

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

IMPLICAȚIILE AQUAPORINELOR ÎN PATOLOGIA  
CARDIOVASCULARĂ

Teză de doctorat  
REZUMAT

Conducător științific  
PROF.DR. VICTOR IOAN POP

Doctorand  
ȚEHANIUC ALINA-MARIA

2011

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

	Lista abrevierilor folosite în lucrare	10
	Introducere	13
<b>I</b>	<b>PARTEA GENERALĂ</b>	<b>16</b>
1	Bolile cardiace – un indicator al stării generale de sănătate a populației	16
1.1	Epidemiologie	16
1.2	Factori de risc cardiovasculari	17
1.3	Patologii cardiace în care sunt implicate aquaporinele	19
1.3.1	Bolile coronariene	19
1.3.1.1	Angina pectorală stabilă	19
1.3.1.2	Sindroame coronariene acute: Angina pectorală instabilă și infarctul miocardic fără supradenivelare de segment ST	22
1.3.1.3	Infarctul miocardic cu supradenivelare de segment ST	24
1.3.2	Hipertensiunea arterială	27
1.3.3	Insuficiența cardiacă	32
2	Aquaporinele în patologia cardiovasculară	36
2.1	Insuficiența cardiacă congestivă	39
2.2	Boala ischemică cardiacă	43
2.3	Hipertensiunea arterială	44
2.4	Obezitatea	46
3	Aquaporinele: aspecte de biologie moleculară și medicină	48
3.1	Structura proteinelor canal pentru apă	49
3.2	Localizarea și rolul fiziologic al aquaporinelor	54
4	Spectroscopia RMN în studiul materialelor biologice	68

4.1	Evoluția cunoștințelor de rezonanță magnetică nucleară	68
4.2.	Principiile fenomenul de rezonanță magnetică	70
4.3.	Aplicații biomedicale ale spectroscopiei RMN	73
5	Transportul apei prin membrana eritocitară	74
5.1	Evoluția conceptelor de transport al apei prin membranele biologice	74
5.2	Contribuția școlii de cercetare clujene la clarificarea aspectelor legate de transportul apei prin membrana eritocitară	77

## II

### CONTRIBUȚII PERSONALE

6	Determinarea caracteristicilor de permeabilitate difuzională la apă a membranelor eritocitare în cazul unor pacienți cu afecțiuni cardiace și subiecți de control	80
6.1	Materiale și metode	81
6.1.1	Loturile studiate	81
6.1.2	Măsurători de morfologie	85
6.1.3	Măsuratori de permeabilitate	90
6.2	Măsurarea caracteristicilor de morfologie și permeabilitate la apă a membranelor eritocitare la subiecți de control	99
6.2.1	Măsurători de morfologie	99
6.2.2	Determinări de permeabilitate pentru apă prin RMN	101
6.2.3	Discuții	104
6.2.3.1	Interpretarea rezultatelor morfologice	104
6.2.3.2	Interpretarea rezultatelor de permeabilitate	107
6.3	Măsurarea caracteristicilor de morfologie și permeabilitate la apă a membranelor eritocitare la pacienți cu boli cardiovasculare	114
6.3.1	Măsurători de morfologie	126
6.3.2	Măsurători de permeabilitate	128

6.4	Patologii cardiace	133
6.4.1	Boala coronariană	133
6.4.1.1	Măsurători morfologice la pacienții cu boala coronariană	133
6.4.1.2	Determinări de permeabilitate la pacienții cu boala coronariană	136
6.4.1.3	Discuții	140
6.4.2	Hipertensiunea arterială	175
6.4.2.1	Măsurători morfologice la pacienții cu hipertensiune arterială	176
6.4.2.2	Determinări de permeabilitate difuzională la pacienții cu hipertensiune arterială	178
6.4.2.3	Discuții	198
6.4.3	Insuficiența cardiacă	208
6.4.3.1	Măsurători de morfologie la pacienți cu insuficiență cardiacă	229
6.4.3.2	Determinări de permeabilitate difuzională la pacienți cu insuficiență cardiacă	233
6.4.3.3	Discuții	236
	<b>CONCLUZII GENERALE</b>	241
	<b>REFERINȚE</b>	243

## Rezumat

*Cuvinte cheie – boli cardiovasculare, aquaporine, spectroscopie RMN*

Bolile cardiovasculare includ afecțiuni ale inimii, arterelor și venelor care asigură necesarul de oxigen pentru creier, cord și alte organe vitale, a căror funcție se desfășoară strict dependentă de oxigen.

Pe plan mondial bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de deces sau de spitalizare la nivelul populației adulte și vârstnice, cu excepția continentului african, în care patologia cardiacă este “detronată” de bolile de etiologie infecțioasă.

Se estimează că un diagnostic timpuriu al bolilor cardiovasculare în sine și al factorilor de risc aferenți (vârsta, tensiunea arterială, sexul, nivelul de colesterol, prezența diabetului zaharat, fumatul, obezitatea, sedentarismul ș.a.), cu o intervenție adecvată asupra acestora din urmă, poate reduce incidența mortalității provocate de afecțiunile cardiace cu până la 80%.

Toate organismele vii sunt constituite majoritar din apă (60% - 70% din corpul mamiferelor). Prin proprietățile sale fizico-chimice, apa contribuie la menținerea echilibrului osmotic, metabolic, termic și hidroelectrolitic al celulelor/organismului. Hematiile umane constituie modelul optim pentru studiul transportului transmembranar al apei, deoarece ele se pot separa relativ simplu din sânge, au o singură membrană (prezentând o permeabilitate crescută comparativ cu a altor celule), iar transportul apei duce, în anumite condiții, la modificări ale raportului volum celular/arie care pot fi relativ ușor cuantificate. Aceste studii au dus la descoperirea canalelor pentru apă, fiind identificate o serie de 13 așa-numite aquaporine. Deși consacrate grație rolului de a facilita transportul transmembranar al apei, aquaporinele au ajuns să includă și alte subclase funcționale - cum ar fi aquagliceroporinele sau supra-aquaporinele de la nivel subcelular. Având în vedere, pe de o parte, importanța bolilor cardiovasculare, iar, pe de alta, progresele înregistrate în elucidarea structurii proteinelor canal pentru apă și a rolului lor fiziologic în transportul apei la nivel membranar, s-a născut ideea studierii implicațiilor acestor proteine transmembranare în patologia cardiovasculară.

Lucrarea conține două părți: partea generală și contribuția personală. Partea generală este alcătuită din patru capitole.

Primul capitol prezintă epidemiologia bolilor cardiovasculare, factorii de risc, precum și bolile cardiovasculare care au fost studiate (definiție, clasificare, diagnostic clinic și paraclinic, diagnostic diferențial, tratament).

Capitolul 2 face o trecere în revistă a localizării aquaporinelor la nivelul cordului și a vaselor de sânge, precum și a implicării lor în bolile cardiovasculare.

Capitolul 3 prezintă structura proteinelor canal pentru apă, tipurile de aquaporine, localizarea acestora și rolul lor pe aparate și sisteme.

Capitolul 4 include descrierea principiilor fenomenului de rezonanță magnetică, evoluția cunoștințelor în domeniul rezonanței magnetice nucleare și a diferitelor aplicații biomedicale ale spectroscopiei RMN.

Capitolul 5 prezintă evoluția conceptelor de transport al apei prin membranele biologice și contribuția școlii de cercetare clujene la clarificarea aspectelor legate de transportul apei prin membrana eritrocitară.

Contribuția personală a constat în determinarea caracteristicilor de permeabilitate difuzională la apă a membranelor eritrocitare în cazul unor pacienți cu afecțiuni cardiace și subiecți de control compararea acestora pe grupe de vârstă și pe boli cardiovasculare. Determinările au vizat măsurarea caracteristicilor dimensionale ale eritrocitelor prin videomicroscopie, măsurarea caracteristicilor de permeabilitate membranală prin spectrometrie RMN și interpretarea statistică a rezultatelor folosind aplicația Excel din programul Microsoft Office.

În program au fost înrolați 128 de voluntari adulți, între care 58 de subiecți normali, și 70 subiecți cu boli cardiovasculare, cu acordul informat al acestora. Din motive deontologice aceștia sunt menționați doar cu inițialele numelui, vârstă și sex, împreună cu numărul fișei de observație. Pacienții cu boli cardiovasculare au fost recrutați voluntar de pe secția cardiologie a Spitalului Județean Suceava în perioada 2003-2009. Nu au fost incluși în program subiecți sub 35 de ani (nici controale) deoarece nu au existat suficiente cazuri de patologii cardiace severe pentru a permite comparații statistice relevante. Între cei 128 de voluntari repartitia pe sexe a fost egală: 64 femei și 64 bărbați. Aceștia au fost repartizați pe trei grupe de vârstă ( 30-49,9 ani , 50-64,9 ani și peste 65 de ani) atât în cazul subiecților de control, cât și al pacienților cu boli cardiovasculare. Patologia cardiacă implicată a cuprins pacienți cu cardiopatie ischemică (angină stabilă, angină instabilă, infarct miocardic cu și fără supradenivelare ST), hipertensiune arterială, respectiv insuficiență cardiacă (clasele NYHA I-IV).

Mostrele de sânge au fost recoltate pe heparină (15IU/ml), refrigerate imediat (la 4 °C) și prelucrate în decurs de 48 de ore de la recoltare. Suspensiile de hematii au fost agitate ușor pentru omogenizare fără spargerea membranei celulare, apoi probele au fost introduse în mediu izoton ("tampon de spălare" – o soluție de NaCl 150mM, glucoză 5,5 mM, HEPES 5 mM) și sedimentate prin triplă centrifugare timp de 10 minute la 4000 rpm, după spălări succesive în mediu izoton, urmate de eliminarea supernatantului prin aspirare la trompa de vid. După a treia centrifugare, o parte din suspensia de eritrocite (aproximativ o treime) a fost supusă unei centrifugări suplimentare de 60 minute la 10000 rpm, pentru eliminarea completă a apei, celelalte două treimi fiind resuspendate la un hematocrit de 50% (1:1) în soluție tampon de spălare la care s-a adăugat 0,5% (procente volumice) de albumină serică bovină.

Din această ultimă tranșă o parte (treime) a fost folosită pentru determinarea parametrilor morfologici (volum, suprafață) prin videomicroscopie, iar cealaltă pentru determinarea prin spectroscopie RMN a timpului de relaxare al protonilor apei în spațiul extracelular ( $T_{2a}$ ), în prezența unor ioni paramagnetici  $Mn^{2+}$ . Tranșa separată inițial și centrifugată suplimentar, având un hematocrit de minim 95%, a fost folosită pentru determinarea prin spectroscopie RMN a timpului de relaxare al protonilor apei intracelulare ( $T_{2i}$ ) în absența ionilor  $Mn^{2+}$ .

Determinările morfologice au vizat estimarea numărului de hematii într-un volum dat, determinarea hematocritului (concentrația de eritrocite în proba diluată în mediu izoton folosită pentru determinarea  $T_{2a}$ ), respectiv determinarea diametrului celulelor, estimarea ariei, a volumului și a raportului V/A.

Pentru determinarea numărului de hematii suspensia eritrocitară s-a diluat în TS după care o picătură s-a picurat în camera plăcii Thoma, acoperindu-se placa cu lamela astfel încât să apară inele de refracție. S-a examinat proba la un microscop prevăzut cu cameră video, numărându-se hematiile din câteva serii de grile (16 pătrate mari - 256 pătrate mici). În funcție de valorile obținute, softul folosit (Olympus MicroImage) a afișat concentrația volumică - exprimată ca milioane RBC/mm<sup>3</sup>.

Pentru determinarea hematocritului, suspensia eritrocitară s-a aspirat după agitare în trei capilarele speciale, care apoi au fost sigilate cu plastelină și centrifugate 8-10 minute pe o microcentrifugă Hawksley. După sedimentare în capilare, hematocritul a fost determinat folosind scala Hawksley, rezultatul fiind exprimat procentual ca medie aritmetică a celor trei măsurători.

Pentru determinarea diametrului hematiilor, pregătirea lamei cu proba de eritrocit a implicat picurarea suspensiei de hematii peste un "film" de soluție BSA, uniformizare prin mișcarea ușoară a lamei și delimitarea conturului cu un fir subțire de nylon, presarea lamelei și îndepărtarea excesului de lichid prin tamponare cu hârtie de filtru. După preparare, lamele au fost examinate la microscop cu un obiectiv 40X, iar diametrele au fost măsurate pe imaginile salvate electronic (prin raportare la rigle micrometrice etalonate corespunzător setărilor) cu același soft Olympus MicroImage. După efectuarea a circa 70 de măsurători pentru fiecare probă în parte, diametrul a fost calculat ca medie +/- deviație standard a tuturor măsurătorilor efectuate. Pe baza unor aproximări în funcție de diametrul măsurat (cu formule adaptate în funcție de specie), programul a afișat valoarea ariei celulei și a volumului acesteia (exprimat ca raport între valoarea hematocritului și numărul de celule estimate pe mm<sup>3</sup>, multiplicat de 10 ori).

Folosind protocolul Morariu-Benga dezvoltat pe baza metodei propuse de Conlon și Outhred, utilizând un spectrometru Bruker Minispec (Bruker Optics GmbH) s-au determinat prin spectroscopie RMN timpii de relaxare ai protonilor excitați la 20 MHz în câmp pulsant (metoda Carr-Purcell-Meiboom-Gill) din “apa extracelulară” ( $T_{2a}$ , în prezența ionilor paramagnetici  $Mn^{2+}$ ) și din “apa intracelulară” ( $T_{2i}$ , în absența ionilor paramagnetici  $Mn^{2+}$ ), din proba cu hematocrit minim 95%, la care apa extracelulară a fost practic complet eliminată) la temperaturi de 15, 20, 25, 30, 37 și 42 °C. Alegerea temperaturilor a avut în vedere acoperirea intervalului 25 °C – 37 °C (temperatura de referință pentru “mediul ambiant”, respectiv temperatura fiziologică a corpului uman).

După intrarea aparatului Bruker Minispec în regim de lucru, calibrarea acestuia și stabilizarea temperaturii, peste eritrocitele suspendate în mediu izoton la un hematocrit de 40%, ținute pe gheață în tuburi speciale pentru RMN, s-au adăugat cantități egale de soluție BSA și soluție de dopaj (40mM  $MnCl_2$ , 100mM NaCl). Tubul s-a introdus apoi în baia de termostatare și s-a lăsat câteva minute (circa 5) pentru omogenizare la temperatura băii de termostatare, apoi s-a trecut la măsurarea valorilor  $T_{2a}$  la 15 °C (minim 10 măsurători). În paralel, în baia de termostatare s-a introdus tubul cu suspensia eritrocitară nedopată (600  $\mu$ l eritrocite, hematocrit minim 95%). Mai puțin sensibil, acesta a fost lăsat la omogenizat pe durata determinărilor  $T_{2a}$ . După terminarea măsurătorilor  $T_{2a}$ , s-a resetat aparatul la alți parametri, adaptați înregistrării unui semnal monoexponențial, și s-a trecut la măsurarea timpilor de relaxare ai protonilor din apa intracelulară,  $T_{2i}$  (cu unul sau două ordine de mărime mai mari decât cei  $T_{2a}$ ), până la zece determinări la fiecare tub de probă. După terminarea măsurătorilor probele s-au reintrodus în gheață, s-a setat temperatura băii de termostatare la valoarea imediat următoare (în general 20 °C) și s-a așteptat stabilizarea temperaturii, apoi s-au măsurat  $T_{2a}$  și  $T_{2i}$  în condițiile descrise anterior. S-au repetat operațiunile la toată gama de temperaturi vizate.

În paralel s-au măsurat valorile  $T_{2a}$  și la probele tratate cu compuși mercurici (PCMB sau PCMBs, pentru blocarea canalelor de apă după metoda Macey-Farmer), în general doar la valorile de 25 și 37 °C. La aceste probe, suspensia eritrocitară a fost anterior supusă unei operații de incubare în baie termostată, la 37 °C. Pe parcursul perioadei de studiu (2003-2009) s-au încercat câteva variante de incubare, cu diverse concentrații (de la 0,5 la 2mM) și durate (de la 15 la 60 minute), cel mai des folosindu-se rețeta PCMB 1 mM cu incubare 60 minute la 37 °C. Înregistrările au fost consemnate într-un document tabelar.

După măsurarea timpilor de relaxare  $T_{2a}$  și  $T_{2i}$  în condițiile de lucru vizate și calcularea unor valori medii pentru fiecare temperatură în parte s-a trecut la calcularea parametrilor de permeabilitate



difuzională. Timpul de schimb al apei ( $T_e$ ) definit de Conlon și Outhred a fost determinat din ecuația  $1/T_e = (1/T_{2a}) - (1/T_{2i})$ .

Cunoscând parametrii morfologici ai eritrocitelor din determinările de videomicroscopie, s-a calculat permeabilitatea difuzională (echivalată pentru  $1 \text{ cm}^2$  din suprafața exterioară a membranei) pentru temperaturile de  $15^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  și  $42^\circ\text{C}$ , folosind formula  $P_d = (1/T_e) \cdot (V/A)$ . Pentru calcularea energiei de activare a procesului de transport al apei prin membranele eritrocitare s-a plecat de la ecuația lui Arrhenius modificată,  $k = A(T/T_0)^n \cdot e^{-E_a/RT}$ , unde  $R$  este constanta gazelor și  $T$  temperatura absolută ( $^\circ\text{K}$ ), iar  $n$  variază în intervalul  $(-1,1)$ . Dacă se acceptă dependența arbitrară de temperatură a factorului pre-exponențial, logaritizarea constantei lui Boltzmann duce la ecuația  $[\ln(k) = -E_a/RT + \ln(A)]$ . Prin trasarea drepte de distribuție a valorilor  $\ln(k)$  funcție de  $T^{-1}$  s-a obținut valoarea constantei  $k$  pentru intervalul de temperatură analizat (panta dreptei). Variația energiei de activare s-a calculat ca diferență pe axa  $Oy$  a proiecțiilor de pe dreapta de distribuție aferente diferenței de temperatură pe axa  $Ox$  (între cele două valori ale intervalului analizat).

După măsurarea parametrilor morfologici și a celor de permeabilitate difuzională s-au efectuat comparații între subiecții de control și cei cu boli cardiovasculare, per ansamblu și la nivelul diferitor grupe de vârstă. Multitudinea de boli asociate, precum și prezența unor factori de risc, a sugerat calcularea parametrilor pentru pacienții prezentând diverse patologii și compararea lor cu parametri similari înregistrați în cazul subiecților de control.

## Concluzii

Afecțiunile cardiace constituie o problemă majoră pentru starea de sănătate a populației generale. În România rata mortalității prin boli cardiovasculare reprezintă 61% din numărul total de decese, ceea ce justifică toate eforturile pentru cunoașterea în profunzime a tuturor mecanismelor desfășurate la nivel celular și molecular, inclusiv cele de transport al apei.

Lotul de voluntari înscriși în studiu a fost suficient de mare ca număr, cu vârste diferite, cuprinse între 30 de ani și 82 ani, cu patologii multiple. A existat un echilibru ca vârstă și sex între subiecții de control și bolnavii cardiovasculari.

Spectroscopia RMN, folosită ca tehnică de bază la toți subiecții înrolați în acest studiu, este o metodă de evaluare sigură, eficientă, cu rezultate reproductibile, utilizată în biochimie, biofizică, biologie moleculară, genetică. Spectroscopia RMN oferă mijloace pentru cuantificarea unor caracteristici cum ar fi volumul celular, potențialul de membrană sau schimbări ale formei celulare. Pentru a studia caracteristicile de difuzie ale moleculelor de apă în țesuturi și efectul lor asupra semnalului RMN de cuantificare a acestui proces au fost propuse câteva modele care interpretează semnalul fizic măsurat în funcție de natura țesutului și parametrii gradientilor în câmp pulsant. Cunoașterea acestor aspecte ajută eforturile de descriere cantitativă la nivel molecular a proceselor ce se petrec in vivo.

Au fost realizate numeroase măsurători ale parametrilor morfologici și difuzionali la toți subiecții, în funcție de vârstă, de patologia cardiacă și asocieri ale altor afecțiuni. Aceste măsurători au evidențiat o serie de modificări, minore, dar unele dintre ele cu semnificație statistică. Cea mai importantă este modificarea remarcată a fost creșterea permeabilității difuzionale la subiecții de control peste 65 ani, comparativ cu cei între 50-65ani.

Compararea parametrilor difuzionali între subiecții de control și cei cu afecțiuni cardiovasculare a indicat prezența unor modificări statistice semnificative la grupa de vârstă 65-82 ani, la toate temperaturile în cazul permeabilității difuzionale  $P_d$  (dar nu și în cazul energiei de activare). În cazul acestui ultim parametru, semnificație statistică a prezentat compararea Ea la grupa de vârstă 50-64,9 ani între subiecții de control și subiecții cu boli cardiovasculare.

Compararea între pacienții încadrați în diferite clase NYHA de insuficiență cardiacă congestivă a evidențiat modificări statistice semnificative între pacienții cu NYHA I și cei din clasa NYHA II la temperaturile de 15, 20, 25, 37 și 42 °C. Nu au fost evidențiate alte modificări semnificative nici la compararea celorlalte clase NYHA între ele, nici între fiecare clasă de insuficiență cardiacă și totalul pacienților cu insuficiență cardiacă. Valorile energiei de activare au fost modificate statistic semnificativ atât la compararea clasei NYHA II cu NYHA I și respectiv NYHA III cât și cu tot lotul de bolnavi cu insuficiență cardiacă.

Lucrarea a prezentat elemente de originalitate intrând într-un domeniu sărac în materiale publicate, cu posibilitatea aplicării rezultatelor în practica curentă și ca bază de pornire pentru alte cercetări.

## ***CURRICULUM VITAE***

**1. Nume, prenume:** ȚEHANIUC ALINA - MARIA

**2. Data și locul nașterii:** 08/02/1970 – SUCEAVA

**3. Cetățenie:** română

**4. Stare civilă:** căsătorită

**5. Adresa:** str. Mărăști nr.11, bloc 11, sc. A, Ap. 7, mun. SUCEAVA, jud.SUCEAVA

**6. Date de contact:** telefon 0745520764, e-mail: [alinademilt@yahoo.com](mailto:alinademilt@yahoo.com)

**7. Studii absolvite:**

**Instituția:**

- Liceul “Ștefan cel Mare” Suceava, profil chimie – biologie : 1984 -1988
- Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr. T. Popa” Iași, profil medicină generală: 1990 -1996

**8. Experiența profesională:**

- 1998 - 2003 - Medic rezident Cardiologie - Institutul Inimii “N.Stăncioiu “ Cluj -Napoca
- 2003 - Medic specialist cardiologie - Spitalul Județean de Urgență Suceava
- 2004 - Competență în “Echografie vasculară “
- 2005 - Competență în “Echocardiografie generală “
- 2009 – Medic primar cardiologie

**9. Locul de muncă actual și funcția:**

- Spitalul Județean de Urgență Suceava – secția cardiologie – medic primar cardiolog

**10. Vechime la locul de muncă actual:** 8 ani

**11 Apartenența la organizații și asociații profesionale**

1. SOCIETATEA ROMÂNĂ DE CARDIOLOGIE
2. SOCIETATEA EUROPEANĂ DE CARDIOLOGIE

**12. Activitate științifică :**

- doctorand Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj – Genetică
- coautor la 4 lucrări științifice
- prim autor la 2 lucrări științifice
- participant la 5 studii clinice multicentrice

**Participări la manifestări științifice în țară cu lucrări publicate în rezumat:**

- Gh. Benga, Ștefana Bâlici, E. Mironescu, **A.M. Țehaniuc**, Water permeability of red blood cells in aged people, *Fiziologia (Physiology)*, Timișoara, p. 9, 2007.
- Ștefana Bâlici, Eugen Mironescu, Adina Chiș, Radu Munteanu, **Alina Țehaniuc**, Gheorghe Benga, Studii ale permeabilității pentru apă a membranelor eritrocitare umane pe grupe de vârstă, prezentare poster, A XXVI-a Sesiune științifică anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară, Cluj-Napoca, 12 - 15 iunie 2008, pag. 151 (volum de rezumate).
- **Alina Țehaniuc**, Eugen Mironescu, Ștefana Bâlici, Adina Chiș, Radu Munteanu, Gh. Benga, Aquaporinele în patologia cardiovasculară, Al 8-lea Congres Național de Medicină de Laborator cu participare internațională – Iași 2009.

**Lucrări publicate in extenso în reviste internaționale sau naționale:**

- **Țehaniuc A.M**, Benga G. Red Blood Cell Water Permeability in Elderly People. *Acta Endocrinologica (Buc)*, 2011; VII(3):299-310. *ISI Factor de impact-3.884 (studiu cuprins în capitolul General Endocrinology)*
- Gh. Benga, Ștefana Bâlici, E. Mironescu, **A.M. Țehaniuc**, Water permeability of red blood cells in aged people, *International Conference on Gerontology*, Arad, Romania, p. 9, 15-16 september 2006.

**Colaborări la cărți coordonate de autori din alte centre universitare:**

- Benga Gheorghe, Mironescu Eugen, Bâlici Ștefana, **Țehaniuc Alina**, Nicula Gheorghe, Water permeability of red blood cells in elderly people, *Gerontology Today*, sub. red. Schneider Francisc și colab., Editura Viața Medicală Românească, București, 2007: 31 – 37.

**Participări la conferințe naționale și internaționale reprezentative :**

- Congresul Național de cardiologie 2004, 2005, 2006, 2007, 2009, 2011
- Congresul Național de Echocardiografie 2004, 2005, 2007
- Conferința Națională de Biologie Celulară 2007
- Congresul Internațional de cardiologie VIENA 2007, MUNCHEN 2008
- Simpozion –“Current trends and future strategies in cardiology treatment” Riga 2011
- Al 8-lea Congres Național de Medicină de Laborator cu participare internațională – Iași 2009
- Conferința Națională de Aterotromboză 2006, 2008
- Conferința Națională a grupurilor de Lucru ale Societății Române de Cardiologie 2007, 2011
- Conferința Națională a SUMIGG - Iași 2008

- Euroecho Lyon 2009, Madrid 2010
- EuroPREvent Stockholm 2009

### **13. Limbi străine cunoscute:**

- engleză - franceză – scris vorbit mediu, citit bine
- italiana – noțiuni

### **14. Specializări și calificări:**

- 2005 – Masa Rotundă Interactivă – Hipertensiunea Arterială de la Studii și Ghiduri Către Pacienți – Suceava ;
- 2005 - Curs perfecționare - Noutăți și tendințe în Managementul Durerii – Iași ;
- 2006 - Curs perfecționare – Actualități în patologia valvulară – Iași ;
- 2006 - Curs perfecționare – Managementul Durerii partea a II - a – Suceava ;
- 2007 - Curs perfecționare – ARCA Aritmii Cardiace ;
- 2007 - Curs perfecționare – ELOGIU – Electrocardiografia în unele afecțiuni cardiovasculare – Suceava;
- 2007 – Curs perfecționare – Doppler Echocardiography from Basics to Advanced Applications – București;
- 2008 - Curs perfecționare – CULTURA Cum evaluăm cum tratăm Hipertensiunea arterială - Piatra Neamț;
- 2009 - Curs perfecționare – Imagistica în evaluarea patologiei cardiovasculare - București ;
- 2009 – Simpozion interactiv – Bazele bunei practici în studiul clinic (BPSC) pentru investigatori și monitori 2009 – București;
- 2011 - Simpozion interactiv – Basics on Good Clinical Practice for Investigators - București ;
- Certificat de absolvire a cursului de instruire/perfecționare profesională « Utilizator microcalculatoare IBM-PC », Suceava

**Data :**

10 octombrie 2011

**Semnătura :**

„IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY  
OF MEDICINE AND PHARMACY - CLUJ-NAPOCA

# **AQUAPORINS’ IMPLICATIONS IN CARDIOVASCULAR PATHOLOGY**

## **ABSTRACT of the DOCTORAL THESIS**

**Scientific supervisor:**

**PROF.DR. VICTOR IOAN POP**

**PhD student:**

**ȚEHANIUC ALINA-MARIA**

**2011**

## Summary

	List of abbreviations used in the paper	10
	Introduction	13
<b>I</b>	<b>STATE OF KNOWLEDGE</b>	<b>16</b>
1	Heart diseases - health status indicator for general populations	16
1.1	Epidemiology	16
1.2	Cardiovascular risk factors	17
1.3	Heart diseases involving aquaporins	19
1.3.1	Coronary diseases	19
1.3.1.1	Stable angina pectoris	19
1.3.1.2	Acute coronary syndromes: Unstable angina pectoris and non-ST segment elevation myocardial infarction (NSTEMI)	22
1.3.1.3	ST segment elevation myocardial infarction (STEMI)	24
1.3.2	Arterial High Blood Pressure (hypertension)	27
1.3.3	Heart failure	32
2	Aquaporins' involvement in cardiovascular pathology	36
2.1	Congestive heart failure	39
2.2	Ischemic heart disease	43
2.3	Arterial High Blood Pressure (hypertension)	44
2.4	Obesity	46
3	Aquaporins: molecular biology and medicine issues	48
3.1	Water channel proteins' structure	49
3.2	Water channel proteins' localization and physiological functions	54

4	NMR spectroscopy in the study of biological materials	68
4.1	NMR knowledge evolution	68
4.2.	Principles of magnetic resonance phenomena	70
4.3.	Biomedical applications of NMR spectroscopy	73
5	Water transport across the erythrocyte membrane	74
5.1	Evolution of knowlegde regarding water transport across biological membranes	74
5.2	Contributions of the Cluj Medical School researchers in clarifying issues concerning water transport across erythrocyte membranes	77
<b>II</b>	<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	<b>80</b>
6	Determination of water permeability indexes of the erythrocyte membranes in patients with heart diseases and control subjects	80
6.1	Materials and methods	81
6.1.1	Study groups	81
6.1.2	Morphology measurements	85
6.1.3	Permeability measurements	90
6.2	Measurement of morphology and permeability indexes in control subjects	99
6.2.1	Morphology measurements	99
6.2.2	Permeability measurements via NMR spectroscopy	101
6.2.3	Discussion	104
6.2.3.1	Interpretation of morphological indexes measurements	104
6.2.3.2	Interpretation of permeability indexes measurements	107
6.3	Measurement of morphology and permeability indexes in patients with cardiovascular diseases	114
6.3.1	Morphology measurements	126
6.3.2	Permeability measurements	128



6.4	Heart Diseases	133
6.4.1	Coronary diseases	133
6.4.1.1	Morphology measurements in patients with coronary diseases	133
6.4.1.2	Permeability measurements in patients with coronary diseases	136
6.4.1.3	Discussion	140
6.4.2	Arterial High Blood Pressure (hypertension)	175
6.4.2.1	Morphology measurements in patients with hypertension	176
6.4.2.2	Permeability measurements in patients with hypertension	178
6.4.2.3	Discussion	198
6.4.3	Heart failure	208
6.4.3.1	Morphology measurements in patients with heart failure	229
6.4.3.2	Permeability measurements in patients with heart failure	233
6.4.3.3	Discussion	236
	<b>GENERAL CONCLUSIONS</b>	241
	<b>REFERENCES</b>	243

## **ABSTRACT of the DOCTORAL THESIS**

Keywords - cardiovascular disease, aquaporins, NMR spectroscopy

Cardiovascular diseases include pathological conditions of the heart and/or blood arteries and veins that provide oxygen to the brain and other vital organs, whose normal functioning require a certain oxygen level.

Worldwide cardiovascular diseases are the leading cause of death or hospitalization in adult and elderly population, with the exception of the African continent, where infectious diseases are the main mortality cause.

It is estimated that an early diagnosis of cardiovascular diseases and related risk factors (age, blood pressure, sex, cholesterol levels, presence of diabetes mellitus, smoking habits, obesity, sedentary lifestyle etc.) and appropriate preventive actions can reduce the incidence of heart disease mortality by up to 80%.

All living organisms are made up mostly of water (60% - 70% of mammalian body). Its physical and chemical properties help maintaining the osmotic, metabolic, termic and electrolyte balance of the organism. Human erythrocytes provide an optimal model for the study of transmembrane transport of water, because they can be relatively simply separated, they present a single membrane (showing increased water permeability compared with other cells) and water transport processes generate, under certain conditions, cell volume/area changes that can be easily quantified. These studies led to the discovery of 13 water channels proteins (aquaporins). In spite of the fact that their established role was to facilitate the transmembrane transport of water, aquaporins have come to include other functional subclasses - such as glyceroporins (facilitating the transmembrane transport of glycerol), aquaglyceroporins (both water and glycerol), or superaquaporins (which may not facilitate water transport at all).

Given the importance of cardiovascular diseases, on one hand, and recent progresses in elucidating the structure of water channel proteins and their physiological role in water transport, on the other hand, the idea of studying the implications of these transmembrane proteins in the cardiovascular pathology came to life.

The thesis contains two parts: a general one (state of knowledge) and another including personal contributions. The state of knowledge part includes five chapters. The first one presents the epidemiology of cardiovascular diseases, risk factors and a series of cardiovascular diseases most frequently met in the patients enrolled in the study (definition, classification, clinical and laboratory diagnosis, differential diagnosis, treatment).

Chapter 2 provides an overview of aquaporin location in the heart and blood vessels, and their involvement in cardiovascular diseases.

Chapter 3 presents the structure of water channel proteins and their classification based on aquaporin location or function.

Chapter 4 includes description of the NMR spectroscopy principles, the state of knowledge in the field of nuclear magnetic resonance and various biomedical applications of NMR spectroscopy.

Chapter 5 shows how the concepts of water transport through biological membranes evolved in time and pays tribute to researchers from the medical school in Cluj for their contribution in clarifying issues related to water transport through the erythrocyte membrane.

Personal contributions were focused on spotting differences in the water permeability characteristics of the erythrocyte membranes in patients with heart diseases compared with control

subjects classified by age and diagnosis, with the idea of alternative treatment options in mind. This implied measurements of several morphology and permeability parameters involved in the water transport through the erythrocyte membranes (using video-microscopy and NMR spectrometry respectively) and statistical interpretation of the results (using the Microsoft Office Excel program).

The study enrolled 128 adult volunteers, including 58 control subjects and 70 patients with various cardiovascular diseases. Prior informed consent was obtained from each of them. For ethical reasons they are identified only by name initials, age and sex. Patients with cardiovascular diseases were recruited from Suceava County Hospital cardiology department during the 2003-2009 interval. Control subjects below 30 years were not included in the study as patients with severe cardiac pathology of similar age were scarce (if any) and relevant statistical comparisons could not be made. Among the 128 volunteers an equal distribution by gender was observed: 64 women and 64 men. Both the control subjects and the cardiac patients were divided into three age groups (30 to 49.9 years, 50 to 64.9 years and over 65 years). Regarding the major cardiac pathologies of patients involved in the study, these included ischemic heart diseases (stable angina pectoris, unstable angina pectoris, ST segment elevation myocardial infarction and non-ST segment elevation myocardial infarction), hypertension and heart failure (NYHA classes I-IV) respectively.

Blood samples were collected on heparin (15IU/ml), chilled immediately (at 4 °C) and processed within 48 hours. RBC suspensions were gently mixed, preventing breakage of the cell membranes, placed in isotonic medium (wash buffer - 150mm NaCl solution, 5.5 mM glucose, 5 mM Hepes) and sedimented by triple centrifugation (3x10 minutes at 4,000 rpm, after successive washes followed by removal of the supernatant via vacuum suction. After the third centrifugation, one third of the erythrocytes suspension was subjected to further centrifugation (60 minutes at 10,000 rpm) for the complete removal of water, while the other two thirds were re-suspended in washing buffer containing bovine serum albumin at a hematocrit of 50% (1:1 ). Of these thirds, one was used to determine morphological parameters (cell volume and area) by video-microscopy and the others to measure the relaxation times of water protons in extracellular and intracellular space via NMR spectroscopy ( $T_{2a}$  and  $T_{2i}$  respectively, in the presence/absence of paramagnetic ions, namely  $Mn^{2+}$ ).

Morphological measurements focused on estimating the number of red blood cells in a given volume, determining the hematocrit (red blood cell concentration in the sample diluted in isotonic medium used for measuring  $T_{2a}$  times) and the cell diameter. Based on these, cell volume and area and the V/A ratio were estimated.

In order to determine the number of red blood cells the erythrocyte suspension was diluted in buffer solution, then a drop was dripped into the Thoma chamber plate and the plate was covered in order to observe so-called refractive rings. Samples were then examined under a microscope equipped with a camera, used for counting the red blood cells from several series of grids (16 large squares - 256 small squares). Based on the figures obtained, the Olympus MicroImage software displayed the volume concentration - expressed as millions of RBC/mm<sup>3</sup>.

To determine hematocrit percentage, red blood cell suspension was aspirated after mixing in three special capillaries, sealed and centrifugated for 10 minutes in a Hawksley microcentrifuge. After sedimentation in capillary hematocrit was determined using the Hawksley scale, the result being expressed as average of the three measurements.

To determine erythrocyte mean diameter for any subject, red blood cell test slide preparation involved dripping of the suspension over a 'film' of BSA solution, delimitating the blood drip with a thin nylon thread, uniform pressing and removal of fluid excess through blotting with filter paper. After preparation, slides were examined and photographed under microscope and diameters were measured on electronically saved images (referring to calibrated micrometer ruler settings) with the same Olympus MicroImage software. After about 70 measurements for each sample, the diameter was calculated as average +/- standard deviation of all measurements. Based on formulas tailored to different mamalian species, the program displayed approximative values of cell area and volume (expressed as the ratio between hematocrit value and the number of RBC cells - millions per mm<sup>3</sup>)

Using the Morariu-Benga protocol based on the method proposed by Conlon and Outhred, relaxation times of protons excited at 20 MHz in a pulsed field (Carr-Purcell-Meiboom-Gill method) were determined by NMR spectroscopy using a Bruker Minispec spectrometer (Bruker Optics GmbH) for both 'extracellular water' ( $T_{2a}$ , in the presence of the paramagnetic ion  $Mn^{2+}$ ) and 'intracellular water' ( $T_{2i}$ , in the absence of paramagnetic ion  $Mn^{2+}$ , for samples with at least 95% hematocrit in which extracellular water was virtually eliminated) at 15, 20, 25, 30, 37 and 42 °C. The choice of temperatures considered covering the 25 °C - 37 °C range (reference environment temperature - human body physiological temperature).

After the Bruker Minispec device reached working conditions, sample calibration was conducted and temperature stabilization was obtained, over the erythrocytes suspended in isotonic medium to a hematocrit of 40% (kept on ice in special NMR tubes) equal volumes (200 µl each) of BSA solution and doping solution ( $MnCl_2$  40mM, NaCl 100mM) were added. The tubes were then

placed a few minutes in the Bruker thermostatic bath to reach bath temperature, then  $T_{2a}$  times for ‘intracellular water’ were recorded (at least 10 different measurements) at the initial temperature (usually 15 °C). The suspension was immediately iced while the thermostatic bath was stabilized at the next designated temperature (20, 25, 30, 37 or 42 °C) and the operation was repeated: sample brought to bath temperature,  $T_{2a}$  times recorded. Similarly  $T_{2i}$  times for ‘intracellular water’ (a hematocrit of at least 95%) were recorded using different settings adapted to capture monoexponential signals, except that the less sensitive samples lacking extracellular water didn’t require icing. Of note,  $T_{2i}$  time values were generally 10 times greater than  $T_{2a}$  times.

Similar measurements of  $T_{2a}$  times were conducted on samples where water transport was inhibited by a mercuric compound (PCMB or PCMBS, using the Macey-Farmer method), mainly at temperatures of 25 and 37 °C. In the case of such samples, red blood cell suspensions were previously subjected to a PCMB/PCMBS incubation at 37 °C bath temperature. During the study period (2003-2009) several incubation versions have been tested, implying various PCMB/PCMBS concentrations (from 0.5 to 2 mM) and times (from 15 to 60 minutes). Best results were obtained for 60 minutes incubation at 37 °C with 1 mM PCMB concentrations. Results were electronically recorded.

After measuring the  $T_{2i}$  and  $T_{2a}$  proton relaxation times in designated working conditions, average values were calculated for each temperature and the water exchange times ( $T_e$ , as defined by Conlon and Outhred) were calculated using the following equation:  $1/T_e = (1/T_{2a}) - (1/T_{2i})$ .

Based on erythrocyte V/A ratios calculated from the morphological parameters determined by video-microscopy, the water diffusional permeability values (equated for a square centimeter of membrane outer surface) were calculated for temperatures of 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C and 42 °C, using the following equation:  $P_d = (1/T_e) \times (V/A)$ .

To calculate the activation energy of the process of water transport through erythrocyte membranes, the Arrhenius modified equation was employed:  $k = A(T/T_0)^n \cdot e^{-E_a/RT}$ , where R is the Universal gas constant and T the absolute temperature (°K), while n varies between -1 and 1 values. If one accepts arbitrary temperature dependence of the pre-exponential factor, logarithmation of the Boltzmann constant leads to the following equation:  $\ln(k) = -E_a/RT + \ln(A)$ . By plotting  $\ln(k)$  values against  $T^{-1}$  values, the constant value was obtained using the slope value and the co-ordinates of any given point. Since  $\ln(k)$  has no values and  $(1/T)$  has values of °K<sup>-1</sup>, the slope of the linear Arrhenius plot has values of °K. Activation energy variance from the initial temperature (say 15 °C) to the final

temperature (say 42 °C) was calculated using the y-axis coordinates of the corresponding x-axis slope projections of the final and initial temperature values.

Following measurements and calculation of morphological and permeability parameters, multiple comparisons between various cardiovascular patients and control subjects were conducted for certain age groups and/or overall categories, taking into consideration associated diseases and the presence of certain risk factors.

## Conclusions

Heart diseases are a major health problem of the general populations. In Romania cardiovascular mortality rate is 61%, a figure that justifies efforts to obtain in-depth knowledge of cellular and molecular mechanisms for all processes occurring in the human body, including transmembrane transport of water.

The number of volunteers enrolled in the study was large enough to provide statistical significance, with ages ranging from 30 to 82 years and several (multiple) pathological conditions. A fair balance in regard of age and sex criteria was observed between control subjects and cardiovascular patients.

NMR spectroscopy, the basic technique used in determining permeability parameters for the subjects enrolled in this study, is a safe and effective evaluation method providing reproducible results intensively employed in biochemistry, biophysics, molecular biology, genetics. NMR spectroscopy provides means for quantifying changes in cell volume and shape or membrane potential. To study the diffusion characteristics of water molecules in tissues and to quantify their effect on NMR signals, several models that translate various physical tissue signals have been proposed, among which pulsed field gradients were employed in this research. Knowledge of such aspects help efforts of quantifying in vivo molecular processes.

Numerous measurements of morphological and permeability parameters were made for all enrolled subjects, grouped according to age and heart condition. These measurements have revealed a number of minor changes between control subjects and cardiac patients, some of them showing

statistical significance. The most important seems to be the increased water diffusional permeability seen over the whole temperature range in cardiac patients over 65 years compared to those between 50 and 65 years. Complementary statistical significance was seen in case of the activation energy when comparing control subjects and cardiac patients aged 50 to 64.9 years.

Comparison between different congestive heart failure groups showed statistically significant differences between NYHA class I and NYHA class II patients at virtually all temperatures (15, 20, 25, 37 and 42 ° C). No other significant changes were found when comparing congestive heart failure patients with other groups or control subjects. Activation energy values showed statistically significant differences in NYHA II patients compared with NYHA I, NYHA III and overall cardiac failure patients.

Several other statistically significant differences were recorded.

The work presented original elements by addressing an area poorly represented in published papers. These results may be used in current clinical practice or as a basis for further research.

## ***CURRICULUM VITAE***

**1. Name:** ȚEHANIUC ALINA - MARIA

**2. Date and Place of Birth:** February 8<sup>th</sup>, 1970 – Suceava

**3. Citizenship:** Romanian

**4. Marital status:** Married

**5. Address:** no.11, Mărăști str./ apt. 7/ Suceava/ Suceava County, Romania

**6. Contact data:** mobile phone 0745520764, e-mail: [alinademilt@yahoo.com](mailto:alinademilt@yahoo.com)

**7. Education degrees**

“Grigore T. Popa” University of Medicine and Pharmacy in Iași, General Medicine, 1996

**8. Professional experience**

- 1998 - 2003 - Resident MD in Cardiology at the “N.Stăncioiu“ Heart Institute in Cluj -Napoca
- 2003 - Specialist MD in Cardiology at the Suceava County Emergency Hospital
- 2004 - Competence in Vascular Ecography
- 2005 - Competence in General Ecography
- 2009 – Primary MD (the highest professional qualification of physicians in Romania) in Cardiology

**9. Current position**

Primary MD in Cardiology - Suceava County Emergency Hospital (since 2003)

**10 Affiliation to professional organizations**

3. Romanian Society of Cardiology
4. European Society of Cardiology

**12. Scientific Activities**

- PhD student at the “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy in Cluj – Napoca
- first author in 2 scientific papers
- co-author in 4 scientific papers
- participant in 5 multicenter clinical studies

**Participations at National Scientific Events with various posters (abstracts):**

- Gh. Benga, Ștefana Bâlici, E. Mironescu, **A.M. Țehaniuc**, Water permeability of red blood cells in aged people, Fiziologia (Physiology), Timișoara, p. 9, 2007.



- Ștefana Bâlici, Eugen Mironescu, Adina Chiș, Radu Munteanu, **Alina Țehaniuc**, Gheorghe Benga, Studii ale permeabilității pentru apă a membranelor eritrocitare umane pe grupe de vârstă, prezentare poster, A XXVI-a Sesiune științifică anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară, Cluj-Napoca, 12 - 15 iunie 2008, pag. 151 (volum de rezumate).
- **Alina Țehaniuc**, Eugen Mironescu, Ștefana Bâlici, Adina Chiș, Radu Munteanu, Gh. Benga, Aquaporinele în patologia cardiovasculară, Al 8-lea Congres Național de Medicină de Laborator cu participare internațională – Iași 2009.

#### **In extenso papers published in national or international journals**

- **Țehaniuc A.M.**, Benga G. Red Blood Cell Water Permeability in Elderly People. Acta Endocrinologica (Buc), 2011; VII(3):299-310. *ISI Factor de impact-3.884 (studiu cuprins în capitoul General Endocrinology)*
- Gh. Benga, Ștefana Bâlici, E. Mironescu, **A.M. Țehaniuc**, Water permeability of red blood cells in aged people, International Conference on Gerontology, Arad, Romania, p. 9, 15-16 september 2006.

#### **Co-author in books published in other universities**

- Benga Gheorghe, Mironescu Eugen, Bâlici Ștefana, **Țehaniuc Alina**, Nicula Gheorghe, Water permeability of red blood cells in elderly people, Gerontology Today, sub. red. Schneider Francisc și colab., Editura Viața Medicală Românească, București, 2007: 31 – 37.

#### **Participations at National and International Congresses or Conferences**

- National Congress of Cardiology - 2004, 2005, 2006, 2007, 2009, 2011
- National Congress of Echocardiography - 2004, 2005, 2007
- National Conference of Cell Biology - 2007
- International Congress of Cardiology - Wien 2007, München 2008
- International Symposium on “Current trends and future strategies in cardiology treatment” - Riga 2011
- National Congress of Laboratory Medicine, 8<sup>th</sup> ed. – Iași 2009
- National Conference of Atherothrombosis - 2006, 2008
- National Conference of the Romanian Society of Cardiology Work Group - 2007, 2011
- National Conference of SUMIGG - Iași 2008
- EuroEcho Lyon 2009, Madrid 2010
- EuroPrevent Stockholm 2009

### **13. Foreign languages**

- English, French – medium level
- Italian – basic level

### **14. Other specializations or qualifications**

- 2005 – Arterial Hypertension: form Studies and Guidelines to Patients – Suceava (Interactive Round Table)
- 2005 – Novelties and Trends in Pain Management – Iași (Lectures)
- 2006 – New Developments in Valvular Pathology – Iași (Lectures)
- 2006 - Novelties and Trends in Pain Management part II – Suceava (Lectures)
- 2007 – ARCA Cardiac Arrhythmias (Lectures)
- 2007 - ELOGIU – Electrocardiography in cardiovascular conditions – Suceava (Lectures)
- 2007 – Doppler Echocardiography from Basics to Advanced Applications – București (Lectures)
- 2008 – Evaluation and Treatment of Arterial Hypertension Curs perfecționare – Piatra Neamț (Lectures)
- 2009 - RMI in Cardiac Pathology – București (Lectures)
- 2009 – Good Practice Basics for Investigating and Monitoring Clinical Studies – București (Interactive Symposium)
- 2011 - Basics on Good Clinical Practice for Investigators - București (Interactive Symposium)

**Date**

October 10, 2011

**Signature**