

**RAPORT ȘTIINTIFIC ȘI TEHNIC**  
**Etapa V, 2016**

*Proteomica și metabolomica în diagnosticul și scorificarea calcificărilor vasculare  
din boala renală cronică (RENART)*

Contract 93/2012

**Etapa 5 : Testarea și validarea scorului de calcificare vasculara. Formularea rezultatelor finale și concluzii.**

**Cuprins:**

I.	Rezumatul etapei
II.	Activitatea 5.1. Testarea și corectarea modelului pentru scorul de calcificare vasculara
III.	Activitatea 5.2. Elaborarea manualului de utilizare al scorului de calcificare vasculara ARTERIOTEST
	Activitatea 5.3. Transferul tehnologiilor dezvoltate către partenerii din consorțiu
IV.	Activitatea 5.4. Elaborarea concluziilor finale ale proiectului
V.	Activitatea 5.5. Diseminarea rezultatelor proiectului
VI.	Bibliografie

**Capitolul I. Rezumatul etapei**

**Obiectivul general al proiectului RENART** este de a dezvolta o funcție de scorificare asistată de calculator pentru evaluarea calcificărilor vasculare.

**Obiectivele principale ale acestei etape** au fost testarea și corectarea scorului de calcificare vasculara asistat de calculator și stabilirea modalității de utilizare a acestuia (Activitățile 5.1, 5.2). Pe baza datelor colectate în etapele anterioare, încărcate și stocate în baza de date a proiectului, s-a efectuat o prelucrare statistică care a permis elaborarea concluziilor finale ale proiectului (Activitatea 5.4).

Rezultatele obținute în urma testării/validării scorului de calcificare vasculara (Activitatea 5.1) au fost integrate în corelații bioinformatică cu utilitate în elaborarea Manualului de utilizare a scorului de calcificare vasculara ARTERIOTEST (Activitatea 5.2), în urma cărora au fost formulate concluziile finale ale proiectului, ce au făcut obiectul procesului de transfer tehnologic către partenerii din consorțiu (Activitatea 5.3).

În cadrul activității 5.5 a fost publicat un articol științific care ilustrează rezultatele obținute în urma evaluării și corelării datelor obținute în cadrul proiectului, intitulat: **“Proteomic Biomarkers Panel: New Insights in Chronic Kidney Disease”** – autori: Simona Mihai, Elena Codrici, Ionela Daniela Popescu, Ana-Maria Enciu,<sup>1,2</sup> Elena Rusu, Diana Zilisteanu, Radu Albușescu, Gabriela Anton și Cristiana Tanase - în revista **Disease Markers** (Volume 2016, Hindawi Publishing Corporation, IF = 2.137). Acest articol a fost înscris pentru premieră în competiția lansată de UEFISCDI – platforma **PN-III-P1-1.1-PRECISI-2016**. De asemenea, rezultatele obținute au fost prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale (Activitatea 5.5).

**Capitolul II. Raport privind testarea și corectarea modelului  
pentru scorul de calcificare vasculara**

**I. Testarea scorului de calcificare vasculara**

URL : <http://renart.itec.ro> Aplicația Renart

În testarea Aplicației RENART s-a ținut cont de:

- Procesul de planificare a testarii Aplicatiei RENART
- Elemente de planificare specifice, cum ar fi managementul resurselor, coordonarea și tehnici de raportare

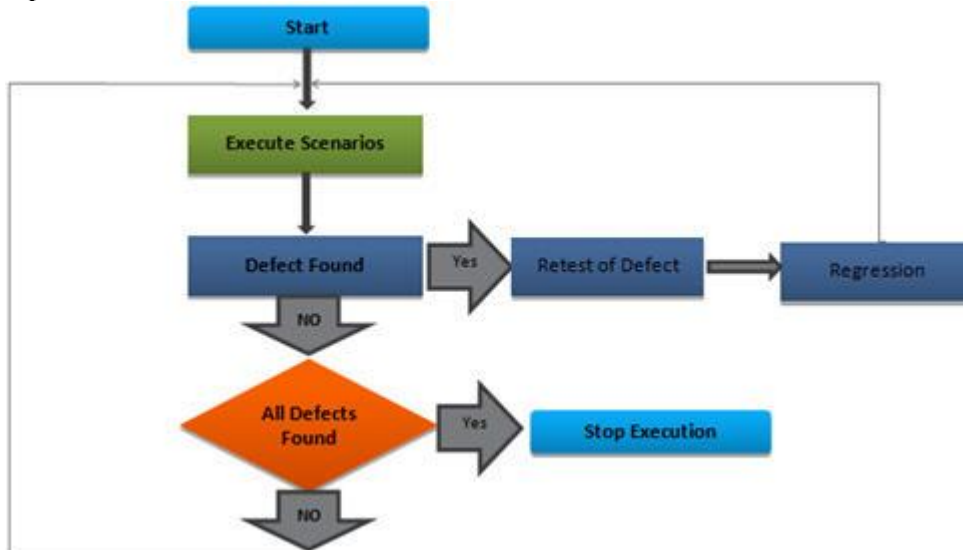


Fig Procesul de testare Aplicatia RENART

Atunci când sunt aplicate tehnici eficiente de planificare, orice riscuri sau erori pot fi identificate cu ușurință, chiar înainte de a începe testarea. Cu toate că fiecare dintre sarcinile de mai jos, sunt interdependente între ele, sunt puse în valoare ca un sistem unic de testare. *Alocarea și distribuirea sarcinilor.* Acest lucru rezultă din estimarea efortului și dimensionarea în faza de planificare. Indicii pentru alocarea de sarcini : abilități, atitudine, programul și dimensiunea echipei (echipa partenerului P3 ITC indeplinește condițiile pentru rularea testării Aplicatia RENART)

1) Se prepară o diagramă de calificare a tuturor membrilor echipei și se alocă în mod corespunzător sarcinile urmărind procesele exemplificate în figura de mai jos



Fig 1 Procese de testare a Performantei ptr Aplicatia RENART

Rezultatele testelor de performanță efectuate sunt mai fiabile și mai relevante atunci când sunt utilizate script-uri automate de testare. Un script de test automat este ajustat pentru a nota înregistrari ori obiecte care se transformă într-un monitor de performanță. Întregul proces porneste cu un Generator de sarcină

(pentru a testa timpul de răspuns al serverului ). Odata atinsă sarcina asumată se măsoara timpul efectiv necesar pentru a rula testele. Procesul de testare pentru Aplicatia RENART este un proces cu trei faze: intrare, proces și ieșire.

Intrarea este asigurata de Informații / Documente de referință clasificate astfel:

- Documente care descriu Cerințele utilizator
- Specificații definite in Etapa 1 si 2 a proiectului
- Planul de testare (a se vedea figura 1)
- Standarde de codificare (in definirea TC-lor)
- Lista de verificare (alocare resurse)
- Alocarea de sarcini per tester

Lansarea proceselor de testare este asigurata de platforma Hardware / Software / Alocarea resurselor umane cat si de Instruirea membrilor echipei de testare

Procesul de testare urmareste:

1) Examinarea funcționalității existente, repararea bug-urilor din versiunile anterioare (dezvoltate in Etapele precedente ale proiectului)

2) Revizuirea Documentelor de Testare în timpul ciclului de viață de dezvoltare de software, aceste documente au fost actualizate de către echipa de testare pe parcursul dezvoltarii proiectului 2012-2016

3) Revizuirea Build Software-ului de configurare (daca a fost cazul in functie de dezvoltarile Etapele)

Procesul de testare este descris in figura de mai jos:

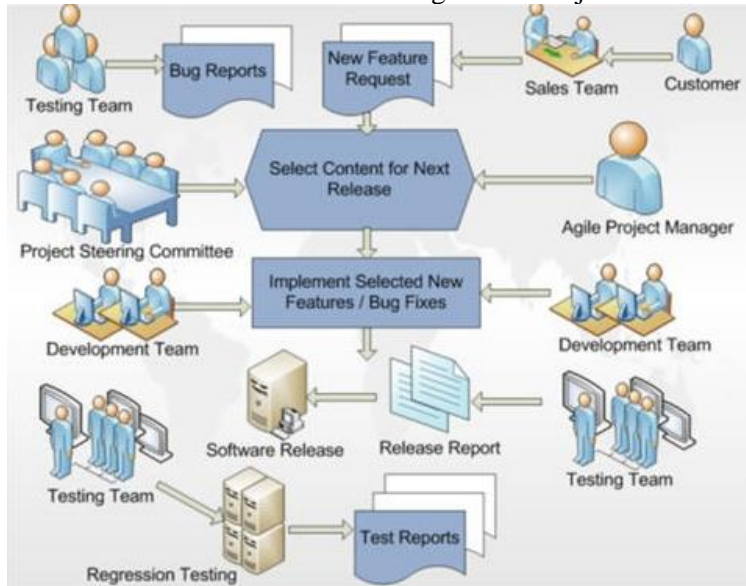


Fig 2 Procesele de testare a Aplicatia RENART

Procesul de planificare de testare al Aplicatiei RENART s-a desfasurat in mai multe etape:

### **Etapa # 1: Revizuirea și analiza cerințelor de testare a Aplicatiei RENART**

Acesta este primul pas care joacă un rol foarte important în orice proiect de testare. În timp ce încearcă să analizeze cerințele proiectului aplicatia RENART, echipa de testare a identificat și, prin urmare, determina ce elemente trebuie să fie testate. Aceste elemente sunt accesate în funcție de modul în care utilizatorul final va utiliza ul. Elementele sau caracteristicile sunt identificate cu cele care descriu cerințele funcționale. Pot exista, de asemenea, unele cerințe de bază non-funcționale identificate, cum ar fi performanța sau interacțiunea componentelor software. Datele masuratorilor efectuate au fost inregistrate in fisele individuale ale fiecarui pacient.

### **Etapa # 2: Domeniul de testare**

Echipele de testare au determinat care elemente urmează să fie testate și care nu. Această activitate vizează determinarea domeniilor de testare care sunt acoperite și de către ce echipe. Populația țintă este întregul grup (calcificarea vasculară din boala renală cronică) care ne interesează, pe care dorim să-l descriem. Pentru a putea realiza generalizări spre populația țintă folosim un eșantion (selecție), care însă trebuie să fie reprezentativ pentru populația pe care vrem să o studiem. Pe baza acestor eșantioane se calculează un estimator care poate fi medie aritmetică, procent, etc. Este foarte importantă descrierea criteriilor de includere și excludere în populația de studiu. În proiectul RENART se utilizează statistica inferențială (inductivă) care reprezintă partea de analiză a datelor și permite extrapolarea unei concluzii trase pe baza eșantionului ales spre populația țintă pentru care a fost efectuat studiul. Scopul analizei statistice este de a evidenția efectul unui factor de risc (calcificarea vasculară) prin datele obținute din eșantionul studiat spre populația țintă. Aceasta implică testarea ipotezelor statistice sau altfel spus testarea semnificației statistice. Testele statistice ne ajută să apreciem în ce măsură rezultatele sunt întâmplătoare și mai ales în ce măsură și dacă se pot aplica populației generale.

Baza de date RENART implicată în condensarea și procesarea unui volum mare de date astfel încât să se poată interpreta corect valorile obținute și să se permită comparațiile. Utilizarea unor teste statistice specifice permite determinarea semnificației (diferenței) statistice, astfel încât estimatorii să poată fi aplicați la populația generală. Baza de date RENART furnizează informații privind corelarea sau relaționarea între date colectate de partenerii proiectului.

### **Etapa # 3: Proiectarea strategiei de testare**

După colectarea cerințelor și identificarea domeniului testării, se generează un document numit documentul de strategie de testare, care definește abordarea de testare pentru a atinge obiectivele de testare. Un document de strategie de testare nu este menit să fie actualizat prea des; conținutul documentului de strategie de testare are descris domeniul de aplicare și obiectivul de testare, abordarea, rolurile și responsabilitățile echipelor de testare individuale, instrumente identificate pentru testare, valorile identificate, riscurile și planurile de atenuare, raportare și urmărire mecanisme etc.

Metoda scorurilor (scoring) este o tehnică de analiză discriminantă, constituind o metodă de diagnostic care constă în măsurarea și interpretarea riscului la care se expune pacientul, dar și sistemul medical ca sistem în activitatea viitoare.

Pentru alegerea metodologiei potrivite funcției de scoring au fost analizate mai multe modele matematice. Acestea sunt:

1. Lanțuri Markov;
2. Lanțuri Markov cu stări ascunse;
3. Regresie liniară multiplă.

În cadrul **RENART**, modulul Marchuk, care se aplică separat, pentru un anumit pacient, la timpul  $t$  (respectiv data curentă). S-au păstrat datele inițiale ale modelului cu notațiile lor.

În soluția X,  $F = \beta_1 / y$ , unde  $\beta_1$  are aceeași semnificație, respectiv  $\beta_1$  coeficientul vitezei de reproducere a parametrului  $A$ , cu diferența că este coeficientul de la timpul la care se face modelarea Marchuk.

**Modelul Marchuk** s-a implementat pe două cazuri:

- 1) când  $\alpha$  este **constant**;
- 2) când  $\alpha$  este **funcție periodică de timp**;

Semnificații ale parametrilor modelului Marchuk:

1.  $V(t)$ , este parametrul A la timpul t,
2.  $C(t)$ , este parametrul B la timpul t
3.  $F(t)$ , este parametrul C la timpul t.

Se consideră două tipuri de reactivitate: reactivitate constantă și reactivitate periodică. Se studiază sistemul de mai jos:

$$\begin{cases} \dot{V}(t) = (\beta - \gamma F(t))V(t) \\ \dot{C}(t) = \alpha(t)V(t - \tau)F(t - \tau) - \mu_c(C(t) - C^*) \\ \dot{F}(t) = \varrho C(t) - (\mu_f + \eta\gamma V(t))F(t) \end{cases} \quad (11)$$

unde:

$\beta$  este coeficientul parametrul A;

$\gamma$  este un coeficient al expresiei a probabilitatii de intalnire si interactie a A-B;

$\alpha(t)$  este o constanta sau o functie periodica neteda;

$\tau$  este intarzierea constanta a reactiei A;

Solutia este MM poate avea doua solutii stationare:

- una  $(0, C^*, F^*)$  ce descrie starea de sanatate a organismului, in care pentru acest punct nu poate avea loc o bifurcare, deoarece valorile caracteristicilor sunt reale.

- O altfel de comportare este posibila pentru a doua solutie stationara a MM., care este:

$$\bar{X} = (\bar{V}, \bar{C}, \bar{F}) = \left( \frac{\mu_c \mu_f (\beta - \gamma F^*)}{\beta(\alpha \varrho - \eta \gamma \mu_c)}, \frac{\alpha \beta \mu_f - \eta \gamma^2 \mu_c C^*}{\gamma(\alpha \varrho - \eta \gamma \mu_c)}, \frac{\beta}{\gamma} \right).$$

Aceasta stare stationara descrie forma cronica a maladii si exista numai daca  $\alpha \varrho > \eta \gamma \mu_c$  and  $\beta > \gamma F^*$  or  $\alpha \varrho < \eta \gamma \mu_c$  si  $\beta < \gamma F^*$ .

Functiile scor sunt foarte apreciate și utilizate întrucât ele au un grad ridicat de predicție, indicând gradul de vulnerabilitate al stabilirii unui diagnostic.

Metoda scoringului poate fi completata cu metoda substituirilor în lanț care permite măsurarea contribuției diferiților factori la formarea sau modificarea rezultatului față de nivelul de bază.

Se aplică în cazul în care relațiile de tip determinist dintre factorii de influență au forma de produs sau raport.

Aplicarea corectă a metodei necesită respectarea următoarelor criterii de ordin procedural:

- substituirea factorilor se face, obligatoriu, în ordinea condiționării lor: întâi factorii cantitativi, apoi factorii cu rol structural iar în final factorii cu rol calitativ;
- operațiunile de substituire se fac succesiv, nu simultan;
- un factor substituit rămâne în această poziție și în operațiile ulterioare.

Caracterul practic al acestei metode, justifică utilitatea sa atât în analiza post-factum, cât și în analizele previzionale, cu scopul declarat de a extrapola tendințele de evoluție ale unor fenomene în viitor.

#### **Etapa # 4: Identificarea instrumentelor necesare pentru testare și managementul testării**

În testarea Aplicatia RENART s-a utilizat instrumentul PractiTest

#### **Etapa # 5: Estimarea efortului de testare și echipa**

Estimarea corecta a efortului de testare previne orice întârziere și permite în mod dinamic re-echilibrarea resurselor în funcție de necesități. Factorii principali care ar putea influența această activitate sunt: mărimea echipei, abilitățile în cadrul echipei, atitudinea echipei și programul (au fost utilizate 5 (cinci) persoane pentru testare pe toata durata anului 2016)

#### **Etapa # 6: Definirea programului de testare**

Testarea a fost pe o perioada determinata si cu un nr de zile de test variabile/persoana fct de necesitati)

#### **Etapa # 7: Planul de Testare (a se vedea figura de mai jos Procese de testare)**

Sa consideram urmatorul exemplu posibil, cu doar doua diagnostice posibile:

$D1$  – pacientul nostru are calcificari vasculare din boala renala cronica,

$D2$  ( $\square D1$ ) – pacientul nostru nu are calcificari vasculare din boala renala cronica,

$S$  – pacientul testeaza pozitiv calcificari vasculare din boala renala cronica.

$D1, D2$  este o familie completa.

Din datele colectate presupunem ca 3% din populatie are calcificari vasculare din boala renala cronica.

Asadar, putem estima:

$$P(D1) = 0.03;$$

și în consecință

$$P(D2) = 0.97.$$

Trebuie să estimăm și probabilitatea condiționată  $P(S | D1)$ . Să presupunem că 90% dintre pacienții suferinzi de boala renală cronică testează pozitiv în analize calcificări vasculare. Așadar,

$$P(S | D1) = 0.90.$$

De asemenea, există sorti foarte mici, să zicem de 1%, că o persoană care nu are calcificări vasculare din boala renală cronică să testeze pozitiv.

Așadar, estimăm că  $P(S | D2) = 0.01$ .

Folosind formula lui Bayes, rezultă:

$$P(D1|S) = (0.03 \times 0.90) / (0.03 \times 0.90 + 0.97 \times 0.01) = 0.736$$

Prin urmare, probabilitatea ca pacientul care a „testat pozitiv” în analize, să aibă calcificări vasculare din boala renală cronică este estimată acum la 73.6%.

(Cu alte cuvinte, din cauza evenimentului  $S$ , probabilitatea de a avea calcificări vasculare din boala renală cronică crește de la 3% la 73.6%.)

Folosirea teoremei lui Bayes este limitată, din cauza condițiilor impuse, anume

- Maladiile trebuie să fie mutual exclusive,
- Diferitele semne și simptome care intervin în procesul de diagnostic trebuie să fie independente,

S-a observat, practic, că în cazul unei populații statistice mari teorema lui Bayes duce la un timp de calcul excesiv din cauza formulei de calcul a probabilității  $p(S|D_k)$

### Etapa # 8: Se determină mediul de testare

Rolul este de a identifica infrastructura necesară pentru testarea sistemului și inițiază toate cererile de hardware necesare, software-ul și rețele. Acesta este un element esențial în faza de planificare a testării, deoarece aceasta va asigura stabilitatea mediului de testare.

### Etapa # 9: Identificarea valorilor de test au fost definite în Test Case-uri

*Gestionarea eficientă a proiectului de testare pentru aplicația RENART:* S-a utilizat un tool numit PractiTest care este o soluție de control al procesului de testare și dezvoltare.

Este o soluție de sine stătătoare, care se poate, de asemenea, integra cu alte instrumente de test:

- Bugtracker (Jira, Redmine etc.);
- Instrumente de automatizare (TestComplete, etc.);
- Platforme CI (Jenkins, CircleCI etc);
- Slack.

Un exemplu de ecran este screen-ul captat mai jos:



Fig 4 Instrumentul de test PractiTest.

Display Name	Shown In	Available In
Assigned To	Issue, TestSet	Issue, Test, TestSet, Instance, Requirement
Author	Issue, Test, Requirement	Issue, Test, Requirement
Closed At		Issue
Closed By		Issue
Created	Issue, Test, TestSet, Requirement	Issue, Test, TestSet, Instance, Requirement
Folder	Test, TestSet	Test, TestSet
Last Modified	Issue, Test, Requirement	Issue, Test, TestSet, Requirement
Last Run	Test, TestSet, Instance	Test, TestSet, Instance
Parent	Requirement	Requirement
Planned Execution	TestSet	Test, TestSet, Instance

Fig 5 Utilizarea instrumentului Practitest

Id	Name	Status	Test Level	Version
46	Delete Entities	Draft	Exploratory	1.5
44	Invalid login	Draft	Exploratory	1.5
42	Entities and Values creation	Draft	Exploratory	1.5
41	Login with International Characters	Draft	Exploratory	1.5
39	log-in new user	Draft	Exploratory	1.5
36	Login with International Characters	Draft	Exploratory	1.5
35	Login without parameters	Draft	Exploratory	1.5
34	Delete Entities	Ready	Exploratory	1.6
32	Add, Modify & Delete Users	Ready	Exploratory	1.6
31	Login without parameters	Ready	Exploratory	1.6
30	Invalid login	Ready	Exploratory	1.6
29	Delete Entities	Ready	Exploratory	1.6
27	Add, Modify & Delete Users	Ready	Exploratory	1.6

Fig 6 Testarea DB Aplicatia RENART

Testarea Aplicatia RENART a fost oprită atunci când:

Din punctul de vedere al cerințelor:

- Cerințele de testare au fost acoperite 100%.

Din punctul de vedere al defectelor fixate:

- Toate defectele cu prioritate ridicată au fost identificate și fixate.
- Rata Defectelor a scăzut sub nivelul ratei acceptabile definite.
- Nu mai sunt defecte de prioritate medie deschise.
- Foarte puține defecte de prioritate scăzută mai sunt deschise, dar care nu au impact asupra software-ului de utilizare a Aplicatiei RENART
- Toate defectele cu prioritate ridicată au fost re-testate și închise iar scenariile de regresie corespunzătoare au fost executate cu succes.

Rata Acoperirii de testare:

- Pragul de acoperire al Test case-lor a atins minimum 99%.
- Rta de trecere a Test-Case-lor a fost de minim 97%. Acest lucru a fost calculat prin formula  $(\text{total Nr TCS A aprobate} / \text{Numărul total TCS}) * 100$ .
- A fost atins rata de acoperire funcțională completă a Aplicația RENART.
- Toate fluxurile majore funcționale au fost executate cu succes și funcționează bine.

## **Capitolul II. Elaborarea manualului de utilizare al scorului de calcificare vasculara** **ARTERIOTEST**

Modelul RENART este un program informatic care urmărește un grup de cunoștințe pentru obținerea în același mod ca și experții umani (doctori) a rezultatelor despre activități dificil de examinat cu principala caracteristică derivată din baza de cunoștințe împreună cu un algoritm de căutare specific metodei de raționare. Scorul de calcificare vasculara ARTERIOTEST rezulta din modelul RENART.

Modelul functional RENART este in legatura cu doua idei de baza:- implica studierea proceselor umane de gandire (doctor);- reprezentarea altor procese, via calculator.

Din punct de vedere structural și arhitectural, va avea următoarele caracteristici:

- sunt construite în general pentru focalizarea task-urilor cu gama limitată de aplicabilitate;
- există o separare explicită între cunoștințele și metodele de raționare utilizate în vederea obținerii unor concluzii pe baza cunoștințelor;
- sunt capabile să explice propriile acțiuni și linii de judecată.

Astfel se pot utiliza cunoștințe euristice ce permit găsirea soluției potrivite fără ca aceasta să fie neapărat soluția optimă. Analiza modelului matematic pentru realizarea scoringului in proiectul RENART si presupune utilizarea corelată a analizei (metodă rațională ce presupune descompunerea unui întreg (fenomen sau proces) în elementele sale constructive pentru ca prin metode specifice să fie studiate esența lor- exemplu “investigații”), sintezei (operațiune logică de reunire într-un singur tot unitar a elementelor , factorilor, cauzelor și condițiilor izolate anterior prin operația de analiză, cu scopul dobândirii imaginii integrale, structural-relaționale a întregului respectiv și al evidențierii manifestărilor esențiale caracteristice acestui întreg – exemplu determinările specific: factori de risc,examen fizic detaliat,semen vitale,medicatie, IMC), inducției (metodă logică, ce permite stabilirea unei concluzii general valabile pentru situații similare celei analizate, mergând pe o filieră de la particular la general, de la exemple concrete la generalizări – ex. analize biochimice, biomarkeri), deducției (operațiune rațională cu ajutorul căreia se poate deduce o concluzie pornind de la general la particular) și abstractizării (metoda rațională prin care se face trecerea de la concretul ce se poate percepe la concretul logic).

Pacienții testați sunt fiinclusi în baza de date prin rezultatele analizelor efectuate. Situarea acestor rezultate în intervalul normal sau patologic se poate realiza de aplicație. Distribuția cazurilor introduse în baza de date conform unor teste de analiza si poate fi prezentată în tabelele I, II și III.

Criteriile de introducere în aplicație pot fi aplicate in 2 moduri: a) direct sau utilizand formularele on-line. Datele care reflecta starea unui pacient sunt definite in termenul de diagnosticare (medicală) ca o combinație de trei aspecte: experiență din cazuri anterior rezolvate, rezultatele ultimelor cercetări și raționamentul personal; luarea unei decizii apare într-un mod foarte important atunci când trebuie pus un diagnostic deoarece la stabilirea unui diagnostic, apar mai multe alternative, deși toate datele medicale au fost colectate.

Sistemul poate oferi și o valoare asociată bolii, aceasta fiind interpretată ca un scor de plauzibilitate. Dacă vom considera lista bolilor care au toate simptomele sesizate, rămânem cu un număr de boli mai mic, astfel spațiul de căutare se micșorează. Motivul pentru care nu putem să facem intersecție este că s-ar putea să nu găsim o boală care să aibă în lista de simptome, de exemplu și simptom A și simptomele caracteristice bolii B. Abordarea reuniunii simptomelor are următoarele consecințe: căutarea devine mai mare, dar facilitează eliminarea bolilor. Astfel putem elabora tratarea bolii B și tratarea bolii A. Trebuie considerată posibilitatea apariției simptomelor false care intră în



etapa de evaluare și scorul va decide dacă este relevantă pentru deciderea bolii. S-a ajuns la concluzia ca e mai bine să facem reuniunea simptomelor și necesitatea definirii unor standarde care să permită o evaluare deterministică corectă. Populația țintă este întregul grup (calcificarea vasculară din boala renală cronică) care ne interesează; pentru a putea realiza generalizări spre populația țintă folosim un eșantion (selecție), care însă trebuie să fie reprezentativ pentru populația pe care o studiem. Pe baza acestor eșantioane s-a calculat un estimator care este un procent. Este foarte importantă descrierea criteriilor de includere și excludere în populația de studiu. În proiectul RENART s-a utilizat statistica inferențială (inductivă) care reprezintă partea de analiză a datelor și permite extrapolarea unei concluzii trase pe baza eșantionului ales spre populația țintă pentru care a fost efectuat studiul: scopul analizei statistice a fost de a evidenția efectul unui factor de risc (calcificarea vasculară) prin datele obținute din eșantionul studiat spre populația țintă. Aceasta implică testarea ipotezelor statistice sau altfel spus testarea semnificației statistice. Testele statistice ne ajută să apreciem în ce măsură rezultatele sunt întâmplătoare și mai ales în ce măsură și dacă se pot aplica populației generale.

### **Capitolul III. Transferul tehnologiilor dezvoltate către partenerii din consorțiu**

Infrastructura de comunicare internă include furnizarea de mecanisme convenabile și adecvate pentru a facilita libera circulație a informațiilor (strategice, administrative și practice).

Proiectul RENART apelează la o infrastructură de comunicații (și, prin urmare, difuzarea) prin construirea unui cadru solid de comunicare în care are loc un dialog și interacțiune (internă și externă). Portalul RENART include:

- informații despre RENART și activitățile sale, inclusiv detaliile de contact, informații generale, documente de lucru, evenimente (seminarii, ateliere de lucru, conferințe) etc.
- protocoale de lucru
- baza de date a proiectului
- rezultatele diseminate

Funcțiile aplicației RENART sunt:

- Interfața pentru introducerea și colectarea datelor medicale de la pacienți;
- Interfața grafică pentru afișarea analizelor statistice;
- Interfața pentru implementarea modelului matematic RENART: introducerea datelor medicale ale pacientului și estimarea riscului și a gradului calcifierii vaselor de sânge, respectiv a dezvoltării bolii renale cronice.

Aplicația RENART, protocoalele de lucru, baza de date a proiectului, rezultatele obținute, sunt utilizate de toți partenerii proiectului.

### **Capitolul IV. Elaborarea concluziilor proiectului**

În studiu au fost incluși 86 de pacienți (28% femei și 72% bărbați, cu vârsta medie de 65 de ani) diagnosticați cu boală renală cronică (BRC), nesupuși dializei, în conformitate cu criteriile KDIGO, dintre care 20 de pacienți cu BRC stadiu 4 (35% femei și 65% bărbați; vârsta medie 62 de ani), 52 de pacienți cu BRC stadiu 3 (33% femei și 67% bărbați; vârsta medie 66 de ani) și 14 pacienți cu BRC stadiu 2 (23% femei și 77% bărbați; vârsta medie 65 de ani), internați în Clinica de Nefrologie, Institutul Clinic Fundeni, București, precum și 20 de martori sănătoși.

Înainte de înscrierea în studiu, pacienții au semnat un consimțământ informat, în conformitate cu cerințele Declarației de la Helsinki și al Comitetului de Etică. Pacienții cu infecții acute, tumori maligne diagnosticate, insuficiență cardiacă acută, boli valvulare și sub tratament cu glucocorticoizi și imunosupresoare au fost excluși din acest studiu.

## **Evaluarea clinică și de laborator**

Datele clinice și antropometrice au fost colectate în ziua recoltării: vârstă, sex, greutate, înălțime, antecedente heredocolaterale și tratament în curs. Testele de laborator uzuale au inclus determinări pentru: hemoglobină, hematocrit, creatinină, uree, acid uric seric, glucoză, colesterol total, trigliceride, fosfatază alcalină, fosfat, calciu, albumină și fibrinogen. Estimarea ratei de filtrare glomerulară (eGFR) a fost calculată folosind formula CKDEPI. Probele de sange (ser) au fost recoltate a jeun și apoi stocate la freezer la  $-80^{\circ}\text{C}$  până la momentul analizării. Analiza xMAP array a fost efectuată în conformitate cu protocoalele producătorilor, iar plăcuțele au fost evaluate pe platforma Luminex 200. Nivelul biomarkerilor a fost determinat simultan utilizând kitul Milliplex MAP Human Bone Magnetic Bead Panel Kit, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA, cu următoarele molecule: citokine proinflamatorii - IL-6, TNF- $\alpha$ , markeri de metabolism mineral și osos - Osteoprotegerin (OPG), Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN) și Factorul de creștere a fibroblastelor-23 (FGF-23). Concentrația Fetuin-A în ser a fost evaluată cu ajutorul kitului Quantikine ELISA Human Fetuin Immunoassay kit, R&D Systems, Inc., SUA, în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Monitorizarea holter timp de 24 de ore a tensiunii arteriale s-a efectuat cu ajutorul sistemului ABPM BTL. Rigiditatea vasculară a fost măsurată non-invaziv cu ajutorul dispozitivului SphygmoCor (AtCor Medical, PWV Inc., Westmead, Sydney, Australia). S-a determinat valoarea presiunii centrale aortice și a anumitor parametri cheie ai funcției cardiace, viteza undei pulsului și indexul de augmentare, acesta din urmă reflectând atât proprietățile arterelor mari, cât și a celor distale.

S-au efectuat evaluări ecografice standard și Doppler utilizând modul 2D, Doppler color și Doppler pulsat la nivelul arterei carotide și ramurilor sale în segmentele extracraniene bilaterale pentru vizualizarea plăcilor aterosclerotice. Este definită drept placă aterosclerotică o structură focală care proeminează în lumen cu o grosime măsurată de la interfața media-adventice la interfața intima-lumen mai mare de 1,5 mm. Plăcile aterosclerotice au fost clasificate conform American Heart Association. De asemenea, s-a evaluat rigiditatea locală arterială la nivel carotidian prin tehnica e-tracking, care permite măsurarea cu acuratețe a modificărilor diametrului carotidian în sistolă și diastolă. Curbele de presiune la nivel carotidian au fost obținute noninvaziv pe baza modificărilor de diametru carotidian calibrate pentru presiunea sistolică și diastolică măsurate la nivelul arterei brahiale. Principalii indici de rigiditate arterială calculați au fost: indicele  $\beta$  de rigiditate arterială, indicele de augmentare, AIx și viteza locală a pulsului, PWV. Examinarea ecocardiografică s-a realizat cu ajutorul unui ecograf Vivid 7 (GE Healthcare, Horten, Norway) echipat cu sonda M5S și 4V.

**Evaluarea VS.** Următorii parametri VS au fost măsurați: diametrul telesistolic și telediastolic VS, grosimea telesistolică și telediastolică a septului interventricular și peretelui posterior VS. Masa VS a fost calculată prin metoda Devereux. Fracția de scurtare VS și FEVS prin metoda Simpson biplan au fost de asemenea calculate. S-a evaluat cinetica segmentară VS și deformarea longitudinală a VS prin STE prin efectuarea de secțiuni apicale (4, 2 și 3 camere) ca medie a 17 segmente. De asemenea, au fost măsurate rata de deformare longitudinală VS sistolică (SSr), protodiastolică (ESr) și telediastolică (ASr).

**Evaluare AS și funcție diastolică VS.** Volumul AS a fost determinat prin metoda arie-lungime biplan. Funcția diastolică VS a fost gradată conform ghidului de evaluare a funcției diastolice. Presiunile de umplere VS au fost estimate pe baza raportului E/E' mediu.

**Evaluare calcificări valvulare.** S-a evaluat prezența și severitatea calcificărilor la nivelul valvei aortice și a inelului mitral.

**Evaluare presiune arterială pulmonară.** S-a realizat pe baza vitezei maxime a fluxului de regurgitare tricuspidiană, a vitezelor proto și telediastolice ale fluxului de regurgitare pulmonară sau a timpului de ascensiune a fluxului anterograd pulmonar.

### **Analiza statistică.**

Rezultatele au fost analizate utilizând testul Student și *t-test* și au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic la un  $p < 0.05$ . Testul chi-square ( $\chi^2$ ; P) a fost utilizat pentru determinarea

corelațiilor semnificative statistic între citokinele implicate în răspunsul inflamator, biomarkerii implicați în metabolismul mineral și osos în boala renală cronică comparativ cu lotul martor.

Corelațiile Pearson ( $r$ ) au fost folosite în explorarea asocierii expresiei diferitor biomarkeri cu parametrii clinici. Valorile de referință (threshold) au fost stabilite în concordanță cu valorile medii obținute pentru grupurile studiate. Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul software-ului SPSS 19.0. Graficele au fost realizate cu software-ul GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

	IL-6	TNF- $\alpha$	OPG	OCN	OPN	FGF-23	Fetuin-A
IL-6	1						
TNF- $\alpha$	0.64	1					
OPG	-0.01	0.28	1				
OCN	0.67	0.69	0.21	1			
OPN	0.59	0.72	0.04	0.35	1		
FGF-23	0.24	-0.21	-0.36	0.06	0.07	1	
Fetuin-A	-0.37	-0.62	-0.31	-0.39	-0.67	0.23	1

Tabelul 1 – Corelații între moleculele analizate în BRC stadiul 4 (Corelații Pearson)

	IL-6	TNF- $\alpha$	OPG	OCN	OPN	FGF-23	Fetuin-A
IL-6	1						
TNF- $\alpha$	0.147	1					
OPG	0.144	0.132	1				
OCN	0.240	-0.079	0.063	1			
OPN	0.173	0.106	0.53	0.083	1		
FGF-23	0.152	0.072	0.159	0.134	0.23	1	
Fetuin-A	0.196	-0.03	-0.048	0.072	0.015	-0.0006	1

Tabelul 2 – Corelații între moleculele analizate în BRC stadiul 3 (Corelații Pearson)

	IL-6	TNF- $\alpha$	OPG	OCN	OPN	FGF-23	Fetuin-A
IL-6	1						
TNF- $\alpha$	0.583	1					
OPG	0.638	0.375	1				
OCN	0.003	0.294	0.054	1			
OPN	0.525	0.511	0.011	0.286	1		
FGF-23	-0.125	0.136	-0.123	-0.2	0.334	1	
Fetuin-A	-0.503	-0.361	-0.655	-0.275	0.158	0.28	1

Tabelul 3 – Corelații între moleculele analizate în BRC stadiul 2 (Corelații Pearson)

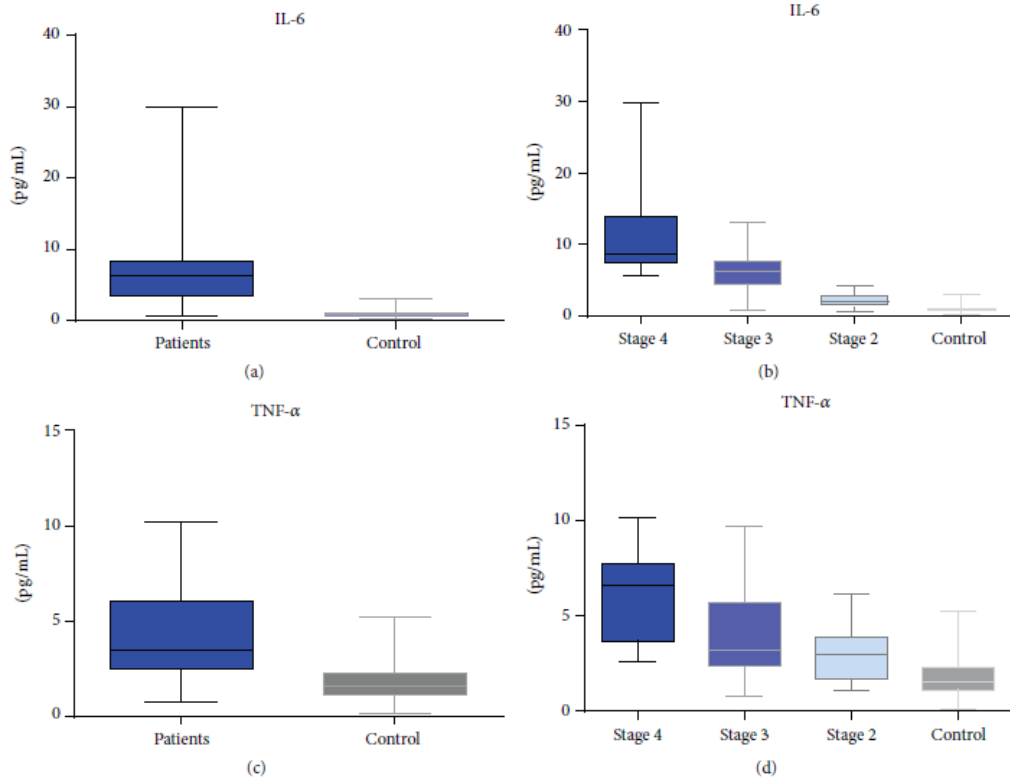


Figura 1 – Nivelele serice ale IL-6 și TNF- $\alpha$  în grupul BRC *versus* control

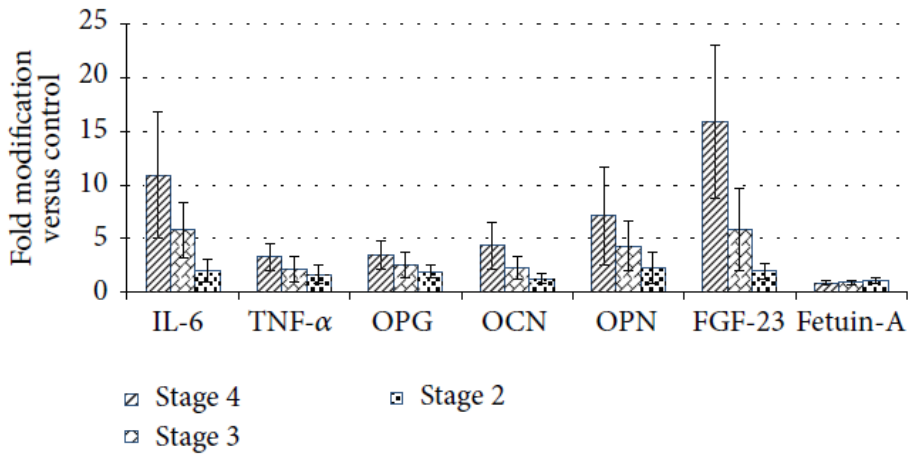


Figura 2 – Nivelul seric al biomarkerilor evaluați în CKD stadiile 4, 3 și 2 *versus* control

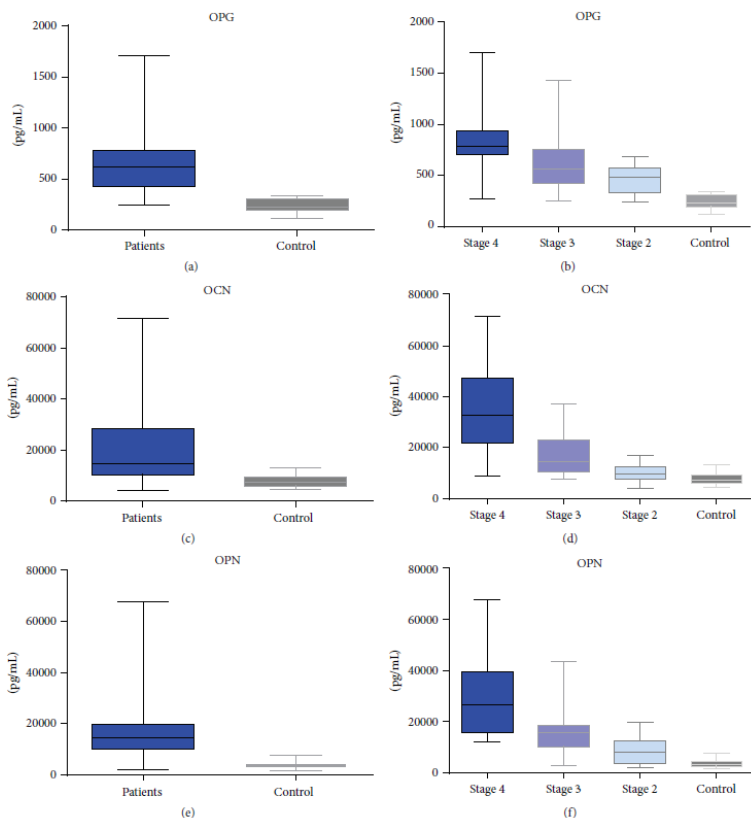


Figura 3 – Nivelele serice ale OPG, OCN și OPN în grupul BRC *versus* control (xMAP array)

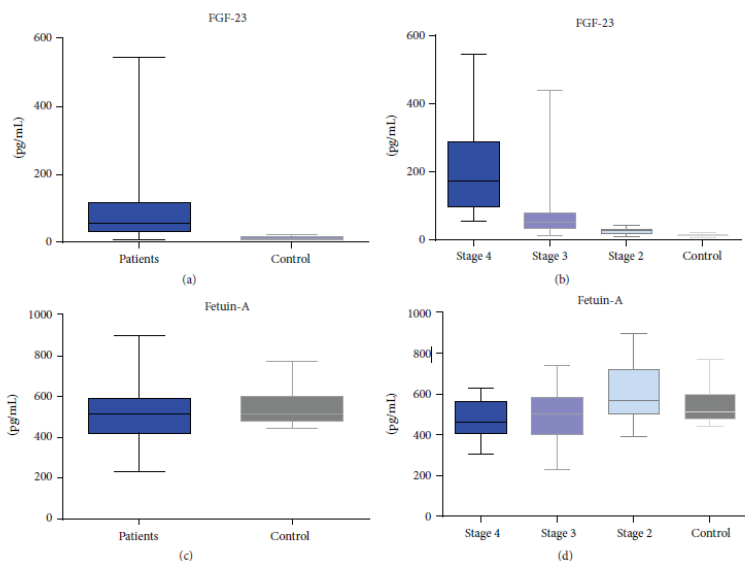


Figura 4 – Nivelele serice ale FGF-23 și Fetuin-A în grupul BRC *versus* control (xMAP array)

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Având în vedere numărul mare de citokine implicate în orchestrarea răspunsului inflamator, rolul procesului inflamator în apariția tulburărilor minerale și osose în boala renală cronică este insuficient demonstrat.

Progresia insuficienței renale cronice în BRC contribuie la apariția anomaliilor în metabolismul mineral și osos (care implică calciu, fosfor, PTH, vitamina D) și a calcificărilor vasculare [1].

## **Statusul inflamator și boala renală cronică**

Inflamația reprezintă o marcă a BRC, iar gradul în care procesul inflamator este asociat cu pierderea funcției renale (eGFR) rămâne neelucidat. Studii recente au evidențiat niveluri crescute ale citokinelor proinflamatorii IL-6 și TNF- $\alpha$  la pacienții cu disfuncții renale [2]. Statusul inflamator în BRC pare a fi corelat cu evoluția și complicațiile BRC, și anume bolile cardiovasculare [2, 3]. Okada et al. susțin ipoteza că variații genetice ale IL-6 pot conduce la BRC și evaluarea genotipurilor implicate ar putea fi utile în identificarea riscului de dezvoltare a BRC [4]. Barreto et al. au evidențiat de asemenea ca nivelurile IL-6 cresc pe măsura progresiei BRC și devin semnificative statistic în BRC stadiile 4 și 3 [5].

Conform datelor obținute de noi, mediatorii răspunsului inflamator IL-6 și TNF- $\alpha$  au prezentat niveluri crescute la pacienții cu BRC (*t-test*;  $p < 0.001$ ; Figurile 1 și 1). Analiza statistică (*t-test*) a arătat că IL-6 a prezentat cel mai ridicat nivel la grupul de pacienți cu BRC stadiul 4 ( $p < 0.001$ ), fiind de 11 ori mai mari decât controlul, în timp ce pentru stadiile 3 și 2, expresia IL-6 a fost de asemenea crescută, de 6 ori ( $p < 0.001$ ), respectiv de 2 ori ( $p = 0.005$ ) - Figurile 1 și 2.

În BRC stadiul 4, nivelul crescut de expresie a citokinei IL-6 a fost direct corelată cu nivelul TNF- $\alpha$  ( $r = 0.64$ ), OCN ( $r = 0.67$ ) și OPN ( $r = 0.59$ ) (Corelații Pearson). În BRC stadiul 2 s-au observat corelații pozitive între IL-6 și TNF- $\alpha$  ( $r = 0.58$ ), OPG ( $r = 0.63$ ) și OPN ( $r = 0.52$ ) și, pe de altă parte, corelații negative cu Fetuin-A ( $r = -0.5$ ) (Corelații Pearson) - Tabelele 1, 2 și 3.

TNF- $\alpha$  prezintă un nivel seric crescut de  $> 3.6$  ori ( $p < 0.001$ ) în BRC stadiul 4, înregistrând, de asemenea, o scădere asociată cu stadiul bolii, după cum urmează: nivel crescut de 2.8 ori ( $p = 0.006$ ) în BRC stadiul 3 și de 1.7 ori în BRC stadiul 2 ( $p = 0.01$ ); aceste valori sunt corelate și cu gradul de insuficiență renală (eGFR). Detalii privind expresia TNF- $\alpha$  sunt redată în Figurile 1 și 2. În BRC stadiul 4, expresia serică crescută a TNF- $\alpha$  este corelată pozitiv cu OCN ( $r = 0.69$ ) și cu OPN ( $r = 0.72$ ), precum și negativ corelată cu nivelul Fetuin-A ( $r = -0.62$ ). În CKD stadiul 2, nivelul TNF- $\alpha$  este corelat pozitiv cu nivelul OPN ( $r = 0.51$ ) - Tabelul 1, 2 și 3.

Studii din literatura de specialitate au precizat că IL-6, o citokină „rea”, cu rol în promovarea aterosclerozei [6], poate avea un rol mai important decât TNF- $\alpha$  în clasificarea pe stadii a BRC [7]. Spoto et al. a relevat că procesul inflamator este asociat cu insuficiența renală, cu nivele crescute ale IL-6 doar în stadiile inițiale ale BRC; însă studiul lor a indicat o corelație negativă între nivelul TNF- $\alpha$  și eGFR, indicând diferențe în dinamica relației dintre cele două citokine [8].

Datele obținute de noi indică o creștere a nivelului seric al IL-6, iar corelațiile dintre TNF- $\alpha$  și funcția renală sunt pozitive. Creșterea nivelului IL-6 și TNF- $\alpha$  în BRC concordă cu rezultatele altor studii recente și care menționează un trend uniform în creșterea nivelului markerilor proinflamatori și progresia bolii [9].

## **Markeri implicați în metabolismul mineral și osos în BRC**

### **Osteoprotegerin (OPG)**

OPG este un membru al familiei recetelor TNF, a cărei expresie este corelată cu disfuncțiile vasculare, care ulterior conduc la apariția patologiei cardiovasculare și care reprezintă principala problemă întâmpinată de pacienții cu BRC. Yilmaz et al. au fost printre primii autori care au menționat potențialul rol al OPG în stratificarea pacienților cu BRC (nesupuși dializei) în ceea ce privește riscul cardiovascular, împreună cu eGFR și FGF-23 [10]. Potrivit unui alt studiu, expresia crescută a OPG ar putea fi legată de calcificările mediei aortei și arterelor renale; astfel expresia lui este legată de mecanismul de protecție împotriva formării calcificărilor vasculare [6]. De asemenea, calea de semnalizare RANK/RANKL/OPG pare a fi implicată în procesul de progresie aterosclerotică [11].

Datele noastre sugerează o creștere semnificativă statistic a expresiei OPG în BRC versus control ( $p < 0.01$ ; Figura 3a), care concordă cu rezultatele altor studii (Demir et al. [12]). Trendul crescut al expresiei OPG se menține la toți pacienții cu BRC, după cum urmează: OPG crescut de 3.5 ori la BRC stadiul 4, de 2.5 ori crescut în BRC stadiul 3 și de 2 ori crescut în BRC stadiul 2 ( $p < 0.001$  pentru toate stadiile; Figurile 3 și 2).

Deși mai multe studii evocă implicarea directă a IL-6 în creșterea nivelului de expresie a OPG, rezultatele noastre susțin corelarea nivelului de expresie al celor doua molecule doar în grupul pacienților cu BRC stadiu 2 ( $r=0.63$ ).

Urmărind parametrii ecografici, OPG s-a corelat pozitiv cu LAVI ( $p=0,006$ ), clasa NYHA ( $p=0,014$ ), și regurgitarea mitrală ( $p=0,02$ ). Nivelul OPG a fost semnificativ mai mare la pacienții cu BCR și sindrom metabolic.

Variable	OPG	
	Correlation coefficient	P-value
age	0.336	0.014
LAVI	0.372	0.006
NYHA class	0.336	0.014
Mitral valve regurgitation	0.316	0.02
IMT	0.280	0.04
PWV	0.108	0.47
Metabolic syndrome	0.316	0.02

Analiza prin regresie multiplă a arătat că raportul E/A s-a corelat independent cu OPG, TA diastolică și indexul de viabilitate subendocardic. OPG a prezentat o corelație semnificativă cu IMT.

Având însă în vedere numărul relativ mic de pacienți incluși în studiul de față, cercetări suplimentare sunt necesare pentru a înțelege pe deplin potențialul terapeutic al OPG la pacienții cu boală renală cronică. Morena et al. au fost printre primii care au menționat în studiul lor că nivelul crescut al OPG este corelat cu progresia calcificărilor arterelor coronare în BRC (nedializați) [13]. A fost evidențiat rolul potențial protector al OPG împotriva calcificărilor vasculare printr-un studiu pe soareci cu knock-out OPG care au dezvoltat calcificări severe [14]. Pe baza corelațiilor dintre nivelul OPG și progresia disfuncției renale, Lewis et al. au indicat potențialul rol protector al OPG în BRC stadiile 3-5, cu prognostic nefavorabil pe termen lung [15].

#### **Osteocalcin (OCN)**

Având în vedere activitatea osteoblastică a OCN, acest marker poate fi direct implicat în axa os-rinichi-sistem cardiovascular [16, 17] și efectele locale și sistemice ar putea fi implicate în procesele de remodelare osoasă, calcificare vasculară și metabolismul energetic [18].

Studiile noastre au relevat niveluri crescute ale OCN la pacienții cu BRC versus control ( $p<0.001$ ), fiind de 4.6 ori mai mare în BRC stadiul 4 ( $p<0.01$ ) și de 2 ori ( $p<0.01$ ), respectiv de 1.3 ori ( $p=0.05$ ) mai mare în BRC stadiile 3 și 2 (Figurile 3, 3 și 2). Corelații pozitive au fost evidențiate între nivelul seric al OCN și IL-6 și TNF- $\alpha$  doar în BRC stadiul 4 ( $r = 0.67$ , respectiv  $r = 0.69$ ) (Tabelele 1, 2 și 3).

Alte studii au indicat o corelație negativă a OCN cu IL-6 la pacienții BRC, dar supuși hemodializei [19]. Din moment ce controversate încă există, cercetări suplimentare sunt necesare pentru a descifra clar conexiunile existente între sistemul imunitar și axa os-sistem vascular.

#### **Osteopontin (OPN)**

Începând încă din stadiile incipiente ale BRC, Barreto et al. au relevat niveluri crescute ale OPN în comparație cu lotul martor, precum și corelații pozitive ale OPN cu markerii inflamatori [4, 20]. În alte studii, OPN a fost direct corelat cu markerii inflamatori IL-6, CRP și iPTH, concluzionând că OPN poate juca un rol important în calea de semnalizare în care procesul inflamator intensifică prognosticul nefavorabil al pacienților cu BRC [21]. Lorenzen et al. a relevat o posibilă corelație între OPN și markerii inflamatori (IL-6, CRP) la pacienții hipertensivi [21].

Rezultatele obținute în studiul nostru au fost în acord cu studiile din literatura de specialitate și a indicat diferențe semnificative între grupul control și BRC ( $p<0.01$ ), crescând de 2 ori în BRC stadiul 2 ( $p=0.01$ ), de 4 ori în BRC stadiul 3 ( $p<0.001$ ) și de 7 ori în BRC stadiul 4 ( $p<0.0001$ ) - Figurile 3 și 2.

Valorile de referință au fost stabilite în funcție de valorile medii obținute pentru grupurile studiate. Corelații negative au fost observate între OPN și Fetuin-A la pacienții cu BRC stadiul 4 ( $r=-0.67$ ), iar corelații pozitive între OPN și IL-6 ( $r=0.59$ ) și TNF- $\alpha$  ( $r=0.72$ ). În grupul de pacienți cu BRC stadiul 3 s-a constatat o corelație statistic semnificativă între OPN și OPG ( $r=0.53$ ), iar în grupul de pacienți BRC stadiul 2 au fost găsite corelații cu IL-6 ( $r=0.52$ ) și TNF- $\alpha$  ( $r=0.51$ ) – Tabelele 1, 2 și 3.

### Factorul de creștere a fibroblastelor-23 (FGF-23)

FGF-23 este un hormon fosfaturic ale căror nivele serice cresc în stadiile precoce ale BRC, înainte ca disfuncțiile în metabolismul mineral și osos să se manifeste [22], putând fi asociate cu disfuncții endoteliale [54] și risc crescut de insuficiență cardiacă congestivă și evenimente aterosclerotice la pacienții cu BRC stadiile 2-4 [24]. În alt studiu, pe de altă parte, FGF-23 nu pare a fi un marker precoce al BRC la pacienții cu vârste mai înaintate; iar nivelele crescute ale FGF-23 nu sunt legate de prognosticul BRC. [25, 26], în ciuda faptului că mecanismele care stau la baza acestor procese nu sunt pe deplin înțelese [27]. Desjardins și colab. sugerează că nivelul seric al FGF-23 ar putea fi considerat un biomarker independent de calcificare vasculara la pacienții cu CKD, începând cu stadiile incipiente [28].

Studiile noastre au relevat niveluri serice crescute ale FGF-23 la pacienții cu BRC ( $p < 0.001$ ) (Figura 4), cel mai înalt nivel înregistrându-se la pacienții cu BRC stadiul 4 ( $p < 0.0001$ ), fiind de 16 ori mai mare decât în grupul control; nivel seric de 6 ori mai mare în BRC stadiul 3 ( $p < 0.001$ ) și de 2 ori mai mare în BRC stadiul 2 ( $p < 0.001$ ) comparativ cu lotul martor. (Figurile 4 și 2).

Deși nivelurile crescute ale FGF-23 au fost crescute în toate stadiile BRC (2, 3 și 4, nedializați), nu au fost identificate corelații semnificative din punct de vedere statistic (corelații Pearson) cu ceilalți biomarkeri analizați.

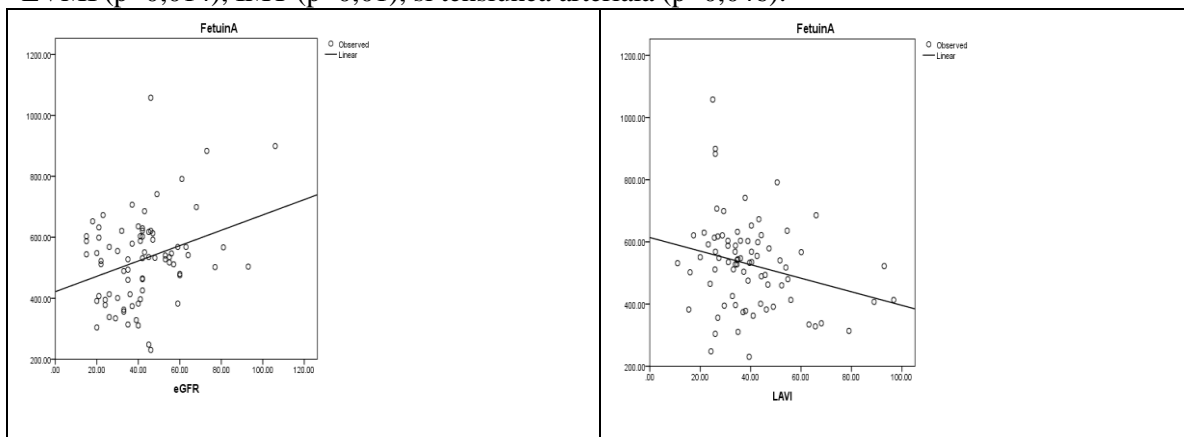
### Fetuin-A

Dintre moleculele implicate în procesul complex de calcificare vasculară, Fetuin-A este considerată a avea un rol inhibitor; în acest context, pacienții cu BRC ar trebui să prezinte o deficiență a nivelului circulant al Fetuin-A, ceea ce ar putea fi considerat un element comun în această maladie [29].

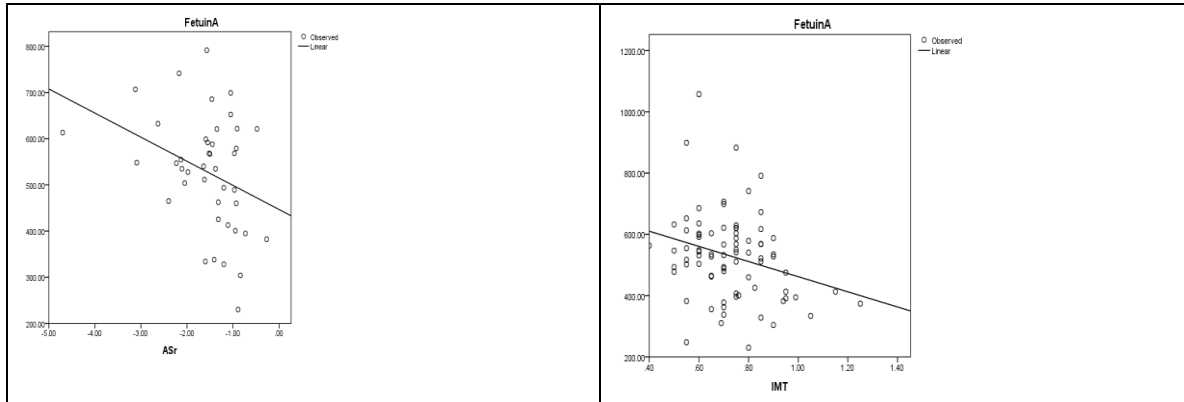
Din studiul nostru reiese un nivel seric scăzut al Fetuin-A seric la pacienții cu BRC în comparație cu lotul martor ( $p=0.15$ ), fiind scăzută de 0.85 de ori la pacienții cu BRC stadiul 4 ( $p=0.02$ ), de 0.91 ori în BRC stadiul 3 ( $p=0.05$ ) și de 1.13 ori în BRC stadiul 2 ( $p=0.13$ ) (*t-test*) – Figurile 4 și 2.

Corelații negative au fost stabilite între Fetuin-A și TNF- $\alpha$  ( $r=-0.61$ ) și OPN ( $r=-0.67$ ) în BRC stadiul 4, în timp ce pentru grupul de pacienți cu BRC stadiul 2, nivelul Fetuin-A s-a corelat negativ cu IL-6 ( $r=-0.5$ ) și OPN ( $r=-0.6$ ) – Tabelele 1, 2 și 3.

Valori crescute ale nivelului fetuin A au fost semnificativ asociate cu eRFG crescut ( $p=0,006$ ) cu valoare crescuta a hemoglobinei ( $p=0,029$ ), si negativ asociata cu LAVI ( $p=0,025$ ), ASr ( $p=0,029$ ), LVMI ( $p=0,014$ ), IMT ( $p=0,01$ ), si tensiunea arteriala ( $p=0,046$ ).







Smith et al. au raportat, de asemenea, corelații între nivelul scăzut al Fetuin-A și markerii inflamatori, precum și citokinele implicate în procesul de calcificare vasculară, explicând astfel potențiala implicare a Fetuin-A în procesul de calcificare vasculară și stiffness aortic [30].

### Corelații între markerii BRC și statusul inflamator

Corelații semnificative statistic au fost stabilite între IL-6 și eGFR ( $\chi^2= 16.8$ ;  $p < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  ( $\chi^2= 7.9$ ;  $p < 0.005$ ), OPN ( $\chi^2= 5.4$ ;  $p < 0.02$ ), OPG ( $\chi^2= 8.28$ ;  $p= 0.04$ ) și FGF-23 ( $\chi^2= 5$ ;  $p= 0.02$ ). Nivelul de expresie al TNF- $\alpha$  s-a corelat cu FGF-23 ( $\chi^2= 7.4$ ;  $p= 0.006$ ) și Fetuin-A ( $\chi^2= 5.9$ ;  $p= 0.001$ ), iar rata de filtrare glomerulară eGFR s-a corelat cu nivelul OCN ( $\chi^2= 6.2$ ;  $p = 0.01$ ) și FGF-23 ( $\chi^2= 19.9$ ;  $p < 0.001$ ); nivelul seric al OCN cu OPN ( $\chi^2= 5.3$ ;  $p= 0.02$ ) și FGF-23 ( $\chi^2= 6.9$ ;  $p = 0.008$ ) în grupul pacienților cu BRC.

### Concluzii

Studiul de față evidențiază potențialul clinic al unui panel de biomarkeri în BRC, care include mediatori ai inflamației (IL-6, TNF- $\alpha$ ) și markeri implicați în metabolismul mineral și osos (OPG, OPN, OCN, FGF-23 și Fetuin-A), care s-a dovedit a fi mai relevant decât un singur biomarker pentru a detecta pacienții în stadii incipiente de BRC. Corelații pozitive semnificative statistic au fost stabilite între biomarkerii IL-6, OCN, FGF-23 și gradul de disfuncție renală (eGFR) în grupul de pacienți cu BRC.

Potrivit rezultatelor obținute în studiul nostru, în grupul de pacienți cu BRC în stadii incipiente - BRC stadiul 2, a fost observată o creștere a nivelului seric pentru 6 dintre cele 7 molecule analizate.

Evaluarea unui panel de biomarkeri proteomici oferă speranța îmbunătățirii managementului pacienților cu BRC încă din stadii incipiente; analiza multiplex xMAP se dovedește astfel a fi utilă în evaluarea pacienților cu BRC.

Pacientul renal, aflat în stadiul predialitic, ar putea fi astfel investigat mult mai complex cu ajutorul platformelor proteomice, care ar putea fi introduse în practica clinică curentă.

Introducerea în practica clinică uzuală a monitorizării BRC cu ajutorul tehnologiilor proteomice ar putea identifica subpopulațiile de pacienți cu risc crescut de progresie a disfuncției renale. Rămâne încă sub semnul întrebării dacă acest lucru va fi însoțit de o creștere a supraviețuirii, studii ulterioare pe un număr mai mare de pacienți, prospectiv, randomizate urmând să demonstreze acest lucru.

De asemenea, s-au efectuat mai multe analize statistice pornind de la următoarele ipoteze clinice: remodelarea atrului stang este un eveniment precoce al afectării cardiace la pacienții cu boala renală cronică (BRC), disfuncția atrială precede dilatarea AS la pacienții cu BRC, disfuncția atrială este un determinant important al simptomelor de insuficiența cardiacă la pacienții cu BRC.

S-au analizat posibili predictorii ai disfuncției atriale la pacienții cu BRC (varsta, sex, remodelare VS, disfuncție diastolică VS, HTA, etiologie și severitate BRC, gradul disfuncției metabolice).

Indexul de volum al atrului stang (LAVI) a fost semnificativ crescut la pacienții cu simptome clinice de insuficiența cardiacă. În lotul de pacienți studiat, 22 pacienți au prezentat insuficiența cardiacă NYHA I, 49 pacienți NYHA II și 19 pacienți prezentau NYHA clasa III. Pacienții cu insuficiența cardiacă simptomatică (clasa NYHA  $\geq 2$ ) au fost mai în vârstă ( $68 \pm 10$  ani vs  $56 \pm 11$  ani,  $p < 0,05$ ), au

avut un eRFG mai scazut ( $37,2 \pm 12,9$  vs  $55 \pm 23$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ), LAVI mai mare ( $42,5 \pm 17,5$  m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ), LVMI mai mare ( $120,7 \pm 29,9$  vs  $105,5 \pm 20,6$  g/m<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ), valoarea E/A mai mica ( $0,84 \pm 0,25$  vs  $1,04 \pm 0,37$ ,  $p < 0,05$ ) si raport E/E` mai mare ( $12,6 \pm 3,5$  vs  $9,8 \pm 2,8$ ,  $p < 0,05$ ).

Analiza tip stepwise multiple regression a aratat ca functia contractila a atrului stang a fost independent corelata cu nivelul fetuin A ( $\beta = -0.381$ ,  $p = 0.018$ ) si cu varsta pacientilor ( $\beta = 0.559$ ,  $p = 0.001$ ). Mai mult, la analiza stepwise multiple regression, doar ASr a fost in mod independent asociat cu prezenta simptomelor de insuficienta cardiaca.

De asemenea, am gasit nivele semnificativ mai mari ale IL-6 si OPG la pacientii NYHA II-III ( $p < 0,05$ ). Analiza univariata a aratat ca insuficienta cardiaca simptomatice a fost corelata cu LAVI ( $p = 0,02$ ), LVMI ( $p = 0,043$ ), E/A ( $p = 0,024$ ), E/E` ( $p = 0,001$ ), IL-6 ( $p = 0,015$ ), fibrinogen ( $p = 0,041$ ), eGFR ( $p < 0,0001$ ), acid uric ( $p = 0,003$ ), OPG ( $p = 0,003$ ), OPN ( $p = 0,02$ ) si media tensiunii arteriale sistolice ( $p = 0,009$ ). Analiza binary logistic regression a identificat eGFR ( $p = 0.029$ ), OPG ( $p = 0.003$ ) si E/E` ( $p = 0.035$ ), ca si markeri ai insuficientei cardiace simptomatice.

In concluzie, in studiul nostru 65,6% pacienti cu fractie de ejectie a ventriculului stang normala au prezentat insuficienta cardiaca simptomatice. IC simptomatice a fost asociata cu un stadiu mai avansat al bolii renale cronice. Rezultatele noastre sugereaza ca OPG este un marker al insuficientei cardiace simptomatice la pacienti cu boala renala cronica.

## **Capitolul V. Diseminarea rezultatelor proiectului**

In cursul anului 2016, membrii echipei de cercetare au luat parte la mai multe manifestari stiintifice pe plan national si international, ocazii cu care au fost prezentate rezultatele obtinute in activitatea de cercetare si au fost diseminate informatii privind activitatile specifice derulate in cadrul proiectului RENART.

Rezultatele proiectului RENART au fost prezentate la mai multe congrese europene si mondiale. Astfel, in cadrul **Congresului European de Nefrologie** (21 – 24 mai 2016, Viena, Austria), au fost prezentata lucrarea ce raporteaza rezultatele proiectului: *SERUM FETUIN-A AND OSTEOPROTEGERIN ARE CORRELATED WITH LEFT ATRIAL SIZE AND FUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE*, autori Elena-Emanuela Rusu, Monica Rosca, Andreea Calin, Simona Mihai, Teodora Atasie, Sonia Balanica, Diana Zilisteanu. Abstractul a fost publicat in revista *Nephrology Dialysis Transplantation* 31 (Supplement 1): 1436, 2016. Meeting Abstract: MP293, May 2016 (ISI, factor impact 3,577).

Pe plan national, un eveniment important a fost **Congresul UMF Carol Davila 2016, Palatul Parlamentului, Bucuresti 2-4 iunie 2016**, manifestare cu participare internationala, in cadrul careia au fost prezentate lucrarile poster *Serum Fetuin-A with left atrial size and function in patients with chronic kidney disease* (Elena Rusu, Monica Rosca, Andreea Calin, Simona Mihai, Cristiana Tanase, Teodora Atasie, Adriana Neatu, Diana Zilisteanu) si *Serum osteoprotegerin is associated with symptomatic heart failure with normal left ventricular ejection fraction in CKD patients* (Diana-Silvia Zilisteanu, Elena-Emanuela Rusu, Monica Rosca, Cristiana Tanase, Teodora Atasie, Adriana Neatu, Mihai Voiculescu), ale caror rezumate au fost publicate in revista *MAEDICA – A Journal of Clinical Medicine*, vol 11, supliment 2016 (CNCSIS B+, indexata Pubmed si EBSCO).

Un alt eveniment national, Zilele IC Fundeni 2016, desfasurat la Poiana Brasov in perioada 29 septembrie – 2 Octombrie 2016, a constituit un prilej de prezentare a rezultatelor proiectului RENART prin prezentarea orala intitulata *Noi biomarkeri serici in evaluarea calcificarilor cardiovasculare in boala cronica de rinichi - rezultate ale proiectului RENART*, autori: Diana Silvia Zilisteanu, Elena Emanuela Rusu, Teodora Atasie, Adriana Neatu, Monica Rosca, Andreea Calin, Simona Mihai, Cristiana Tanase, Carmen Ginghina, Mihai Voiculescu.

Rezultatele obtinute in acest proiect au fost valorificate, de asemenea, prin prezentarea lucrării „**Markeri proteomici în boala renală cronică**” – autori: Simona Mihai, Elena Codrici, Ionela Daniela Popescu, Ana-Maria Enciu, Radu Albuлесcu, Elena Rusu, Diana Zilisteanu, N. Constantin, N. Lopazan,

Gabriela Anton, Cristiana Tanase - în cadrul **Sesiunii Științifice Anuale a Institutului Național de Patologie Victor Babeș** - Al 9-lea Simpozion Național de Patologie - 129 de ani (1887 - 2016) - *Tradiție, continuitate, inovație.*

De asemenea, membrii echipei partenerului P2 au participat la „**Congresul Național de Cardiologie**” septembrie 2016, Sinaia:

- Prof Dr. Carmen Ginghina a moderat sesiunea cu titlul: Genetica în cardiologie. Boli cardiovasculare genetice rare? Nu chiar atât de rare! Si a sustinut o conferinta cu tema: „Displazia aritmogenă de ventricul drept” si o conferinta privind „Reacția ventriculului drept la hipertensiunea pulmonară”

- Dr. Monica Rosca a sustinut conferinta cu titlul „Rolul imagisticii in CMH” si conferinta intitulata „Ecocardiografia de stres”. De asemenea a prezentat doua lucrari originale sub forma de poster: „Principalul determinant al fibrilației atriale la pacienții cu cardiomiopatie hipertrofică este volumul atrului stâng și nu diametrul acestuia” si „Impactul regiunii de interes ajustabile în măsurarea deformării miocardice a ventriculului stâng prin speckle-tracking și în estimarea riscului aritmic la pacienții cu cardiomiopatie hipertrofică”

- Dr. Andreea Calin a prezentat o conferinta cu titlul: "Avem test de efort performant. De ce mai avem nevoie de ecografie de stress?" si doua lucrari originale: un poster cu titlul : "Alterarea deformării miocardice a atrului stâng prezice instalarea fibrilației atriale postoperatorii după înlocuirea valvei aortice la pacienții cu stenoză aortică strânsă" si o prezentare orala cu titlul: „Proprietățile elastice ale aortei ascendente la pacienții cu valvă aortică bicuspidă versus tricuspidă și stenoză aortică severă izolată”

La **Congresul Asociației Europene de Imagistica Cardiovasculara, Leipzig decembrie 2016:**

- Prof. Dr. Carmen Ginghina a moderat sesiunea: „Heart valves" - Teaching Course
- Dr. Monica Rosca a sustinut o conferinta invitata cu tema: „VHD in atrial fibrillation.” în cadrul sesiunii cu titlul „Imaging in atrial fibrillation: from diagnosis to treatment”. De asemenea, a prezenta doua lucrari poster: „Left atrial volume and not diameter is the main determinant of atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy”, respectiv „The impact of adjustable region of interest on ventricular strain measurements and arrhythmic risk assessment in patients with hypertrophic cardiomyopathy”

- Dr Andreea Calin a sustinut o conferinta cu titlul “Grading aortic stenosis: tips and tricks.” si va prezenta o lucrare poster cu titlul: “Impaired left atrial myocardial deformation predicts postoperative atrial fibrillation after aortic valve replacement in patients with aortic stenosis”.

Menționam că în cadrul Activității 5.5 a fost publicat un **articol științific** care ilustrează rezultatele obținute în urma evaluării și corelării datelor obținute în cadrul proiectului, intitulat: **“Proteomic Biomarkers Panel: New Insights in Chronic Kidney Disease”** – autori: Simona Mihai, Elena Codrici, Ionela Daniela Popescu, Ana-Maria Enciu,1,2 Elena Rusu, Diana Zilisteanu, Radu Albulescu, Gabriela Anton și Cristiana Tanase - în revista **Disease Markers** (Volume 2016, Hindawi Publishing Corporation, IF = 2.137). Acest articol a fost premiat în competiția UEFISCDI – platforma **PN-III-P1-1.1-PRECISI-2016**.

De asemenea, un nou articol avand ca tema remodelarea AS si impactul clinic al acesteia la pacientii cu BRC este in curs de finalizare.

#### **Bibliografie:**

- [1] F. M. Shaheen, R. Kurpad, A. Al-Sayyari et al., “Multinational observational study on clinical practices and therapeutic management of mineral and bone disorders in patients with chronic kidney disease stages 4, 5, and 5D: the OCEANOS study,” Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation, vol. 27, no. 2, article 290, 2016.
- [2] A. G. Abraham, A. Darilay, H. McKay et al., “Kidney dysfunction and markers of inflammation in the multicenter AIDS cohort study,” The Journal of Infectious Diseases, vol. 212, no. 7, pp. 1100–1110, 2015.
- [3] L. H'enaut, M. D. Sanchez-Nino, G. Aldamiz-Echevarria Castillo, A. B. Sanz, and A. Ortiz, “Targeting local vascular and systemic consequences of inflammation on vascular and cardiac valve calcification,” Expert Opinion on Therapeutic Targets, vol. 20, no. 1, pp. 89–105, 2016.

- [4] R. Okada, K. Wakai, M. Naito et al., "Pro-/anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms and chronic kidney disease: a cross-sectional study," *BMC Nephrology*, vol. 13, no. 1, article 2, 2012.
- [5] D.V. Barreto, F. C. Barreto, S. Liabeuf et al., "Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease," *Kidney International*, vol. 77, no. 6, pp. 550–556, 2010.
- [6] P. Stenvinkel, M. Ketteler, R. J. Johnson et al., "IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : central factors in the altered cytokine network of uremia - the good, the bad, and the ugly," *Kidney International*, vol. 67, no. 4, pp. 1216–1233, 2005.
- [7] D. J. Oh, H. R. Kim, M. K. Lee, and Y. S. Woo, "Profile of human  $\alpha$ -defensins 1,2 and proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) in patients with chronic kidney disease," *Kidney & Blood Pressure Research*, vol. 37, no. 6, pp. 602–610, 2013.
- [8] B. Spoto, D. Leonardis, R. M. Parlongo et al., "Plasma cytokines, glomerular filtration rate and adipose tissue cytokines gene expression in chronic kidney disease (CKD) patients," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 22, no. 11, pp. 981–988, 2012.
- [9] B. Spoto, F. Mattace-Raso, E. Sijbrands et al., "Association of IL-6 and a functional polymorphism in the IL-6 gene with cardiovascular events in patients with CKD," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 10, no. 2, pp. 232–240, 2015.
- [10] M. I. Yilmaz, D. Siritopol, M. Saglam et al., "Osteoprotegerin in chronic kidney disease: associations with vascular damage and cardiovascular events," *Calcified Tissue International*, vol. 99, no. 2, pp. 121–130, 2016.
- [11] K. Caidahl, T. Ueland, and P. Aukrust, "Osteoprotegerin: a biomarker with many faces," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no. 9, pp. 1684–1686, 2010.
- [12] P. Demir, F. Erdenen, H. Aral et al., "Serum osteoprotegerin levels related with cardiovascular risk factors in chronic kidney disease," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2016.
- [13] M. Morena, A.-M. Dupuy, I. Jausset et al., "A cut-off value of plasma osteoprotegerin level may predict the presence of coronary artery calcifications in chronic kidney disease patients," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 24, no. 11, pp. 3389–3397, 2009.
- [14] M. Mesquita, A. Demulder, F. Wolff et al., "Osteoprotegerin and progression of coronary and aortic calcifications in chronic kidney disease," *Transplantation Proceedings*, vol. 42, no. 9, pp. 3444–3449, 2010.
- [15] J. R. Lewis, W. H. Lim, T. Ueland et al., "Elevated circulating osteoprotegerin and renal dysfunction predict 15-year cardiovascular and all-cause mortality: a prospective study of elderly women," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 7, Article ID e0134266, 2015.
- [16] G. M. London, "Bone-vascular axis in chronic kidney disease: a reality?" *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 4, no. 2, pp. 254–257, 2009.
- [17] N. K. Lee, H. Sowa, E. Hinoi et al., "Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton," *Cell*, vol. 130, no. 3, pp. 456–469, 2007.
- [18] A. N. Kapustin and C. M. Shanahan, "Osteocalcin: a novel vascular metabolic and osteoinductive factor?" *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, no. 10, pp. 2169–2171, 2011.
- [19] T. Eleftheriadis, C. Kartsios, G. Antoniadi et al., "The impact of chronic inflammation on bone turnover in hemodialysis patients," *Renal Failure*, vol. 30, no. 4, pp. 431–437, 2008.
- [20] D. V. Barreto, A. Lenglet, S. Liabeuf et al., "Prognostic implication of plasma osteopontin levels in patients with chronic kidney disease," *Nephron Clinical Practice*, vol. 117, no. 4, pp. c363–c372, 2011.
- [21] J. M. Lorenzen, H. Neuhoffer, S. David, J. T. Kielstein, H. Haller, and D. Fliser, "Angiotensin II receptor blocker and statins lower elevated levels of osteopontin in essential hypertension—results from the EUTOPIA trial," *Atherosclerosis*, vol. 209, no. 1, pp. 184–188, 2010.
- [22] P. Evenepoel, B. Meijers, L. Viaene et al., "Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis," *American Society of Nephrology*, vol. 5, no. 7, pp. 1268–1276, 2010.
- [23] A. Yasin, D. Liu, L. Chau, J. Madrenas, and G. Filler, "Fibroblast growth factor-23 and calcium phosphate product in young chronic kidney disease patients: a cross-sectional study," *BMC Nephrology*, vol. 14, no. 1, article 39, 2013.
- [24] J. J. Scialla, H. Xie, M. Rahman et al., "Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 25, no. 2, pp. 349–360, 2014.
- [25] J. Chudek, P. Kocelak, A. Owczarek et al., "Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and early chronic kidney disease in the elderly," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 29, no. 9, pp. 1757–1763, 2014.
- [26] T. Stomp'or, "Coronary artery calcification in chronic kidney disease: an update," *World Journal of Cardiology*, vol. 6, no. 4, p. 115, 2014.
- [27] M. Wolf, "Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease," *Kidney International*, vol. 82, no. 7, pp. 737–747, 2012.
- [28] V. David, A. Martin, T. Isakova et al., "Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production," *Kidney International*, vol. 89, no. 1, pp. 135–146, 2016.
- [29] L. Desjardins, S. Liabeuf, C. Renard et al., "FGF23 is independently associated with vascular calcification but not bone mineral density in patients at various CKD stages," *Osteoporosis International*, vol. 23, no. 7, pp. 2017–2025, 2012.
- [30] N. X. Chen and S. M. Moe, "Pathophysiology of vascular calcification," *Current Osteoporosis Reports*, vol. 13, no. 6, pp. 372–380, 2015.
- [31] E. R. Smith, M. L. Ford, L. A. Tomlinson et al., "Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 25, no. 2, pp. 339–348, 2014.

**05.12.2016**

**Director de proiect,**

**Dr. Rusu Elena-Emanuela**

