
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Modularea terapeutică a modificărilor adaptative (morfologice și funcționale) în HTA esențială în relație cu biomarkeri ai sistemului renină angiotensină aldosteron

Doctorand **Oana Codrea Mocan**

Conducător de doctorat Prof. dr. **Lucia Maria Procopciuc**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	19
1. Hipertensiunea arterială esențială	21
1.1. Considerații generale -Definiție, clasificare, măsurare	21
1.2. Prevalența hipertensiunii arteriale	21
1.3. Importanța hipertensiunii arteriale esențiale	21
2. Sistemul renină angiotensină aldosteron	26
2.1. Introducere	26
2.2. Fiziologia SRAA	26
3. Genetică	29
3.1. <i>M235T</i> - AGT	30
3.2. <i>T174M</i> - AGT	30
3.3. <i>I/D</i> - ECA	31
3.4. <i>A2350C</i> - ECA8	32
3.5. <i>A1166C</i> - R1AngII	32
3.6. <i>A3123C</i> - R2AngII	33
3.7. <i>G83A</i> - REN	33
4. Tratamentul hipertensiunii arteriale	34
4.1. Generalități	34
4.2. Inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei	34
4.3. Blocanții receptorilor angiotensinei	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	37
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
1.1. Ipoteza generală a cercetării personale	39
1.2. Obiectivele cercetării generale	39
2. Metodologie generală	40
2.1. Design-ul studiilor	40
2.2. Selectarea pacienților	40
2.3. Examinarea clinică	41
2.4. Analize de laborator	42
2.5. Ultrasonografia	42
2.6. Metode folosite pentru evaluarea variațiilor genetice	42
2.7. Analiza statistică	44
3. Studiul 1 - Asocierea dintre polimorfismele genetice ale SRAA și ateromatoza carotidiană la pacienții cu HTA esențială	45

3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	46
3.3. Material și metodă	46
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	70
3.6. Concluzii	73
4. Studiul 2 - Rolul polimorfismelor genetice ale SRAA în remodelarea cardiacă morfologică și funcțională la pacienții hipertensivi	75
4.1. Introducere	75
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	77
4.3. Material și metodă	77
4.4. Rezultate	79
4.5. Discuții	88
4.5.1. Caracteristicile pacienților în asociere cu HVS și DDVS	88
4.5.2. Polimorfismul genetic al SRAA în asociere cu HVS și DDVS	89
4.6. Concluzii	92
5. Studiul 3 Modularea terapeutică a modificărilor adaptative (morfologice și funcționale) cardio-vasculare în HTA în relație cu polimorfismul genetic al SRAA	93
5.1. Introducere	93
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	96
5.3. Material și metodă	96
5.4. Rezultate	99
5.5. Discuții	120
5.5.1. Caracteristicile pacienților hipertensivi în cele două grupuri sub tratament cu IECa sau BRA	120
5.5.2. Evoluția parametrilor cardio-vasculari în funcție de polimorfismele genetice ale SRAA	121
5.6. Concluzii	124
6. Concluzii generale (sinteză)	125
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	127
REFERINȚE	129

Cuvinte cheie: hipertensiunea arterială esențială, sistemul renină angiotensină aldosteron, polimorfismele genetice, ateromatoza carotidiană, hipertrofia ventriculară stângă, disfuncția diastolică a ventriculului stâng, inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei, blocanții receptorilor angiotensinei

INTRODUCERE

Hipertensiunea arterială (HTA) reprezintă un factor de risc cardio-vascular major, cu o incidență crescută pentru evenimentele ischemice cardiace și cerebrovasculare. HTA esențială este o boală poligenică. Unul dintre sistemele implicate în etiologia HTA este sistemul renină angiotensină aldosteron (SRAA), care intervine în patogeneza ateromatozei (ATS) și a remodelării cardiace.

Polimorfismul genetic al SRAA poate influența răspunsul la tratament, evoluția și prognosticul bolii. Scopul acestei lucrări a fost de a identifica modificările adaptative cardiace și vasculare ale HTA esențiale în relație cu polimorfismul genetic al SRAA și de a evalua răspunsul la tratament în funcție de profilul genetic al pacienților hipertensivi.

Observațiile desprinse din această lucrare deschid noi perspective pentru pacientul hipertensiv, în ceea ce privește stadializarea bolii, evaluarea prognosticului și a răspunsului la tratament, în funcție de polimorfismul genetic.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

HTA esențială este principala cauză de mortalitate generală la nivel global și european, acest aspect fiind atribuit și îmbătrânirii populației. Evaluarea riscului cardio-vascular la pacienții hipertensivi se estimează prin afectarea de organ țintă mediată de hipertensiunea arterială (AOTMH). Această evaluare permite clasificarea HTA și administrarea tratamentului antihipertensiv.

Hipertrofia ventriculară stângă (HVS) este un factor de predicție negativ, independent pentru mortalitatea la pacienții cu HTA esențială. În evoluția HTA remodelarea prin HVS se complică cu insuficiența cardiacă (IC) cu fracție de ejeție (FE) păstrată, respectiv disfuncția diastolică a VS (DDVS).

Ateromatoza carotidiană (AC) și creșterea grosimii intimei medii (GIM) de la nivelul axului carotido-vertebral sunt manifestări ale bolii aterosclerotice și au valoare predictivă pentru evenimentele ischemice cardio-vasculare și cerebrovasculare.

Presiunea pulsului (PP) este considerat indicator pentru rigiditatea arterială și ATS arterială, induce apariția fenomenului de ATS și a trombozelor in situ.

Componentele SRAA sunt renina (REN), angiotensinogenul (AGT), enzima de conversie a angiotensinei I în angiotensina II (ECA), angiotensina I (AngI), angiotensina

II (AngII), receptorul de tip 1 al AngII (R1 AngII), receptorul de tip 2 al AngII (R2 AngII) și aldosteronul.

Rolul polimorfismelor genetice poate interveni în etiopatogenia HTA esențiale. Dintre polimorfismele genetice situate în genele care codifică componentele SRAA asociate cu HTA amintim *M235T* și *T174M* (gena AGT), *I/D* și *A2350C* (gena ECA), *A1166C* (gena R1 AngII), *A3123C* (gena R2 AngII), *G83A* (gena REN).

Inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei (IECA) și blocanții receptorului angiotensinei (BRA) reprezintă cele mai utilizate antihipertensive, au eficacitate medicamentoasă similară asupra evenimentelor cardio-vasculare majore și a mortalității.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Lotul de studiu a inclus în total 165 de pacienți diagnosticați cu HTA esențială (în tratament), cât și pacienți nou diagnosticați cu HTA esențială. Pacienții au fost recrutați din 3 centre medicale din Cluj Napoca, anume Clinica Medicală IV, Clinica Medicală V și Spitalul Polaris, din ambulatoriu și din secțiile de medicină internă, respectiv cardiologie, în perioada iunie 2015- decembrie 2017. Pentru omogenitatea lotului studiat am exclus din studiu pacienți cu HTA secundară, FE a ventriculului stâng (VS) sub 50%, cu IC clasa funcțională NYHA III și IV, cu boală coronariană instabilă, boală renală acută, boală renală cronică cu rată de filtrare glomerulară <30 ml/min/1,72m² sau în faza de dializă.

Protocolul de cercetare a fost analizat și aprobat de Comisia de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca, pentru toate studiile desfășurate în cadrul acestei cercetări doctorale.

Studiul 1. Asocierea dintre polimorfismele genetice ale SRAA și ateromatoza carotidiană (AC) la pacienții cu HTA esențială

Introducere: AC și GIM crescută de la nivelul axului carotido-vertebral sunt manifestări ale bolii aterosclerotice și marker de diagnostic pentru cardiopatia ischemică și boala ischemică cerebro-vasculară. Polimorfismele genetice ale SRAA sunt implicate în patogeneza ATS.

Ipozeza de lucru: Obiectivul studiului nostru a fost de a analiza polimorfismele genetice ale SRAA la pacienții cu HTA esențială și relația acestor mutații cu AC ca factori predictivi pentru evenimentele ischemice cerebro-vasculare.

Material și metodă: În studiu au fost incluși 162 de pacienți hipertensivi. La toți pacienții s-au efectuat anamneza detaliată, examenul obiectiv, prin care s-au măsurat indicele de masă corporală (IMC), valorile tensiunii arteriale (TA) sistolice

(TAS), TA diastolice (TAD) și s-au exclus alte cauze de HTA secundară. S-au notat factorii de risc asociați, cum ar fi dislipidemia, diabetul zaharat și steatoza hepatică (SH) non alcoolică. S-au efectuat următoarele analize de laborator: colesterolul total, trigliceridele (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) și funcția renală (uree, creatinină), după metodele de laborator standard.

S-a efectuat ecografia doppler a arterelor carotide pentru a diagnostica prezența plăcilor de ATS. De asemenea, s-a efectuat ecografia abdominală pentru a evalua prezența sau absența SH. La toți pacienții incluși în studiu, pentru identificarea genotipurilor SRAA (*M235T-AGT*, *T174M-AGT*, *I/D-ECA*, *A2350C-ECA8*, *A1166C-R1AngII*, *A3123C-R2AngII* și *G83A-REN*), s-au folosit metode specifice PCR-RFLP.

Analizele statistice au fost efectuate în mediu R versiunea 3.6.2, iar pentru asociațiile genetice s-a utilizat pachetul SNPAssociation 1.9-2.

Rezultate: Din cei 162 pacienți hipertensivi incluși în studiu, 73 au prezentat AC. Rezultatele obținute arată un număr semnificativ statistic mai mare al pacienților hipertensivi cu AC cu vârsta mai mare de 60 de ani comparativ cu cei fără AC ($p < 0.001$). Am constatat o asociere semnificativă statistic între prezența AC și hipertrigliceridemie (HTG) ($p = 0.021$). Pacienții hipertensivi cu AC au prezentat într-un număr semnificativ mai mare TG > 130 mg/dl ($p = 0.049$), creșterea GIM la nivelul axului carotidian ($p < 0.001$) și HVS ($p = 0.002$) comparativ cu pacienții hipertensivi fără AC.

În ceea ce privește polimorfismul *M235T-AGT*, în modelul dominant șansa ca un pacient să aibă AC a fost de 2.17 (95% CI 1.08-4.53) ori mai mare la pacienții purtători ai genotipului *MT235-TT235* față de *MM235*, asocierea fiind statistic semnificativă ($p = 0.0298$). Am constatat că asocierea se menține și după ajustarea pentru variabile de confuzie (vârstă, sex, SH și LDL-C) cu o șansă de 2.3 (95% CI 1.05-5.26) ori mai mare de a avea AC ($p = 0.041$) pentru pacienții purtători ai genotipurilor *MT235-TT235*.

Concluzii: Rezultatele noastre au arătat asocierea dintre polimorfismul *M235T-AGT* și AC, după ajustarea factorilor de confuzie și control pentru HTA. Nu am găsit corelație statistică între AC și variațiile genetice *I/D-ECA*, *T174M-AGT*, *A2350C-ECA8*, *A1166C-R1 AngII*, *A3123C-R2 AngII* și *G83A-REN*.

Studiul 2. Rolul polimorfismelor genetice ale SRAA în remodelarea cardiacă morfologică și funcțională la pacienții hipertensivi

Introducere: HTA esențială este asociată cu risc crescut pentru afectarea de organ, incluzând HVS. SRAA este implicat în procesul fiziopatologic al remodelării cardiace, în creșterea postsarcinii VS, efect care este independent de valorile TA și factorii neuro-umoralii. Variațiile genetice ale SRAA sunt implicate în remodelarea cardiacă a VS, posibil în mecanismul fiziopatologic al DDVS.

Ipoteza de lucru: Ne-am propus să identificăm relația dintre diferitele pattern-uri de remodelare structurală și funcțională în HTA esențială și polimorfismul genetic al SRAA și de asemenea stabilirea unor modele diferențiate de adaptare anatomică și funcțională la HTA esențială, în relație cu variațiile genetice ale SRAA.

Material și metodă: În acest studiu am inclus 139 pacienți cu HTA esențială. La toți pacienții incluși în studiu s-a efectuat ecografia cardiacă, în mod M și 2D. S-au măsurat următorii parametri morfologici: septul interventricular, peretele posterior al ventriculului stâng, diametrul telediastolic al ventriculului stâng și diametrul telesistolic al ventriculului stâng ale cavității VS, masa ventriculului stâng (MVS), masa ventriculului stâng indexată (MVSI) și grosimea relativă a peretelui (GRP). Pentru evaluarea funcției diastolice a VS a fost utilizată metoda Doppler pulsat. DDVS a fost definită dacă raportul E/A a fost <1 . Am definit 4 tipuri de remodelare cardiacă prin prezența sau absența HVS, $GRP < \text{sau} > 0.42$: geometria normală, hipertrofie concentrică, hipertrofie excentrică și remodelare concentrică. Pentru identificarea genotipurilor SRAA și analiza statistică s-au folosit metodele descrise anterior la studiul 1.

Rezultate: Cel mai frecvent model de HVS a fost remodelarea concentrică prezentă la 59 de pacienți (42.45%), urmată de hipertrofia concentrică la 48 de cazuri (34.53%) și hipertrofia excentrică la 8 cazuri (5.75%). Asocierea între DDVS cu modele de remodelare cardiacă a VS a fost statistic semnificativă ($p < 0.009$), fiind mai frecventă în grupul cu HVS excentrică (75%), urmată de HVS concentrică (72.92%), și de remodelarea cardiacă (64.41%). Pacienții hipertensivi cu DDVS au prezentat valori statistic semnificative ale $GRP < 0.42$ ($p < 0.003$) și valoare patologică a MVSI (g/m^2) ($p < 0.033$) comparativ cu grupul fără DDVS. În studiul nostru, am găsit asocierea statistic semnificativă dintre DDVS și variantele genetice ale SRAA: *M235T-AGT* ($p < 0.035$), *A1166C-R1 AngII* ($p < 0.046$) și *G83A-REN* ($p < 0.02$). Genotipurile *CC3123*, *AC3123* ale polimorfismului *A3123C-R2 AngII* au fost statistic semnificativ asociate cu $GRP < 0.42$ ($p < 0.029$). Cu privire la polimorfismul genetic *A3123C-R2 AngII*, șansa ca un pacient să aibă $GRP < 0.42$ a fost de 2.7 mai mare pentru genotipurile *CC3123*, *AC3123* comparativ cu genotipul *AA3123*, asocierea fiind statistic semnificativă ($p = 0.029$).

Concluzii: Rezultatele noastre au confirmat ipoteza asocierii adaptative funcționale a răspunsului variabil la HTA, condiționat de polimorfismul genetic al SRAA. Variației genetice *A3123C-R2 AngII* a fost asociată cu remodelarea cardiacă de tip non-concentrică ca răspuns de adaptare la HTA esențială.

Studiul 3. Modularea terapeutică a modificărilor adaptative (morfologice și funcționale) cardio-vasculare în HTA în relație cu polimorfismul genetic al SRAA

Introducere: Supresia SRAA, prin IECA și BRA, reprezintă strategia de tratament pentru controlul valorilor TA crescute și prevenirea AOTMH. Tratamentul HTA ar putea fi personalizat în funcție de genotipul pacientului.

Ipoteza de lucru: Ne-am propus să studiem implicarea tratamentului cu IECA și BRA în modularea terapeutică a modificărilor adaptative cardiace morfologice (HVS), funcționale (DDVS) și a modificărilor adaptative vasculare, indirect, prin PP în relație cu polimorfismele genetice ale SRAA. De asemenea, am dorit să demonstrăm rolul polimorfismelor genetice ale SRAA în relație cu controlul terapeutic al HTA esențiale cu BRA și IECA.

Material și metodă: În acest studiu am inclus 83 pacienți hipertensivi, care s-au prezentat inițial la consult, în perioada 2015-2017, ulterior la control în perioada 2016-2019.

La recrutare, pacienții hipertensivi au fost împărțiți în două loturi, în funcție de tratamentul administrat BRA sau IECA. La etapa de control, la unii pacienți, s-a decis schimbarea clasei de medicație, din următoarele motive: lipsa sau controlul slab al valorilor TA sub tratament și intoleranță la clasa de medicamente antihipertensive cu apariția efectelor adverse.

La toți pacienții incluși în studiul inițial și la control, s-a efectuat măsurarea IMC, a valorilor TAS și TAD, s-a calculat PP. De asemenea, s-a efectuat ecografia cardiacă, în mod M și 2D pentru evaluarea parametrilor morfologici (MVS, MVSI, GRP) și funcționali (FE, DDVS). Analiza genetică și statistică s-a efectuat la toți pacienții care au fost incluși în studiu la consultul inițial, conform metodei menționate în studiul 1 și 2.

Rezultate: Pacienții au fost împărțiți în două loturi: 52 de subiecți (62,7%) au fost sub tratament cu IECA și 31 (37,3%) au fost sub tratament cu BRA. Se observă că în evoluție TAS, TAD, PP, parametrii morfologici de remodelare cardiacă (MVS, MVSI și GRP) și FE s-au ameliorat în mod similar în cele două grupuri sub tratament.

Variațiile genetice ale SRAA au fost distribuite asemănător în grupul care a primit tratament cu IECA și cel care a primit BRA, neobservându-se diferențe statistice semnificative.

Există asociere statistic semnificativă între MVS patologică și varianta genetică *M235T-AGT*, atât în cazul heterozigoților ($p < 0.016$, respectiv $p < 0.012$) cât și a homozigoților ($p < 0.034$, respectiv $p < 0.026$) în analiza univariată și multivariată după ajustare în funcție de vârstă (ani), IMC (kg/m^2) și tratamentul cu IECA sau BRA administrat la control.

Rezultatele obținute în studiu, au arătat o asociere statistic semnificativă între MVSİ și varianta genetică *M235T-AGT*, obținută în analiza univariată, modelul dominant ($p < 0.017$), care s-a păstrat și în analiza multivariată ($p < 0.013$), după ajustare în funcție de vârstă (ani), IMC (kg/m^2) și tratamentul cu IECA sau BRA.

Am obținut o asociere statistic semnificativă între evoluția GRP și varianta genetică *A1166C-R1 AngI*, la modelul dominant în analiza univariată ($p < 0.046$), asociere care s-a păstrat și în analiza multivariată ($p < 0.052$), după ajustare în funcție de vârstă (ani), IMC (kg/m^2) și tratamentul cu IECA sau BRA.

Concluzii: Prin acest studiu am reușit să punem în evidență asocieri între unele variante ale polimorfismelor SRAA și ale parametrilor de remodelare cardiacă și vasculară la pacienții hipertensivi. Astfel, s-a observat că la pacienții hipertensivi purtători ai genotipului *MM235 (M235T-AGT)* există o scădere a valorilor patologice ale MVS, respectiv scăderea MVSİ patologic comparativ cu celelalte genotipuri.

De asemenea am demonstrat că genotipul *AA1166* pentru variația genetică *A1166C-R1 AngII* este legată de scăderea valorii patologice a GRP comparativ cu celelalte genotipuri.

Regresia AOTMH sub tratament cu IECA sau BRA indică o îmbunătățire a prognosticului bolii. Răspunsul la tratament este influențat de polimorfismul genetic al SRAA.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Punctele forte ale studiului sunt:

- 1) Am reușit să demonstrăm rolul SRAA și al polimorfismului genetic al SRAA în fiziopatologia HTA esențiale și a AOTMH.
- 2) Prezența genotipurilor *MT235-TT235* (polimorfismul *M235T-AGT*) reprezintă factor de risc independent pentru AC la pacienții hipertensivi.
- 3) Pacienții hipertensivi purtători ai variațiilor genetice *M235T-AGT*, *A1166C-R1 AngII* și *G83A-REN* pot dezvolta DDVS. Mai mult, variația genetică *A3123C-R2 AngII* a fost asociată cu remodelarea cardiacă de tip non-concentrică ca răspuns de adaptare la HTA esențială.
- 4) Am demonstrat că polimorfismele genetice sunt implicate în: evoluția remodelării cardiace morfologice (MVS și MVSİ) pentru varianta genetică *M235T-AGT*, evoluția GRP și TAD pentru varianta genetică *A1166C-R1 AngI*.
- 5) Tratamentul cu IECA și BRA este eficient în prevenirea și regresia AOTMH.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Therapeutic modulation of adaptive
(morphological and functional)
changes in essential hypertension in
relation to biomarkers of the renin
angiotensin aldosterone system

Doctoral candidate **Oana Codrea Mocan**

Doctoral supervisor Prof. Dr. **Lucia Maria Procopciuc**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	17
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	19
1. Essential hypertension	21
1.1. General considerations – Definition, classification, measurement	21
1.2. Prevalence of hypertension	21
1.3. Importance of essential hypertension	21
2. The renin angiotensin aldosterone system	26
2.1. Introduction	26
2.2. Physiology of RAAS	26
3. Genetics	29
3.1. <i>M235T</i> -AGT	30
3.2. <i>T174M</i> -AGT	30
3.3. <i>I/D</i> -ACE	31
3.4. <i>A2350C</i> -ACE8	32
3.5. <i>A1166C</i> -AngII R1	32
3.6. <i>A3123C</i> -AngII R2	33
3.7. <i>G83A</i> -REN	33
4. Treatment of hypertension	34
4.1. General notions	34
4.2. Angiotensin converting enzyme inhibitors	34
4.3. Angiotensin receptor blockers	35
PERSONAL CONTRIBUTION	37
1. Hypothesis/objectives	39
1.1. General hypothesis of the personal research	39
1.2. Objectives of the personal research	39
2. General methodology	40
2.1. Study design	40
2.2. Patient selection	40
2.3. Clinical examination	41
2.4. Laboratory tests	42
2.5. Ultrasound	42
2.6. Methods used for the evaluation of genetic variants	42
2.7. Statistical analysis	44
3. Study 1 – The association between RAAS gene polymorphisms and carotid atheromatosis in patients with essential HTN	45

3.1. Introduction	45
3.2. Hypothesis/objectives	46
3.3. Material and method	46
3.4. Results	52
3.5. Discussions	70
3.6. Conclusions	73
4. Study 2 – The role of RAAS gene polymorphisms in morphological and functional cardiac remodeling in hypertensive patients	75
4.1. Introduction	75
4.2. Hypothesis/objectives	77
4.3. Material and method	77
4.4. Results	79
4.5. Discussions	88
4.5.1. Characteristics of patients in association with LVH and LVDD	88
4.5.2. RAAS gene polymorphism in association with LVH and LVDD	89
4.6. Conclusions	92
5. Study 3 – Therapeutic modulation of adaptive (morphological and functional) cardiovascular changes in HTN in relation to RAAS gene polymorphism	93
5.1. Introduction	93
5.2. Hypothesis/objectives	96
5.3. Material and method	96
5.4. Results	99
5.5. Discussions	120
5.5.1. Characteristics of hypertensive patients in the two groups on treatment with ACEIs and ARBs	120
5.5.2. Evolution of cardiovascular parameters depending on RAAS gene polymorphisms	121
5.6. Conclusions	124
6. General conclusions (synthesis)	125
7. Originality and innovative contributions of the thesis	127
REFERENCES	129

Key words: essential hypertension, renin angiotensin aldosterone system, gene polymorphisms, carotid atheromatosis, left ventricular hypertrophy, left ventricular diastolic dysfunction, angiotensin converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers

INTRODUCTION

Hypertension (HTN) is a major cardiovascular risk factor, with an increased incidence for ischemic cardiac and cerebrovascular events. Essential HTN is a polygenic disease. One of the systems involved in the etiology of HTN is the renin angiotensin aldosterone system (RAAS), which plays a role in the pathogenesis of atheromatosis (ATS) and cardiac remodeling.

RAAS gene polymorphism can influence the response to treatment, the evolution and prognosis of the disease. The aim of this thesis was to identify the adaptive cardiac and vascular changes of essential HTN in relation to RAAS gene polymorphism and to evaluate treatment response depending on the genetic profile of hypertensive patients.

The observations of this thesis open new perspectives for hypertensive patients regarding the staging of the disease, the evaluation of prognosis and response to treatment, depending on the genetic polymorphism.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Essential HTN is the main cause of general mortality at global and European level, this aspect being attributed to population aging as well. Cardiovascular risk in hypertensive patients is assessed based on hypertension-mediated organ damage (HMOD). This evaluation allows HTN classification and antihypertensive treatment administration.

Left ventricular hypertrophy (LVH) is an independent negative predictive factor for mortality in patients with essential HTN. In the evolution of HTN, remodeling through LVH is complicated by heart failure (HF) with preserved ejection fraction (EF), by LV diastolic dysfunction (LVDD), respectively.

Carotid atheromatosis (CA) and increased intima-media thickness (IMT) in the carotid-vertebral axis are manifestations of atherosclerotic disease and have a predictive value for ischemic cardiovascular and cerebrovascular events.

Pulse pressure (PP) is considered an indicator of arterial stiffness and arterial ATS, inducing ATS and thrombosis in situ.

The components of RAAS are renin (REN), angiotensinogen (AGT), angiotensin I to angiotensin II converting enzyme (ACE), angiotensin I (AngI), angiotensin II (AngII), AngII receptor type 1 (AngII R1), AngII receptor type 2 (AngII R2) and aldosterone.

Gene polymorphisms can play a role in the etiopathogenesis of essential HTN. Among the gene polymorphisms situated in genes encoding RAAS components associated with HTN, we mention *M235T* and *T174M* (AGT gene), *I/D* and *A2350C* (ACE gene), *A1166C* (AngII R1 gene), *A3123C* (AngII R2 gene), *G83A* (REN gene).

Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) and angiotensin receptor blockers (ARBs) are the most widely used antihypertensives, with similar drug efficacy on major cardiovascular events and mortality.

PERSONAL CONTRIBUTION

The study group included 165 patients diagnosed with essential HTN (on treatment), as well as newly diagnosed patients with essential HTN. The patients were recruited from the inpatient, internal medicine and cardiology services of 3 medical centers in Cluj-Napoca: Medical Clinic IV, Medical Clinic V, and Polaris Hospital, in the period June 2015 – December 2017. For the homogeneity of the studied group, patients with secondary HTN, left ventricular EF less than 50%, NYHA functional class III and IV heart failure, unstable coronary disease, acute kidney disease, chronic kidney disease with a glomerular filtration rate <30 ml/min/1.72m² or in the dialysis phase were excluded from the study.

The research protocol was analyzed and approved by the Ethics Committee of "Iuliu Hațieganu" UMPH in Cluj-Napoca, for all the studies conducted as part of this doctoral research.

Study 1. The association between RAAS gene polymorphisms and carotid atheromatosis (CA) in patients with essential HTN

Introduction: CA and increased IMT in the carotid-vertebral axis are manifestations of atherosclerotic disease and diagnostic markers for ischemic heart disease and ischemic cerebrovascular disease. RAAS gene polymorphisms are involved in the pathogenesis of ATS.

Hypothesis: The objective of our study was to analyze RAAS gene polymorphisms in patients with essential HTN and the relationship of these mutations with CA as predictive factors for ischemic cerebrovascular events.

Material and method: The study included 162 hypertensive patients. All patients underwent detailed history taking, objective examination, by which the body mass index (BMI), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) values

were measured, and other causes of secondary HTN were excluded. Associated risk factors such as dyslipidemia, diabetes mellitus and non-alcoholic hepatic steatosis (HS) were recorded. The following laboratory tests were performed: total cholesterol, triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and renal function (urea, creatinine), according to standard laboratory methods.

Doppler ultrasound of carotid arteries was carried out to diagnose the presence of ATS plaques. Also, abdominal ultrasound was performed to assess the presence or absence of HS. In all patients included in the study, to identify RAAS genotypes (*M235T*-AGT, *T174M*-AGT, *I/D*-ACE, *A2350C*-ACE8, *A1166C*-AngII R1, *A3123C*-AngII R2 and *G83A*-REN), specific PCR-RFLP methods were used.

Statistical analysis was performed in R environment version 3.6.2, and for genetic associations, the SNP association 1.9-2 package was used.

Results: Of the 162 hypertensive patients included in the study, 73 had CA. The results obtained show a statistically significantly higher number of hypertensive patients with CA aged over 60 years compared to those without CA ($p < 0.001$). A statistically significant association was found between the presence of CA and hypertriglyceridemia (HTG) ($p = 0.021$). A significantly higher number of hypertensive patients with CA had TG > 130 mg/dl ($p = 0.049$), an increase in IMT in the carotid axis ($p < 0.001$) and LVH ($p = 0.002$) compared to hypertensive patients without CA. Regarding *M235T*-AGT polymorphism, in the dominant model there was a 2.17-fold higher risk (95% CI 1.08-4.53) for a patient to have CA among carriers of *MT235-TT235* compared to *MM235* genotype, the association being statistically significant ($p = 0.0298$). The association was maintained after adjustment for confounders (age, sex, HS and LDL-C), with a 2.3-fold higher risk (95% CI 1.05-5.26) of having CA ($p = 0.041$) for carriers of *T235-TT235* genotypes.

Conclusions: Our results showed the association between *M235T*-AGT polymorphism and CA, after adjustment for confounders and control for HTN. There was no statistical correlation between CA and the genetic variants *I/D*-ACE, *T174M*-AGT, *A2350C*-ACE8, *A1166C*-AngII R1, *A3123C*-AngII R2 and *G83A*-REN.

Study 2. The role of RAAS gene polymorphisms in morphological and functional cardiac remodeling in hypertensive patients

Introduction: Essential HTN is associated with an increased risk for organ damage, including LVH. RAAS is implicated in the pathophysiological cardiac remodeling process, in the increase of LV postload, an effect that is independent of BP values and neurohumoral factors. RAAS gene variants are involved in LV cardiac remodeling, possibly in the pathophysiological mechanism of LVDD.

Hypothesis: We aimed to identify the relationship between various structural and functional remodeling patterns in essential HTN and RAAS gene polymorphism, as well as to establish differentiated anatomical and functional adaptation models in essential HTN, in relation to RAAS gene variants.

Material and method: This study included 139 patients with essential HTN. All patients included in the study underwent M-mode and 2D cardiac ultrasound. The following morphological parameters were measured: the interventricular septum, the left ventricular posterior wall, the left ventricular telediastolic diameter and the left ventricular telesystolic diameter of the LV cavity, left ventricular mass (LVM), indexed left ventricular mass (ILVM) and relative wall thickness (RWT). To evaluate LV diastolic function, pulsed Doppler was used. LVDD was defined as an E/A ratio <1 . We defined 4 types of cardiac remodeling by the presence or absence of LVH, $RWT < \text{or} > 0.42$: normal geometry, concentric hypertrophy, eccentric hypertrophy and concentric remodeling. For RAAS genotype identification and statistical analysis, the methods previously described in study 1 were used.

Results: The most frequent LVH pattern was concentric remodeling present in 59 patients (42.45%), followed by concentric hypertrophy in 48 cases (34.53%) and eccentric hypertrophy in 8 cases (5.75%). The association between LVDD and LV cardiac remodeling patterns was statistically significant ($p < 0.009$), being more frequent in the group with eccentric LVH (75%), followed by concentric LVH (72.92%), and cardiac remodeling (64.41%). Hypertensive patients with LVDD had statistically significant RWT values < 0.42 ($p < 0.003$) and pathological values of ILVM (g/m^2) ($p < 0.033$) compared to the group without LVDD. In our study, we found a statistically significant association between LVDD and the RAAS gene variants: *M235T-AGT* ($p < 0.035$), *A1166C-AngII R1* ($p < 0.046$) and *G83A-REN* ($p < 0.02$). The *CC3123*, *AC3123* genotypes of the *A3123C-AngII R2* polymorphism were statistically significantly associated with $RWT < 0.42$ ($p < 0.029$). Regarding the *A3123C-AngII R2* gene polymorphism, the risk for a patient to have $RWT < 0.42$ was 2.7-fold higher for *CC3123*, *AC3123* genotypes compared to *AA3123* genotype, the association being statistically significant ($p = 0.029$).

Conclusions: Our results confirmed the hypothesis of the adaptive functional association of the variable response to HTN, conditioned by RAAS genetic polymorphism. The *A3123C-AngII R2* genetic variant was associated with non-concentric cardiac remodeling as an adaptive response to essential HTN.

Study 3. Therapeutic modulation of adaptive (morphological and functional) cardiovascular changes in HTN in relation to RAAS gene polymorphism

Introduction: RAAS suppression, through ACEIs and ARBs, represents the treatment strategy for the control of increased BP values and prevention of HMOD. The treatment of HTN could be personalized depending on patient's genotype.

Hypothesis: We aimed to study the implication of ACEI and ARB treatment in the therapeutic modulation of adaptive cardiac morphological (LVH) and functional (LVDD) changes, as well as of adaptive vascular changes, indirectly, by PP in relation to RAAS gene polymorphisms. We also wanted to demonstrate the role of RAAS gene polymorphisms in relation to the therapeutic control of essential HTN with ARBs and ACEIs.

Material and method: This study included 83 hypertensive patients who presented initially for examination in the period 2015-2017 and subsequently for follow-up in the period 2016-2019.

At recruitment, hypertensive patients were divided into two groups depending on the administered treatment with ARBs or ACEIs. At follow-up, a change of the medication class was decided in the case of some patients, for the following reasons: no or poor control of BP values under treatment and intolerance to the class of antihypertensive drugs, with the occurrence of adverse effects.

In all patients included in the initial study and at follow-up, BMI, SBP and DBP values were measured, and PP was calculated. Also, M-mode and 2D cardiac ultrasound was performed to evaluate morphological (LVM, ILVM, RWT) and functional (EF, LVDD) parameters. Genetic and statistical analysis was carried out for all patients included in the study at the initial examination, according to the method mentioned in studies 1 and 2.

Results: The patients were divided into two groups: 52 subjects (62.7%) were on treatment with ACEIs, and 31 (37.3%) were on treatment with ARBs. It was observed that during evolution, SBP, DBP, PP, morphological cardiac remodeling parameters (LVM, ILVM and RWT) and EF were improved similarly in the two groups on treatment.

RAAS gene variants were similarly distributed in the group receiving ACEI treatment and the group receiving ARBs, without statistically significant differences being observed.

There was a statistically significant association between pathological LVM and the *M235T*-AGT genetic variant, both in the case of heterozygotes ($p < 0.016$, $p < 0.012$ respectively) and homozygotes ($p < 0.034$, $p < 0.026$ respectively), in univariate and multivariate analysis after adjustment for age (years), BMI (kg/m^2) and treatment with ACEIs or ARBs administered at follow-up.

The results obtained in the study showed a statistically significant association between ILVM and the *M235T-AGT* genetic variant, obtained in univariate analysis, in the dominant model ($p < 0.017$), which was maintained in multivariate analysis ($p < 0.013$), after adjustment for age (years), BMI (kg/m^2) and treatment with ACEIs or ARBs.

A statistically significant association was obtained between the evolution of RWT and the *A1166C-AngI R1* genetic variant in the dominant model in univariate analysis ($p < 0.046$), an association that was maintained in multivariate analysis ($p < 0.052$) as well, following adjustment for age (years), BMI (kg/m^2) and treatment with ACEIs or ARBs.

Conclusions: Through this study, we evidenced associations between some variants of RAAS polymorphisms and cardiac and vascular remodeling parameters in hypertensive patients. Thus, it was observed that in hypertensive patients carrying the *MM235 (M235T-AGT)* genotype there was a decrease in pathological LVM and ILVM values compared to the other genotypes.

HMOD regression under treatment with ACEIs or ARBs indicates an improvement in the disease prognosis. Treatment response is influenced by RAAS gene polymorphism.

Originality and innovative contributions of the thesis

The strengths of the study are the following:

- 1) We managed to demonstrate the role of RAAS and RAAS gene polymorphism in the pathophysiology of essential HTN and HMOD.
- 2) The presence of *MT235-TT235* genotypes (*M235T-AGT* polymorphism) is an independent risk factor for CA in hypertensive patients.
- 3) Hypertensive patients carrying the genetic variants *M235T-AGT*, *A1166C-AngII R1* and *G83A-REN* can develop LVDD. Furthermore, the *A3123C-AngII R2* genetic variant was associated with non-concentric cardiac remodeling as an adaptive response to essential HTN.
- 4) We demonstrated that gene polymorphisms are involved in: the evolution of morphological cardiac remodeling (LVM and ILVM) for the *M235T-AGT* genetic variant; the evolution of RWT and DBP for the *A1166C-AngI R1* genetic variant.
- 5) Treatment with ACEIs and ARBs is effective in HMOD prevention and regression.