

2024

ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ/MEDICINĂ DENTARĂ/FARMACIE



PROFILUL DE RISC AL PACIENTULUI DIABETIC ÎN INFARCTUL MIOCARDIC ACUT
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. SERBAN MIHAI BĂLĂNESCU

Student-doctorand:

BARBU ELENA

Cuprins

Lista de publicații și lucrări

Lista de abrevieri

Introducere

I. Partea generală.....	1
1. Mecanisme inflamatorii în afecțiuni metabolice cronice.....	1
1.1. Inflamația la bază.....	1
1.2. Boala cardiovasculară și inflamația.....	11
1.2.1. Ateroscleroza și inflamația.....	11
1.2.2. Inflamația în IMA.....	13
1.3. Inflamația în DZ tip 2.....	19
1.3.1. Mecanisme inflamatorii în obezitate, prediabet și DZ tip 2.....	19
1.3.2. Profilul glicemic în infarctul miocardic acut. Hiperlipemia de stres și rezistența acută la insulină.....	26
2. Convergențe între DZ tip 2 și BCV. Inflamația ca numitor comun.....	30
II. Contribuții personale.....	38
3. Ipoteza de lucru și obiective generale.....	38
3.1. Ipoteze de lucru.....	38
3.2. Obiective generale.....	38
4. Metodologia generală a cercetării.....	39
4.1. Criterii includere/ excludere în studiu:.....	39
4.2. Parametri clinici și paraclinici evaluați.....	41
4.2.1. Parametri clinici.....	41
4.2.2. Parametri paraclinici:.....	41
4.3. Prelucrarea și analiza datelor.....	43
5. Studiul 1: 1 Implicarea prognostică a parametrilor inflamatori la pacienții IMA în timpul spitalizării evenimentului index cu focus pe neutrofil și comparații între nediabetici și nediabetici.....	46
5.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice).....	46
5.1.1. Ipoteze de lucru.....	48
5.1.2. Obiective specifice :.....	49
5.2. Material și metoda.....	49
5.3. Rezultate.....	49
5.3.1. Caracterizarea populației.....	49
5.3.2. Evaluarea rolului parametrilor inflamatori în evoluția pe termen scurt a IMA, cu evidențierea activității neutrofilului și a capacității sale de predicție pentru evoluție nefavorabilă.....	54
5.3.3. Evaluarea particularităților pacienților diabetici în perioada acută a infarctului miocardic, în special din punct de vedere al inflamației sistemice.....	58
5.3.3.1. Profilul inflamator la pacienții diabetici.....	59
5.3.3.2. Profilul glicemic în IMA.....	62
5.3.3.3. Alte particularități ale pacienților diabetici.....	69

5.3.4. Identificarea parametrilor sau combinațiilor de parametri care influențează evoluția în perioada acută a infarctului miocardic și folosirea acestora pentru identificarea pacientului la risc prin întocmirea de scoruri de predicție	72
5.4. Discuții:	83
5.5. Concluzii studiu 1	89
6. Studiul 2. Evaluarea profilului inflamator al neutrofilelor la pacienții cu infarct miocardic acut	90
6.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	90
6.2. Materiale si metode	91
6.3. Rezultate	95
6.3.1. Obținerea si caracterizarea neutrofilelor	95
6.3.2. Expresia genelor pro-inflamatorii în neutrofilele izolate de la pacienții cu IM, comparativ cu expresia lor în neutrofilele izolate de la subiecții sănătoși.....	97
6.3.3. Profilul inflamator al neutrofilelor la pacienții cu IM, cu sau fără diabet.....	99
6.3.4. Neutrofilele pacienților cu IM si diabet prezinta un metabolism energetic deteriorat si produc nivele crescute de ROS	101
6.3.5. Profilul inflamator exacerbant al neutrofilelor de la pacienții IM si evoluție nefavorabilă.....	102
6.3.6. Expresia NET în serul și neutrofilele pacienților cu IMA.....	105
6.3.7. Expresia și activitatea neutrofil-elastazei în neutrofilele pacienților cu evoluție intraspitalicească negativă	107
6.4. Discuții.....	109
6.5. Concluzii studiu 2	113
7. Concluzii finale si contribuții personale	114
Bibliografie	117
Anexa 1	160

Introducere și premise

Bolile cardiovasculare (BCV) constituie cauza principală de mortalitate și morbiditate în lume cu prevalență semnificativ mai mare la pacienții cu diabet [1]. Mai mult, complicațiile BVC induc mortalitate crescută pacienților cu diabet zaharat [2,3]. Relația dintre DZ tip 2 și BCV, este complexă și bidirecțională, având implicații clinice, sociale și economice semnificative. BCV exacerbează rezistența la insulina (RI) și efectele sale, perpetuând un cerc vicios de disfuncție metabolică și risc cardiovascular crescut. În plus la factorii de risc tradiționali, precum diabetul, hipertensiunea, dislipidemia, fumatul și obezitatea, mecanismele inflamatorii contribuie atât la etiopatogenia, cât și la progresia BCV [4–6].

Interesul pentru rolul inflamației în cazul pacienților cu ateroscleroză coronariană se extinde acum de la o perspectivă cronică la una acută, însă cercetările în acest domeniu rămân încă în stadii incipiente. Evenimentele ischemice acute declanșează un răspuns inflamator intens, implicat atât în procesul de vindecare cât și în complicații acute. Dacă rolul nociv al inflamației cronice este bine stabilit prin cercetări preclinice și clinice ample precum CANTOS, COLCOT și LoDoCo [7–9], este încă o provocare să se stabilească punctul de la care cascada acută de citokine încetează să mai fie un stimul reparator util și devine un mecanism dăunător în cadrul infarctului miocardic acut (IMA). Diabetul reprezintă, de asemenea, o entitate metabolică complexă, caracterizată printr-un grad de inflamație cronică de nivel redus [10]. Este intuitiv pentru un clinician să presupună că un eveniment cardiovascular acut, suprapus peste mediul diabetic, ar putea declanșa un răspuns inflamator exagerat, ducând la complicații adverse [4,11].

Deși rata mortalității în spital pentru pacienții cu infarct miocardic cu supradenivelare de ST (STEMI) a scăzut odată cu introducerea programelor de revascularizare interventională în urgență, persistă o heterogenitate în ceea ce privește evoluția acestor pacienți în spital, chiar și la pacienți care profil clinic și istoric patologic relativ similare. Dacă mecanismele inflamatorii sunt responsabile măcar parțial pentru acest fapt rămâne de stabilit. Numeroase studii au evidențiat importanța inflamației sistemice și au arătat că aceasta nu este doar o consecință reactivă, ci este, de fapt, un factor important contribuitor și un proces tratabil al bolii [12,13]. Într-o perspectivă simplistă, un clinician poate observa cu ușurință și fără costuri mari răspunsul inflamator la pacienții cu IMA folosind doar testele de sânge obișnuite, cum ar fi dozarea leucocitelor,

neutrofilelor și a proteinei C reactive (CRP). Acestea au fost găsite crescute în studii clinice, confirmate pe cohorte și prezic evenimente adverse. Acest răspuns inflamator exacerbă sugerează un dezechilibru al celulelor imune care se asociază cu procesul inflamator. De asemenea, tot mai multe dovezi atestă implicarea răspunsului imun înnăscut în patogeneza IMA, iar descoperirile emergente indică un fenotip alterat al celulelor imune, inclusiv al neutrofilelor. [14].

În acest context, lucrarea de față a avut următoarele obiective principale: ***implicarea prognostică a parametrilor inflamatori la pacienții cu IMA în timpul spitalizării evenimentului index; evaluarea răspunsului inflamator acut comparativ la pacienții diabetici și nediabetici ; investigarea profilului inflamator al neutrofilelor de la pacienții cu IMA.***

Teza este structurată în două părți. Prima secțiune generală detaliază mecanismele inflamatorii de bază, mecanismele implicate în patologia cardiovasculară și diabet, și punctele de intersecție dintre acestea. Partea a doua, dedicată contribuțiilor personale, cuprinde două studii. Primul studiu clinic evaluează asocierea dintre evoluția nefavorabilă post IMA în timpul spitalizării și parametrii inflamatori, comparând totodată pacienții diabetici cu cei nediabetici. Constatările acestui studiu au fost validate și consolidate printr-un studiu in vitro care investighează fenotipul proinflamator al neutrofilelor izolate de la pacienți cu IMA.

I. Partea generală

Din această primă secțiune, sunt prezentate pe scurt mecanismele prin care neutrofilul combate agentul patogen și rolul acestora în infarctul miocardic acut.

Neutrofilele dispun de diverse mecanisme pentru a neutraliza agenții patogeni, cum ar fi fagocitoza, degranularea și eliberarea de proteine și peptide antimicrobiene (precum elastaza, mieloperoxidază și metaloproteinaze ale matricei), generarea de specii radicali liberi de oxigen (ROS) și formarea de capcane extracelulare ale neutrofilului (NETs) compuse din ADN, histone și proteine antimicrobiene [15], mecanisme rezumate în ***Tabelul 1.***

Tabel 1. Mecanisme de actiune ale neutrofilului

Mecanism	Descriere	Funcții	Exemple/ componente
Degranulare-enzime lizozomale si peptide antimicrobiene	Enzimele si proteinele mici conținute în granule sunt eliberate de neutrofilul activat	Descompun membranele celulare și distrug patogenul	Lizozim, mieloperoxidază (MPO), elastaza, metaloproteinaze ale matricei; defensine, catelicidine
Generare de specii reactive de oxigen (ROS)	Molecule reactive, cum ar fi peroxidul de hidrogen și radicalii liberi sunt produse de NADPH oxidaza activata	Oxidarea și distrugerea componentelor bacteriene	Superoxid (O ²⁻), peroxid de hidrogen (H ₂ O ₂)
Fagocitoza	Procesul de ingerare a bacteriilor și a altor patogeni.	Capturarea și distrugerea bacteriilor	Vacuola in care este ingerat patogenul-Fagolizozom
Formarea de capcane extracelulare ale neutrofilelor (NETs)	Eliberarea de ADN extracelular împreună cu proteine antimicrobiene.	Capturarea și imobilizarea bacteriilor	NETs compuse din ADN, histone, elastază, mieloperoxidază (MPO)
Eliberarea de citokine și chemokine	Molecule semnalizatoare, chemoattractante produse de neutrofilul activat	Implicate in medierea răspunsului imun	Proinflamatorii: CXCL8, TNF-alfa, IL-1beta; Antiinflamatorii : IL4, IL10
Eliberarea de proteine complement	Proteine plasmatice care formează complexe de atac asupra membranelor.	Liza celulelor patogene și opsonizarea acestora	C3, C5, complexul de atac membranar (MAC)
Alte proteine citoplasmatic	Proteine intracelulare ale neutrofilelor prezente in citoplasma însă nefăcând parte din conținutul granular. Se eliberează după activarea neutrofilelor, la formarea de NET	Mediatori ai inflamatiei. Proprietăți antimicrobiene. Sechestrarea nutrienților necesari pentru creșterea bacteriilor	S100 A8/A9

IL- interleukina, NET- capcane extracelulare ale neutrofilelor, TNF- factor de necroza tumorală

Cercetările recente fac din ce în ce mai evident faptul că neutrofilele sunt mult mai mult decât celule care distrug agenții patogeni. Ele pot afișa mai multe fenotipuri și pot îndeplini o gamă largă de funcții celulare inclusiv în inflamația din cadrul tulburărilor metabolice. Când anumite funcții metabolice sunt modificate, cum se întâmplă în DZ tip 2, dislipidemie, BCV, neutrofilele pot fi pregătite pentru a prezenta răspunsuri proinflamatorii mai puternice. In cadrul IMA, după ruperea plăcii, trombocitele activate interacționează cu neutrofilele la locul lezat, exacerbând NEToza [16]. În plus, are loc obstrucția microvasculară prin rețele NET și formarea de microtrombi în microcirculație, ceea ce duce la creșterea dimensiunii infarctului[17]. Neutrofilele activate sunt de asemenea mai puțin deformabile, blochează capilarele, pot cauza obstrucții microvasculare si afecta perfuzia. ROS generat de neutrofilele activate în plăcile aterosclerotice provoacă, de

asemenea, activarea trombocitelor. Această intensificare a proceselor protrombotice de către neutrofile poate influența semnificativ evoluția post IMA [18]. Un alt mecanism prin care neutrofilele amplifică procesele pro-trombotice este dependent de inflamazomi, care acționează ca amplificatori nu numai pentru aterogeneză, ci și pentru tromboză [19]. Astfel, Il-1 β și Il-18 generate de activarea inflamazomilor NLR Family Pyrin Domain Containing 3 (NLRP3) în neutrofilele activate, acționează asupra macrofagelor și induc generarea de Il-6. La rândul său, Il-6 eliberat sistemic stimulează hepatocitele să producă CRP, fibrinogen și PAI -1, creând un status protrombotic.

Alături de fenomenele produse la nivel vascular și leziunea ischemică inițiază o cascadă inflamatorie care va induce activarea leucocitelor și celulelor endoteliale. Aceste celule activate secretă citokine proinflamatorii precum TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, chemokine și molecule de adeziune, care exacerbează leziunile tisulare și favorizează recrutarea leucocitelor în zonă afectată. Neutrofilele atrase și activate se atașează de celulele endoteliale și penetrează țesutul. Odată localizate în țesut, neutrofilele secretă specii ROS, NET-s, proteaze și agenți inflamatori, contribuind astfel la stresul oxidativ, la deteriorarea tisulară și la inflamație [20]. Decisiv pentru leziunea de ischemie reperfuzie este faptul că neutrofilele activate reprezintă o sursă importantă de ROS, produse prin activitatea complexului enzimatic nicotin adenin dinucleotid fosfat oxidaza (NADPH) [21]. Producția de ROS de către neutrofile intensifică răspunsul inflamator și agravează leziunile tisulare [18,22]. În plus, s-a demonstrat că blocarea S100A8/A9 pe termen scurt în primele 3 zile post-IM cu blocantul specific ABR-238901, care inhibă legarea dintre S100A8/A9 și receptorii săi reduce infiltrarea neutrofilelor și macrofagelor în miocardul ischemic și îmbunătățește performanța cardiacă [23]. O creștere a raportului neutrofile/limfocite (NLR) este corelat cu prognosticul negativ în IMA iar modificările dinamice ale NLR preced starea clinică cu câteva ore și pot oferi date rapide despre prognostic [24].

II. Contributii personale

Ipoteze de lucru și obiective generale

Ipoteze de lucru

- Inflamația joacă un rol important în prognosticul pe termen scurt al pacienților cu IMA, astfel ca markerii inflamatori ar putea fi utilizați în fenotiparea pacientului la risc în IMA.
- Răspunsul inflamator acut este disfuncțional în prezența diabetului și un astfel de răspuns se asociază cu o evoluție clinică mai severă în spital.
- Stratificarea riscului trebuie evaluată diferit, cu utilizarea scorurilor de predicție specifice în funcție de prezența diabetului.
- Activarea neutrofilelor are un rol prognostic în evoluția intraspitalicească a pacientului cu IMA. Fenotipul neutrofilelor de la pacienții cu IM și evoluție nefavorabilă suferă transformări care pot fi responsabile de evoluția intraspitalicească nefavorabilă a pacienților cu IM.

Obiective generale

- Evaluarea rolului parametrilor inflamatori în evoluția pe termen scurt a IMA, cu evidențierea activității neutrofilului și a capacității sale de predicție pentru evoluție nefavorabilă.
- Evaluarea particularităților pacienților diabetici în perioada acută a infarctului miocardic, în special din punct de vedere al inflamației sistemice.
- Identificarea predictorilor pentru evoluție nefavorabilă și folosirea acestora prin întocmirea de scoruri pentru identificarea pacientului la risc în IMA.
- Identificarea unui fenotip specific de neutrofil, definit de anumiți markeri proinflamatori care să fie responsabil pentru prognosticul negativ al pacienților cu IM.

Metodologie generală :

Studiul este prospectiv, longitudinal și este compus din 2 etape / 2 sub-studii cu metodologie care se suprapune parțial, respectiv

- 1) Studiu clinic**
- 2) Studiu in vitro**

Cazuisitica este reprezentata de un eșantion de 229 de pacienți internați între aprilie 2021 și septembrie 2022 la Spitalul de Urgență „Elias” din București, România. Dintre aceștia, 63 nu erau diabetici, 78 aveau prediabet, iar 88 erau diabetici. Pentru evaluarea factorilor clinici și a biomarkerilor cu valoare prognostică, pacienții au fost împărțiți într-un subgrup cu evoluție nefavorabilă (cu complicații în spital, N = 77) și un subgrup cu evoluție favorabilă (fără complicații, N = 152).

Prognosticul negativ sau evolutia intraspitaliceasca complicata a fost definit ca prezența a oricare dintre cele 5 conditii :

1. Dezvoltarea clasei Killip 3 sau 4
2. FEVS la externare < 40%
3. Aritmii ventriculare complexe
4. Complicatii mecanice
5. Deces

Criterii includere:

- Pacienții care se prezintă în primele 24 de ore de la debutul IMA conform definiției universale ale infarctului miocardic acut [25]

Criterii excludere:

- Sindrom infecțios acut viral/bacterian/fungic; inclusiv infecție acuta SARS COV2
- Disfuncții organice severe preexistente – Insuficiente hepatice si renale severe care ar fi influentat semnificativ probele biologice
- Boli inflamatorii, auto-imune în tratament (poliartrita reumatoidă, artropatie psoriazică, lupus, boala inflamatorie intestinală, spondilartropatii)
- Neoplazii sau alte boli care limitează supraviețuirea pentru perioada propusă de urmărire post IMA
- FEVS<30%

Analizele și comparațiile au fost făcute în funcție de :

- mediul diabetic/prediabetic/nediabetic
- evoluția intraspitalicească (mai exact au fost analizați parametri care influențează pacienții cu evoluție intraspitaliceasca complicata)

Am decis să limităm înrolarea pacienților cu IM și FEVS sever redusă <30% deoarece este bine cunoscută implicarea disfuncției severe în evoluția post infarct [26,27] și a efectului independent al fracției de ejeție reduse asupra parametrilor inflamatori [28,29] indiferent de cauza subiacentă. Am considerat că FEVS sever deprimată poate fi o sursă de eroare care poate schimba semnificativ markerii inflamatori în grupul nostru de studiu. Astfel, am considerat un FEVS între 30-40% ca criteriu pentru complicațiile acute ale SCA și care nu are un efect major asupra marker-ilor inflamatori, în ciuda consecințelor prognostice.

Evaluarea clinica:

Examenul fizic a fost efectuat zilnic, începând cu prezentarea din camera de gardă. Au fost evaluați factorii de risc tradiționali pentru diabet și boala aterosclerotică, precum vârsta, sexul, fumatul, hipertensiunea arterială și dislipidemia. Istoricul medical și tratamentele anterioare au fost documentate pentru fiecare pacient.

Investigații:

Probele de sânge au fost recoltate și analizate conform standardelor de îngrijire pentru infarctul miocardic, la internare, în timpul spitalizării și la externare. Markerii inflamatori uzuali, cum ar fi proteina C reactivă, Feritina, viteza de sedimentare a eritrocitelor și markerii specifici diabetului, precum hemoglobina glicată și insulinemia, au fost de asemenea evaluați. Parametrii biologici standard au fost măsurați conform procedurilor de laborator ale spitalului. Electrocardiograme cu 12 derivații au fost efectuate zilnic. Ritmul cardiac a fost monitorizat continuu în primele 72 de ore după infarct pentru detectarea aritmiilor. Ecocardiografiile transtoracice și evaluarea fracției de ejeție a ventricolului stang (FEVS) au fost realizate la internare și externare sau când au apărut simptome noi. Angiografia și revascularizarea intervențională au fost realizate în primele 60 de minute de la internare la toți pacienții. A fost documentată leziunea responsabilă de infarct, numărul de vase coronariene epicardice cu stenoze semnificative hemodinamic și numărul total de stenoze coronariene. Probe de sange speciale au fost efectuate pentru determinarea biomarkerilor inflamatori și profilului inflamator al neutrofilului după cum urmează:

Pentru cuantificarea diferiților markeri inflamatori (*IL-1β*, *IL-18*, *IL6*, *S100A9A9*, *NETs*)

- Probele de sânge periferic au fost colectate în tuburi de ser sterile, în primele 12 până la 24 de ore după debutul simptomelor de IM și serul a fost izolat prin centrifugare timp de 15 minute la 1500 xg. Serul a fost depozitat la -20°C, ulterior prelucrat prin ELISA/Colorare Sytox Green.

Pentru izolarea de neutrofile :

- Probele de sânge periferic de la 35 de pacienți cu SCA cu sau fără diabet au fost colectate în tuburi de recoltare de sânge Vacutainer EDTA.
- Un grup de voluntari sănătoși (n = 10) a fost inclus ca referință pentru unele dintre investigațiile moleculare.

Pentru mai o mai buna intelegere, metodologia specială de izolare si evaluare in vitro a neutrofilului vor fi detaliate la studiul 2.

Analiza statistica:

Colectarea de date a fost efectuată in programul IBM SPSS. Analizele statistice și vizualizările au fost realizate în Python 3. Pentru fiecare parametru numeric masurat au fost verificate diferențele dintre grupuri (diabetic, prediabetic, fără diabet) utilizând analiza one-way Anova cu post-testul Tukey pentru comparații multiple (pachetul statsmodels) [30]. Alternativ, pentru comparațiile dintre două grupuri au fost utilizate teste t student (scipy). Pentru evaluarea corelațiilor dintre parametri, au fost calculate individual pentru fiecare pereche de variabile coeficientul Pearson R și valoarea p corespunzătoare folosind SciPy [31]. Rezultatele au fost apoi compilate într-o matrice, coloanele și rândurile au fost grupate prin metoda grupului de perechi neponderate cu metoda medie aritmetică (UPGMA) și reprezentate grafic folosind pachetul seaborn. A fost folosit un model de regresie logistică liniară (sklearn) -evalua valoarea prognostică a diferiților parametri. Sensibilitatea+specificitatea biomarkerilor -prin analiza ROC (receiver operating characteristic) și a fost selectat pragul corespunzător celei mai mari statistici Youden J (sensibilitate + specificitate -1). Pentru combinații de markeri, a fost utilizat un model support vector machine (SVM) cu kernel liniar (pachetul sklearn) [32]. GraphPad Prism 7.0 cu puncte de date exprimate ca medie ± abatere standard (SD) a fost utilizat pentru toate analizele statistice ale rezultatelor in vitro.

Studiul 1. Implicarea prognostică a parametrilor inflamatori la pacienții IMA în timpul spitalizării evenimentului index

Rezultate.

Caracteristicile populației. Datele clinice și prevalența factorilor de risc pentru întreaga populație de studiu, precum și pentru subgrupurile de pacienți de control, pre-diabet și diabet zaharat sunt rezumate în *Tabelul 2*.

Tabel 2 .Caracteristicile populației

	Control (N)	Prediabet (PD)	Diabet (D)	Total
Număr	63	78	88	229
Sex F	19 (30,2%)	27 (34,6%)	29 (33%)	75 (32,8%)
Sex M	44 (69,8%)	51 (65,4%)	59 (67%)	154 (67,2%)
Vârstă	60,9 (40,1 - 82,1)	61,05 (46 - 79,3)	63,5 (43,8 - 79,9)	61,9 (41,5 - 81,4)
HTA	40 (63,5%)	53 (67,9%)	74 (84,1%)	167 (72,9%)
Fumatori	48 (76,2%)	47 (60,3%)	55 (62,5%)	150 (65,5%)
Anemie	5 (7,9%)	5 (6,4%)	9 (10,2%)	19 (8,3%)
Deces intraspitalicesc	6 (9,5%)	3 (3,8%)	4 (4,5%)	13 (5,7%)
Zile de spitalizare	4,0 (2,0 - 13,9)	4,0 (2,0 - 9,3)	4,0 (2,0 - 21,0)	4,0 (2,0 - 18,2)
LDL > 100	50 / 63 (79,4%)	60 / 78 (76,9%)	52 / 85 (61,2%)	162 / 226 (71,7%)
Istoric de IM	2 (3,2%)	5 (6,4%)	18 (20,5%)	25 (10,9%)
Istoric de AVC	5 / 62 (8,0%)	3 / 77 (3,9%)	9 / 88 (10,2%)	17 / 227 (7,5%)
Prognostic nefavorabil	23 (36,5%)	15 (19,2%)	39 (44,3%)	77 (33,6%)

* variabilele categorice sunt prezentate ca număr (procent) iar variabilele numerice ca Mediană (5% - 95%), F - femeie, M- barbat, HTA- hipertensiune arteriala. LDL- low density lipoproteins. AVC- accivend vascular cerebral

Subgrupurile (nediabetici, prediabetici, diabetici) au avut distribuții similare pe sexe, cu aproximativ o treime femei și două treimi bărbați și fără diferențe semnificative ale vârstei ($p = NS$) pentru toate comparațiile intergrup, ANOVA, post-testul Tukey). În studiul nostru au fost 63 nediabetici (27%), 78 cu prediabet (34%) și 88 diabetici (38%). Numărul mediu de zile de spitalizare a fost de 4, același pentru toate grupurile de pacienți. Procentul total de decese pe perioada spitalizării a fost de 5.7%, cei mai mulți dintre pacienții care au decedat au fost nediabetici. Subgrupurile au avut o distribuție relativ similară, fără alte diferențe semnificative între grupuri.

Pentru o caracterizare globală a populației și încărcăturii patologice cu impact prognostic, o analiză de regresie logistică multinominală a fost efectuată pe date clinice pentru a evalua factorii clinici independenți care prezic un prognostic nefavorabil. În lotul studiat, anemia (HR=3.1, p = 0,045), fibrilația atrială (HR= 3.5, P = 0,013) și diabetul (HR=2, P = 0,032) sunt factori de risc independenți care influențează semnificativ prognosticul precoce al IM.

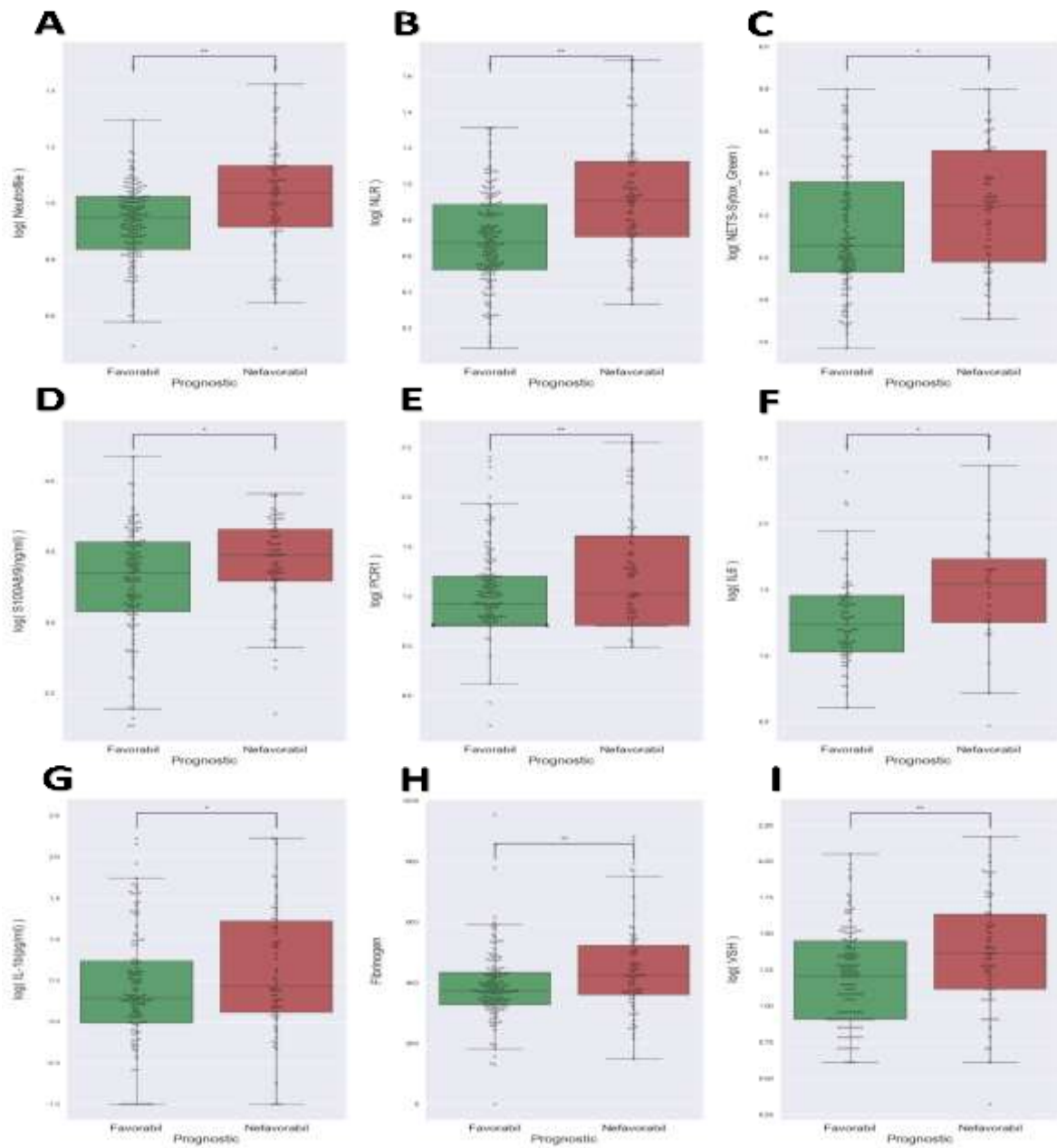
Influența parametrilor inflamatori asupra prognosticului.

VSH, CRP, fibrinogen, IL-1 β , IL-6, numărul de neutrofile, NLR, S100 A8/A9 și NETS au fost semnificativ crescute în grupul cu evoluție nefavorabilă (*Figura 1*).

Se evidențiază și este notabil faptul că majoritatea moleculelor inflamatorii corelate cu grupul de prognostic nefavorabil provin din răspunsul neutrofilic.

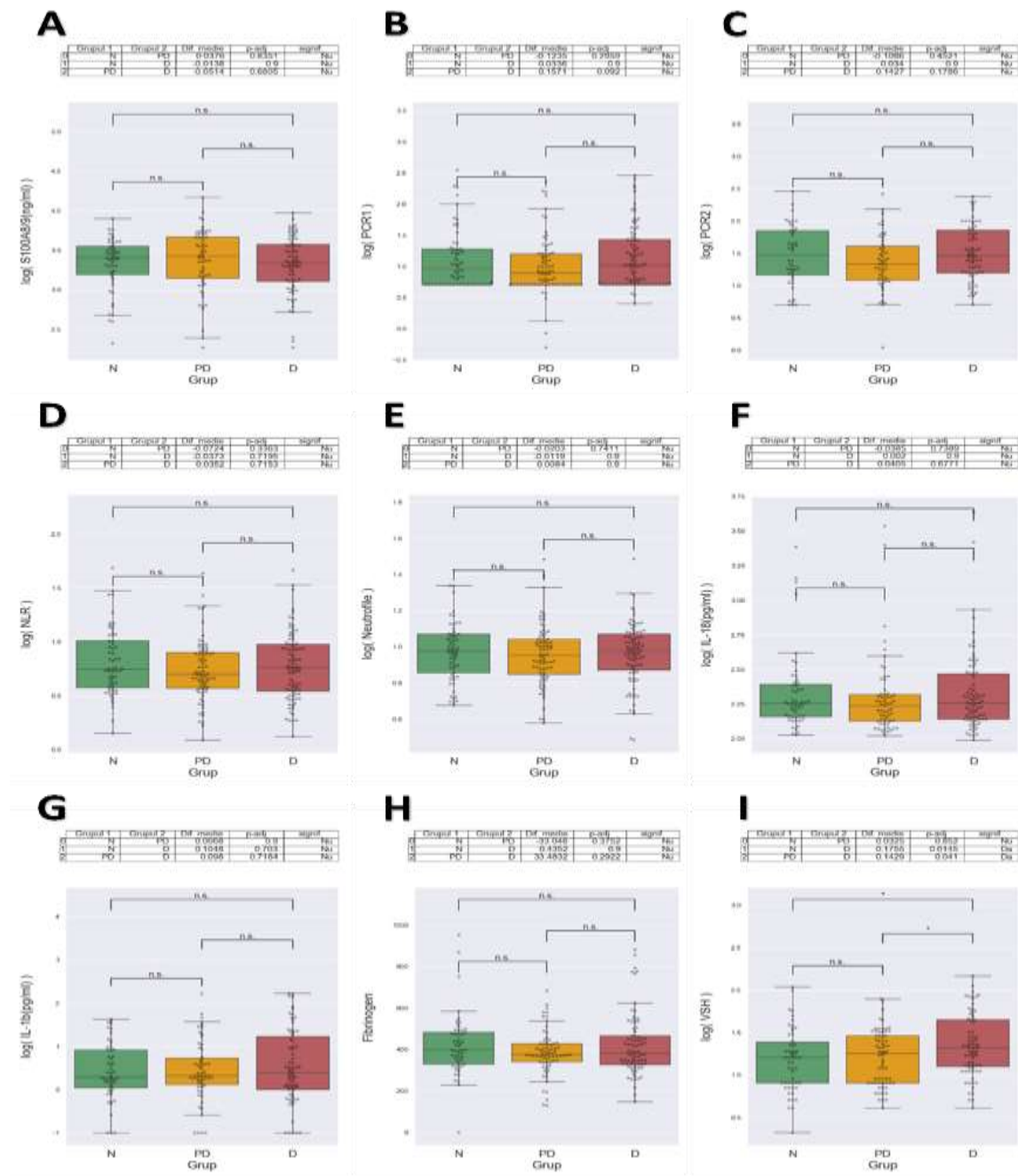
Mai exact, 4 dintre cei 9 parametri din figura (neutrofile, NLR, S100 A8/A9, NETs) și chiar și IL6 a cărei secreție poate fi amplificată în urm activării neutrofilului parametri au valori crescute în grupul de prognostic negativ conform *Figurii 1*. În plus față de valoarea cantitativă a neutrofilului (prin nr. neutrofile și NLR), producția de activare ai neutrofilului NET (P = 0,0297*, *Figura 1C*) și S100A8/9 (p = 0,0293*, *Figura 1D*) au fost crescuți la pacienții cu evoluție intraspitalicească nefavorabilă, date care sugerează că activarea neutrofilelor are un rol în evoluția pe termen scurt.

Neutrofilele pot indica severitatea și prognosticul IM nu doar prin valoarea lor, reflectând severitatea afecțiunii printr-un răspuns inflamator corespunzător, ci și prin prezenta produșilor lor de activare care pot contribui la o progresie adversă după IM [17,33,34].



Figură 1. Influența parametrilor inflamatori asupra prognosticului. Rosu- Prognostic nefavorabil, Verde- prognostic favorabil. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Evaluarea comparativă a parametrilor inflamatori între loturi (diabetici/prediabetici/nediabetici)



Figură 2 Comparații între markerii inflamatori în funcție de sublot. A) S100 A8/A9; B) PCR1- Proteina C Reactiva la internare; C) PCR2- Proteina C Reactiva la externare; D) NLR – Raport Neutrofile/Limfocite; E) Neutrofile; F) IL18 - Interleukina 18; G) IL-1β- Interleukina 1 beta; H) Fibrinogen; I) VSH- Viteza de sedimentare a hematiilor D-diabetic, PD-prediabetic, N-normal. (n.s.-nesemnificativ, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$).

Rezultatele analizei comparative sunt prezentate în grafice box and whiskers în **Figura 2**. Barele reprezintă cuartilele 25% - 75% iar linia orizontală indicată în interiorul barelor reprezintă mediana. Barele de eroare au lungimea de 1,5 distanța dintre cuartile. Semnificația statistică indicată pe grafic reprezintă rezultatele analizei Tukey pentru comparații multiple (n.s.- nesemnificativ, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Tabelul de deasupra graficelor prezintă rezultatele analizei 2-way ANOVA pentru identificarea sursei de variație între grupurile de pacienți: creșterea în greutate față de martor, diabetul sau/și interacțiunea dintre cei doi factori (**Figura 2**).

Făcând analiza markerilor inflamatori, în răspunsul de fază acută din primele 12 ore de la debutul simptomelor infarctului miocardic, a fost surprinzătoare lipsa diferențelor dintre pacienții diabetici, prediabetici sau fără diabet. Răspunsul inflamator a fost crescut în contextul IMA, însă fără a se evidenția ca fiind potențat de mediul diabetic în ceea ce privește valoarea cantitativă a parametrilor inflamatori.

Identificarea parametrilor sau combinațiilor de parametri care influențează evoluția în perioada acută a infarctului miocardic și folosirea acestora pentru identificarea pacientului la risc prin întocmirea de scoruri de predicție

Conform obiectivelor propuse, după evaluarea detaliată a parametrilor inflamatori și a diferențelor între diabetici și nediabetici, am continuat studiul pentru a identifica biomarkerii asociați unui prognostic nefavorabil.

Rezultatele au arătat că pacienții din grupul cu evoluție nefavorabilă au avut valori semnificativ mai mari decât pacienții cu evoluție favorabilă ai parametrilor generali, care oglindesc comorbiditățile, asociați cu:

- i) statusul protrombotic : D-Dimeri ($p = 0,0119$), Fibrinogen ($p = 0,0035$);
- ii) inflamație: VSH ($p = 0,0027$), CRP ($p = 0,0021$),
- iii) disfuncție renală: creatinina ($p = 0,0024$), EGFR ($p < 0,01$)
- iv) profil glicemic: glicemia la internare ($p < 0,01$)
- v) numărul de stenoze coronariene ($p < 0,01$)

Am continuat evaluând puterea predictivă a parametrilor asociați cu un prognostic negativ. Pentru fiecare biomarker înregistrat, am determinat cea mai bună valoare de prag pentru a distinge

între un prognostic favorabil și unul nefavorabil, precum și sensibilitatea și specificitatea biomarkerului la această valoare optimă. Având în vedere că pacienții diabetici pot avea factori prognostici diferiți față de non-diabetici, am analizat și capacitatea biomarkerilor de a prezice evoluția în grupuri mai omogene, separate pe baza prezenței diabetului. S-a constatat că cei mai eficienți predictorii pentru pacienții non-diabetici nu au prezentat aceeași specificitate și sensibilitate pentru pacienții diabetici (**Figura 3**). În plus, s-a observat că dintre primii zece parametri sortați după valoarea lor prognostică pentru pacienții diabetici, majoritatea au fost markeri inflamatori și au fost în mare parte legați de activitatea neutrofilelor, spre deosebire de pacienții non-diabetici, unde activitatea inflamatorie este mai puțin indicativă pentru evoluția pacienților și markerii predictivi principali sunt mai generali, reflectând comorbiditățile.

Nediabetici					Diabetici				
Biomarker	Prag	Youden j	Sensibilitate (%)	Specificitate (%)	Biomarker	Prag	Youden i	Sensibilitate (%)	Specificitate (%)
D-Dimeri	180	0.604	90	70.37	IL-18(pg/ml)	206.1	0.398	58.82	80.95
eGFR	69.84	0.589	73.91	85	HDLI	46	0.375	50	87.5
IL6	36.27	0.581	63.64	94.44	TriglicerideI	131	0.375	73.68	63.83
Creatinina	1	0.571	69.57	87.5	NETS-Sytox Green	143020	0.362	60.61	75.61
Varsta	58.9	0.545	86.96	67.5	NLR	5.829787	0.325	65.79	66.67
Potasiu	4.5	0.48	60.87	87.18	Neutrofile	11.83	0.317	42.11	89.58
VSH	18	0.444	72.22	72.22	Fibrinogen	367	0.301	74.29	55.81
NLR	5.51	0.439	77.27	66.67	S100A8/9(ng/ml)	2197.97	0.296	67.65	61.9
Neutrofile	11.13	0.437	59.09	84.62	Linfocite	1.88	0.295	84.62	44.9
Feritina	235	0.422	63.64	78.57	IL-1b(pg/ml)	2.28	0.276	66.67	60.98

Figură 3. Evaluarea sensibilității și specificității markerilor de a prezice prognosticul pentru pacienții separați în funcție de statusul diabetic. Rezultatele analizei de regresie logistică liniară arată parametrii sortați de la cel mai bun la cel mai rău predictor de prognostic.

Am utilizat cei mai specifici și sensibili dintre acești parametri separat, pentru diabetici și pentru nediabetici, pentru alcătuirea de scoruri prognostice. Pentru a identifica cea mai bună separare liniară între pacienții cu prognostic favorabil față de nefavorabil, s-au efectuat o analiza support vector machine (SVM) cu kernel liniar, bazată pe primii cei mai buni 8 pentru fiecare lot.

Am definit scorul N pentru nediabetici și Scorul D pentru diabetici.

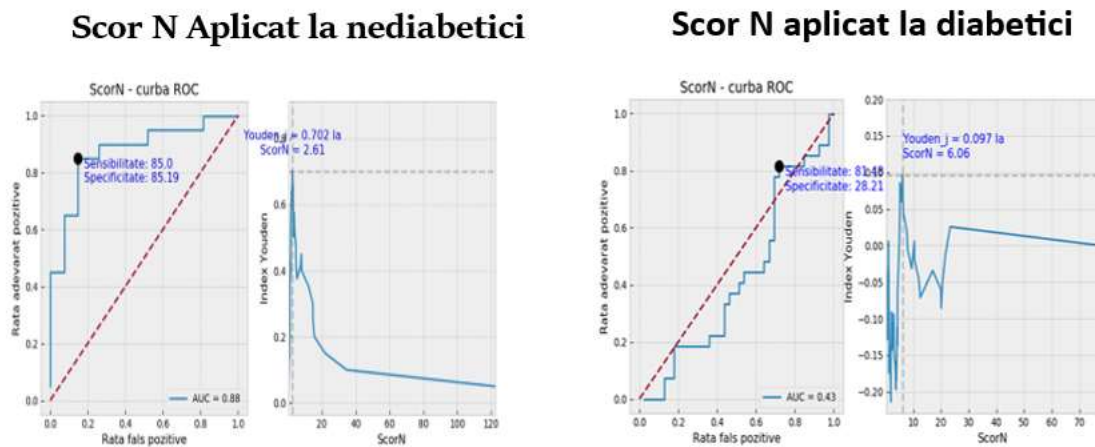
S-au obtinut urmatoarele ecuatii pentru prognostic:

$$\text{ScorN} = \text{DDimeri}/e\text{GFR}$$

Scorul N a prezentat pentru toți pacienții din studiu o sensibilitate și o specificitate de 85% atunci când s-a setat o valoare prag de prognostic de **2,61**.

$$\text{ScorD} = \text{IL18} * \text{sqrt}(\text{NETs})$$

Scorul D a prezentat pentru toți pacienții diabetici o sensibilitate 58% și o specificitate de 78% atunci când s-a setat o valoare prag de prognostic de 82864.



Figură 4 Curbă ROC pentru evaluarea aplicabilității scorului ScorN pentru pacienții nediabetici (stanga) si diabetici din studiu (dreapta).

Interesant, scorul pentru nediabetici a fost total lipsit de valoare la pacientii diabetici (**Figura 5**).

Discuții studiu 1.

În ceea ce privește **implicarea prognostică a parametrilor inflamatori la pacienții IMA în timpul spitalizării evenimentului index** studiul 1 a aratat că inflamația este strâns legată de complicațiile intraspitalicești. VSH, CRP, fibrinogen, IL-1 β , IL-18, IL-6, neutrofilele, NLR, S100A8/A9 și NETs au fost semnificativ crescute în grupul cu evoluție intraspitalicească cu complicații. Dintre moleculele inflamatorii studiate, se remarcă ponderea valorii de prognostic a biomarkerilor de activitate neutrofilului. În rezultatele noastre, neutrofilele sunt asociate cu evoluția intraspitalicească atât cantitativ (prin număr absolut și NLR) cât și calitativ prin producții

săi (S100A8/A9 și NETs) și prin cascada inflamatorie declanșată odată cu activarea lor, ceea ce ridică ipoteza unui fenotip diferit, mai agresiv al neutrofilului la pacienții cu evoluție complicată.

În ceea ce privește *evaluarea comparativă a parametrilor inflamatori între loturi (diabetici/prediabetici/nediabetici)* nu s-au observat diferențe între pacienții diabetici, prediabetici sau fără diabet. Având în vedere varietatea de parametri inflamatori evaluați, observația evidentă din acest studiu este că, în ceea ce privește răspunsul inflamator hiperacut nu sunt diferențe semnificative între loturile de pacienți. Acest lucru poate fi probabil explicat prin faptul că diferențele cronice la nivel de inflamație dintre mediu diabetic/nediabetic sunt mascate de cascada inflamatorie declanșată în cazul unui eveniment critic precum IMA.

Când am evaluat *valoarea prognostică a diferiților markeri asociați cu evoluția complicată*, am evidențiat cum cei mai buni predictorii pentru pacienții nediabetici nu au avut aceeași specificitate și sensibilitate pentru pacienții nediabetici. Mai mult, scorul N, un scor de predicție pentru evoluția cu complicații intraspitalicești, alcătuit din cei mai buni markeri rezultați ca fiind prognostici pentru pacienții nediabetici, cu o sensibilitate și o specificitate de 85% alcătuit pentru acești pacienți, este total lipsit de valoare predictivă în cazul pacienților cu diabet. Primii parametri în ordine prognostica pentru pacienții diabetici, au fost în principal inflamatori și cu evidențierea produșilor neutrofilului, în schimb ce pentru a prezice evoluția pacienților nediabetici au fost mai utili parametri referitori la comorbidități precum afectarea funcției renale (creatinină/eGFR), activității de coagulare (D-Dimeri), hipopotasemia sau vârsta.

Studiul 2- in vitro. Evaluarea profilului inflamator al neutrofilelor la pacienții cu infarct miocardic acut

1.1. Materiale si metode

Obținerea si prelucrarea neutrofilelor

Probele de sânge periferic de la 35 de pacienți cu SCA cu sau fără diabet au fost colectate în tuburi de recoltare de sânge Vacutainer EDTA. După colectarea sângelui, neutrofilele au fost izolate prin centrifugare in gradient folosind Polymorphoprep (Proteogenix) sau folosind un kit de izolare a neutrofilelor umane (Milteni) conform instrucțiunilor producătorului [35]. După izolare, neutrofilele au fost supuse:

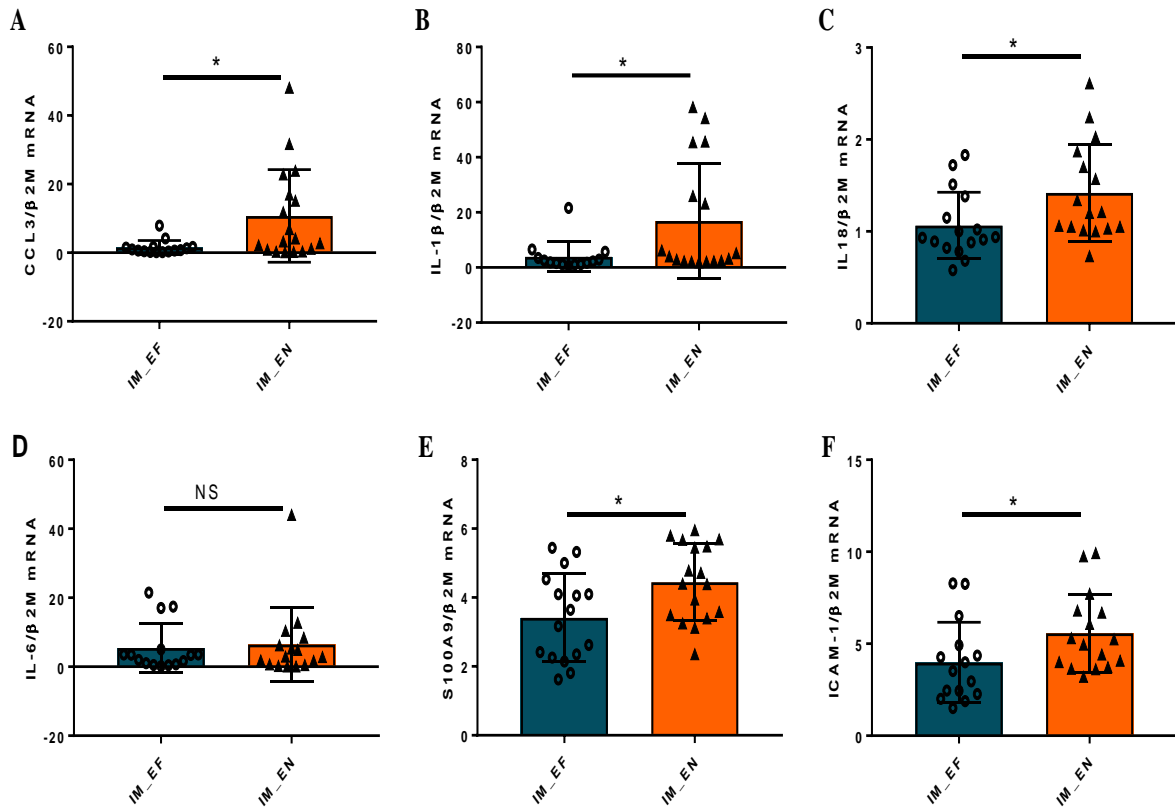
- izolării totale de ARN prin tehnica RT-PCR
- determinării expresiei proteice prin Western Blot
- măsurării speciilor reactive de oxigen
- evaluării metabolismului celular Seahorse
- detecției NET-urilor prin microscopia cu fluorescență
- Cuantificării activității neutrofil elastazei (NE)

Rezultate studiul 2.

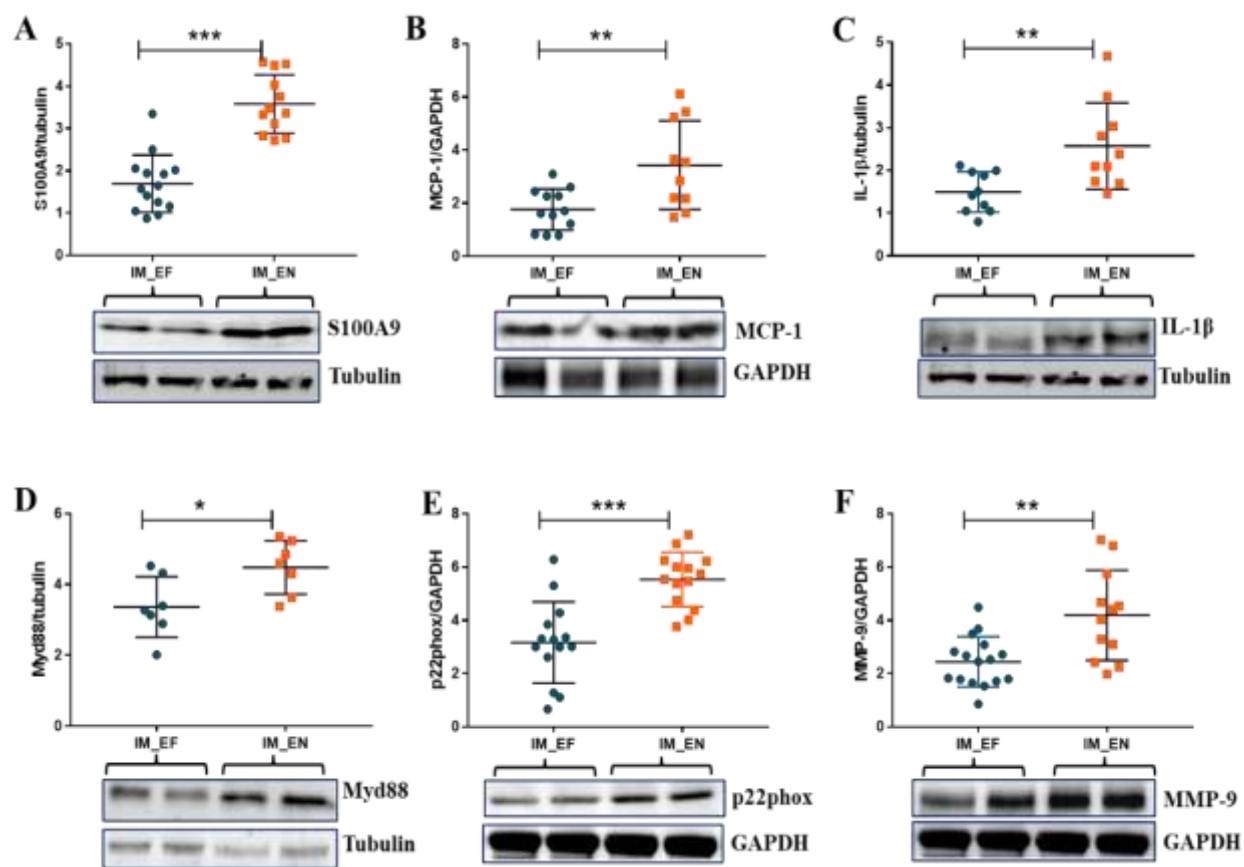
Profilul inflamator exacerbat al neutrofilelor de la pacienții IM si evoluție nefavorabilă

Deoarece datele clinice au arătat că evoluția nefavorabilă post-IM a fost asociată cu o stare inflamatorie crescută, am caracterizat și comparat profilul inflamator al neutrofilelor izolate de la pacienții cu IM cu sau fără evoluție nefavorabilă. Rezultatele de expresie genică a diferitelor molecule pro-inflamatoare au arătat că neutrofilele izolate de la pacienții cu IM cu evoluție nefavorabilă (IM_EN) au prezentat o expresie genică semnificativ crescută a majorității moleculelor pro-inflamatoare investigate: CCL3, IL-1 β , IL-18, S100A9, precum și a moleculei de adeziune celulară ICAM-1 (*Figura 5*). Și pentru că funcționalitatea acestor molecule este dată de exprimarea lor la nivel de proteină, unele din aceste molecule au fost investigate și la nivel de expresie proteică.

Analiza la nivel de expresie proteică a confirmat rezultatele de expresie genică, datele de Western Blot arătând că expresia proteică a moleculelor proinflamatorii, S100A9, MCP-1 și IL-1 β a fost semnificativ mai mare în neutrofilele de la pacienții cu evoluție negativă (**Figura 6**).



Figură 6 Neutrofilele de la pacienții cu SCA cu prognostic negativ prezintă o expresie crescută a genelor proinflamatorii. (A-E) Expresia genelor asociate cu un fenotip inflamator al neutrofilelor, CCL3, IL-1 β , IL-18, IL-6, S100A9, și ICAM-1 investigate în neutrofilele de la pacienți cu SCA (MI) sau pacienți cu SCA și evoluție nefavorabilă (MI_EN). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, (MI_EN vs. MI).

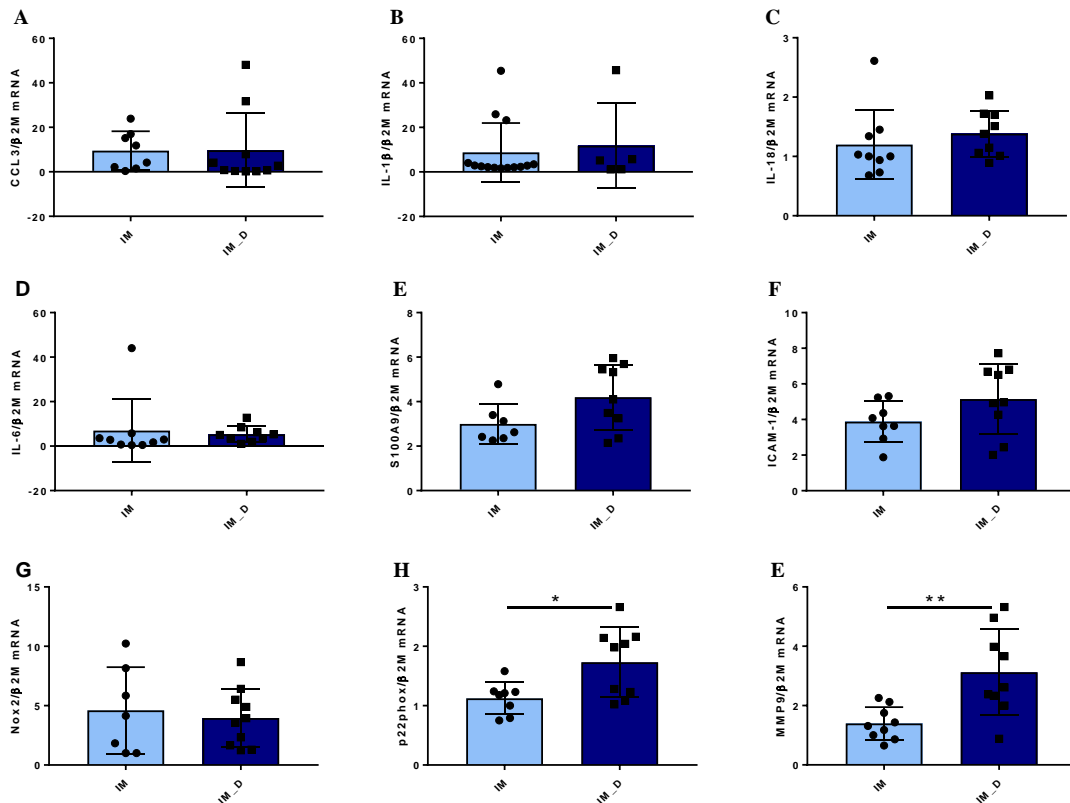


Figură 7. Expresia proteică a moleculelor proinflamatorii exprimată de neutrofile izolate de la pacienții cu SCA cu sau fără prognostic negativ (A-D). Cuantificarea expresiei proteinei și imaginile reprezentative ale moleculelor proinflamatorii S100A9, MCP-1, IL-1β și Myd88, determinate prin Western Blot. (E, F) Cuantificarea expresiei proteinelor și imaginile reprezentative ale p22phox și MMP-9, așa cum au fost determinate de Western Blot. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (pacienți cu IM versus pacienți cu IM cu evoluție nefavorabilă - MI_EN).

Profilul inflamator al neutrofilelor la pacienții cu IM, cu sau fără diabet

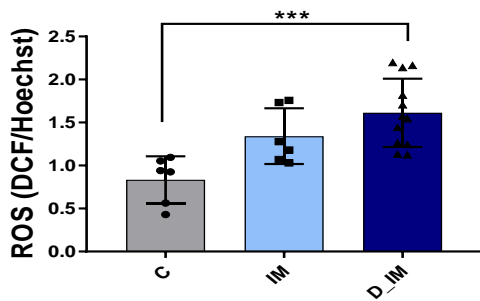
Atunci când aceleși molecule inflamatoare au fost analizate în neutrofilele de la pacienții diabetici versus cei nediabetici, rezultatele obținute nu au evidențiat diferențe semnificative în nivelurile de expresie genică ale moleculelor analizate CCL3, IL-1β, IL-18, IL-6, S100A9, ICAM-1 (**Figura 7 A-G**), date în acord cu rezultatele clinice obținute la pacienții IMA cu sau fără diabet. În studiul nostru, deși analiza moleculelor inflamatorii nu a arătat diferențe semnificative între neutrofilele pacienților cu IM cu sau fără diabet, moleculele p22phox (**Figura 7 H**) care fac parte din

complexul activ al NADPH oxidazei implicat in producerea de ROS, dar și expresia MMP-9 (*Figura 7 E*) au fost semnificativ crescute la neutrofilele de la diabetici, în comparație cu pacienții nediabetici.



Figură 8 Expresia genică a moleculelor proinflamatorii în neutrofile izolate de la pacienții cu infarct miocardic (IM) cu sau fără diabet (D). Analiza qPCR (A-E) a markerilor pro-inflamatorii CCL3, IL-1β, IL-18, IL-6, S100A9 și ICAM-1.. Expresiile moleculelor p22phox și MMP-9 sunt semnificativ crescute la neutrofilele izolate de la pacienții diabetici, comparativ cu nondiabetici (H-E). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ IM_D versus IM).

Pentru a confirma că stresul oxidativ este cel care face diferența între neutrofilele pacienților cu IM cu sau fără diabet, am analizat in continuare speciile reactive de oxigen (ROS) produse de neutrofilele izolate de la cele doua categorii de pacienți.

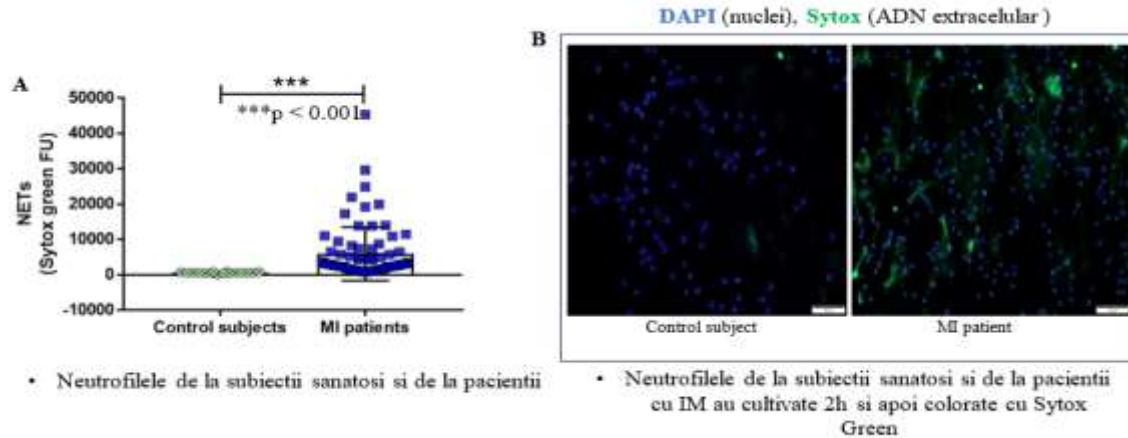


Figură 9 Cuantificarea ROS intracelulară s-a efectuat folosind fluoroforul DCF-DA. Datele sunt prezentate ca nivele crescute fata de control \pm SE. Semnificația statistică este prezentată ca, *** $<0,001$.

Rezultatele obținute arată că într-adevăr, neutrofilele de la pacienții IM cu diabet produc un nivel mai mare de ROS comparativ cu neutrofilele de la pacienții cu IM fără diabet și un nivel semnificativ, aproape dublu, fata de neutrofilele de la subiecți sănătoși (**Figura 8**).

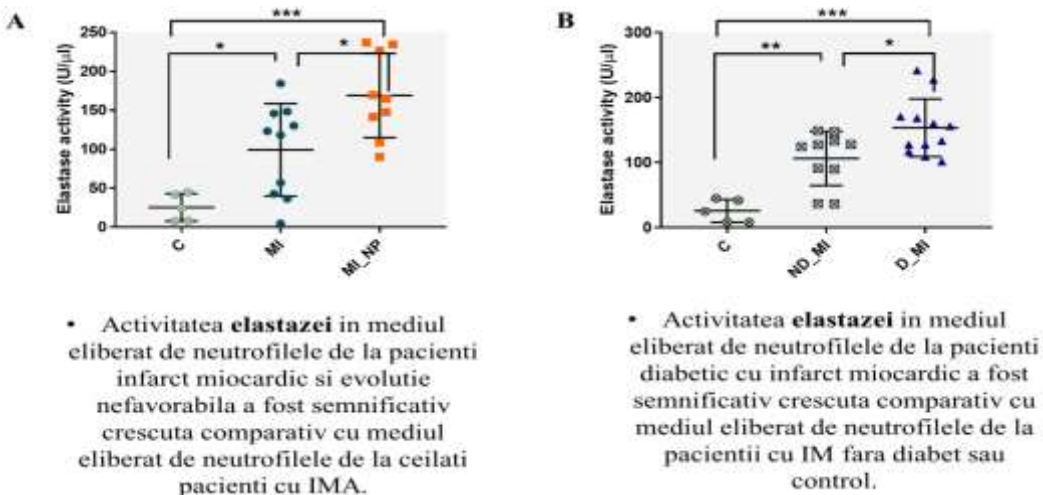
Expresia NET în serul și neutrofilele pacienților cu IMA

Pe lângă moleculele inflamatorii, activarea neutrofilelor și degranularea implică, de asemenea, formarea de NET și eliberarea diferitelor enzime, inclusiv elastaza neutrofilică (NE) și mieloperoxidaza (MPO), cu roluri cheie atât în apărarea gazdei cât și în diferite patologii [36,37]. Prin urmare, am dorit să comparăm nivelurile de NET din mediul condiționat al neutrofilelor atât de la subiecți sănătoși, cât și de la pacienții cu IM care au fost expuși 1h la 50nM PMA, folosind Sytox green, iar rezultatele au arătat faptul că pacienții cu IM prezintă un nivel crescut de NET (**Figura 9-stanga**). Acest rezultat a fost confirmat și prin microscopie de fluorescență unde s-a observat că după 2 ore de cultură, neutrofilele de la pacienții cu IM au eliberat mai multe NET comparativ cu neutrofilele control (**Figura 9-dreapta**).



Figură 10 Evaluarea NET-urilor eliberate de neutrofilele de la pacienții cu IM. (A) Nivelurile NET în mediul de condiționat ale neutrofilelor de la subiecți sănătoși și de la pacienți cu IM, expuse timp de 1 oră la 50 mM PMA, și evaluate prin colorare acu fluoroforul Sytox green. (B) Colorarea fluorescența (Sytox Green) a NET în neutrofile izolate de la un subiect sănătos versus neutrofile izolate de la un pacient cu IM, după 2 ore în cultură (verde). Nucleii neutrofilelor sunt colorați cu DAPI (albastru). *** $p < 0,001$ pacient cu IM versus subiect sănătos.

Analiza la nivel de expresie proteica a NE a arătat diferențele semnificative ale activității acestora la neutrofilele de la pacienții cu IM cu prognostic favorabil versus nefavorabil (**Figura 10-stanga**). În plus, s-au determinat niveluri de activitate a elastazei crescute în secretomul neutrofilelor de la pacienții diabetici cu infarct comparativ cu cel al pacienților nediabetici (**Figura 10-dreapta**).



Figură 11 Activitatea elastazei neutrofilului în funcție de grup.

Discuții studiu 2.

În studiul din acest capitol am făcut un pas înainte și am investigat fenotipul neutrofilelor la pacienții cu IM, diabetici sau nu, cu prognoză favorabilă sau nefavorabilă, pentru a găsi acel fenotip care definește neutrofilului responsabil de agravarea evoluției post-IM. Analiza detaliată, în vitro, a neutrofilelor pacienților cu IM a generat rezultate interesante care vin să susțină datele clinice, și care arată un fenotip alterat, mai agresiv al neutrofilelor de la pacienții cu IM și evoluție nefavorabilă. Astfel, atunci când au fost analizate și comparate neutrofilele de la subiecții sănătoși cu cele de la pacienții cu IM, toate moleculele inflamatorii au fost semnificativ crescute în neutrofilele de la pacienții cu IM. Acest profil modificat al neutrofilelor a fost însoțit, în plus, de un nivel exacerbant de NET găsit atât în ser, cât și în neutrofilele de la pacienții cu IM, în comparație cu martorii sănătoși.

Analiza comparativă a neutrofilelor de la pacienții cu IM cu evoluție nefavorabilă versus cei cu evoluție favorabilă a evidențiat o creștere semnificativă a citokinelor inflamatorii, precum CCL3, IL-1 β , IL-18 și alarmina S100A9.

Când a fost comparată expresia genică a aceluiași molecule între neutrofilele de la pacienții cu IM cu sau fără diabet, aceste diferențe semnificative au dispărut, rezultat care poate sugera din nou, ca și în studiul clinic, că inflamația exacerbată din faza acută post-IM maschează efectele specifice induse de hiperglicemia cronică, făcându-le nedetectabile în acest context. Deși moleculele inflamatorii nu au prezentat o expresie semnificativ diferită între pacienții diabetici versus cei nondiabetici, totuși componente ale complexului enzimatic NADPH oxidaza, principala sursă de producere a speciilor reactive de oxigen, au fost semnificativ crescute în neutrofilele pacienților diabetici versus nondiabetici. În plus la moleculele asociate cu stresul oxidativ, o altă moleculă din studiul de față, găsită semnificativ diferită în neutrofilele pacienților diabetici versus non-diabetici a fost MMP-9, care a prezentat nivele semnificativ crescute la pacienții diabetici cu IM. MMP-9 este un biomarker potențial pentru remodelarea cardiacă, așa cum a fost demonstrat anterior, atât în modelele animale, cât și în studiile clinice [38]. La cuantificarea ROS, rezultatele obținute arată că într-adevăr, neutrofilele de la pacienții IM cu diabet produc un nivel mai mare de ROS comparativ cu neutrofilele de la pacienții cu IM fără diabet, rezultat care poate explica cel puțin parțial progresia rapidă și nefavorabilă întâlnită la pacienții diabetici, post IM

Elastaza alături de mieloperoxidaza sunt enzime proinflamatoare implicate în leziunile tisulare în diferite patologii incluzând bolile ischemice cardiovasculare [39,40]. Rezultatele

analizei expresiei proteice a acestor molecule neutrofilice granulare, din studiul de fata, a arătat niveluri ale NE crescute semnificativ în neutrofilele de la pacienții cu IM cu evoluție nefavorabilă, comparativ cu cei cu evoluție favorabilă. Mai mult, activitatea NE a fost găsită crescută în serul acestor pacienți dar și al pacienților cu IM cu diabet, indicând starea de activare a neutrofilelor. Expresia și activitatea crescută a NE de către neutrofile de la pacienții cu IM cu evoluție nefavorabilă sau cu diabet ar putea reprezenta de asemenea, un factor care contribuie la progresia adversă post-IM la acești indivizi. Studiul 2 a confirmat rezultatele noastre clinice anterioare, arătând că nu există diferențe semnificative cantitative între parametrii inflamatori la diabetici și non-diabetici. Totuși, primii biomarkeri ca valoarea de predicție din studiul 1 pentru pacienții diabetici au rezultat a fi inflamatori, sugerând un profil mai agresiv al moleculelor inflamaatorii, dintre acestea distingându-se activitatea neutrofilului. La analiza in vitro, in cazul diabeticilor, activitatea speciilor reactive ROS si NE este crescută în neutrofile. De asemenea, MMP-9, un biomarker potențial pentru remodelarea cardiacă, a fost semnificativ crescut la pacienții diabetici cu IMA.

Împreună, datele din acest capitol aduc dovezi că fenotipul neutrofilelor de la pacienții cu IM suferă transformări care sunt responsabile de evoluția intraspitaliceasca nefavorabilă a pacienților cu IM. Diferențele notabile în profilurile inflamatorii observate la neutrofile de la pacienții cu IM cu o evoluție complicată în spital, care implică modificări potențiale ale răspunsului imun înnăscut în cadrul acestui grup specific de pacienți, pot explica cel puțin parțial, rolul neutrofilelor cu un fenotip alterat asupra evoluției ulterioare a bolii.

Concluzii finale și contribuții personale:

Concluzionând, datele noastre indică faptul că evoluția nefavorabilă în spital a pacienților cu infarct miocardic (IM) este asociată cu markerii inflamatori sistemici și că biomarkerii neutrofilici sunt mai predictivi pentru prognosticul pe termen scurt în cazul diabeticilor. În acest studiu am făcut un pas înainte și am investigat în vitro fenotipul neutrofilelor la pacienții cu IM, diabetici sau nu, cu prognoza favorabilă sau nefavorabilă, pentru a găsi fenotipul neutrofilului responsabil de agravarea evoluției post-IM.

Neutrofilele circulante ale pacienților cu IMA manifestă un fenotip pro-inflamator modificat, chiar înainte de a ajunge la zona infarctată, fenotip care este mai pronunțat la pacienții cu un prognostic negativ. Diferențele semnificative în profilurile inflamatorii ale neutrofilelor de la

pacienții cu IM care au avut o evoluție complicată în spital sugerează posibile modificări ale răspunsului imun înăscut în acest grup specific de pacienți, cu potențiale efecte adverse asupra evoluției bolii.

Studiul aduce elemente de noutate întrucât evaluează parametri de risc în IM prin prisma unor grupuri mai omogene, separând pacienții în funcție de statusul diabetic, știut fiind faptul că prognosticul pacienților cu diabet este diferit. Raționamentul a fost validat prin rezultatele obținute, care arată cei mai buni predictori pentru pacienții nediabetici nu au avut aceeași specificitate și sensibilitate pentru pacienții diabetici, de unde rezultă și scoruri de prognostic total diferite pentru cele 2 categorii de pacienți și necesitatea unor măsuri specifice de stratificare a riscului, aplicate în funcție de mediul diabetic.

Integrarea în studiu a noțiunilor de cardiologie, diabetologie și imunologie ne apropie de descifrarea mecanismelor patologice complexe, care nu sunt limitate la un singur sistem și care încep la nivel molecular. Eforturile de cercetare ar trebui să se concentreze din toate aceste direcții pe identificarea și înțelegerea mecanismelor patogenice inflamatorii pentru a dezvolta noi strategii de prevenție și tratament.

Principalele limite ale acestui studiu, provin din evaluarea pacienților pe termen scurt, în cadrul evenimentului index. Aceste limite provin din design-ul complex al studiului, care își propune să efectueze profilul de risc în infarctul miocardic acut și să efectueze analiză detaliată in vitro a principalelor observații clinice și din faptul că înrolarea în studiu și din faptul că evaluările s-au desfășurat în perioade de restricție din timpul pandemiei SARS COV2 .

Este important de menționat și faptul că totalitatea rezultatelor generate de această teză de doctorat reprezintă de fapt un merit comun al întregului colectiv din Clinica de Cardiologie a Spitalului Universitar de Urgență Elias și în mod particular al laboratorului de Biopatologie și Terapia Inflamației din cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”.

Bibliografie selectivă :

1. Cardiovascular diseases [Internet]. [cited 2021 Jun 20]. Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1
2. Wong ND, Sattar N. Cardiovascular risk in diabetes mellitus: epidemiology, assessment and prevention. *Nat Rev Cardiol* 2023 2010 [Internet]. 2023 May 16 [cited 2024 Jan 24];20(10):685–95. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41569-023-00877-z>
3. Ma CX, Ma XN, Guan CH, Li YD, Mauricio D, Fu SB. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: progress toward personalized management. *Cardiovasc Diabetol* 2022 211 [Internet]. 2022 May 14 [cited 2024 Jan 24];21(1):1–15. Available from: <https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-022-01516-6>
4. Barbu E, Popescu MR, Popescu AC, Balanescu SM. Inflammation as A Precursor of Atherothrombosis, Diabetes and Early Vascular Aging. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Jan 22];23(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35778078/>
5. Libby P, Everett BM. Novel Antiatherosclerotic Therapies [Internet]. Vol. 39, Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. NLM (Medline); 2019 [cited 2021 Jun 23]. p. 538–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30816799/>
6. Libby P. Inflammation during the life cycle of the atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2021 Nov 15 [cited 2024 Mar 13];117(13):2525–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34550337/>
7. Klingenberg R, Nitschmann S. Colchicine treatment after myocardial infarction: Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial (COLCOT). *Internist* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2020 Nov 14];61(7):766–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32103281/>
8. Samuel M, Tardif J-C, Khairy P, Roubille F, Waters DD, Grégoire JC, Pinto FJ, Maggioni AP, Diaz R, Berry C, et al. Cost-effectiveness of low-dose colchicine after myocardial infarction in the Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial (COLCOT). *Eur Hear J - Qual Care Clin Outcomes* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2020 Nov 14]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32407460/>
9. Hennessy T, Soh L, Bowman M, Kurup R, Schultz C, Patel S, Hillis GS. The Low Dose Colchicine after Myocardial Infarction (LoDoCo-MI) study: A pilot randomized placebo controlled trial of colchicine following acute myocardial infarction. *Am Heart J* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2020 Nov 14];215:62–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31284074/>
10. Abstract 12959: Inflammation and Diabetes Mellitus in Acute Myocardial Infarction. Are They Risk Equivalent of Short-Term and Long-Term Prognosis? | *Circulation* [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/circ.140.suppl_1.12959
11. Barbu E, Mihaila AC, Gan A-M, Ciortan L, Macarie RD, Tucureanu MM, Filippi A, Stoenescu AI, Petrea SV, Simionescu M, et al. The Elevated Inflammatory Status of Neutrophils Is Related to In-Hospital Complications in Patients with Acute Coronary Syndrome and Has Important Prognosis Value for Diabetic Patients. *Int J Mol Sci* 2024, Vol 25, Page 5107 [Internet]. 2024 May 8 [cited 2024 May 26];25(10):5107. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/10/5107/htm>
12. Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ Res* [Internet]. 2005 May 13 [cited 2024 Mar 20];96(9):939–49. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.res.0000163635.62927.34>
13. Lorenzatti AJ. Anti-inflammatory Treatment and Cardiovascular Outcomes: Results of Clinical Trials. *Eur Cardiol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Mar 30];16:e15–e15. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC8086421>
14. Maréchal P, Tridetti J, Nguyen ML, Wéra O, Jiang Z, Gustin M, Donneau AF, Oury C, Lancellotti P. Neutrophil Phenotypes in Coronary Artery Disease. *J Clin Med* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 Mar 17];9(5):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32466264/>
15. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*

- [Internet]. 2018 Feb 20 [cited 2024 Mar 13];9(FEB):113. Available from: [/pmc/articles/PMC5826082/](#)
16. Wu Y, Wei S, Wu X, Li Y, Han X. Neutrophil extracellular traps in acute coronary syndrome. *J Inflamm (United Kingdom)* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Mar 14];20(1):1–11. Available from: <https://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12950-023-00344-z>
 17. Kurup R, Patel S. Neutrophils in Acute Coronary Syndrome. *EMJ Cardiol* 51 2017 [Internet]. 2017 Oct 12 [cited 2024 Mar 14];5(1):79–87. Available from: <https://www.emjreviews.com/cardiology/article/neutrophils-in-acute-coronary-syndrome/>
 18. Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MCL, Cooper MA. Neutrophils - A key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock* [Internet]. 2013 Dec [cited 2023 Sep 27];40(6):463–70. Available from: https://journals.lww.com/shockjournal/fulltext/2013/12000/neutrophils_a_key_component_of.4.aspx
 19. Libby P. Targeting Inflammatory Pathways in Cardiovascular Disease: The Inflammasome, Interleukin-1, Interleukin-6 and Beyond. *Cells*. 2021/05/01. 2021;10(4):951.
 20. Ge L, Zhou X, Ji WJ, Lu RY, Zhang Y, Zhang YD, Ma YQ, Zhao JH, Li YM. Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2023 Oct 1];308(5):H500–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25527775/>
 21. Cowled P, Fitridge R. Pathophysiology of Reperfusion Injury. *Mech Vasc Dis A Ref B Vasc Spec* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2024 Mar 18];331–50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534267/>
 22. Ma Y. Role of Neutrophils in Cardiac Injury and Repair Following Myocardial Infarction. *Cells* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Oct 1];10(7):1676. Available from: [/pmc/articles/PMC8305164/](#)
 23. Mihaila AC, Ciortan L, Macarie RD, Vadana M, Cecoltan S, Preda MB, Hudita A, Gan AM, Jakobsson G, Tucureanu MM, et al. Transcriptional Profiling and Functional Analysis of N1/N2 Neutrophils Reveal an Immunomodulatory Effect of S100A9-Blockade on the Pro-Inflammatory N1 Subpopulation. 2021 Aug 10 [cited 2022 Sep 6];12:708770. Available from: [/pmc/articles/PMC8384118/](#)
 24. Tavares F, Moraes PIM, Souza JM, Barbosa AH, Santos EM, Marcondes JA, Oliveira MD, Gonçalves I, Espírito Santo CVA, Bianco HT, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing to pharmaco-invasive strategy. *Cardiovasc Revasc Med* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Mar 17];34:99–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33736961/>
 25. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD, Corbett S, Chettibi M, Hayrapetyan H, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* [Internet]. 2018 Nov 13 [cited 2023 Sep 1];138(20):e618–51. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIR.0000000000000617>
 26. Group TMPR. Risk Stratification and Survival after Myocardial Infarction. <http://dx.doi.org/101056/NEJM198308113090602> [Internet]. 2010 Jan 19 [cited 2024 Mar 6];309(6):331–6. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198308113090602>
 27. Volpi A, De Vita C, Franzosi MG, Geraci E, Aldo ;, Maggioni P, Mauri F, Negri E, Santoro E, Tavazzi L, et al. Determinants of 6-month mortality in survivors of myocardial infarction after thrombolysis. Results of the GISSI-2 data base. The Ad hoc Working Group of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-2 Data Base. *Circulation* [Internet]. 1993 Aug [cited 2024 Mar 6];88(2):416–29. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.CIR.88.2.416>
 28. Peng H, Wu H, Zhang G, Zhang W, Guo Y, Chang L, Chen S, Xue R, Zhang S. Expression and Clinical Prognostic Value of Platelet NLRP3 in Acute Coronary Syndrome. *Int J Gen Med* [Internet]. 2020 [cited 2024 Mar 6];13:791–802. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33116771/>
 29. De Gennaro L, Brunetti ND, Montrone D, De Rosa F, Cuculo A, Di Biase M. Subacute inflammatory activation in subjects with acute coronary syndrome and left ventricular dysfunction. *Inflammation* [Internet]. 2012 Feb [cited 2024 Mar 6];35(1):363–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21487907/>

30. Seabold S, Perktold J. Statsmodels: Econometric and Statistical Modeling with Python. PROC 9th PYTHON Sci CONF [Internet]. 2010 [cited 2024 Mar 5]; Available from: <http://statsmodels.sourceforge.net/>
31. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. Nat Methods 2020 173 [Internet]. 2020 Feb 3 [cited 2024 Mar 5];17(3):261–72. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41592-019-0686-2>
32. Pedregosa FABIANPEDREGOSA F, Michel V, Grisel OLIVIERGRISEL O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Vanderplas J, Cournapeau D, Pedregosa F, Varoquaux G, et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python Gaël Varoquaux Bertrand Thirion Vincent Dubourg Alexandre Passos PEDREGOSA, VAROQUAUX, GRAMFORT ET AL. Matthieu Perrot. J Mach Learn Res [Internet]. 2011 [cited 2024 Mar 6];12:2825–30. Available from: <http://scikit-learn.sourceforge.net>.
33. Tian J, Liu Y, Liu Y, Song X, Zhang M, Xu F, Yuan F, Lyu S. Prognostic Association of Circulating Neutrophil Count with No-Reflow in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction following Successful Primary Percutaneous Intervention. Dis Markers [Internet]. 2017 [cited 2023 Oct 1];2017. Available from: </pmc/articles/PMC5742887/>
34. Ma Y. Role of Neutrophils in Cardiac Injury and Repair Following Myocardial Infarction. Cells 2021, Vol 10, Page 1676 [Internet]. 2021 Jul 2 [cited 2023 Sep 27];10(7):1676. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/7/1676/htm>
35. Mihaila AC, Ciortan L, Macarie RD, Vadana M, Cecoltan S, Preda MB, Hudita A, Gan AM, Jakobsson G, Tucureanu MM, et al. Transcriptional Profiling and Functional Analysis of N1/N2 Neutrophils Reveal an Immunomodulatory Effect of S100A9-Blockade on the Pro-Inflammatory N1 Subpopulation. Front Immunol [Internet]. 2021 Aug 10 [cited 2024 Mar 30];12:708770. Available from: www.frontiersin.org
36. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J Cell Biol [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2024 Mar 30];191(3):677–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20974816/>
37. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. Clin Rev Allergy Immunol [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2024 Mar 30];61(2):194–211. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32740860/>
38. Halade G V., Jin YF, Lindsey ML. Matrix Metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. Pharmacol Ther [Internet]. 2013 Jul [cited 2024 Mar 30];139(1):32. Available from: </pmc/articles/PMC3660444/>
39. Sawicki M, Sypniewska G, Kozinski M, Gruszka M, Krintus M, Obonska K, Pilaczynska-Cemel M, Kubica J. Diagnostic efficacy of myeloperoxidase for the detection of acute coronary syndromes. Eur J Clin Invest [Internet]. 2011 Jun [cited 2024 Mar 30];41(6):667–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21226709/>
40. Voisin MB, Leoni G, Woodfin A, Loumagne L, Patel NSA, Di Paola R, Cuzzocrea S, Thiemermann C, Perretti M, Nourshargh S. Neutrophil elastase plays a non-redundant role in remodeling the venular basement membrane and neutrophil diapedesis post-ischemia/reperfusion injury. J Pathol [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Mar 30];248(1):88–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30632166/>

LISTA DE PUBLICAȚII ȘI LUCRĂRI

1. **Barbu E, Mihaila AC, Gan A-M, Ciortan L, Macarie RD, Tucureanu MM, Filippi A, Stoenescu AI, Petrea SV, Simionescu M, et al. The Elevated Inflammatory Status of Neutrophils Is Related to In-Hospital Complications in Patients with Acute Coronary Syndrome and Has Important Prognosis Value for Diabetic Patients.** Int J Mol Sci 2024, Vol 25, Page 5107 [Internet]. 2024 May 8 [cited 2024 May 26];25(10):5107. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/10/5107/htm> DOI: [10.3390/IJMS25105107](https://doi.org/10.3390/IJMS25105107); Factor Impact 5.6
2. **Barbu E, Popescu MR, Popescu AC, Balanescu SM. Inflammation as A Precursor of Atherothrombosis, Diabetes and Early Vascular Aging.** Int J Mol Sci [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Jan 22];23(2). Available from: /pmc/articles/PMC8778078/ DOI: [10.3390/IJMS23020963](https://doi.org/10.3390/IJMS23020963); Factor Impact 5.6
3. **Barbu E, Popescu MR, Popescu AC, Balanescu SM. Phenotyping the Prediabetic Population-A Closer Look at Intermediate Glucose Status and Cardiovascular Disease.** Int J Mol Sci [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Jan 22];22(13). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34202289/> DOI: [10.3390/IJMS22136864](https://doi.org/10.3390/IJMS22136864)
4. **Lechea E, Popescu M, Dimulescu D, Godoroja D, Copaescu C. The Impact of Bariatric Surgery on Diabetes and Other Cardiovascular Risk Factors.** Chirurgia (Bucur) [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Jan 8];114(6):725–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31928577/> DOI: [10.21614/CHIRURGIA.114.6.725](https://doi.org/10.21614/CHIRURGIA.114.6.725)