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA" BUCUREȘTI**

***ROLUL VASOPRESINEI ÎN
FIZIOPATOLOGIA SINDROMULUI
METABOLIC***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Coordonator științific

PROF. UNIV. Dr. CĂTĂLINA POIANĂ

Doctorand

Dr. AURA-MĂDĂLINA VINTILĂ

BUCUREȘTI

2016

Cuprins

Introducere	2
Obiectivele lucrării	5
Materiale și metode	6
Rezultate	10
Discuții	21
Concluzii	25
Finanțare	27
Bibliografie	27

1. INTRODUCERE

Subiectul tezei îl constituie investigarea axei neuroendocrine a vasopresinei (AVP) și receptorului de tip V1a al AVP în relație cu sindromul metabolic, prin explorarea de markeri genetici și biologici.

Motivația alegerii acestei teme de cercetare pornește de la contextul actual al sindromului metabolic. Acesta reprezintă asocierea mai multor factori de risc cardiovascular: obezitatea, dislipidemia aterogenă, hipertensiunea arterială și hiperglicemia, componente ce sunt înglobate sub o anumită formă sau alta în mai multe definiții existente. Insulino-rezistența este o caracteristică a sindromului și, deși nu intră în criteriile diagnostice după definițiile mai recente, este în centrul patogenezei bolii. Sindromul metabolic este un indice important de sănătate publică, fiind asociat cu mortalitatea cardiovasculară și generală a populațiilor. Riscul cardiovascular și de diabet zaharat sunt crescute de două, respectiv cinci ori la pacienții cu sindrom metabolic, iar bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate a pacienților cu sindrom metabolic¹. Prevalența sindromului metabolic este în creștere alarmantă la nivel mondial², la vârste din ce în ce mai tinere, ceea ce implică necesitatea de acțiune terapeutică, dar și preventivă. Aceste acțiuni nu pot fi realizate eficient fără a identifica factorii determinanți ai sindromului metabolic, încă incomplet elucidați. Este cunoscut că factorii genetici, exprimați specific în anumite grupuri etnice³, factori epigenetici și de mediu contribuie în măsură variată la apariția acestei maladii complexe cu frecvențe și fenotipuri diferite în populații diferite, și că acești factori implică multiple căi patogenice.

Susceptibilitatea genetică în sindromul metabolic

Sindromul metabolic face parte din bolile complexe poligenice. Numeroase gene contribuie la apariția bolii dar cu efect individual redus. Studiul genelor implicate în etiopatogenia sindromului metabolic reprezintă o provocare în cercetarea actuală, prin natura complexă a acestei patologii și prin natura componentelor ce o alcătuiesc. Există numeroase gene descrise separat în asocieri cu componentele individuale ale sindromului metabolic, iar aceste componente au expresie diferită în populații diferite³.

Sunt peste 1000 gene raportate în prezent în asocieri cu sindromul metabolic (baza de date *HuGE Navigator – Phenopedia*⁴), o mare parte a acestora fiind comună cu genele descrise în insulino-rezistență sau în obezitate. Interogând aceeași bază de

date separat pentru componentele sindromului metabolic, am desoperit un număr de 34 de gene comune pentru toate criteriile de sindrom metabolic (vezi **Figura 1**): PPARG, ADIPOQ, LEPR, INS, IL6, FTO, IRS1, HNF1A, LMNA, ACE, APOC3, ADRB3, PPARGC1A, SHBG, APOE, APOA1, ADRB2, MTHFR, PPARG, PNPLA3, THADA, UCP2, NOS3, RETN, APOA5, SREBF1, LEP, CYP2C9, APOC1, CRP, MC4R, SLCO1B1, BDNF, LHCGR. Cele mai multe dintre acestea apar ca gene descrise în rezistența la insulină.

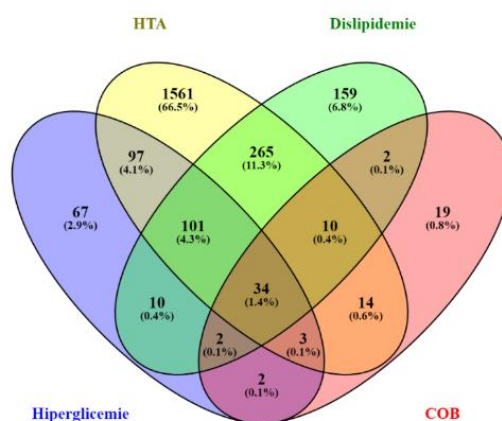


Figura 1. Suprapunerea genelor descrise în relație cu componentele sindromului metabolic în baza de date HuGE (Phenopedia). COB, obezitate centrală

Cu ajutorul studiilor de asociere genomică (GWAS – *genome-wide association study*) au fost identificate mai multe locusuri de susceptibilitate pentru componentele sindromului metabolic, dar pentru sindrom ca entitate rezultatele au avut un succes variabil, baza genetică ce determină gruparea acestor trăsături fenotipice rămânând încă neclară⁵. Polimorfismele uninucleotidice (SNP, *single nucleotide polymorphism*) descrise în asociere cu sindromul metabolic sunt puternic asociate cu cel puțin unul din componentele sale. Interogând baza de date *HuGE Navigator – GWAS Integrator*⁶ pentru genele descrise în GWAS pentru sindromul metabolic, am găsit 97 de polimorfisme pozitive situate în 59 de gene, asociate cu sindromul metabolic sau componente ale acestuia.

Există fenotipuri particulare de sindrom metabolic. De exemplu, sindromul de ovar polichistic (SOPC), de asemenea o maladie complexă, este recunoscut ca o patologie metabolică importantă pe lângă impactul pe care îl are asupra fertilității.

Sindromul metabolic este de aproximativ 2 ori mai frecvent la femeile cu SOPC față de femeile de aceeași vârstă din populația generală⁷ iar între criteriile diagnostice cele mai frecvent întâlnite sunt HDL-colesterolul scăzut (68-91.7%) și obezitatea (31-67%)⁸. În schimb, hipertensiunea arterială este mai rară (2.2-20%)^{9,10}. Hiperandrogenismul este un factor de risc pentru sindromul metabolic¹¹. Astfel, SOPC este un bun model populațional pentru identificarea determinațiilor genetice de insulino-rezistență și sindrom metabolic, cât și pentru înțelegerea diferențelor între sexe față de susceptibilitatea pentru aceste patologii.

Hipertensiunea arterială (HTA) din sindromul metabolic reprezintă un alt aspect interesant. O treime din pacienții hipertensivi dezvoltă sindrom metabolic¹² iar HTA este asociată cu rezistența la insulină și obezitatea viscerală¹³. Totuși, mecanismele patogenice de apariție a HTA în sindromul metabolic sunt încă incomplet elucidate. Factori diferiți pot fi implicați în apariția hipertensiunii din sindromul metabolic față de hipertensiunea arterială esențială izolată. Cercetările în acest sens sunt în continuă desfășurare iar aportul studiilor genetice este din ce în ce mai vizibil. Ultimele date de GWAS privind HTA din aceeași baza de date HuGE releva peste 200 de polimorfisme pozitive, interesante pentru asocierea nu doar în HTA și fenotipuri ale tensiunii arteriale (TA sistolică, TA diastolică, presiunea pulsului, rigiditatea vasculară), ci și pentru asocierea în sindromul metabolic, diabet, insulino-rezistență sau obezitate.

Vasopresina (arginin-vasopresina, AVP), un neurohormon cunoscut în principal pentru rolul său în reglarea echilibrului hidric, este mai puțin întâlnit în literatură în contextul sindromului metabolic. Totuși, în ultimii ani, rolul său a fost din ce în ce mai mult cercetat, interogându-se relația pe care acest hormon se pare că îl are cu diferite căi etiopatogenice și cu diferite componente ale sindromului metabolic. Datele din literatură susțin implicarea axei neuroendocrine în patogenia sindromului metabolic. Există studii care au relevat asocierea între copeptină (fragmentul carboxi-terminal al precursorului pre-provasopresină, considerat ca expresie biologică a vasopresinei) și sindromul metabolic sau componente ale sale, chiar independent de rezistența la insulină^{14,15}. Mai recent, corelația copeptinei cu riscul cardiovascular a fost specificată la femeile cu SOPC¹⁶. În plus, polimorfisme ale receptorului V1a al vasopresinei au fost asociate cu hiperglicemia și riscul de diabet¹⁷ și, mai sporadic, cu hipertensiunea arterială¹⁸. Studiul complexului AVP - receptor AVP în sindromul

metabolic ridică o serie de întrebări datorită prezenței mai multor tipuri de receptori tisulari ai AVP și datorită variabilității fenotipului de sindrom metabolic în populația generală.

În contextul tehnicilor actuale de investigații genetice, relația între axa neuroendocrină și metabolică reprezintă o țintă atractivă de cercetare, cu potențial de a releva noi markeri pentru sindromul metabolic.

2. OBIECTIVELE LUCRĂRII

Studiul de față a avut ca obiectiv principal investigarea contribuției complexului vasopresină - receptor 1a al vasopresinei în sindromul metabolic și componentele acestuia, prin markeri biologici și genetici. Cercetarea a făcut parte din proiectul european MEDIGENE – FP7-279171 cu titlul "Factori genetici și de mediu ai sindromului de rezistență la insulină și complicațiilor sale pe termen lung în populațiile imigrante mediteraneene" (www.medigene-fp7.eu), 2012 – 2016, iar Universitatea „Carol Davila” București a participat ca partener în proiect. Scopul proiectului a fost studiul factorilor genetici și de mediu implicați în patogenia sindromului metabolic la populații native și migrante din jurul Mării Mediterane, luând în considerare structura genetică ancestrală a populațiilor.

Obiectivele urmărite în această cercetare au fost:

- 1) Stabilirea unui grup reprezentativ pentru explorarea sindromului metabolic, alcătuit de cazuri și subiecți control, cu includerea unei populații de femei cu sindrom de ovar polichistic (SOPC), ca subgrup la risc pentru complicații metabolice.
- 2) Evaluarea relației dintre AVP și sindromul metabolic prin determinarea copeptinei serice (ca marker biologic al secreției de vasopresină) la subiecți cu sindrom metabolic versus control.
- 3) Studiul variabilității genetice a receptorului AVPR1A la subiecți cu sindrom metabolic versus control și stabilirea corelațiilor cu elementele sindromului metabolic
- 4) Evaluarea asocierii între nivelul seric al copeptinei și variantele genetice ale locusului AVPR1A.
- 5) Obiectivul final este reprezentat de îmbunătățirea markerilor genetici și biologici în sindromul metabolic.

3. MATERIALE ȘI METODE

Subiecții incluși în studiu au fost recrutați în conformitate cu Declarația de la Helsinki. Consimțământul informat a fost obținut de la toți subiecții. Toate procedurile au fost efectuate după semnarea consimțământului informat de către subiect. Toate probele recoltate în cadrul proiectului MEDIGENE și incluse în această cercetare, au fost declarate la MESR (Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche), în Franța. Toate probele biologice au fost codificate. Pentru România, studiul a fost aprobat de către Consiliul Etic al Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila” București.

S-au prelevat probe de ser pentru caracterizarea parametrilor biologici de sindrom metabolic și insulino-rezistență, precum și pentru determinarea nivelului de copeptină. Pentru investigația genetică a fost utilizat ADN (acid dezoxiribonucleic) genomic izolat din leucocite din sângele periferic.

Strategia de cercetare a propus studierea locusului AVPR1A (cromozomul 12q14.2) al receptorului V1a al vasopresinei în mai multe populații. Ca prima investigație genetică am testat asocierea polimorfismului lider rs1042615 al genei AVPR1A într-o populație de femei de origine română cu sindrom de ovar polichistic complicat cu sindrom metabolic și/sau hipertensiune arterială. Ulterior am axat cercetarea pe o serie de probe ADN obținute de la pacienți cu sindrom metabolic și subiecți control provenind din Franța, România și Turcia. În același timp, am inițiat o cercetare biologică privind nivelul copeptinei serice la subiecții de origine română cu sindrom metabolic versus control.

3.1. Dozarea copeptinei serice la subiecți de origine română cu sindrom metabolic și control.

Am realizat dozarea copeptinei serice pentru un lot de 171 subiecți, femei și bărbați, născuți în România, de origine română. Apartenența la grupul etnic român a fost stabilită anamnetic, subiectul recrutat și membrii familiei pe cel puțin două generații în urmă (părinții și bunicii) având locul nașterii în aceeași regiune geografică din România. Au fost incluși 92 subiecți control și 79 subiecți cu sindrom metabolic.

Participanții au fost incluși în studiu fie ca subiecți presupuși a avea sindrom metabolic, fie ca subiecți considerați control din populația generală. Criteriile de evaluare pentru sindromul metabolic au fost de multe ori obezitatea și hipertensiunea

arterială. Diagnosticul de sindrom metabolic a fost definit în conformitate cu criteriile *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel-III (NCEP ATP-III)* ¹⁹. Subiecții au fost diagnosticați cu sindrom metabolic dacă au îndeplinit 3 din următoarele 5 criterii: circumferința abdominală ≥ 102 cm pentru bărbați și ≥ 88 cm pentru femei; glicemie a jeun ≥ 110 mg/dL, HDL-colesterol ≤ 40 mg/dL pentru bărbați și ≤ 50 mg/dL pentru femei; trigliceride ≥ 150 mg/dL; TA sistolică ≥ 130 mmHg sau TA diastolică ≥ 85 mmHg; hiperglicemia, hipertensiunea arterială, hipertrigliceridemia și HDL-colesterol scăzut au fost stabilite ținând cont de tratament specific sau diagnostic prestabilit. Subiecții control (fără sindrom metabolic) au fost recrutați în aceeași instituție cu ocazia unui bilanț al stării de sănătate, fiind admiși ca aparent sănătoși după același protocol de investigație. Subiecții nu au avut alte boli majore endocrine sau neoplazii.

Dozarea copeptinei serice a fost realizată prin metoda imunometrică ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) competitivă din sânge recoltat a jeun (kituri Elabscience® și Phoenix Pharmaceuticals®). Dozarea copeptinei a fost realizată la Institutul Național de Endocrinologie "CI Parhon" - Laboratorul de Cercetare. O parte din aceste probe au fost incluse în lotul de investigație genetică a locusului AVPR1A.

3.2. Genotiparea polimorfismului *rs1042615* al genei AVPR1A ca prim screening al acestei gene în relația cu sindromul metabolic

Într-o primă etapă a investigației genetice am efectuat un pre-screening al genei candidat AVPR1A într-un lot de ADN provenit de la femei de origine română cu sindrom de ovar polichistic, considerat ca situație clinică de insulino-rezistență. Probele analizate au inclus cazuri de SOPC cu și fără sindrom metabolic sau hipertensiune arterială versus control. Am folosit un număr de 544 probe (401 cazuri și 143 control).

Pacientele cu SOPC au fost recrutate după criteriile Consensului de la Rotterdam, și anume prezența a minimum 2 din cele 3 criterii cardinale: oligo-amenoree cronică, hiperandrogenism biochimic sau clinic, morfologie de ovar polichistic evaluată ultrasonografic. Pacientele nu au prezentat alte manifestări de boli endocrine sau neoplazice cu hiperandrogenism. Grupul control a inclus subiecți care nu au prezentat SOPC și nici nu au întrunit criteriile pentru definirea sindromului metabolic. Au fost incluse femei cu ciclul menstrual regulat (între 27-34 zile), fără hirsutism pe scala Ferriman-Gallwey.

Am efectuat genotiparea pentru polimorfismul rs1042615 al genei AVPR1A, descris în literatură în asociere cu valori mai mari ale glicemiei și risc de diabet zaharat¹⁷. Pentru genotipare am utilizat tehnologia KASPar™ (KBioscience/LGC Genomics) și sistemul LightCycler480. KASPar (Kompetitive Allele Specific PCR) este un sistem de genotipare uniplex bazat pe fluorescență alelic-specifică, ce are la bază puterea de discriminare prin transferul de fluorescență (FRET – fluorescence resonance energy transfer) a unei reacții PCR (reacție de polimerizare în lanț) competitive, între alelele unui locus specific.

Am realizat această parte experimentală în timpul unor stagii de pregătire în Laboratorul de Endocrinologie Moleculară – Institut Universitaire de Recherche Clinique (IURC), Montpellier.

3.3. Screeningul locusului AVPR1A prin genotiparea cu cipul MEDISCOPE și analiza computațională la pacienți cu sindrom metabolic și control provenind din populațiile română, franceză și turcă

În studiul locusului AVPR1A au fost incluse, pe lângă populația română, și populația franceză și turcă. Au fost incluși pacienți cu sindrom metabolic și control din populația generală. Raționamentele de grupare a celor 3 populații în acest studiu au fost: 1) comparația criteriului etnic; 2) relevanță statistică superioară; 3) modul de recrutare a pacienților în cele 3 țări, colecțiile fiind realizate de aceeași manieră, de serii clinice.

Recrutarea subiecților a fost realizată după același protocol descris în subcapitolul 3.1. În toate cele 3 țări s-au prelevat mostre de ser pentru evaluarea glicemiei a jeun, colesterolului total, LDL-colesterolului, HDL-colesterolului, trigliceridelor și insulinemiei a jeun.

Am utilizat ADN genomic izolat din leucocite. Genotiparea probelor de ADN a fost realizată folosind un cip Affymetrix MyDesign personalizat (MEDISCOPE), utilizat în proiectul MEDIGENE, ce conține în total 758.223 polimorfisme la nivelul întregului genom. Genotiparea a fost realizată în cadrul programului MEDIGENE pe aparatul GeneTitan (în laboratorul IDIBAPS, Barcelona), iar datele brute au fost transferate către serverul IURC din Montpellier, Franța, pentru a fi analizate.

Metode computaționale

Pentru datele brute de genotipare (*raw data*) s-a realizat o analiză bioinformatică inițială, înainte ca acestea să fie analizate statistic în studiu caz-

control. Procedura *Principal Component Analysis (PCA)* a fost folosită pentru identificarea valorilor *outliers*, dar și pentru și pentru corecția stratificării populațiilor.

Regiunea genotipată conține 139 polimorfisme incluse în cipul MEDISCOPE. Pentru augmentarea „acoperirii” la locusul AVPR1A s-a realizat procedura de *imputing* cu programul Beagle v.4.1 folosindu-se ca sistem de referință datele din proiectul 1000 Genomes Project (www.1000genomes.org/data). Am obținut 2123 polimorfisme pentru regiunea selectată. În regiunea acestui locus, gena AVPR1A este poziționată pe cromozomul 12: 63536539-63546590, conținând 8184 de nucleotide și 2 exoni. Inferior de gena AVPR1A mai sunt localizate 3 pseudogene (RPL14P1, LDHAL6CP, RSL24D1P5).

Am ales locusul pentru *fine mapping* al genei AVPR1A din baza de date NCBI build GRCh37/hg19 din Februarie 2009 și l-am considerat a fi între genele PPM1H (*Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺-Dependent 1H*) și DPY19L3 (*Dpy-19 Like 3 (C. Elegans)*) (**figura 2**).

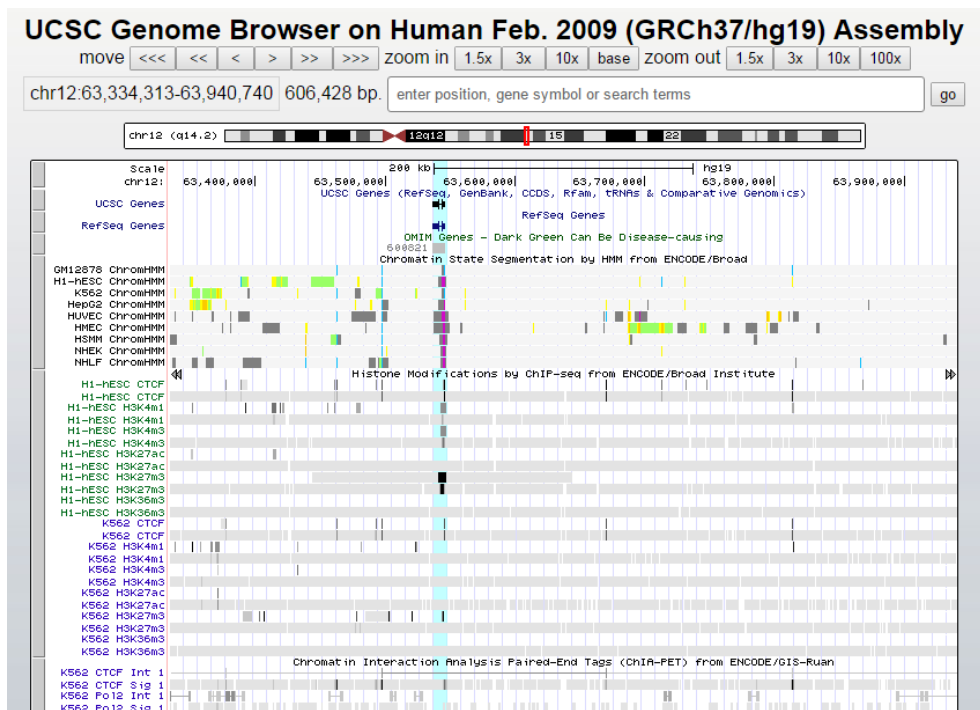


Figura 2. Fine mapping-ul genei AVPR1A (NCBI build GRCh37/hg19)

Pentru a determina potențialele diferențe etnice, polimorfismele pozitive au fost obținute separat pentru populațiile Franței, Turciei și României. Numărul de subiecți fiind relativ mic pentru a obține un studiu valid, în analiza finală am luat în considerare toate cele trei populații.

Într-o a doua etapă, pentru a înțelege mai bine asocierea semnalelor în locusul AVPR1A, acestea au fost testate în mod separat pentru componentele sindromului metabolic, incluzând obezitatea centrală (COB), HTA, nivelul de trigliceride, HDL-colesterol scăzut și hiperglicemia, ca variabile nominale.

Am construit haplotipuri folosind programul PHASE 2.1. Genotipurile semnificative au fost analizate de asemenea, cu StatView 5.0, SAS și JMP (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Pentru corelația genotip – fenotip am folosit ANOVA (nivelul 2α a fost considerat la 5%) pentru a explica parametrii metabolici.

4. REZULTATE

4.1. Copeptina în sindromul metabolic

Descrierea grupurilor de studiu.

Caracteristicile clinice și de laborator ale subiecților sunt redate în **tabelul 1**.

În grupul de subiecți recrutați pentru sindrom metabolic, utilizând definiția NCEP ATP-III, diagnosticul a fost confirmat pentru 91,8% din cazuri (n=79). Șapte subiecți presupuși a avea sindrom metabolic la evaluarea clinică inițială au avut doar 1 sau 2 criterii. Deoarece diagnosticul de sindrom metabolic nu a fost confirmat (<3 criterii), acești subiecți au fost excluși din grup. Din grupul control inițial, niciun subiect nu a fost diagnosticat cu sindrom metabolic. Totuși, 30% din subiecții din acest grup au prezentat un criteriu, iar 15% chiar două criterii de sindrom metabolic.

În acest studiu a existat o proporție mai mare a subiecților femei (78,9%). În ceea ce privește prevalența sindromului metabolic în totalitatea lotului de studiu, aceasta a fost de 46.2%, fără diferențe semnificative între bărbați și femei (52,6% și 47,4%, $P = 0,53$).

În grupul de sindrom metabolic, frecvența obezității a fost mai mare, toți subiecții având obezitate evaluată prin IMC sau circumferința abdominală. Prevalența

criteriilor de sindrom metabolic în grupul de cazuri a fost 100% pentru obezitatea abdominală, 58,2% pentru hiperglicemie, 97,5% pentru hipertensiunea arterială, 74,7% pentru hipertrigliceridemie și 74% pentru HDL-colesterol scăzut. Subiecții cu sindrom metabolic au avut un grad mai mare de insulino-rezistență (75,9%) cu HOMA_{IR} de 5,09 ± 0.4. Indicele de rezistență la insulină (HOMA_{IR}) a fost calculat prin formula: glicemia bazală (mg/dL) x insulină (μUI/mL)/405. Valoarea prag a rezistenței la insulină a fost de 2,6. Nivelurile de proteină C reactivă au fost diferite între cele două grupuri, subiecții cu sindrom metabolic având valori mai mari.

Tabel 1. Caracteristicile clinice și de laborator ale populației de MetS și controlii din România testate pentru copeptina serică

	Control	MetS (ATP-III)	Valoarea P ¹ CTR vs MetS
<i>n</i>	92	79	NA
Vârstă (ani)	43,4± 1,2	51,2± 1	< 0.0001
Sex (femei/bărbați)	71 / 21	64 / 15	NS (0.5)
IMC (kg/m ²)	23,3 ± 0,35	35,52 ± 0,66	< 0.0001
Circumferință talie (cm)	82,08 ± 1,16	111,10 ± 1,49	< 0.0001
Obezitate centrală (%)* ²	19,6	100	< 0.0001
Glicemie a jeun (mg/dL)	84,9± 0,9	117,1 ± 3,7	< 0.0001
Hiperglicemie (%)* [†]	2,2	58,2	< 0.0001
Insulinemie a jeun (μU/ml)	6.13 ± 0.48	18.02 ± 1.41	< 0.0001
HOMA _{IR} ³	1.32 ± 0.11	5.09 ± 0.41	< 0.0001
Rezistență la insulină (%) ⁵	9,8	75,9	< 0.0001
TAS (mmHg)	116.07 ± 1.48	145.27 ± 2.31	< 0.0001
TAD (mmHg)	72.64 ± 1.08	86.91 ± 1.72	< 0.0001
Hipertensiune arterială (%)* [†]	22,8	97,5	< 0.0001
Trigliceride (mg/dL)	85.67 ± 4.80	168.80 ± 9.10	< 0.001
Hipertrigliceridemia (%)* [†]	4,5	74,7	< 0.0001
Colesterol total (mg/dL)	199.30 ± 3.95	212.05 ± 4.53	NS
HDL-Colesterol (mg/dL)	62.76 ± 1.80	45.31 ± 1.37	< 0.0001
HDL-Colesterol scăzut (%)* [†]	9,2	74	< 0.0001
Hs-CRP (mg/dL)	0.38 ± 0.17	2.22 ± 0.51	< 0.001
Creatinină (mg/dL)	0.73 ± 0.01	0.76 ± 0.19	NS (0.47)
Acid uric (mg/dL)	4.25 ± 0.17	6.01 ± 0.18	< 0.001
Copeptină (ng/mL)	0.46 ± 0.03	0.6 ± 0.03	0.02

NA, nu se aplică. NS, non-semnificativ. 1, Mann-Whitney pentru variabile numerice și chi-pătrat pentru variabile nominale. * reprezintă criteriile individuale pentru definiția ATP-III a MetS (minim 3 criterii). 2, obezitatea a fost stabilită în funcție de IMC și circumferința abdominală calculată separat pentru bărbați și femei; [†]hiperglicemia, hipertensiunea arterială, hipertrigliceridemia și HDL-colesterol scăzut au fost stabilite ținând cont de tratament specific sau diagnostic pre-stabilit. 3, HOMA = *Homeostasis Model Assessment* index. 5, rezistența la insulină a fost definită la o valoare prag de 2.6 a indicelui HOMA.

Copeptina

Există o diferență semnificativă statistic dar slabă (P<0.023, Rho =0,17) între valorile de copeptină pentru bărbați și femei la nivelul întregului grup, acestea fiind mai mari la femei (0.39 ± 0.31 ng/mL, versus 0.56 ± 0.39 ng/mL) (**figura 3**).

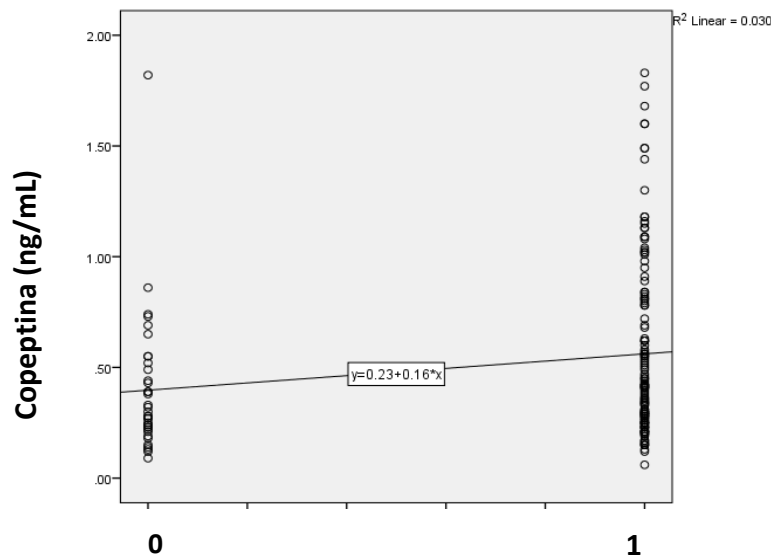


Figura 3. Distribuția copeptinei pe sexe (0= bărbați, 1 = femei)

La pacienții cu sindrom metabolic, valoarea medie a copeptinei a fost de $0,6 \pm 0,03$ ng/mL, față de $0,46 \pm 0,03$ ng/mL în grupul control, asocierea fiind semnificativă statistic ($P = 0.02$, Mann-Whitney). Această implicație a rămas semnificativă și după ajustare pentru vârstă și sex ($P = 0.025$)

Regresia logistică pentru diferiți parametri ai sindromului metabolic a confirmat asocierea cu nivelul de copeptină; astfel, asocierea a fost valabilă după ajustarea pentru hipertensiune arterială, hiperglicemie și hipertrigliceridemie ($P=0,037$) sau HDL-colesterol ($P=0,01$).

Pentru a testa potențiala corelație dintre nivelul de copeptină și diferiții parametri ai sindromului metabolic, am aplicat testul de corelație Spearman. Rezultatele sunt prezentate în **tabelul 2**. Vârsta nu a influențat valorile copeptinei ($P=0.78$, $Rho = -0.21$). Am găsit valori semnificative legate de valorile HDL-colesterol, unde corelația a fost negativă ($P= 0.005$, $Rho - 0.22$) și cu nivelul de trigliceride ($P=0.04$); ambele asocieri au fost slabe.

Tabel 2. Testul de corelație Spearman între copeptină și parametrii numerici pentru toată populația.

	P	Rho
Vârstă	NS (0.78)	-0.21
IMC	NS (0.15)	0.11
Circumferință talie	NS (0.47)	0.57
TAS	NS (0.38)	0.06
TAD	NS (0.82)	-0.10
Glicemie a jeun	NS (0.25)	0.89
Insulinemie	NS (0.82)	0.17
HOMA-IR	NS (0.60)	0.41
Trigliceride	0.04	0.159
HDL-colesterol	0.005	-0.22
CRP	NS (0.76)	0.03

În corelația punct biserială asocierea cu diagnosticul de HDL-colesterol scăzut și hipertrigliceridemie s-a menținut; în plus, am evidențiat asocierea copeptinei cu diagnosticul de obezitate centrală; în toate cazurile valorile de asociere au fost semnificative statistic dar slabe (**tabel 3**).

Tabel 3. Corelația copeptinei cu obezitatea, hipertrigliceridemia și HDL-colesterol scăzut

	P	Coeficient rpb
Obezitate abdominală	0.041	0.157
Hipertrigliceridemie	0.001	0.224
HDL-colesterol scăzut	0.024	0.176

Nu am găsit asocieri cu alte criterii de sindrom metabolic – hipertensiunea arterială (P=0.265) sau hiperglicemia (P=0.717). Totuși, pe măsura acumulării numărului de criterii de sindrom metabolic, se observă o creștere a copeptinei, care este semnificativă statistic, P= 0.022, r=0.176 (**figura 4**).

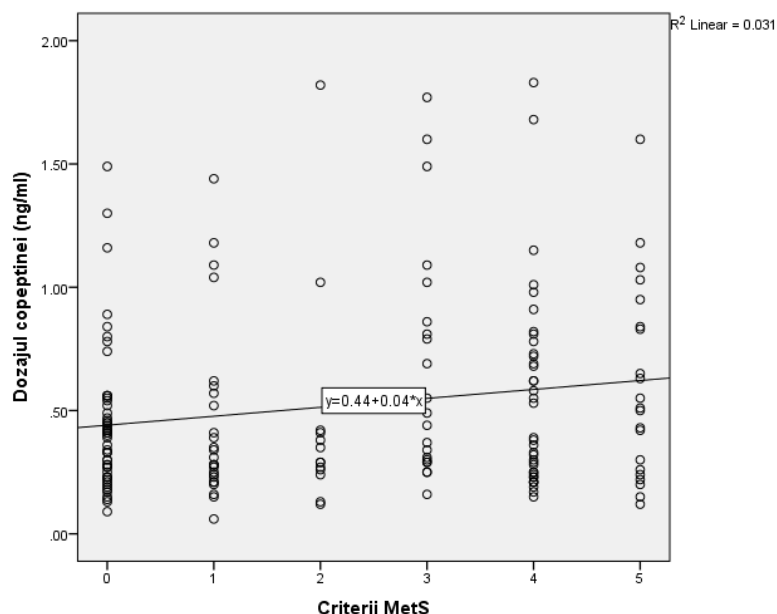


Figura 4. Distribuția copeptinei în funcție de numărul de criterii de sindrom metabolic ($P = 0.022$)

Valorile de copeptină au avut o distribuție largă, variind între 0.06 și 1.83 ng/mL. Pentru a înțelege mai bine variabilitatea acestor valori, am făcut împărțirea în centile. Cele mai mari valori ale copeptinei au fost 0.82 – 1.83 ng/mL la 14% din subiecții control și la 24% din grupul subiecților cu sindrom metabolic (**Figura 5**).

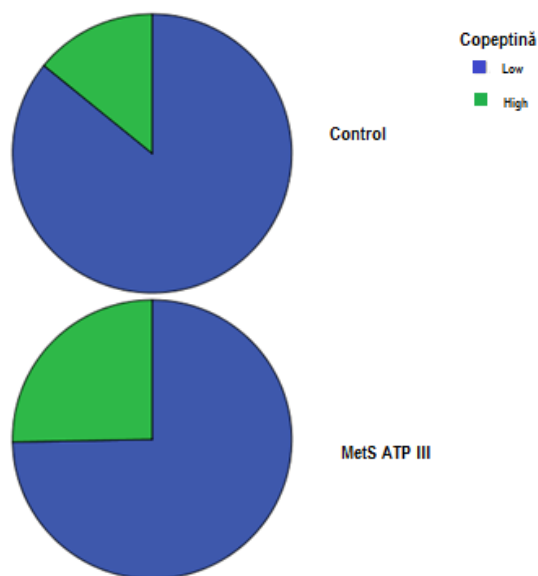


Figura 5. Distribuția nivelelor de copeptină în grupurile control și MetS. Valorile cele mai mari ale copeptinei, în verde, 0.82-1.83 ng/mL (calculate în centile) au fost prezente la 14% din subiecții control și la 24% din subiecții cu MetS.

Folosind ANOVA, nivelul de copeptină a fost explicat de prezența MetS ($P < 0.018$, $\lambda = 5.6$), cu valori de la 0.46 ± 0.03 , până la 0.60 ± 0.04 ng/mL.

Relația a fost valabilă în ANOVA și pentru obezitatea centrală, cu $P = 0.04$, $\alpha = 4.2$. În privința dislipidemieii, corelația a fost de asemenea valabilă. HDL-colesterolul scăzut s-a corelat în ANOVA cu nivelul de copeptină, cu $P = 0.024$, $\alpha = 5.18$, iar trigliceridele cu $P = 0.001$, $\alpha = 10.45$.

Relația cu insulino-rezistența a fost la limita semnificației statistice, $P = 0.05$, $\alpha = 3.04$, în clasificarea subiecților ca insulino-rezistenți ($HOMA_{IR} > 2.6$) sau non-insulino-rezistenți. Relația cu HTA nu a fost semnificativă, nici la nivelul întregii populații, nici în subgrupul de sindrom metabolic. Nu am evidențiat o legătură cu HTA ca diagnostic, și nici separat cu valorile tensiunii arteriale sistolice sau diastolice.

Toate aceste date indică o corelație dintre nivelul crescut de copeptină și sindromul metabolic, precum și cu unele dintre componentele sindromului metabolic. Astfel, pacienții cu nivel crescut de copeptină prezintă mai des obezitate, au nivele mai mari de trigliceride și mai mici de HDL-colesterol.

4.2. Genotiparea polimorfismului rs1042615 prin metoda KASPar

Caracteristicile loturilor studiate sunt centralizate în **tabelul 4**.

Femeile cu SOPC au avut 38% obezitate, aproximativ 15% au avut sindrom metabolic după criteriile ATP-III și au prezentat insulino-rezistență în proporție semnificativ mai mare (61%, cu $HOMA_{IR}$ de 4.7 ± 0.2) comparativ cu lotul control.

Rezultatul genotipării a indicat o asociere pozitivă și semnificativă statistic între rs1042615 și obezitatea exprimată prin IMC (indicele de masă corporală) și insulinemia în grupul de paciente cu SOPC (**figurile 6 și 7**). Astfel genotipul CC s-a asociat cu obezitatea la femeile cu SOPC, cu o valoare $P = 0.0237$, OR 1.737, 95% CI (1.076 – 2.803). Purtătoarele genotipului CC din grupul SOPC au avut de asemenea valori mai mari ale insulinemiei, în ANOVA acest genotip explicând variații ale insulinemiei de la $17.45 \mu\text{U/mL}$ la $22.78 \mu\text{U/mL}$ ($P = 0.0248$). Nu am găsit o asociere cu diagnosticul de sindrom metabolic sau alte componente individuale ale sindromului metabolic

Tabel 4. Caracteristicile clinice și de laborator ale populației de femei cu SOPC și control din România la care a fost genotipat SNP lider rs1042615

	Control	SOPC	P ¹ SOPC/CTR
Număr	143	401	-
Vârsta (ani)	31.5 ± 0.8	24.6 ± 0.3	<0.0001
IMC (kg/m ²)	21.8 ± 0.31	27.99 ± 0.36	<0.0001
Circumferință talie (cm)	71.5 ± 0.8	89.5 ± 0.99	<0.0001
Obezitate centrală (%) ² . *	4.95	33.9	<0.0001
Glicemie a jeun (mg/dL)	85,32 ± 10,44	87,12 ± 21,96	NS
Hiperglicemie (%) ³ . *‡	4.95	7.2	<0.005
Insulinemie a jeun (μU/ml)	7.18 ± 4.12	20.34 ± 23	<0.0001
HOMA-IR ⁴	1.59 ± 0.13	4.72 ± 0.28	0.0018
TAS (mmHg)	106 ± 1.7	116 ± 0.9	<0.0001
TAD (mmHg)	66 ± 1.7	71 ± 0.6	<0.0001
Hipertensiune arterială (%) ⁵ *.‡	4.8	15.9	<0.0001
Trigliceride (mg/dL)	85,91 ± 3,54	108,94 ± 2,65	<0.0001
Hipertrigliceridemia (%) ⁵ *.‡	7.69	16.9	<0.0001
HDL-Colesterol (mg/dL)	60 ± 1.7	52.8 ± 0.96	<0.0001
HDL-Colesterol scăzut (%) ⁵ *.‡	11.88	36.65	<0.001
MetS (%)	-	14.89	

1, Mann-Whitney pentru variabile numerice și chi-pătrat pentru variabile nominale. * reprezintă criteriile individuale pentru definiția ATP-III a MetS (minim 3 criterii). 2, obezitatea a fost stabilită în funcție de IMC și circumferința abdominală calculată separat pentru bărbați și femei. 3, IGT (toleranța alterată la glucoză) și IFG (glicemie bazală modificată) au fost diagnosticate după criteriile *American Diabetes Association* (ADA); ‡, hiperglicemia, hipertensiunea arterială, hipertrigliceridemia și HDL-colesterol scăzut au fost stabilite ținând cont de tratament specific sau diagnostic pre-stabilit. 4, HOMA = *Homeostasis Model Assessment* index. 5, rezistența la insulină a fost definită la o valoare prag de 2.6 a indicelui HOMA.

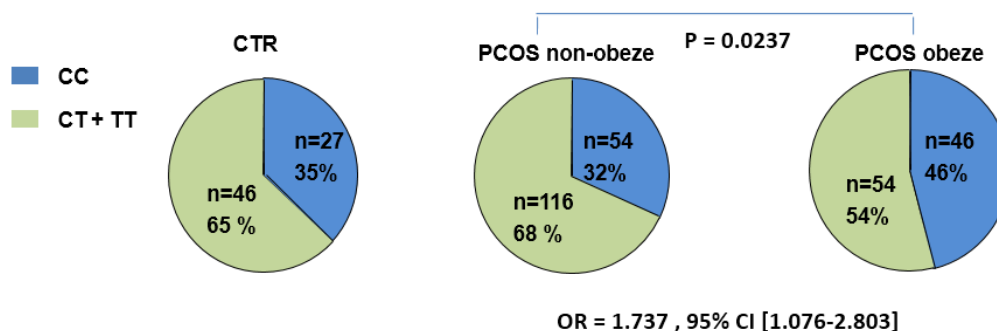


Figura 6. Asocierea genotipului CC al rs1042615 cu obezitatea în SOPC

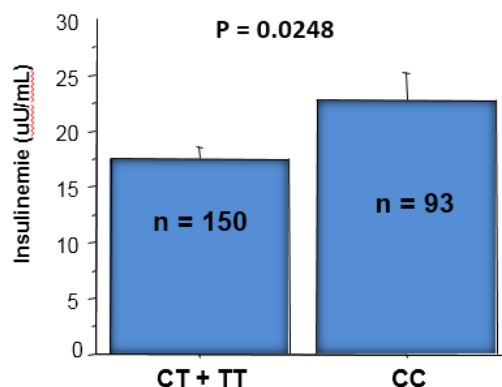


Figura 7. Asocierea genotipului CC al rs1042615 cu obezitatea în SOPC

4.3. Locusul AVPR1A și corelații în sindromul metabolic și hipertensiunea arterială

4.3.1. Grupurile incluse în studiul locusului AVPR1A

Din fiecare colecție de probe ADN (română, franceză, turcă), doar o parte din eșantioane au fost prelucrate genetic. Datele clinice și de laborator au arătat că, pentru fiecare din cele 3 țări, grupul subiecților incluși în studiul genetic nu este diferit de totalul din care provine, caracteristicile fiind în aceeași medie, fiind deci reprezentative pentru colecția țării de proveniență. În **tabelul 5** sunt indicate populațiile incluse în studiul locusului AVPR1A.

Tabel 5. Populațiile genotipate și analizate pentru locusul AVPR1A

Țara	Cazuri	Control	Total
România	112	45	157
Franța	120	206	326
Turcia	36	31	67
Total	268	282	550

Populația formată din cele 3 grupuri, România (RO), Franța (FR), și Turcia (TR), a fost inițial analizată statistic prin Principal Component Analysis (PCA) pentru identificarea valorilor *outliers*, dar și pentru corecția stratificării populațiilor (control genomic) și obținerea unei populații omogene. Cele 3 populații, română, franceză și turcă s-au grupat în același cluster, împreună cu populația CEU (*Utah Residents (CEPH) with Northern and Western Ancestry*). Un număr de 19 eșantioane au fost

outliers și excluse din analiză. Lotul final analizat pentru locusul AVPR1A cuprinde 531 subiecți de origine română, franceză și turcă. Din total, 222 subiecți au îndeplinit criteriile de sindrom metabolic după definiția ATP-III, iar 309 au format lotul control.

Distribuția pe sexe a fost echilibrată între subiecții cu sindrom metabolic și control (femei - 40,1% vs 59,9%, P=NS).

În grupul de sindrom metabolic prevalența obezității centrale a fost mai mare (72.1 %). Circumferința taliei a avut praguri specifice în funcție de sex, conform criteriilor ATP-III, 88 de cm pentru femei, respectiv 102 cm pentru bărbați.

Nu au existat diferențe semnificative între populațiile incluse în studiu din România, Franța sau Turcia, deși s-a constatat faptul că populația turcă a prezentat o rezistență la insulină mai mare. Pacienții cu sindrom metabolic au prezentat mai frecvent rezistență la insulină, având un indice HOMA_{IR} de $4,9 \pm 0,3$. Valorile HOMA_{IR} au fost $3,8 \pm 0,5$ în Franța, $4,3 \pm 0,3$ în România și $7,2 \pm 0,6$ în Turcia. Creșterea progresivă a rezistenței la insulină măsurată prin HOMA-IR s-a corelat cu numărul progresiv crescător de criterii ale sindromului metabolic.

Hipertensiunea arterială (HTA) a fost prezentă la 242 din subiecții cu sindrom metabolic (89,6%), cu o medie a TAS de $137,5 \pm 0,6$ mmHg și a TAD de $83,7 \pm 0,9$ mmHg. În funcție de numărul de criterii de sindrom metabolic întrunite la subiecți, HTA a fost prezentă la majoritatea acestora, aproximativ 75% pentru cei ce prezentau numărul minim de criterii de includere (3) și 90% la cei cu 4 criterii. Mai mult, hipertensiunea arterială a fost frecventă și în cadrul subiecților care nu au îndeplinit minimul de 3 criterii diagnostice ale sindromului metabolic.

În mod clar, există diferențe semnificative statistice între cele două grupuri, control versus sindrom metabolic, pentru fiecare din cele 5 criterii ale sindromului metabolic. În populația cu sindrom metabolic cea mai frecventă componentă a fost hipertensiunea arterială (89,6%), urmată de obezitatea centrală (72,1%), hipertrigliceridemie (63,9%), hiperglicemie, (55,8%), ce mai puțin frecventă componentă fiind HDL-colesterol scăzut (51,3%). Deci cohorta studiată este predominant hipertensivă.

4.3.2. Genotiparea locusului AVPR1A (12q14.2)

Asocierea locusului 12q14.2 (AVPR1A) cu sindromul metabolic

Asocierea genetică între grupul control și cel al pacienților cu sindrom metabolic a relevat 140 de asocieri pozitive. Totuși, niciuna dintre acestea nu a fost confirmată după corecția Bonferroni. Asocierea a fost testată ulterior folosind corecția stratificată a populației. Deși unele dintre valorile P au fost modificate, niciun SNP nu a fost confirmat de corecția Bonferroni.

Pentru a testa suplimentar asocierea în sindromul metabolic am adăugat în modelul de studiu 2012 SNP, introduse din catalogul 1000 Genome Project prin procedura de *imputing* folosind programul BEAGLE. Au reieșit 51 de SNP asociate pozitiv cu sindromul metabolic, însă niciunul dintre acestea, genotipat sau obținut după imputing nu a suportat corecția Bonferroni (*manuscris in preparare*).

Mai mult decât atât, polimorfismul lider **rs1042615** (A/G) nu a fost identificat ca fiind semnificativ pentru MetS. Acest SNP nu a fost genotipat, ci a fost obținut prin imputing. Am analizat acest polimorfism dat fiind studiul inițial asupra sa la femeile cu SOPC, într-o etapă preliminară a cercetării (subcapitolul 4.2).

Asocierea locusului AVPR1A (12q14.2) cu hipertensiunea arterială

În continuare am testat asocierea pentru componentele sindromului metabolic. În mod surprinzător, nu am remarcat nicio asociere cu obezitatea, trigliceridele, HDL-colesterolul, glicemia sau rezistența la insulină.

În schimb am identificat o asociere semnificativă cu hipertensiunea arterială pentru locusul genotipat. Astfel, am obținut un semnal pentru un polimorfism care a fost asociat cu HTA semnificativ statistic. Asocierea s-a dovedit a fi puternică, păstrându-se și după utilizarea corecției Bonferroni sau a corecției pentru FDR (*False Discovery Rate*). Acest SNP a fost identificat ca polimorfism comun (MAF, *minor allele frequency* > 0.5). Am verificat asocierea după corecția aplicată stratificării populațiilor. Acest SNP a rămas asociat și după corecție, și a avut valori similare în toate cele 3 populații. Nu au fost diferențe semnificative statistic între bărbați și femei.

Pentru a confirma că acest SNP este purtătorul unui semnal interesant pentru hipertensiunea arterială, am analizat polimorfismele introduse în același locus prin *imputing*. Implicarea unei regiuni *din amonte* de gena receptorului AVPR1A a fost

confirmată prin prezența mai multor polimorfisme obținute după imputing cu valori de asociere mai bune ale P, toate cu MAF <0.5, >0.1.

Haplotipurile

În următoarea etapă a analizei, pentru a înțelege mai bine rolul acestei regiuni în HTA, am efectuat analiza haplotipurilor. Am analizat datele întâi în HAPLOVIEW și am determinat blocurile de LD (*linkage disequilibrium*) în regiunea locusului AVPR1A. Haplotipurile au fost reconstruite în populațiile respective utilizând PHASE 2.1. Am evidențiat 3 blocuri LD care conțin 10, 9 și respectiv 6 haplotipuri. Am testat haplotipurile în regresia logistică pentru asocierea fie cu MetS, fie cu HTA. Haplotiparea a confirmat în întregime asocierea cu HTA. Totodată, semnalul nu s-a menținut pentru haplotipurile în care a fost cuprins rs1042615.

4.3.3. Alte corelații clinice

Pentru a evalua suplimentar relația *vasopresină - AVPR1A - hipertensiune arterială*, în subgrupul format de populația română, am verificat polimorfismul nou identificat în legătură cu nivelul coceptinei serice în subgrupul format de populația română. Dozarea de coceptină a fost disponibilă pentru un număr limitat de subiecți, n=105. În mod interesant, alela patogenă a fost asociată statistic semnificativ cu nivele ridicate de coceptină, deși la nivele mai mici de semnificație. Efectul a fost echivalat și de haplotipul patogen în care este inclus polimorfismul.

Nici unul dintre ceilalți parametrii clinici sau de laborator nu au fost semnificativ asociați în ANOVA- astfel, nu a existat nici o corelație a acestui polimorfism cu obezitatea, hiperglicemia, hipertrigliceridemia sau HDL-colesterol scăzut (*manuscris in preparare*).

5. DISCUȚII

5.1. Copeptina serică în sindromul metabolic

În această etapă a cercetării am arătat asocierea între nivelul crescut de copeptină și sindromul metabolic la populația română. Nivelul copeptinei s-a corelat cu prezența obezității abdominale și cu dislipidemia. Aceste date sunt în concordanță cu observații anterioare de la nivelul altor populații europene și susțin ipoteza că secreția crescută de AVP are legătură cu riscul crescut de sindrom metabolic la nivelul populației generale²⁰ și poate fi astfel utilizată ca marker al bolii.

Datele din literatură exprimă valori ușor mai mari ale copeptinei la bărbați²⁰. Cu toate acestea, în grupul pe care l-am studiat diferența a fost în sens opus, femeile au avut valori mai mari ale copeptinei, corelația fiind totuși slabă. Această corelație poate fi explicată prin procentul mai mare de femei incluse în lotul de studiu și probabil că datele prezente reflectă mai bine populația feminină. Nu a fost găsită nicio corelație cu vârsta, în concordanță cu datele din literatura de specialitate²⁰.

Am remarcat o variabilitate largă a nivelurilor de copeptină. Acest fapt poate fi explicat într-o oarecare măsură de variabilitatea măsurătorilor biochimice ale copeptinei. Copeptina este considerată un peptid stabil iar măsurarea acesteia în plasmă are acuratețe crescută, după datele din literatură. Totuși, în practica medicală curentă nu este încă larg utilizată, cel puțin în țara noastră, iar o variabilitate a testelor diagnostice nu poate fi exclusă. Pe de altă parte, copeptina este influențată de osmolalitatea plasmei. În lotul studiat osmolalitatea plasmei a fost disponibilă pentru un număr mic de subiecți (n=23), cu o valoare medie 291 mOsm/L, fără diferențe semnificative între cazuri și controlii, și fără o corelație cu nivelul copeptinei pentru acest număr redus de subiecți la care a fost disponibilă dozarea. Se poate presupune totuși că osmolalitatea este în limite normale pentru întreg grupul studiat, având în vedere că toți subiecții au fost din afara spitalului, având nivele normale ale natremiei și neavând semne clinice de deshidratare sau hiperhidratare.

Copeptina oglindește eliberarea de vasopresină²¹ și este din ce în ce mai des folosită ca marker alternativ pentru AVP, în diverse boli. De altfel, ideea acestei cercetări a fost de a caracteriza copeptina la populația română, în scopul definirii ei ca marker de sindrom metabolic. Datele trebuie analizate în perspectiva definirii mai

multor markeri biologici pentru sindromul metabolic. Copeptina, ca expresie a vasopresinei, poate fi un astfel de biomarker.

Vasopresina și activarea axei hipotalamo-hipofizo-adrenale au fost evaluate în rezistența la insulină și alte tulburări metabolice. Copeptina a fost descrisă în asociere cu obezitatea^{14,22} și cu riscul de diabet zaharat, independent de alți markeri²². Relația cu obezitatea și insulino-rezistența este dovedită și în modelul clinic de sindrom de ovar polichistic, patologie cu risc de 2-4 ori mai crescut pentru sindromul metabolic²³. Mecanismul prin care nivelul crescut de copeptină este corelat cu obezitatea nu este pe deplin cunoscut. Se știe că vasopresina are efect asupra eliberării de ACTH, prin intermediul receptorilor V1b, cu creșterea ulterioară a nivelului de glucocorticoizi¹⁵ și, mai mult decât atât, se pare că eliberarea de ACTH stimulată de AVP este rezistentă la feedback-ul cortizolului, spre deosebire de ce mediată prin CRH²⁴. Aceasta ar putea fi o explicație pentru asocierea obezității cu nivelul crescut de vasopresină și implicit copeptină.

Pe lângă secreția de vasopresină, implicarea acestei axei neuroendocrine în sindromul metabolic ar trebui urmărită și pe calea receptorilor vasopresinei. Rolul vasopresinei în sindromul metabolic este complex, și include și efecte asupra receptorilor V1a și V1b de la nivelul ficatului și pancreasului. Vasopresina determină stimularea producției de trigliceride la nivelul hepatocitelor²⁵ iar șoarecii invalidați pentru receptorii V1a au un metabolism lipidic îmbunătățit, cu nivel scăzut de trigliceride²⁶, ceea ce susține vederea de ansamblu ce trebuie avută asupra relației vasopresină – receptor V1a - sindrom metabolic, inclusiv în relația cu hipertensiunea arterială.

5.2. Genotiparea rs1042615 in SOPC

Prevalența sindromului metabolic la femeile cu SOPC a fost de 14.89%. În literatură datele descrise sunt variabile. Prevalența sindromului metabolic la femeile cu SOPC variază în diverse populații, fiind raportată de la valori foarte reduse de 1,6% în populația cehă, până la 43% în Statele Unite ale Americii. Această variabilitate reflectă probabil și o variabilitate în criteriile utilizate pentru definirea atât a sindromului metabolic cât și a SOPC²⁷.

Dintre componentele de sindrom metabolic, HDL-colesterolul scăzut și obezitatea au fost cele mai frecvente, concordante cu datele din literatură⁸, urmate de

hipertrigliceridemie și hipertensiunea arterială iar hiperglicemia a fost cea mai puțin întâlnită componentă.

În privința asocierii găsite între alela C a rs1042615 și tulburările metabolice la femeile cu SOPC, obezitatea și hiperinsulinismul, rezultatul obținut diferă de datele existente în literatură. Alela T a rs1042615 a fost descrisă la bărbați într-o cohortă de peste 6000 subiecți în asocierie cu metabolismul glucidic și lipidic, purtătorii acestei alele având valori mai mici ale trigliceridelor, nivele mari ale glicemiei și predispoziție spre diabet în contextul unei diete bogate în lipide¹⁷. Acest rezultat susține necesitatea de explorări suplimentare pentru clarificarea acestor diferențe între bărbați și femei.

5.3. Locusul AVPR1A în sindromul metabolic și hipertensiunea arterială

În această cercetare am arătat prezența unui nou semnal de asociere în amonte de gena AVPR1A care ar putea explica apariția hipertensiunii arteriale la pacienții cu sindrom metabolic. Această observație este întărită de asocierea pozitivă a unui polimorfism nou identificat și de rezultatele convergente obținute în urma imputing-ului în aceeași regiune genomică, prin corelarea cu valori ridicate ale TA și chiar cu valori ridicate ale copeptinei în plasmă. În plus, haplotipurile au confirmat asocierea cu valorile mai mari ale tensiunii arteriale și inclusiv cu copeptina plasmatică, marker pentru AVP.

În contrapartidă, niciuna dintre aceste asocieri nu au fost identificată în cazul polimorfismului anterior cercetat, rs1042615.

Am considerat că polimorfismul nou identificat ar putea fi un marker bun, din moment ce MAF este ridicată și nu există nicio diferență între cele 3 populații din Balcani sau sudul Franței. Identificarea asocierii în cele 3 grupuri etnice reprezintă un indicator bun pentru semnificația rezultatelor obținute. Observația inițială a fost în grupul de subiecți români, iar apoi reconfirmată în celelalte două populații. Valorile de asociere s-au menținut semnificative statistic și după realizarea controlului genomic pentru stratificare și pentru corelarea rezultatelor cu o populație standard.

Examinarea regiunii în bazele de date sugerează prezența unei arii reglatorii mai sus de gena receptorului AVPR1A, ce ar putea avea consecințe importante în înțelegerea rolului acestui receptor în special în patogenia hipertensiunii arteriale, dar poate și a altor componente ale sindromului metabolic.

Un alt aspect de discutat este despre rezultatele precedente ale rs1042615, considerat polimorfism lider al acestui locus. La oameni, rs1042615 al genei AVPR1A a fost asociat la bărbați cu dereglări metabolice precum hiperglicemie sau trigliceride scăzute pentru subiecții cu alela T, cum a fost detaliat mai sus. Mai mult, prezența alelei T a fost asociată cu aceleași modificări metabolice ca la șoarecii knock-out pentru receptorul V1a (V1aR^(-/-))¹⁷. Din punct de vedere metabolic, șoarecii AVPR1A^(-/-) confirmă modelul de la oameni. Nu a existat nicio corelație a acestui polimorfism cu sindromul metabolic sau hipertensiunea arterială în loturile analizate. Pentru că nu am găsit nicio asociere cu nivelul de trigliceride, se poate concluziona că cele două semnale sunt diferite. Studiul preliminar efectuat pe lotul de femei cu SOPC susține această idee.

Din datele adunate reiese că la nivelul receptorului AVPR1A sunt două semnale, unul corelat cu tulburările metabolice, iar celălalt, mai nou descoperit, este asociat cu hipertensiunea arterială iar această din urmă asociere este mult mai puternică. Descoperirea din această cercetare ridică noi comentarii asupra înțelegerii actuale a reglării tensiunii arteriale.

Având în vedere implicarea receptorului V1A în reglarea tensiunii arteriale²⁸, gena AVPR1A pare să fie un bun candidat pentru hipertensiune. Cercetarea prezentată reprezintă prima dovadă de implicare a unui marker genomic de tipul AVPR1A în hipertensiunea arterială.

Cercetarea în domeniul sindromului metabolic este asiduă, miza fiind complicațiile cardiovasculare ale sindromului, cu consecințele lor la nivelul sănătății populațiilor. Abordările sunt variate, ținând cont de multitudinea căilor biologice posibil implicate în mecanismele fiziopatologice. Noi descoperiri sunt de importanță particulară, din aceleași considerente.

Potențiala relație dintre sindromul metabolic și componentele sale pe de-o parte, și axa vasopresină-receptor V1a apar ca o noutate, nefiind anticipate în multe studii până acum.

6. CONCLUZII

1. Am demonstrat prezența nivelurilor crescute ale copeptinei într-o populație română cu sindrom metabolic.
2. Copeptina s-a corelat cu componente ale sindromului metabolic, inclusiv obezitatea și dislipidemia (atât HDL-colesterol scăzut cât și hipertrigliceridemia). Corelația a fost la limita semnificativă statistic pentru insulino-rezistență și nu au fost asocieri cu hipertensiunea arterială.
3. În lotul studiat a fost o diferență semnificativă statistic între valorile copeptinei serice la bărbați și femei, acestea fiind mai mari la femei. Această corelație poate fi explicabilă din perspectiva unei cohorte mai mari de femei.
4. Prevalența sindromului metabolic în lotul de femei cu sindrom de ovar polichistic a fost de 14.89%. Cele mai frecvent întâlnite componente ale sindromului metabolic au fost HDL-colesterol scăzut și obezitatea, similar cu datele din literatură
5. Genotiparea prin metoda KSAPar a arătat asocierea polimorfismului rs1042615, alela C, cu obezitatea și hiperinsulinismul în sindromul de ovar polichistic.
6. Lucrarea actuală abordează detaliat locusul AVPR1A folosind o metodă inovativă, genotiparea cu cipul personalizat MEDISCOPE alături de metodele bioinformaticice de imputing, care au permis caracterizarea amănunțită a acestui locus și identificarea de semnale noi de asociere, în contextul unei genotipări mai puțin dense.
7. Am identificat un semnal de asociere în locusul AVPR1A pentru hipertensiunea arterială care poate explica prezența fenotipului hipertensiv în sindromul metabolic.
8. Polimorfismul nou identificat în locusul AVPR1A a fost asociat cu hipertensiunea arterială în sindromul metabolic în 3 populații diferite etnic (română, franceză și turcă), cu valoare de asociere P semnificativă și după corecția Bonferroni

9. Polimorfismul nou identificat a fost egal distribuit în cele trei populații studiate, confirmând o selecție corectă a subiecților incluși și este un polimorfism frecvent; astfel, poate fi un marker genetic bun pentru evaluarea asocierii genetice în locusul AVPR1A.
10. Deși genele privind hipertensiunea arterială au fost extensiv studiate, locusul AVPR1A nu a fost evidențiat până în prezent în studiile *genome-wide*. O posibilă explicație este că hipertensiunea arterială din sindromul metabolic este diferită de hipertensiunea arterială esențială.
11. Determinarea haplotipurilor a permis o caracterizare mai exactă a locusului genei AVPR1A și a confirmat asocierea cu hipertensiunea arterială și chiar cu nivelul de copeptină serică, cu putere mai mare decât polimorfismele independente.
12. Am evidențiat două semnale diferite în locusul AVPR1A, unul pentru hipertensiunea arterială, respectiv altul pentru obezitate și hiperinsulinism, semnalul asociat hipertensiunii arteriale fiind net mai puternic.
13. Prezentul studiu răspunde unora dintre întrebările legate de rolul locusului genei AVPR1A și deschide noi perspective de cercetare în direcția îmbunătățirii markerilor genetici în sindromul metabolic și de elucidare a mecanismelor patogenice implicate în apariția hipertensiunii în sindromul metabolic, precum și de posibile ținte terapeutice.
14. Atât hipertensiunea arterială cât și sindromul metabolic sunt afecțiuni cu puternic impact asupra stării de sănătate a populațiilor la nivel global. Descoperirile din această lucrare ar putea avea un impact în viitoarele teme de cercetare, conducând la aplicabilitate clinică diagnostică și terapeutică.

FINANȚARE

Această cercetare a fost finanțată parțial prin următoarele fonduri:

- Proiect MEDIGENE – FP7-279171 - "*Factori genetici și de mediu ai sindromului de rezistență la insulină și complicațiilor sale pe termen lung în populațiile imigrante mediteraneene*" – la care am participat ca cercetător în perioada 2012 – 2016
- Proiect CERO – PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN. Contract de finanțare: POSDRU/159/1.5/S/135760 la care am participat ca doctorand în perioada 2014 – 2015.

Bibliografie

1. Guize L, Thomas F, Pannier B, Bean K, Jegu B, Benetos A. All-cause mortality associated with specific combinations of the metabolic syndrome according to recent definitions. *Diabetes Care*. 2007;30:2381-2387.
2. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2008;29(7):777-822. doi:10.1210/er.2008-0024.
3. Pollex R, Hanley A, Zinman B, Harris S, Khan H, Hegele R. Metabolic syndrome in aboriginal Canadians: prevalence and genetic associations. *Atherosclerosis*. 2006;184(1):121-129.
4. Yu W, Clyne M, Khoury MJ, Gwinn M. Phenopedia and Genopedia: Disease-centered and Gene-centered Views of the Evolving Knowledge of Human Genetic Associations. *Bioinformatics*.;doi:10.1093/bioinformatics/btp618.
5. Tekola-Ayele F, Doumatey AP, Shriner D, et al. Genome-wide association study identifies African-ancestry specific variants for metabolic syndrome. *Mol Genet Metab*. 2015;116(4):305-313. doi:10.1016/j.ymgme.2015.10.008.
6. Yu W, Gwinn M, Clyne M, Yesupriya A, Khoury MJ. A navigator for human genome epidemiology. *Nat Genet*. 2008;40(2):124-125. doi:10.1038/ng0208-124.
7. Attaoua R, Ait El Mkaem S, Radian S, et al. FTO gene associates to metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(2):230-234. doi:10.1016/j.bbrc.2008.06.039.
8. Bentley-Lewis R, Seely E, Dunaif A. Ovarian hypertension: Polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(2):433-449. doi:10.1016/j.ecl.2011.01.009.
9. Sampson M, Kong C, Patel A, Unwin R, Jacobs HS. Ambulatory blood pressure profiles and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity in lean women with and without the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol*

(Oxf). 1996;45(5):623-629. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8977761>. Accessed September 30, 2016.

10. Zimmermann S, Phillips RA, Dunaif A, et al. Polycystic ovary syndrome: Lack of hypertension despite profound insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(2):508-513. doi:10.1210/jcem.75.2.1639952.
11. Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome: Syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(8):365-370. doi:10.1016/j.tem.2003.08.002.
12. Schillaci G, Pirro M, Vaudo G, et al. Prognostic value of the metabolic syndrome in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(10):1817-1822. doi:10.1016/j.jacc.2003.12.049.
13. Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, Lehtovirta M, Jacob S, Yki-Järvinen H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Hypertension.* 1997;30(5):1144-1149.
14. Enhörning S, Struck J, Wirfält E, Hedblad B, Morgenthaler NG, Melander O. Plasma copeptin, a unifying factor behind the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):E1065-72. doi:10.1210/jc.2010-2981.
15. Saleem U, Khaleghi M, Morgenthaler NG, et al. Plasma carboxy-terminal provasopressin (copeptin): A novel marker of insulin resistance and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(7):2558-2564. doi:10.1210/jc.2008-2278.
16. Karbek B, Ozbek M, Karakose M, et al. Copeptin, a surrogate marker for arginine vasopressin, is associated with cardiovascular risk in patients with polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res.* 2014;7(1):31. doi:10.1186/1757-2215-7-31.
17. Enhörning S, Leosdottir M, Wallström P, et al. Relation between human vasopressin 1a gene variance, fat intake, and diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(1):400-406. doi:10.3945/ajcn.2008.26382.
18. Yaël Nossent a, Hansen JL, Doggen C, Quax PH, Sheikh SP, Rosendaal FR. SNPs in MicroRNA Binding Sites in 3'-UTRs of RAAS Genes Influence Arterial Blood Pressure and Risk of Myocardial Infarction. *Am J Hypertens.* 2011;24(9):999-1006. doi:10.1038/ajh.2011.92.
19. Grundy SM, BREWER Jr. HB, Cleeman JI, Smith Jr. SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition 23. *Circulation.* 2004;109(1524-4539 (Electronic)):433-438.
20. Morgenthaler NG, Struck J, Jochberger S, Dünser MW. Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(2):43-49. doi:10.1016/j.tem.2007.11.001.
21. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Fenske W. Copeptin as a biomarker and a diagnostic tool in the evaluation of patients with polyuria-polydipsia and hyponatremia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(2):235-247.

doi:10.1016/j.beem.2016.02.003.

22. Enhörning S, Bankir L, Bouby N, et al. Copeptin, a marker of vasopressin, in abdominal obesity, diabetes and microalbuminuria: the prospective Malmö Diet and Cancer Study cardiovascular cohort. *Int J Obes.* 2012;37(4):598-603. doi:10.1038/ijo.2012.88.
23. Taskin MI, Bulbul E, Adali E, Hismiogulları AA, Inceboz U. Circulating levels of obestatin and copeptin in obese and nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015;189:19-23. doi:10.1016/j.ejogrb.2015.03.006.
24. Rabadan-Diehl C, Aguilera G. Glucocorticoids increase vasopressin V1b receptor coupling to phospholipase C. *Endocrinology.* 1998;139(7):3220-3226. doi:10.1210/en.139.7.3220.
25. Pollard AD, Brindley DN. Effects of vasopressin and corticosterone on fatty acid metabolism and on the activities of glycerol phosphate acyltransferase and phosphatidate phosphohydrolase in rat hepatocytes. *Biochem J.* 1984;217(2):461-469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6320808>. Accessed October 7, 2016.
26. Hiroyama M, Aoyagi T, Fujiwara Y, et al. Hypermetabolism of fat in V1a vasopressin receptor knockout mice. *Mol Endocrinol.* 2007;21(1):247-258. doi:10.1210/me.2006-0069.
27. Mandrelle K, Kamath MS, Bondu DJ, Chandy A, Aleyamma T, George K. Prevalence of metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome attending an infertility clinic in a tertiary care hospital in south India. *J Hum Reprod Sci.* 2012;5(1):26-31. doi:10.4103/0974-1208.97791.
28. Koshimizu T, Nasa Y, Tanoue A, et al. V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(20):7807-7812. doi:10.1073/pnas.0600875103.