

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA  
TEZĂ DE DOCTORAT**

***„Studiul polimorfismelor genetice implicate în etiologia, evoluția și  
complicațiile accidentelor vasculare cerebrale”***

**-REZUMAT-**

Doctorand  
**Maria-Felicia Petrișor**

Conducător științific  
**Prof.dr. Ioan Victor Pop**

**CUPRINS**

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	15
<b>1. Accidentul vascular cerebral</b>	17
1.1. Generalități	17
1.2. Etiopatogenie. Factori de risc implicați în accidentul vascular cerebral ischemic	20
1.2.1. Factori de risc convenționali	20
1.2.1.1. Factori predispozanți	20
1.2.1.2. Factori igieno-dietetici	22
1.2.1.3. Factori metabolici	23
1.2.2. Noi factori de risc asociați cu accidentul vascular cerebral ischemic	24
1.2.2.1. Markerii de inflamație	24
1.2.2.2. Factori metabolici	25
1.2.2.3. Factori trombogeni și de fibrinoliză	25
1.2.2.4. Factori imunologici	26
1.2.2.5. Markerii de disfuncție endotelială	26
<b>2. Biologia moleculară a accidentului vascular cerebral ischemic</b>	27
2.1. Sindroame cerebrovasculare ischemice ereditare	27
2.2. Gene candidat implicate în etiopatogenia accidentului vascular cerebral ischemic	29
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	39
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	41
<b>2. Metodologie generală</b>	45
2.1. Lotul de studiu	45
2.2. Analiza moleculară a ADN-ului	46
2.2.1. Izolarea și purificarea ADN-ului genomic	46

2.2.2. Măsurarea purității și concentrației ADN	48
2.2.3. Tehnica PCR-RFLP	48
2.2.3.1. Amplificarea fragmentelor ADN (PCR)	49
2.2.3.2. Digestia ADN-ului cu enzime de restricție	50
2.2.3.3. Separarea fragmentelor de ADN	51
2.2.3.4. Detecția fragmentelor de ADN	51
2.3. Analiza statistică	51
<b>3. Studiu 1. Rolul variantelor genice <i>TNF-α</i> rs1800629 și <i>IL-6</i>rs1800795 în etiopatogenia accidentului vascular cerebral ischemic</b>	53
3.1. Introducere	53
3.2. Obiective	54
3.3. Material și metodă	56
3.4. Rezultate	60
3.5. Discuții	66
<b>4. Studiu 2. Influența variantelor genice <i>FGB</i> rs1800790, <i>GPIIIa</i> rs5918 și <i>FXIII</i> rs5985 asupra accidentului vascular cerebral ischemic</b>	77
4.1. Introducere	77
4.2. Obiective	78
4.3. Material și metodă	79
4.4. Rezultate	83
4.5. Discuții	91
<b>5. Concluzii generale</b>	103
<b>6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	107
<b>REFERINȚE</b>	109
<b>ABREVIERI</b>	11

**Cuvinte cheie:** accident vascular cerebral, polimorfisme genetice, TNF- $\alpha$ , IL-6, FGB, GPIIIa, FXIII

### Stadiul actual al cunoașterii

Accidentul vascular cerebral (AVC) este o problemă majoră de sănătate la nivel mondial, în special în țările dezvoltate, unde această patologie reprezintă cauza principală de dezvoltare a unui handicap pe termen lung, și a treia cauză de deces după afecțiunile cardiovasculare și neoplazii. Anual au loc 15 milioane de AVC în lume, dintre care 5 milioane de pacienți decedază în primele 2 săptămâni de la evenimentul acut, iar alte 5 milioane rămân cu dizabilități grave. În 2010, prevalența AVC la nivel global era de 33 milioane, dintre aceștia 16,9 milioane fiind la primul episod și se estimează că până în anul 2050 accidentele vasculare cerebrale vor deveni principala cauză de mortalitate.

În România, un om decedază la fiecare 10 minute secundar unui AVC. Datele statistice oferite de Ministerul Sănătății ne clasează pe primul loc în lume la mortalitate prin AVC, cu 177 decese la 100.000 locuitori, comparativ cu SUA, care înregistrează aproximativ 33 de decese prin AVC la fiecare 100.000 de locuitori. Un lucru important de menționat ar fi că o treime din accidentele vasculare cerebrale se produc la vârste sub 65 de ani. Accesul inadecvat la terapie și profilaxie secundară crește riscul apariției complicațiilor astfel că peste 400.000 repetă evenimentul vascular la scurt timp după AVC primar.

Incidența mare precum și implicațiile pe care accidentul vascular cerebral le are asupra individului, familiei și sistemului social și sanitar, impune o strânsă colaborare interdisciplinară care să implementeze, un protocol biologic de profilaxie primară bazat pe utilizarea unor markeri moleculari care să faciliteze în primul rând identificarea indivizilor cu risc crescut dar și a posibilităților de terapie personalizată, motiv pentru care cercetările medicale din ultimul deceniu au încercat să identifice și descifreze mecanismele etiopatogenice asociate AVC și subtipurile acestuia.

AVCi prezintă o bază genetică și este considerată a fi o boală multifactorială și astfel fiind dificil de studiat din punct de vedere molecular, datorită interacțiunii genotip-mediu-fenotip, a heterogenității genetice și nongenetice, datorită transmiterii poligenice cu penetranță variabilă și nu în ultimul rând, a vârstei de debut. În ultimii ani studiile genetice s-au concentrat pe identificarea genelor candidat și a variantelor alelice care ar putea conferii susceptibilitate pentru accidentul vascular cerebral precum și asocierea lor cu factorii de risc, ce pot avea un efect potențator în fenotipul acestei patologii.

Lucrarea de față a cuprins 2 studii și a fost construită sub forma unui studiu de tip caz-control, retrospectiv, randomizat; primul studiu având ca scop evaluarea variantelor genice ale *TNF- $\alpha$*  (rs1800629), *IL-6* (rs1800795), respectiv cel de-al doilea al *FGB* (rs 1800790), *GP* (rs5918) și *FXIII* (rs5985) ca și posibili factori de risc în etiopatogenia AVC ischemic. În cadrul celor două studii am analizat 298 de subiecți distribuiți pe două loturi: 148 de pacienți cu patologie AVCi care au alcătuit lotul de studiu și 150 pacienți fără antecedente cerebrovasculare care au reprezentat lotul de control, recrutați din cadrul Clinicii Medicală II a SCJUCJ, România. Analiza celor 5 polimorfisme genice studiate a necesitat utilizarea unor tehnici de investigație genetică moleculară (extracția și purificarea ADN, amplificarea PCR a ADN, digestia enzimatică și electroforeza segmentelor de interes), conform unor protocoale actuale și bine definite.

Rezultatele studiului prezintă o mare heterogenitate în ceea ce privește distribuția genotipurilor respectiv alelelor variant în populația studiată.

## **Studiul 1. Rolul variantelor genice *TNF- $\alpha$* rs1800629 și *IL-6* rs1800795 în etiopatogenia accidentului vascular cerebral ischemic**

### **Introducere**

*TNF- $\alpha$*  (factor de necroză tumorală  $\alpha$ ) și *IL-6* (interleukina 6) sunt două dintre citokinele pro-inflamatorii cu importanță majoră în inițierea și reglarea răspunsului în procesul inflamator prin creșterea permeabilității capilare și activarea endotelială, ducând în final la modificarea aderenței și acumularea excesivă a neutrofilelor în capilare și vasele mici. S-a observat o expresie ridicată a citokinei proinflamatori *TNF- $\alpha$*  și *IL-6* atât la nivel plasmatic cât și în lichidul cefalo-rahidian (LCR) la pacienții cu AVCi. Deasemenea, *TNF- $\alpha$*  accentuează leziunea ischemico-cerebrală și crește dimensiunea zonei afectate prin mecanisme diverse, care includ tromboza, eliberarea de agenți vaso-activi puternici, stimulând astfel adeziunea și infiltrarea leucocitară asociată evenimentelor inflamatorii locale. Activitatea *IL-6* este considerată a fi importantă în etiopatogenia mai multor boli cardiovasculare ischemice, printre care și angina pectorală instabilă și sindroamele coronariene acute. Expresia genei *IL-6* este crescută la modelele animale de leziuni cerebrale de tip ischemie/reperfuție. La subiecții umani, nivelurile plasmatice ridicate au fost asociate cu agravarea statusului neurologic precoce post AVCi și progresia infarctului lacunar.

Având în vedere lipsa datelor epidemiologice în ceea ce privește rolul factorilor genetici implicați în etiopatogenia accidentelor cerebrovasculare în populația din România, în cadrul prezentului studiu am urmărit evaluarea unei posibile asocieri ale polimorfismelor funcționale *TNF- $\alpha$*  -308 G>A (**rs1800629**) și *IL-6* -174 G>C (**rs1800795**) într-un eșantion de pacienți cu AVCi din Nord-Vestul Transilvaniei.

## Concluzii

- Analiza variantelor genice  $TNF-\alpha$  -308G>A și  $IL-6$  -174G>C, a relevat o frecvență a alelei variante A -308 de 13,7%, respectiv 39,7%, la subiecții din lotul de control.  
Evaluarea asocierii variantelor genice  $TNF-\alpha$  -308G>A și  $IL-6$  -174G>C cu AVCi nu a evidențiat diferențe statistic semnificative între cele două loturi la purtătorii alelei variante A, ( $p=0,673$ , OR 0,900, 95%IC:0,560-1,453); respectiv C ( $p=0,161$ , OR 0,790, 95% IC:0,564-1,100), privind riscul de apariție a AVCi.
- Evaluarea asocierii polimorfismelor  $TNF-\alpha$  -308G>A și  $IL-6$  -174G>C cu AVCi nu a evidențiat diferențe statistic semnificative în ceea ce privește riscul de a dezvolta AVCi în prezența genotipurilor sau alelelor variante indiferent de sex, sau factorii de risc considerați;
- Evaluarea asocierii polimorfismelor  $TNF-\alpha$  -308G>A și  $IL-6$  -174G>C cu media scorului Caprini nu a evidențiat o diferență statistic semnificativă în lotul de pacienți, conform modelului dominant de analiza;

## Studiul 2. Influența variantelor genice *FGB* rs1800790, *GPIIIa* rs5918 și *FXIII* rs5985 asupra accidentului vascular cerebral ischemic

### Introducere

Echilibrul hemostatic este rezultatul interacțiunii dintre factorii procoagulanți și anticoagulanți, iar prin sinergismul lor asigură hemostaza la nivelul leziunii vasculare. Fibrinogenul fiind unul dintre factorii implicați în hemostază are un rol esențial în agregarea plachetară, prin formarea de legături covalente încrucișate cu receptorii săi de suprafață, printre care și glicoproteina IIb-IIIa, având ca și rezultat încorporarea plachetelor noi în trombul aflat în dezvoltare. În plus, la finalul cascadei de coagulare, fibrinogenul este transformat în fibrină, o proteină insolubilă ce formează o rețea de fibre peste zona lezată. Plachetele și alte celule sangvine se conglomerază în această rețea și formează un tromb. Producerea acestui dop hemostatic după leziunile vasculare este esențială și foarte dependentă de funcția plachetară, motiv pentru care variantele genice ale *FGB* și *GP* au fost intens studiate în patologia cardiovasculară și cerebrovasculară. Polimorfismul -455 G>A (**rs1800790**) de la nivelul genei *FGB* a fost investigat ca și posibil factor de risc în apariția AVCi.

Studii recente au demonstrat mecanismul prin care polimorfismul funcțional *GPIIIa* PIA1/A2 (**rs5918**) contribuie la tromboza arterială. Acest polimorfism determinând o reactivitate crescută prin stimularea formării de complexe cu fibrinogenul imobilizabil seric, o exacerbare a polimerizării actinei plasmatică și o retracție excesivă a fibrinei cheagului. Astfel funcția plachetară este alterată, susținând contribuția majoră în etiopatogeneza bolilor cerebrovasculare ischemice.

Un alt factor important în cascada coagulării este și *FXIII*. Principalul rol biochimic al acestui factor în hemostaza normală este acela de a forma legături covalente încrucișate între lanțurile fibrinei, precum și formarea de legături cu alte proteine implicate în reglarea fibrinolizei pe rețeaua de fibrină formată. Prin formarea acestor legături, *FXIII* modulează rigiditatea, elasticitatea și integritatea mecanică a cheagului sangvin, crescând rezistența la fibrinoliza. Deficitul acestui factor produce hemoragii severe, iar la pacienții netratați determină frecvent hemoragii fatale la nivel cerebral. Fiind un motiv plauzibil de cercetare a variantelor genice ale *FXIII*, printre care și polimorfismul genic *FXIII* Val34Leu (**rs5985**), care este cel mai intens studiat în bolile cerebrovasculare ischemice.

Lipsa datelor privind rolul polimorfismelor funcționale ale genelor *FGB*, *GPIIIa* și *FXIII* și AVCi, în populația din România, justifică efectuarea studiului actual. Pe baza ipotezei formulate am urmărit cercetarea influenței variantelor genice *FGB* -455 G>A, *GPIIIa* PIA1/A2 și *FXIII* Val34Leu într-un grup de pacienți cu AVCi din Nord-Vestul Transivaniei.

## Concluzii

- Analiza variantei genice *GPIIIa* PIA1/A2, a relevat o frecvență a alelei variante A2 de 10,7% la subiecții din lotul de control. Evaluarea asocierii variantei genice *GPIIIa* PIA1/A2 și AVCi nu a evidențiat diferențe statistic semnificative între cele două loturi la purtătorii alelei variante A2 ( $p=0,823$ , OR:0,944, 95%IC:0,558-1,599), privind riscul de apariție a AVCi.
- Evaluarea asocierii variantei genice *FGB* -455 G>A și AVCi a evidențiat o corelație semnificativă privind scăderea riscului de apariție AVCi, pe modelul dominant ( $p=0,037$ , OR:0,612, 95%IC:0,387-0,969).
- Evaluarea asocierii dintre genotipurile variantei genice *FGB* -445 G>A în prezența factorilor de risc considerați, a evidențiat o asociere inversă semnificativă a purtătorilor genotipurilor variante doar în prezența HTA ( $p=0,026$ , genotipuri GA-OR:0,404,95%IC:0,207-,787/AA-OR:0,726,95%IC:0,254-2,286) nu și a statusului de fumător;
- Evaluarea asocierii variantei genice *FGB* -455G>A cu AVCi în prezența factorilor de risc considerați și caracteristicile demografice, a evidențiat o asociere semnificativă cu un risc mai redus de apariție a AVCi, pe modelul dominant ( $p=0,036$ , OR:0,607, 95%IC:0,381-0,968);
- Analiza variantei genice *FXIII* Val34Leu, a relevat o frecvență a alelei variante Leu34 de 25,3% la subiecții din lotul de control. Evaluarea asocierii variantei genice *FXIII* Val34Leu și AVCi a evidențiat diferențe statistic semnificative între cele două loturi la purtătorii alelei variante Leu ( $p=0,013$ , OR:0,599, 95%IC:0,401-0,894), privind scăderea riscul de apariție a AVCi.
- Evaluarea asocierii dintre genotipurile variantei genice *FXIII* Val34Leu și AVCi a relevat diferențe statistic semnificative între purtătorii genotipurilor Val/Leu sau Leu/Leu comparativ cu purtătorii genotipului Val/Val ( $p=0,033$ , genotip Val/Leu OR:0,569,95%IC:0,351-0,924, genotip Leu/Leu OR:0,343, 95%IC:0,086-1,371), privind scăderea riscului de apariție a AVCi.
- Evaluarea asocierii variantei genice *FXIII* Val34Leu cu AVCi a evidențiat o corelație semnificativă privind scăderea riscului de apariție AVCi, pe modelul dominant ( $p=0,012$ ,OR:0,546,95%IC:0,341-0,876). Pentru sexul masculin studiul a pus în evidență diferențe la purtătorii alelei Leu34 comparativ cu lotul de control, atunci când se utilizează modelul dominant ( $p=0,016$ , OR:0,462, 95%IC:0,246-0,868);
- Evaluarea asocierii dintre genotipurile variantei genice *FXIII* Val34Leu cu AVCi în prezența factorilor de risc considerați, a evidențiat o asociere la limita semnificației statistice la purtătorii genotipurilor variante în absența statusului de fumător ( $p=0,057$  genotip Val/Leu OR:0,609,95%IC:0,343-1,081, genotip Leu/Leu OR:0,159, 95%IC:0,019-1,359); Această asociere este semnificativă dacă se realizează analiza după modelul dominant ( $p=0,013$ , OR:0,564, 95%IC:0,339-0,878), scăzând riscul de apariție a AVCi.
- Evaluarea asocierii variantei genice *FXIII* Val34Leu în prezența factorilor de risc considerați și caracteristicile demografice, a evidențiat o asociere inversă semnificativă cu riscul de apariție AVCi, pentru modelul dominant ( $p=0,008$ , OR:0,521, 95%IC:0,321-0,846);

Teza de față vine ca răspuns la probleme existente astăzi în patologia cerebrovasculară: informații insuficiente legate de identificarea unor biomarkeri moleculari posibil implicați în etiologia AVC; date insuficiente în ceea ce privește explicarea mecanismelor care stau la baza declanșării, evoluției și răspunsului terapeutic și nu în ultimul rând perspectiva utilizării unor date precum acestea în practica clinică ceea ce ar putea să îmbunătățească prognosticul și să scadă morbiditatea asociată acestei afecțiuni.

Prin cercetarea de față s-a încercat extinderea sferei de cunoaștere a particularităților genetice a AVCi, cu date, după cunoștința noastră, unice pentru populația țării, studiul de față fiind printre puținele de acest tip din România. Astfel, rezultatele studiului oferă în premieră pentru populația noastră, informații legate atât de distribuția celor 5 polimorfisme investigate, precum și despre asocierea acestora cu AVCi.

**UNIVERSITY OF GENERAL MEDICINE AND PHARMACY  
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA  
DOCTORAL THESIS**

***„The study of genetic polymorphisms involved in the etiology,  
evolution and complications of stroke”***

**-SUMMARY-**

PhD Student  
**Maria-Felicia Petrișor**

Scientific Coordinator  
**Prof.dr. Ioan Victor Pop**

**TABLE OF CONTENTS**

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	15
<b>1. STROKE</b>	17
1.1. Overview	17
1.2. Etiopathogeny. Risk factors involved in ischemic stroke	20
1.2.1. Conventional risk factors	20
1.2.1.1. Predisposing factors	20
1.2.1.2. Dietary factors	22
1.2.1.3. Metabolic factors	23
1.2.2. New risk factors associated with ischemic stroke	24
1.2.2.1. Inflammation markers	24
1.2.2.2. Metabolic factors	25
1.2.2.3. Trombogenic and fibrinolysis factors	25
1.2.2.4. Immunologic factors	26
1.2.2.5. Endothelial dysfunction markers	26
<b>2. Molecular biology of ischemic cerebrovascular accidents</b>	27
2.1. Hereditary ischemic stroke syndromes	27
2.2. Candidat genes in ischemic stroke etiopathogeny	29
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	39
<b>1. Working hypothesis/Objectives</b>	41
<b>2. General methodology of research</b>	45
2.1. The studied population	45
2.2. Molecular analysis of DNA	46
2.2.1. Genomic DNA isolation and purification	46

2.2.2. Measurement of DNA purity and concentration	48
2.2.3. PCR-RFLP technique	48
2.2.3.1. DNA amplification (PCR)	49
2.2.3.2. DNA digestion with restriction enzymes	50
2.2.3.3. DNA fragments separation	51
2.2.3.4. DNA fragment detection	51
2.3. Statistical analysis	51
<b>3. Study 1. The role of <i>TNF-α</i> rs1800629 and <i>IL-6</i>rs1800795 genetic variants in ischemic stroke etiopathogeny</b>	<b>53</b>
3.1. Introduction	53
3.2. Objectives	54
3.3. Material and methods	56
3.4. Results	60
3.5. Discussions	66
<b>4. Study 2. The influence of <i>FGB</i> rs1800790, <i>GPIIIa</i> rs5918 și <i>FXIII</i> rs5985 genetic variants in ischemic stroke</b>	<b>77</b>
4.1. Introduction	77
4.2. Objectives	78
4.3. Material and methods	79
4.4. Results	83
4.5. Discussions	91
<b>5. General conclusions</b>	<b>103</b>
<b>6. Originality and innovative contribution of the thesis</b>	<b>107</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>109</b>
<b>ABREVIATION</b>	<b>11</b>

**Key words:** stroke, genetic polymorphisms, TNF- $\alpha$ , IL-6, FGB, GPIIIa, FXIII

### **Current state of knowledge**

Stroke is a major health problem worldwide, especially in developed countries where this pathology is the main cause of developing a long-term disability and the third leading cause of death after cardiovascular diseases and cancers. Annually 15 million strokes occur worldwide, of which 5 million patients die within the first 2 weeks of the acute event, and another 5 million remain with serious disabilities. In 2010, the prevalence of stroke worldwide was 33 million, of whom 16.9 million were in the first episode and it is estimated that by 2050 stroke will become the leading cause of death.

In Romania, a person dies every 10 minutes secondary to stroke. The statistics provided by the Ministry of Health ranks us first in the world to stroke mortality, with 177 deaths per 100,000 inhabitants, compared with the US, which accounts for about 33 deaths from stroke every 100,000 inhabitants. One important thing to note is that a third of strokes occur in persons who have less than 65 years. Inadequate access to treatment and secondary prophylaxis increases the risk of complications so that more than 400,000 repeat the vascular event shortly after first stroke event.

The high incidence and implications that stroke has on the individual, family and social system and health requires close interdisciplinary collaboration to implement a biological protocol

for primary prevention based on the use of molecular markers to facilitate firstly the identification of individuals at risk and also the opportunities for personalized therapy, which is why medical research in the last decade have tried to identify and decipher the etiopathogenic mechanisms associated to stroke and its subtypes.

Ischemic stroke has a genetic basis and is considered to be a multifactorial disease and thus difficult to study from a molecular point of view, due to the interaction genotype-environment-phenotype, genetic and nongenetic heterogeneity, due to polygenic transmission with variable penetrance and not least, age of onset. In recent years genetic studies have focused on identifying candidate genes and allelic variants that could confer susceptibility to stroke and their association with risk factors that can have an amplify the effect on the phenotype of this pathology.

This work comprised two studies and was designed as a case-control, retrospective, randomized study. The first study aimed to investigate TNF- $\alpha$  (rs1800629), IL-6 (rs1800795) gene variants and the the second of FGB (rs 180079), GP (rs5918) and FXIII (rs5985) gene variants as potential risk factors in ischemic stroke etiopathogeny. In both studies we analyzed 298 subjects distributed in two groups: 148 patients with ischemic stroke pathology who composed the study group and 150 patients without a history of cerebrovascular events who represented the control group, that were recruited from the Medical Clinic II SCJUCJ, Romania.

Analysis of the 5 studied gene polymorphisms required the use of molecular genetics techniques (DNA extraction and purification, PCR amplification of DNA, digestion and electrophoresis segments of interest), according to current and well-defined protocols.

The study results show a great heterogeneity in the distribution of variant genotypes and alleles in the studied population.

## **Study 1. The role of TNF- $\alpha$ rs1800629 and IL-6 rs1800795 genetic variants in ischemic stroke etiopathogeny**

### **Introduction**

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) and IL-6 (interleukin 6) are two important pro-inflammatory cytokines as a response to initiation and regulation of the inflammatory process by increasing capillary permeability and endothelial activation, leading ultimately to the changes of adhesion and excessive neutrophil accumulation in capillaries and small vessels. A high expression of these two pro-inflammatory cytokine was observed in the blood plasma and in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with ischemic stroke. Also, TNF- $\alpha$  emphasizes cerebral ischemic lesion and increases the size of the area affected by various mechanisms, including thrombosis, by stimulating leukocyte adhesion and infiltration of inflammatory events at the site of injurie. IL-6 activity was initially considered of having an important role in the etiopathogeny of ischemic cardiovascular disease, including unstable angina and acute coronary syndromes. IL-6 gene expression is increased in animal models of cerebral ischemic injury/reperfusion. In humans, elevated plasma levels were associated with worsening neurological progression early after ischemic stroke and lacunar infarction.

Considering the lack of epidemiological data regarding the role of genetic factors involved in the etiopathogeny of stroke in the romanian population, in this study we investigated a possible association of functional polymorphisms TNF- $\alpha$  -308 G>A (rs1800629) and IL-6 -174 G>C (rs1800795) in a group of patients with ischemic stroke, from northwestern Transylvania.



## Conclusion

- TNF- $\alpha$  -308G>A and IL-6 -174G>C gene polymorphisms analysis revealed a frequency of 13.7% for variant allele A, respectively 39.7% for variant allele C in the control group in the control group. Association between TNF- $\alpha$  -308G> A and IL-6 -174G> C polymorphisms and ischemic stroke revealed no statistically significant differences, between the two studied groups, for variant allele A carriers ( $p = 0.673$ , OR 0.900, 95% CI: 0.560 1453); respectively C carriers ( $p = 0.161$ , OR 0.790, 95% CI: 0.564 to 1.100) on the risk of ischemic stroke;
- Association between TNF- $\alpha$  -308G> A and IL-6 -174G> C polymorphisms and ischemic stroke did not show statistically significant differences in terms of risk of developing ischemic stroke in the presence of variants genotypes or allele regardless of sex or risk factors;
- Association between TNF- $\alpha$  -308G> A and IL-6 -174G> C polymorphisms and Caprini average score showed no statistically significant difference in the group of patients according to the dominant model of analysis;

## Study 2. The influence of FGB rs1800790, FXIII rs5985 and GPIIIa rs5918 gene variants on ischemic stroke

### Introduction

Hemostatic balance is the result of interaction between coagulant and anti-coagulants factors, and by their synergism provides hemostasis in vascular lesion. Fibrinogen is one of the factors involved in hemostasis, playing an essential role in platelet aggregation by binding to their surface receptors, like glycoprotein IIb-IIIa, fibrinogen cross-links platelets essential for incorporating new platelets into the developing thrombus. Moreover, at the end of the coagulation cascade, fibrinogen is converted to fibrin, an insoluble protein which forms a network of fibers over the injured site; platelets and other blood cells get caught in this network and form a blood clot. The production of this hemostatic plug after vascular lesions is crucial and highly dependent on platelet function, which is why the FGB and GP gene variants have been extensively studied in cardiovascular and cerebrovascular pathology. Polymorphism -455 G>A (**rs1800790**) in the FGB gene was investigated as a possible risk factor in the development of ischemic stroke.

Recent studies have demonstrated the mechanism by which the GPIIIa PIA1/A2 (**rs5918**) functional polymorphism contributes to arterial thrombosis. This polymorphism causing an increased reactivity by stimulating the formation of networks with serum immobilisable fibrinogen, plasma actin polymerization exacerbation and fibrin clot excessive retraction. Thus alters platelet function, supporting a major contribution in the etiopathogenesis of ischemic cerebrovascular diseases.

Another important factor in the coagulation is FXIII. The main role of this biochemical factor in normal hemostasis is to form covalent cross-link with fibrin chains and other proteins involved in the regulation of fibrinolysis on fibrin network. By forming these cross-link networks, FXIII modulates rigidity, elasticity and mechanical integrity of the blood clot, increasing the strength in fibrinolysis. The deficiencies of FXIII causes severe haemorrhages, untreated patients frequently suffer fatal cerebral haemorrhages. Thereby FXIII gene variants research is of great interest, including gene polymorphism FXIII Val34Leu (**rs5985**), which is the most extensively studied in ischemic stroke.

Limited studies regarding the role of functional polymorphisms in genes FGB, GPIIIa, FXIII in ischemic stroke in romanian population justifies the current study. We followed the hypothesis formulated based on research of gene variants FGB -455 G> A, GPIIIa PIA1 / A2 and FXIII Val34Leu influence in a group of patients with ischemic stroke in northwestern Transylvania.

## Conclusion

- GPIIIa PIA1/A2 gene variant analysis revealed a frequency of 10.7% for variant allele A2 in the control group. Association between GPIIIa PIA1/A2 gene variant and ischemic stroke revealed no statistically significant differences, between the two studied groups, for variant allele A2 carriers ( $p=0.823$ ; OR: 0.944; 95%CI:0.558-1.599) on the risk of ischemic stroke;
- Association between FGB -455 G>A gene variant and ischemic stroke revealed a significant lower risk correlation for ischemic stroke, using the dominant model ( $p = 0.037$ , OR: 0.612, 95% CI: 0.387 to 0.969);
- Evaluation of the association between the FGB -445 G>A gene variant genotypes in the presence of risk factors, revealed a significant inverse association for carriers of the variant genotypes only in the presence of hypertension ( $p=0.026$ ; genotypes GA: OR:0.404; 95%CI: 0,207-0,787 / AA- OR: 0.726; 95%CI: 0.254-2.286) but not for smoking;
- Association between FGB -455G> A gene variant and ischemic stroke with the risk factors and demographic characteristics revealed a positive correlation at the lower limit of statistical significance with the risk of developing ischemic stroke, by dominant model ( $p=0.036$ ; OR: 0.607; 95% CI: 0.381-0.968);
- FXIII Val34Leu gene variant analysis revealed a frequency of 25.3% variant allele Leu34 in the control group. Association between FXIII Val34Leu gene variant and ischemic stroke revealed statistically significant differences between the two studied groups for variant allele Leu34 carriers ( $p=0.013$ ; OR: 0.599; 95%CI: 0.401-0.894) having a lower risk of ischemic stroke;
- We evaluated the association between the FXIII Val34Leu gene variant and ischemic stroke according to genotype, and found positive statistically significant differences between Val/Leu or Leu/Leu genotype carriers and Val/Val carriers ( $p=0.033$  genotype Val/Leu OR:0,569; 95%CI:0.351-0.924; genotype Leu/Leu OR:0.343; 95%CI:0.086-1.371) having a lower risk of ischemic stroke;
- Association between FXIII Val34Leu gene variant and ischemic stroke revealed a significant correlation, thus decreasing the risk of ischemic stroke, under the dominant model ( $p = 0.012$ ; OR: 0,546; 95% CI: 0.341-0.876). Furthermore male carriers of Leu34 variant allele showed significant differences compared with the males from the control group, when using the dominant model ( $p = 0.016$ ; OR: 0.462; 95% CI: 0.246-0.868);
- Evaluation of the association between the FXIII Val34Leu gene variant according to genotypes and ischemic stroke with the risk factors, revealed a positive association at the lower limit of statistical significance to variant genotypes carriers in the absence of smoking ( $p =0.057$  genotype Val/Leu OR: 0,609; 95%CI : 0.343 -1.081, genotype Leu/Leu OR: 0.159; 95%CI:0.019-1.359); This association is significant when statistical analysis is performed by the dominant model ( $p=0.013$ , OR: 0.564, 95% CI: 0.339 to 0.878), reducing the risk for ischemic stroke;
- Association between FXIII Val34Leu gene variant with the risk factors and demographic characteristics revealed a significant inverse association with the risk of ischemic stroke for the dominant model ( $p = 0.008$ , OR: 0.521, 95% CI: 0.321 to 0.846);

This thesis comes as a response to current problems existing in stroke pathology: insufficient information relating to the identification of molecular biomarkers possible involved in stroke etiology; insufficient data regarding clear mechanisms underlying the onset, evolution and therapeutic response and not least the prospect of using data like these in clinical practice which could improve prognosis and decrease morbidity associated with this cerebrovascular pathology.

Through this research we tried to extend our knowledge on the genetic field of ischemic stroke, to our knowledge, unique to our population, this study is among the few of its kind in Romania. Thus, the study results provide for the first time in our population, both information regarding the distribution of the 5 polymorphisms investigated, as well as their association with ischemic stroke.