

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANTA
FACULTATEA DE ȘTIINȚE ALE NATURII ȘI ȘTIINȚE AGRICOLE
SCOALA DOCTORALA DE ȘTIINȚE APLICATE
DOMENIUL FUNDAMENTAL: BIOLOGIE- BIOCHIMIE

TEZA DE DOCTORAT

STUDIUL UNOR MARKERI BIOCHIMICI ÎN BOLI CRONICE HEPATICE ASOCIATE CU POLIARTRITĂ REUMATOIDĂ

Rezumat

CONDUCATOR DE DOCTORAT

Prof.Univ.Dr. CS I NATALIA ROȘOIU

Membru Titular al Academiei Oamenilor de Știință din România

DOCTORAND
DANIELA GHIDUȘ

CONSTANȚA

2014

LISTĂ DE ABREVIERI

ACR - Colegiul American de Reumatologie (American College of Rheumatology)	NK - celule natural killer
AGL - acizi grași liberi	NO - oxid de azot
ALT - alaninaminotransferaza	OCT - ornitilcarbamiltransferaza
AST - aspartatamniotransferaza	PG - prostaglandine
AU - acid uric	PMN- neutrofile polimorfonucleare
BD - bilirubină directă	PR - poliartrită reumatoidă
BI - bilirubină indirectă	RA - risc aterogen
BT - bilirubină totală	RE - reticul endoplasmatic
CHE - colinesterază	RI - rezistența la insulină
CR - creatinină	RL - radicali liberi
CT - colesterol total	SDH - sorbitoldehidrogenază
EULER - Liga Europeană împotriva Reumatismului	SH - steatoză hepatică
Fe – fier	SHNA - steatoză hepatică non-alcoolică
FIB- fibrinogen	SRS-A - Slow-reacting Substance of Anaphylaxis
FR - factor reumatoid	SM - sindrom metabolic
GGT - γ -glutamyltranspeptidaza	SOD- superoxid dismutaza
GL - glucoza serică	SRO - specii reactive de oxigen
GPx - glutathion peroxidaza	SRN - specii reactive de azot
GLDH - glutamatdehidrogenaza	TAS- statusul total antioxidant
LDH - lactatdehidrogenaza	TG - triacilgliceroli, trigliceride
HDL - high-density lipoprotein- fracțiune lipoproteică cu densitate mare	TNF α - factorul de necroză tumorală α
H ₂ O ₂ - apă oxigenată, peroxid	UR - uree
HCVC – hepatită cronică cu virus C	VHC – virus hepatic C
ICDH - izocitratdehidrogenaza	VLDL - very low-density lipoprotein- fracțiune lipoproteică cu densitate mica foarte mică
IL - interleukină	VSH - viteza de sedimentare a hematiilor
IFN γ - interferon γ	XO – xantinoxidaza
LDL - low-density lipoprotein- fracțiune lipoproteică cu densitate mica	OCT - ornitilcarbamiltransferaza
LB - limfocite B	PG - prostaglandine
LT - limfocite T	PMN - neutrofile polimorfonucleare
MTX - metotrexat	PR - poliartrită reumatoidă
NF-kB – factor de transcripție nuclear	RA - risc aterogen
GLDH - glutamatdehidrogenaza	RE - reticul endoplasmatic

Cuvinte cheie: hepatită cronică virală C, poliartrită reumatoidă, steatoză hepatică, stres oxidativ

**STUDIUL UNOR MARKERI BIOCHIMICI ÎN
BOLI CRONICE HEPATICE ASOCIATE CU POLIARTRITĂ REUMATOIDĂ**

CUPRINS

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII	7
PARTEA I- STADIUL CUNOAȘTERII	10-57
Capitolul 1. Poliartrita reumatoidă	10
1.1. Definiție	10
1.2. Epidemiologie	10
1.3. Etiologie	11
1.4. Patogenie	14
1.5. Diagnostic	17
1.6. Tratament	19
 Capitolul 2. Patologia hepatică asociată poliartritei reumatoide	 24-44
2.1. Funcțiile ficatului	24
2.2. Poliartrita reumatoidă și bolile asociate	36
2.3. Steatoza hepatică non-alcoolică asociată poliartritei reumatoide	38
2.4. Hepatita cronică virală C asociată poliartritei reumatoide	42
 Capitolul 3. Stresul oxidativ	 45-57
3.1. Specii reactive de oxigen	45
3.2. Stresul oxidativ în poliartrita reumatoidă	51
3.3. Stresul oxidativ în steatoza hepatică non-alcoolică	53
3.4. Stresul oxidativ în hepatita cronică virală C	54
 PARTEA a II-a - CONTRIBUȚII PERSONALE	 58-152
Capitolul 4. Introducere	58
Capitolul 5. Materiale și metode	60-111
Capitolul 6. Rezultate și discuții	112-145
6.1. Stresul oxidativ și modificările unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu steatoză hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă	112
6.2. Stresul oxidativ și modificările unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă	142
Concluzii generale	246
Bibliografie selectivă	253
Lucrări științifice elaborate în cursul stagiului de doctorat	271
A. Lucrări științifice publicate în reviste recunoscute C.N.C.S.I.S.	271
B. Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale și publicate sub formă de rezumat	271
C. Participări la manifestări științifice naționale și internaționale	273

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII

Patologia hepatică este variată și poate exista în contextul mai multor afecțiuni acute sau cronice. Studiile în populația generală indică o incidență crescută a bolilor hepatice virale care afectează un procent semnificativ din populația lumii. Dintre afecțiunile hepatice cronice virale, infecția virală cu virus hepatic C este considerată o adevărată problemă de sănătate publică. O altă afecțiune hepatologică considerată comună în populație este steatoza hepatică, afecțiune care constă în acumularea de lipide în hepatocite. Ambele patologii hepatice sunt considerate boli cronice, dar cu etiologii diferite, patologii care se pot asocia și cu alte boli.

Patologia reumatismală se caracterizează prin prezența unei inflamații cronice, cu implicații imunologice, din care fac parte o serie de boli reumatice care afectează ambele sexe, indiferent de vârstă. Din această categorie face parte poliartrita reumatoidă, patologie cronică inflamatorie, autoimună care poate asocia diferite boli cronice hepatice.

Monitorizarea ficatului în patologia reumatismală este importantă deoarece afectarea hepatică din poliartrita reumatoidă poate fi consecința mai multor factori, cum sunt tratamentul medicamentos hepatotoxic, prezența infecțiilor virale cu tropism hepatic, hepatita autoimună sau datorate unor tulburări în metabolismul lipidic cu apariția dislipidemiilor și a steatozei hepatice non-alcoolice. Deasemenea, se ține seama de tratamentul imunosupresor și implicațiile prezenței lui în infecțiile virale asociate bolii reumatismale. Toți acești factori pot coexista la un moment dat și pot acționa sinergic asupra ficatului.

O serie de studii asupra patologiei hepatice în contextul patologiei reumatismale, consideră că bolile hepatice pot evolua către formele mai severe de boală, cu apariția cirozei hepatice sau a cancerului hepatic, afecțiuni grave care duc la complicarea bolii de bază, a tratamentului reumatologic și alterarea funcționalității întregului organism. Ghidurile de tratament recomandă monitorizarea hepatică la pacienților cu afecțiuni reumatismale pentru prevenirea apariției hepatitei toxice secundare terapiei administrate.

Diferite studii asupra efectelor prezenței tulburărilor în metabolismul lipidic precum și a prezenței virusului hepatic C, sugerează că acestea ar putea induce în organism un proces inflamator cronic, cu apariția unor manifestări reumatismale. Deasemenea, cercetările din ultimii ani conturează noi ipoteze cu privire la posibilitatea implicării inflamației cronice din poliartrita reumatoidă, cu inducerea unor modificări în funcționalitatea ficatului ce au ca rezultat apariția unor tulburări în metabolismul lipidic.

Afecțiunile hepatice prezente la pacienții diagnosticați cu poliartrită reumatoidă complică boala și tratamentul de bază. Este important să se monitorizeze pacientul cu multiple comorbidități, în special cele legate de funcționarea hepatică, precum și identificarea unor markeri biochimici care pot oferi o mai bună apreciere a statusului funcțional al întregului organism.

În prezent, se pune accent pe concepte noi de abordare a tratamentului prin aplicarea unei „*terapii personalizate*”. Pentru aplicarea unui tratament adecvat, este necesară studierea și înțelegerea mecanismelor patologice implicate în bolile asociate, în special a mecanismelor implicate în dezvoltarea afecțiunilor hepatice. Este de asemenea important identificarea unor markeri biologici cât mai predictivi pentru stabilirea unui diagnostic cât mai precoce al bolii, aplicarea unor metode terapeutice optime care să reducă riscul de apariție și dezvoltare a unei afecțiuni hepatice grave cu creșterea calității vieții pacientului.

Obiectivul principal al acestui studiu îl reprezintă evaluarea unor markeri biochimici, stabilirea prezenței unor corelații și a unor modele (modele) între acești markeri biochimici în contextul bolilor cronice hepatice asociate cu poliartrita reumatoidă, care să contribuie la:

- Înțelegerea mecanismelor care stau la baza acestor boli și a modului de influențare și potențare reciprocă
- Ameliorarea evoluției și prognosticului bolii de bază
- Stabilirea unui tratament adecvat și găsirea de noi baze terapeutice
- Îmbunătățirea calității vieții pacientului.

Acestea reprezintă obiectivele care stau la baza dezideratelor organizațiilor internaționale medicale implicate în creșterea calității vieții pacienților și a speranței de viață, cu scăderea numărului de decese datorită complicațiilor asociate.

Pentru atingerea obiectivului principal s-au studiat și comparat mai multe loturi de pacienți:

- Lot de pacienți diagnosticați cu poliartrită reumatoidă (**PR**)
- Lot de pacienți diagnosticați cu steatoză hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă (**PR+SH**)
- Lot de pacienți diagnosticați cu hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă (**HCVC+PR**)
- Lot de pacienți diagnosticați cu hepatită cronică virală C (**HCVC**)
- Lot de martor de pacienți sănătoși (**M**)

În această teză s-au realizat două studii a căror obiective principale au fost următoarele:

1.Stresul oxidativ și modificările unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu steatoză hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă.

2.Stresul oxidativ și modificările unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă.

În acest scop, s-au determinat în laboratorul Spitalului Clinic Port CF Constanța, următorii parametrii:

- Antioxidanții enzimatici: superoxid dismutaza, glutatión peroxidaza, statusul total antioxidant
- Glicemia
- Colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triacilgliceroli
- Proteinelor totale serice
- Sideremina
- Fibrinogenului și VSH
- Transaminaze (AST, ALT), γ -glutamilttransferaza
- Bilirubina totală, bilirubina direct și bilirubina indirectă
- Fosfataza alcalină
- Uree
- Creatinină
- Acid uric

PARTEA II

CONTRIBUȚII PERSONALE

INTRODUCERE

Obiectivele urmărite în acest studiu sunt următoarele:

Obiectivul principal îl constituie evaluarea statusului funcțional al ficatului în poliartrita reumatoidă în contextul prezenței a două comorbidități hepatice, steatoza hepatică și hepatita cronică virală C.

Obiective secundare:

- Evaluarea diferiților markeri biochimici și de stres oxidativ în cadrul fiecărui lot de pacienți
- Compararea diferiților markeri biochimici și de stres oxidativ analizați între diferite loturi de pacienți
- Realizarea și stabilirea unor corelații între diferiți markeri biochimici
- Evaluarea echografică a ficatului pentru prezența steatozei hepatice la pacienții cu poliartrită reumatoidă.

În această teză s-au realizat **două studii a căror obiective principale** au fost următoarele:

1. Stresul oxidativ și modificările unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu steatoză hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă.

2. Stresul oxidativ și modificările unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă.

Studiul s-a realizat pe un număr de 93 de pacienți, prin realizarea a trei experimente. Pacienții au fost distribuiți pe mai multe loturi în funcție de patologie:

- Pacienți diagnosticați cu poliartrită reumatoidă (**PR**)
- Pacienți diagnosticați cu hepatită cronică cu virus C (**HCVC**)
- Pacienți diagnosticați cu hepatită cronică cu virus C asociată cu poliartrită reumatoidă (**HCVC+PR**)
- Pacienți diagnosticați cu steatoză hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă (**PR+SH**)
- Lot martor de pacienți sănătoși (**M**).

Studiul s-a desfășurat în perioada 2009-2012. Pentru realizarea acestui studiu am colaborat cu Spitalul Clinic Port CF II, secția medicală II, medicină internă și departamentul de laborator, pe baza unui contract de colaborare cu Departamentul de Cercetare al Spitalului. Studiul s-a desfășurat cu aprobarea Consiliului de Administrație al Spitalului. Pentru acest studiu, s-a mai colaborat și cu un cabinet de medicină de familie (CMF).

Pacienții înrolați în studiu au fost informați asupra utilizării datelor în scopul cercetării și le-a fost cerut consimțământul.

Evaluarea statistică utilizată pentru validarea ipotezelor obținute s-a realizat prin aplicarea metodelor Student (t-student), analiza de varianță unifactorială ANOVA și corelația liniară Pearson.

MATERIALE ȘI METODE

- Determinările biochimice au fost realizate pe ser, plasma și lizat eritrocitar
- Determinările biochimice s-au efectuat pe analizorul de biochimie DOCHEM-300, iar markerii stresului oxidativ pe analizorul de biochimie RANDOX
- Pentru determinările hematologice s-a utilizat analizorul automat de hematologie SYSMEX-K1000
- Pentru determinarea fibrinogenului s-a utilizat aparatul de coagulometrie automat ACL-1000 pentru determinarea fibrinogenului
- Kiturile de reactivi utilizați pentru determinarea markerilor de stres oxidativ au fost achiziționați de la firma RANDOX Laboratories, Marea Britanie

- Kiturile de reactivi utilizate pentru determinarea diferiților marker biochimici sunt conforme cu standardele internaționale și a metodelor standardizate.

METODE DE EVALUARE A PARAMETRILOR BIOCHIMICI SANGUINI

Kiturile de reactivi utilizați au fost produși de RANDOX Laboratories, Marea Britanie. Kiturile de reactivi sunt prevăzute a fi utilizate pentru metoda manuală sau semiautomată, pe analizorul automat utilizat s-au păstrat concentrațiile reactivilor, proporțiile între reactanți (reactivi și proba de analizat), timpii de reacție. Calibrarea s-a efectuat cu calibrator sau soluție standard, factorul de pantă construindu-se pe raportul dintre concentrația acestuia și extincția citită. Reacția a fost controlată cu seruri de control. Rezultatele s-au situat foarte aproape de valoarea optimă (media limitelor minim și maxim), ceea ce a permis să se continue determinările activităților enzimelor.

Parametrii biochimici determinați în laboratorul Spitalului Clinic Port CF Constanța sunt următorii:

- Antioxidanții enzimatici: superoxid dismutaza, glutatión peroxidaza, statusul total antioxidant
- Glicemia
- Colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triacilgliceroli
- Proteinele totale serice
- Sideremina sau fierul seric
- Fibrinogenului și viteza de sedimentare a hematiilor (VSH)
- Transaminazele (AST, ALT), γ -glutamyltransferază;
- Bilirubina totală, bilirubina directă și bilirubina indirectă
- Fosfataza alcalină
- Uree
- Creatinină
- Acid uric.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.1. Stresul oxidativ și modificările unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu steatoză hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă.

Introducere

Ficatul este principalul organ implicat în metabolismul lipidic. Expresia tulburărilor în metabolismul lipidic din PR o reprezintă modificarea concentrațiilor plasmatice ale lipidelor și acumularea de lipide intrahepatocitar cu apariția steatozei hepatice (SH) sau steatozei hepatice non-alcoolice (ROȘOIU și VERMAN, 2008). În prezent, patogenia SH este necunoscută, dar se consideră că sunt implicate o balanță redox alterată și stresul oxidativ (GAMBINO și col., 2011).

Se consideră că steatoza hepatică poate fi implicată în activitatea poliartritei reumatoide și poate fi un predictor negativ pentru atingerea și menținerea unei activități minime a PR (MINNO și col., 2012). Un studiu asupra prevalenței, factorilor de risc și asupra caracteristicilor bolii hepatice în poliartrita reumatoidă și psoriazică, arată că prevalența bolii de ficat este crescută în aceste patologii și că cea mai frecventă boală de ficat este SH (ficatul gras) fiind un principal factor de risc în PR (SANTIAGO și col., 2012). Modificările în metabolismul lipidic induc o serie de tulburări la nivelul diferitelor aparate și sisteme ale organismului cu manifestarea unor boli cum sunt bolile cardiovasculare și hepatice.

Diferite studii s-a emis ipoteza prin care se afirmă că pacienții cu inflamații cronice, cum sunt cei cu PR, prezintă un risc crescut de a dezvolta boli cardiovasculare și prin supresia inflamației cronice se reduce riscul cardiovascular. S-a stabilit că

markerii inflamației sistemice, chiar și la nivele mici ale concentrației plasmatice la pacienții diagnosticați cu PR sunt factori predictivi pentru evenimentele coronariene (SATTAR și col. 2003).

În PR citokine eliberate de la nivelul țesutului sinovial în circulația sanguină, (McINNES, 2001), acționează asupra țesuturilor distale cu alterarea activității lor. Citokinele pot acționa asupra ficatului, pot modifica funcția endotelă sau determină apariția unor condiții proaterogene sau de stres oxidativ, modulează răspunsul imun și mediază diferite efecte metabolice care au ca rezultat intensificarea metabolismului la nivelul diferitelor organe, modifică metabolismul lipidic (HILL și col., 1998).

Studii prospective au evaluat profilul lipidic la pacienții cu poliartrită reumatoidă și au demonstrat prezența unui model de alterare a metabolismului lipidic (SATTAR și col.2003; COJOCARU și col, 2012) Modelul de perturbare a metabolismului lipidic din PR propus de aceste studii este colesterol total scăzut, HDL colesterolul scăzut, triacilglicerolii crescuți, LDL colesterolul scăzut (HELDENBERG și col., 1983). Acest model nu este singurul propus, existând o serie de alte variante de modele dislipidemice asupra cărora se cercetează în prezent.

Studiile asupra nivelurilor concentrațiilor plasmatice ale CT și TG în patologia reumatică nu sunt clare. Unele studii indică prezența unei concentrații serice a TG, CT crescute, în alte studii TG și CT sunt scăzute sau prin evaluarea per total a profilului lipidic în PR se constată că modelul dislipidemic este extrem de aterogen, cu un index aterogenic CT/HDL nefavorabil (>4) (TRACY, 2003; KAKAFIKA și col., 2006; NISAR și col, 2012; GEORGIADIS și col., 2006). Mecanismele care stau la baza modelului dislipidemic din PR, se consideră că sunt determinate de acțiunea citokinelor la nivelul unor țesuturi și că aceste dislipidemii pot fi secundare procesului inflamator cronic din PR (KHOVIDHUNKIT și col., 2000; LEE și col., 2000).

Obiectivele studiului

1. Evaluarea stresului oxidativ și a unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu poliartrită reumatoidă comparativ cu pacienții diagnosticați cu steatoză hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă
2. Analiza cantitativă comparată a rezultatelor obținute pentru observarea unor diferențe semnificative ca pondere între cele două loturi studiate
3. Compararea valorilor obținute cu valorile de referință din literatură și cu cele din studiile de referință
4. Stabilirea prezenței unor diferențe semnificative statistic între cele două loturi și în cadrul fiecărui lot
5. Stabilirea prezenței unor modele dislipidemice la nivelul întregului lot de pacienți
6. Stabilirea prezenței sau absenței unor corelații statistice între TAS - Fe, TAS - colesterol total, TAS - fibrinogen, precum și corelații între fibrinogen și markerii profilului lipidic (CT, TG, LDL, HDL, RA).

Materiale și metode

Pentru acest studiu s-au evaluat 22 de pacienți diagnosticați cu poliartrită reumatoidă, internați în Spitalul Clinic Port CF II, secția medicală II. Toți pacienții au fost evaluați prin ecografie abdominală pentru stabilirea prezenței de steatoză hepatică. Probele biologice au fost recoltate în cadrul spitalului. Prelucrarea și dozarea markerilor biochimici s-a realizat în departamentul de laborator al spitalului.

Criteriile de excludere din lot pacienți au fost afecțiunile cronice renale, respiratorii, cardiovasculare grave, consumatori cronici de alcool și prezența altor afecțiuni hepatice.

Markerii biochimici investigați pentru următoarele sindroame și profile biochimice sunt următorii:

- Sindromul de citoliză hepatică: transaminazele serice (aspartaminotransferaza -AST și alaninaminotransferaza -ALT)
- Sideremia (Fe seric)
- Sindromul inflamator: fibrinogen (FIB), viteza de sedimentare a hematiilor (VSH)
- Profilul lipidic: colesterol total (CT), triacilgliceroli (TG), fracțiunile lipoproteice: HDL, LDL, index de risc aterogen $RA = CT/HDL$
- Evaluarea stresului oxidativ: statusul total antioxidant (TAS).

În urma evaluării ecografice s-au stabilit două loturi de studiu:

- Un lot de 12 pacienți diagnosticați cu poliartrită reumatoidă (**PR**)
- Un lot de 10 pacienți diagnosticați cu steatoză hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă (**PR+SH**).

În cele două loturi s-au determinat și comparat valorile medii ale parametrilor biochimici. S-au evaluat prezența sau absența unor corelații între diferiți markeri, în fiecare lot de pacienți, după cum urmează:

- TAS și Fe (TAS-Fe)
- TAS și colesterol total (TAS-CT)
- TAS și fibrinogen (TAS-FIB)

S-a evaluat prezența sau absența unor corelații în lotul total de pacienți:

- Fibrinogen și markerii profilului lipidic (CT, TG, LDL, HDL, RA)

Prelucrarea statistică s-a realizat prin aplicarea testului T-student, cu expunerea ei în tabele și grafice.

Rezultate și discuții

Analiza demografică pe sexe și vârstă a pacienților din acest experiment indică că majoritatea pacienților sunt femei, 20 paciente (90,91%) și doar 2 pacienți de sex masculin. Vârsta medie a pacienților este de $64,68 \pm 16$ ani și nu există nici o diferență semnificativ statistică între cele două loturi.

În urma evaluării ecografiei abdominale din cei 22 de pacienți diagnosticați cu poliartrită reumatoidă, 10 pacienți (45,45%) au fost identificați cu ficat cu aspect de statoză hepatică (SH).

Afectarea hepatică prin liză celulară este pusă în evidență prin modificarea **transaminazelor serice**. În acest studiu, în figurile 5 și 6, se observă o tendință de creștere a transaminazelor serice (ALT, AST) în lotul de pacienți care asociază steatoză hepatică, cu existența unei diferențe semnificativ statistice între cele două loturi de pacienți ceea ce indică prezența unui stres intracelular determinat de prezența unor leziuni hepatocelulare, cu creșterea permeabilității membranei celulare pentru aceste enzime.

Sideremia nu prezintă diferențe semnificativ statistic între cele două loturi. Se observă o tendință de scădere a sideremiei către limita inferioară a valorilor de referință. Ficatul are un rol central în menținerea homeostaziei fierului. Fierul este implicat în mecanismele prooxidante, depozitele în exces de fier exercită efecte citotoxice și induce leziuni hepatocelulare.

Stresul oxidativ. Între loturile PR și PR+SH este prezentă o diferență semnificativ statistică între valorile medii ale TAS-lui, (fig.4), cu o tendință de scădere a valorilor medii în lotul de pacienți PR+SH, ceea ce indică o creștere a stresului oxidativ ca urmare a scăderii mecanismelor antioxidante secundar existenței unei injurii hepatocelulare date de prezența steatozei hepatice și probabil a depozitelor hepatice de fier. Această scădere a sistemelor antioxidante se poate explica prin consumul lor în procesul de neutralizare a speciilor reactive de oxigen.

Ficatul steatoreic este vulnerabil și prezintă posibilitatea de a dezvolta mai repede toxicitatea hepatică. La nivel hepatocelular există un cerc vicios între steatoza hepatică și stres oxidativ, în care mecanismele care stau la baza acestor procese sunt interconectate la diferite nivele și au ca rezultat progresia steatozei hepatice către steatohepatită și creșterea stresului oxidativ în timp, cu cronicizarea acestei afecțiuni hepatice.

Profilul inflamator. Markerii inflamatori (fibrinogenului, VSH) sunt crescuți în ambele loturi, dar nu sunt prezente diferențe semnificative între valorile medii pentru cele două loturi de pacienți (fig.13, fig.14). Prezența SH presupune un grad de lezare hepatocelulară și inducerea unui anumit grad de inflamație hepatică. Exprimarea acestei inflamații la nivel global nu a generat diferențe semnificative între cele două loturi.

S-a evaluat posibilitatea existenței unor corelații între nivelul concentrațiilor serice ale TAS și colesterolului total, TAS și fibrinogen, TAS și fier seric cele două loturi de pacienți, dar nu s-a găsit nici o corelație între acești parametrii.

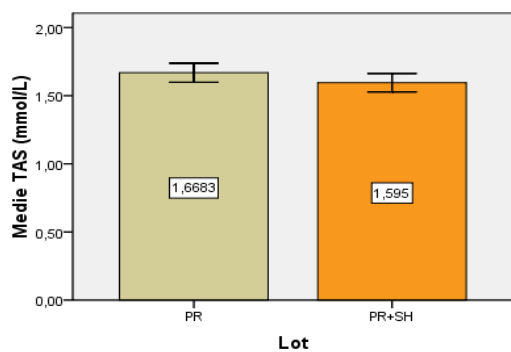


Fig.4. TAS- valoarea medie și deviația standard în PR și PR+SH

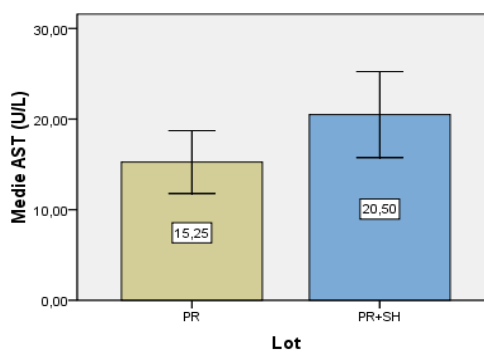


Fig.5. AST- valoarea medie și deviația standard în PR și PR+SH

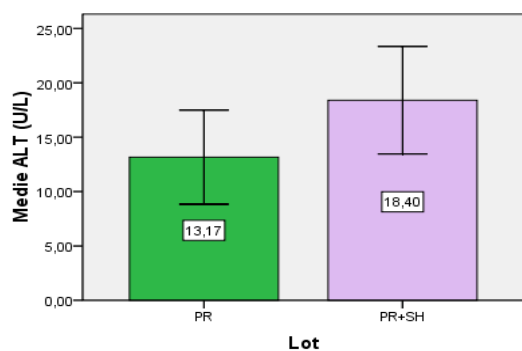


Fig.6. ALT- valoarea medie și deviația standard în PR și PR+SH

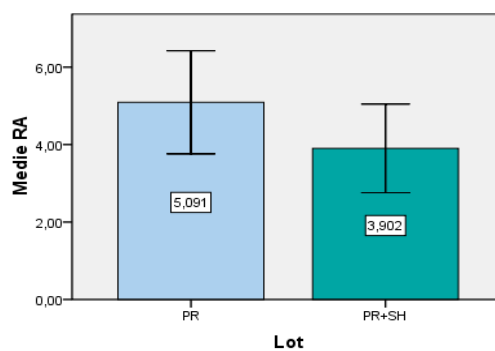


Fig.12. Risc aterogen (RA=CT/HDL)- valoarea medie și deviația standard în PR și PR+SH

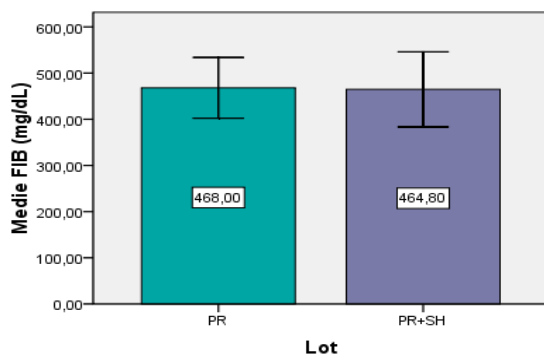


Fig.13. FIB- valoarea medie și deviația standard în PR și PR+SH

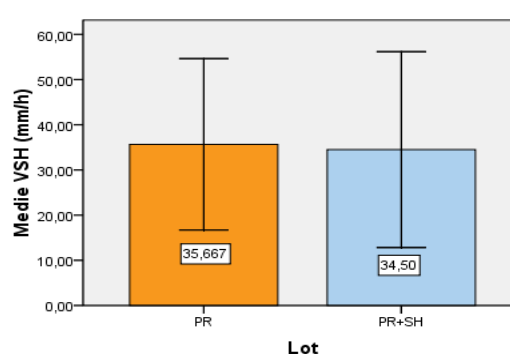


Fig.14. VSH- valoarea medie și deviația standard în PR și PR+SH

Tabel 9. Corelații între fibrinogen și CT în lotul general de pacienți.

		FIB (mg/dL)	CT (mg/dL)
FIB (mg/dL)	Corelația Pearson (r)	1	-0,500*
	Sig. (2-tailed) (p)		0,018
	N	22	22
CT (mg/dL)	Corelația Pearson	-0,500*	1
	Sig. (2-tailed)	0,018	
	N	22	22

*Corelația este semnificativă la nivelul 0.05 (p) (2-tailed).

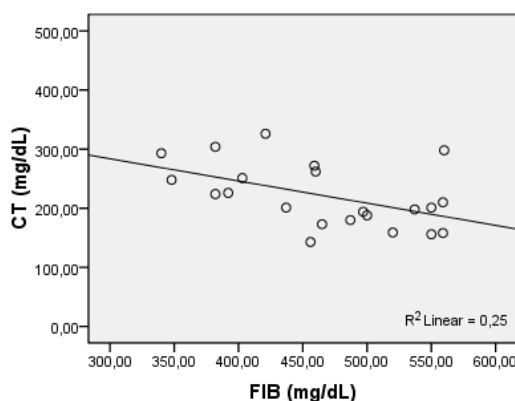


Fig.15. Corelații între fibrinogen și CT în lotul general de pacienți

Tabel 10. Corelații între fibrinogen și LDL în lotul general de pacienți

		FIB (mg/dL)	LDL (mg/dL)
FIB (mg/dL)	Corelația Pearson (r)	1	-0,544**
	Sig. (2-tailed) (p)		0,009
	N	22	22
LDL (mg/dL)	Corelația Pearson(r)	-0,544**	1
	Sig. (2-tailed) (p)	0,009	
	N	22	22

**Corelația este semnificativă la nivelul 0.01 (p) (2-tailed).

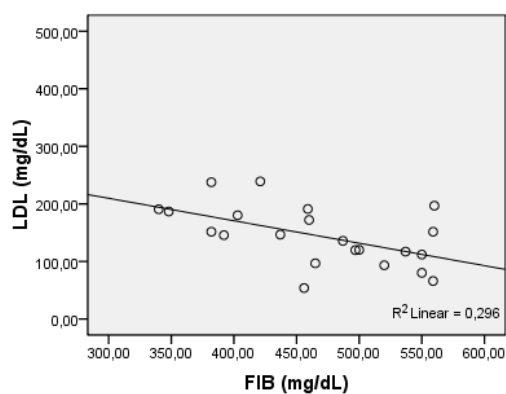


Fig.16. Corelații între fibrinogen și LDL în lotul general de pacienți.

Profilul lipidic. În datele din literatura de specialitate, studiile pe pacienții cu PR descriu un model dislipidemic care nu este bine definit. Diferențe semnificative statistic nu sunt prezente între markerii profilului lipidic în cele două loturi PR și PR+SH, dar este prezentă o diferență semnificativ statistică pentru RA=CT/HDL, cu creșterea acestui raport în lotul PR față de lotul PR+SH (fig.12). Pacienții cu steatoză hepatică prezintă o valoare medie a RA, apropiată de limita superioară ceea ce indică tendința acestor pacienți de a dezvolta boli cardiovasculare. Pacienți cu PR simplă prezintă un risc foarte crescut de a dezvolta boli cardiovasculare. În lotul total de pacienți se constată o hipercolesterolemie cu CT peste 200mg/dl prezentă la 13 pacienți (59,09%), dintre care se disting 9 pacienți (36,36%) cu CT peste 240mg/dl. Se consideră că pacienții cu CT peste 200mg/dl prezintă și la valori de peste 240mg/dl au risc crescut de ateroscleroză, risc de a dezvolta boli cardiovasculare.

Tabel 11.Corelații între fibrinogen și RA în lotul general de pacienți.

		FIB (mg/dL)	RA
FIB (mg/dL)	Corelația Pearson (r)	1	-0,481 [*]
	Sig. (2-tailed) (p)		0,023
	N	22	22
RA	Pearson Correlation(r)	-0,481 [*]	1
	Sig. (2-tailed) (p)	0,023	
	N	22	22

Corelația este semnificativă la nivelul 0.05 (p) (2-tailed).

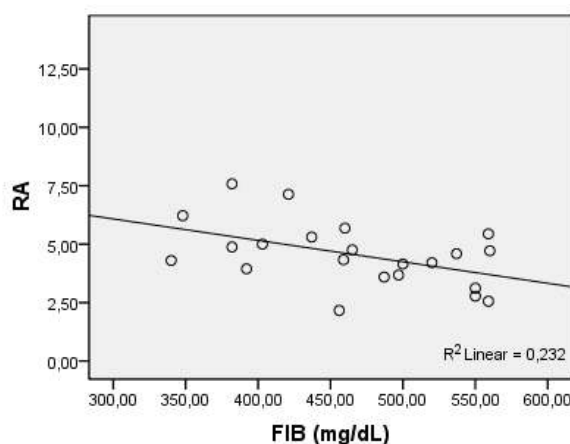


Fig.17. Corelații între fibrinogen și RA în lotul general de pacienți.

Hipertrigliceridemia este prezentă la 6 pacienți (27,27%), LDL este crescut la 13 pacienți (59,09%), iar valorile concentrațiilor serice pentru HDL au tendința de scădere către limita inferioară a valorilor de referință. Se consideră că fracția lipoproteică LDL reprezintă un factor proaterogen și HDL crescut este un factor antiaterogen. Pentru a preciza riscul aterogen și de dezvoltare a bolii cardiovasculare (RA) s-a calculat raportul dintre colesterol total și HDL (CT/HDL). Valorile raportului mai mari de 4 indică un risc aterogen crescut, risc de dezvoltare a bolii cardiovasculare și de deces prin afecțiuni cardiace. În urma calculării RA, 15 pacienți (68,18%) prezintă un risc aterogen crescut. Se constată că jumătate dintre pacienții luați în studiu au prezentat simultan valori crescute pentru CT, LDL și RA. În lotul general de pacienți există un procent ridicat de pacienți care asociază hiperfibrinogenemii cu diferite dislipidemii (tabel 14).

În lotul general de pacienți, s-a evaluat probabilitatea existenței unor corelații între fibrinogen, ca marker al activității bolii inflamatorii și dislipidemie. Între fibrinogen și TG, fibrinogen și HDL nu există corelații statistice, dar s-au stabilit corelații negative între fibrinogen și CT ($r = -0,500$, $p = 0,018 < 0,05$), FIB-LDL ($r = -0,544$, $p = 0,009 < 0,01$), și FIB- RA ($r = -0,481$, $p = 0,023 < 0,05$).

Tabel 14. Hiperfibrinogenemie asociată cu diferite dislipidemii

Asociere	nr.pacienți	%pacienți
Hiperfibrinogenemie+ hipercolesterolemie	8	36,36%
Hiperfibrinogenemie+ hipertrigliceridemie	5	22,73%
Hiperfibrinogenemie+ LDL crescut	8	36,36%
Hiperfibrinogenemie+ RA crescut (>4)	11	50%

Un studiu recent realizat de JOHNSSON și colaboratorii în anul 2013 realizat în Scoția pe un lot mare de pacienți cu afecțiuni acute și cronice inflamatorii sistemice, a urmărit modul cum variază CT și HDL în raport cu un marker inflamator (PCR), pornind de la ipoteza că există o asociere inversă între markerul inflamator și CT și HDL. Studiul nostru indică o astfel de corelație, printr-o corelație negativă între fibrinogen și CT, LDL și RA, confirmând ipoteza că acești markeri lipidici scad pe măsură ce crește fibrinogenul.

Concluzii

1. Analiza demografică pe sexe și vârstă din acest experiment indică că majoritatea sunt femei (90,91%). Vârsta medie a pacienților aparține decadelor de vârstă 60-70 de ani specifice dezvoltării bolii reumatismale, între cele două loturi patologice studiate nu există diferențe semnificativ statistice.
2. Prezența unui stres oxidativ în lotul de pacienți cu steatoză hepatică asociată poliartritei reumatoide este reflectat prin diferențe semnificativ statistice pentru TAS și transaminazele serice. Tendința de creștere a acestor enzime și scăderea TAS-lui în acest lot este un semn al prezenței lezării hepatice.
3. Nu sunt prezente corelații între TAS-Fe, TAS-CT, TAS- fibrinogen în cele două loturi patologice, poliartrita reumatoidă și poliartrita reumatoidă asociată cu steatoză hepatică.
4. Steatoza hepatică determină o creștere a sensibilității ficatului la un stres suplimentar, astfel este posibil să dezvolte mai rapid toxicitate hepatică în urma medicației utilizate în poliartrita reumatoidă. Existența unui cerc vicios între steatoză hepatică și stres oxidativ are ca rezultat progresia steatozei hepatice și potențarea stresului oxidativ cu cronicizarea acestei afecțiuni hepatice.
5. Prezența steatozei hepatice, a stresului oxidativ și a medicației reumatice poate duce la manifestarea mai precoce și a unei hepatite toxice, de aceea terapia ar trebui completată cu o terapie medicamentoasă antioxidantă și un regim igienico-dietetic corespunzător.
6. Analiza statistică pentru markerii profilului lipidic, CT, TG, HDL, LDL, între cele două loturi de pacienți reflectă că nu sunt prezente diferențe semnificativ statistice.
7. Analiza statistică pentru riscul aterogen ($RA=CT/HDL$), a pus în evidență o diferență semnificativ statistică între loturile PR și PR+SH. Pacienții cu poliartrita reumatoidă asociată cu steatoză hepatică au o tendință de a dezvolta boală cardiovasculară. Pacienții cu poliartrita reumatoidă au un risc aterogen și de a dezvolta boli cardiovasculare mult mai crescut.
8. Există un model dislipidemic : hipercolesterolemie, LDL crescut și un raport de risc aterogen nefavorabil la pacienții cu poliartrita reumatoidă cu sau fără steatoză hepatică care prezintă un risc crescut de a dezvolta boli cardiovasculare. Jumătate dintre pacienții cu poliartrita reumatoidă au prezentat simultan valori crescute pentru CT, LDL și RA.
9. Fibrinogenul, marker de inflamație, se asociază cu diferite dislipidemii în procente destul de semnificative, dintre care se remarcă că pentru 50% dintre pacienți există o asociere între hiperfibrinogenemie și risc aterogenic crescut.
10. Fibrinogenul prezintă corelații negative cu CT, LDL și RA, ceea ce confirmă ipoteza că markerii lipidici scad pe măsură ce crește fibrinogenul. Aceste rezultate sunt aproximativ similare cu rezultatele din alte studii, dar în care corelațiile au fost aplicate pentru alți parametri inflamatori.
11. Nu sunt prezente corelații între fibrinogen - TG, și fibrinogen - HDL.
12. Acest studiu propune un model dislipidemic și confirmă ipoteza existenței unei modulări a procesului inflamator în raport cu variații concentrației serice a lipidelor.
13. Procesul inflamator determinat prin fibrinogen și VSH, la nivel global nu a generat diferențe semnificativ statistice între cele două loturi, valorile medii ale markerilor inflamatori fiind crescute în cele două loturi, ceea ce indică că nu există un proces inflamator suplimentar indus de prezența steatozei hepatice.
14. Pacienții din acest lot au posibilitatea de a dezvolta în timp anemie prin hiposideremie prin posibilitatea sechestrării fierului la nivel hepatic. Astfel, la pacienții cu steatoză hepatică, se induce un stres oxidativ suplimentar și astfel se atinge mai repede nivelul de hepatotoxicitate din poliartrita reumatoidă.
15. Considerăm că rezultatele noastre contribuie la dezvoltarea și la extinderea de noi cercetări referitoare la:

- studierea și înțelegerea cât mai bine a evoluției modelului dislipidemic în prezența unor condiții inflamatorii
- utilizarea medicației antiinflamatorii și hipolipemiente
- abordarea unor noi scheme terapeutice țintă
- o mai bună evaluare a riscului de a dezvolta boli cardiovasculare și de deces la pacienți cu poliartrită reumatoidă care pot asocia și steatoză hepatică.

6.2. Stresul oxidativ și modificările unor markeri biochimici la pacienții diagnosticați cu hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă

Poliartrita reumatoidă este o boală inflamatorie cronică, autoimună, cu manifestări extraarticulare, de etiologie necunoscută. Mecanismele de producere a leziunilor tisulare la nivelul articulațiilor precum și leziunile sistemice ce apar în PR nu sunt pe deplin elucidate. Se consideră că sunt implicate modificări genetice influențate de factorii de mediu, la care se adaugă prezența stresului oxidativ la nivel tisular. Astfel, în prezent PR este considerată o boală multifactorială (TOBÓN și col., 2009). Studiile epidemiologice la populația generală evidențiază o frecvență crescută a persoanelor diagnosticate cu poliartrită reumatoidă și cu risc crescut de a dezvolta multiple comorbidități care complică boala de bază și crește riscul de mortalitate (GABRIEL și MICHAUD, 2009). Studiile efectuate asupra infecțiilor oportuniste din PR, indică un risc crescut de infecții bacteriene, fungice și virale (B,C), acestea fiind mai frecvente în formele mai active și severe de poliartrită reumatoidă, ca urmare a tratamentului imunosupresiv de bază cu complicarea bolii reumatismale (GABRIEL și MICHAUD, 2009; CROWSON și col., 2012; VASSILOPOULOS și col., 2012). Studiile asupra PR și hepatitelor virale C relevă modificarea mecanismelor de apărare intracelulare cu apariția stresului oxidativ, acesta fiind considerat un element principal în dezvoltarea acestor boli (OZKAN și col., 2007; CLÉMENT și col., 2009).

În contextul asocierii mai multor comorbidități la pacienții cu PR, este importantă evaluarea hepatică, pentru a permite o mai bună evaluare a statusului funcțional al întregului organism. Deasemenea, este importantă stabilirea de noi markeri biochimici și corelații care pot fi utili în aprecierea prognosticului evoluției PR în prezența infecției cu virus hepatic C.

Studiul 1. Compararea loturilor HCVC+PR; HCVC

Obiectivele studiului

1. Evaluarea unor markeri biochimici și a stresului oxidativ, prin determinarea unor antioxidanți enzimatici și neenzimatici, la pacienții diagnosticați cu hepatită cronică C asociată cu poliartrită reumatoidă comparativ cu pacienții diagnosticați cu hepatită cronică virală C și un lot martor de pacienți sănătoși
2. Analiza cantitativă comparată a rezultatelor obținute pentru observarea unor diferențe semnificative ca pondere între cele trei loturi studiate
3. Compararea valorilor obținute cu valorile de referință din literatură
4. Stabilirea prezenței unor diferențe semnificativ statistice între cele trei loturi și în cadrul fiecărui lot patologic
5. Stabilirea prezenței sau absenței unor corelații statistice între SOD, GPx și alți parametri biochimici, acid uric, BT, fierul seric și fibrinogen, la loturile HCV+PR și HCVC.

Materiale și metode

Prezentul studiu s-a realizat în colaborare cu Spitalul Clinic Port Constanța, Secția Medicală II și cu un cabinet privat de medicina de familie, în perioada 2009-2012.

Studiul include 38 de pacienți repartizați în două loturi și un lot de martori sănătoși, astfel:

- 16 pacienți diagnosticați cu hepatită cronică cu virus C (**HCVC**)
- 19 pacienți diagnosticați cu hepatită cronică cu virus C asociată cu poliartrită reumatoidă (**HCVC+PR**)
- 18 martori sănătoși (**M**).

Pacienții au fost diagnosticați pe baza criteriilor ACR de diagnostic pentru PR și pe baza diagnosticului imunologic de laborator de infecție cu virus hepatic C.

Probele biologice au fost recoltate în cadrul spitalului. Prelucrarea și dozarea markerilor biochimici s-a realizat în departamentul de laborator al spitalului. Dozarea probelor biochimice s-a realizat pe ser, plasmă și sânge integral, pe lizat eritocitar pentru SOD și sânge recoltat pe anticoagulant (heparină) pentru GPx, conform standardelor de laborator în vigoare.

Markerii biochimici dozați în acest studiu sunt următorii:

- Superoxid dismutaza (SOD) și glutatión peroxidaza (GPx) – markeri enzimatici ai stresului oxidativ
- Transaminazele serice: Aspartaminotransferaza (AST) alaninaminotransferaza (ALT), - sindromul de citoliză hepatică
- γ -glutamiltanspeptidaza (GGT), fosfataza alcalină (ALP); bilirubina serică totală, directă și indirectă (BT, BI, BD) - sindromul de colestază
- Sideremia (Fe seric)
- Fibrinogen (FIB) - sindromul inflamator
- Colesterol total (CT), triacilgliceroli (TG) - profilul lipidic
- Uree, creatinină, acid uric, proteine totale, glucoza serică

Evaluarea statistică s-a realizat prin aplicarea testului ANOVA, cu expunerea ei în tabele și grafice. Criteriile de excludere din studiu sunt pacienții cu afecțiuni cronice renale și maligne, afecțiuni respiratorii, consumatori cronici de alcool și pacienții cu alte afecțiuni hepatice.

Rezultate și discuții

Din analiza demografică a loturilor de pacienți rezultă că în ambele loturi de pacienți sexul feminin predomină, cu un procent de 68,42% femei în lotul HCVC+PR și 62,50% în lotul HCVC. Vârsta pacienților la care se asociază cele două boli (HCVC+PR) este cuprinsă între 41-80 de ani, iar la pacienții cu HCVC vârsta este de 51-80 de ani. Cei mai mulți pacienți cu HCVC+PR (8p, 36,84%) au vârsta cuprinsă în decada 61-70 de ani și cei mai mulți pacienți cu HCVC (8p, 50%) au decada de vârstă 71-80 de ani.

Superoxid dismutaza (SOD). Prin evaluarea valorilor medii ale activității SOD se observă că există o diferență semnificativ statistică între loturile HCVC și M ($p < 0,001 < 0,05$) și HCVC+PR-M ($p = 0,006 < 0,05$), în sensul scăderii valorilor medii în loturile patologice față de lotul martor. Compararea statistică a valorilor medii ale SOD între loturile patologice HCVC și HCVC+PR confirmă ipoteza că există diferențe semnificativ statistice între aceste loturi ($p = 0,007 < 0,05$). Se constată că deși în ambele loturi valorile medii ale enzimei SOD tind să scadă, se observă că această scădere este mai puțin accentuată în lotul de pacienți HCVC+PR comparativ cu lotul HCVC, în care scăderea lui SOD este mai accentuată (fig. 24).

Glutațiön peroxidaza (GPx) Prin evaluarea statistică a valorilor medii ale activității GPx se confirmă ipoteza că există diferențe statistice între lotul HCVC+PR și lotul martor, în sensul creșterii acestor valori în lotul patologic ($p = 0,001 < 0,05$). Deși, valorile medii ale activității GPx sunt mai mari față de lotul martor, prin evaluarea statistică a valorilor medii a activității GPx, se admite ipoteza că nu există diferențe statistice între loturile HCVC-M ($p > 0,05$). Între loturile de pacienți HCVC și HCVC+PR, în urma analizei statistice, se admite ipoteza că nu există diferențe semnificativ statistice ($p > 0,05$), se observă o tendință de creștere a valorilor GPx mai accentuată în lotul HCVC+PR (fig. 25). Pentru loturile patologice s-au realizat corelații statistice între activitatea enzimelor SOD și GPx și între alți parametri biochimici, acidul uric, bilirubina totală, fierul seric și fibrinogen. În urma corelațiilor statistice pentru lotul de pacienți HCVC+PR, se constată prezența unei corelații negative, slab moderate între activitatea enzimelor antioxidante SOD și GPx ($r = -0,491$, $p = 0,033 < 0,05$). În urma acestei corelații și împreună cu evaluarea statistică a valorilor medii a activității SOD și GPx, se constată faptul că atunci când mecanismele de apărare primară (SOD) tind să scadă, linia a doua de apărare antioxidantă tinde să crească (GPx), deoarece există un exces de peroxizi care necesită a fi neutralizați, exces ce se datorează prezenței crescute de ioni superoxid.

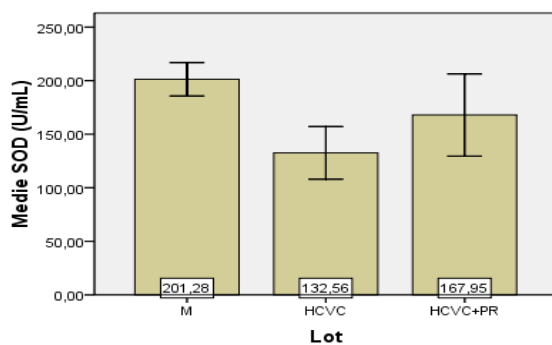


Fig.24. Variația superoxid dismutazei

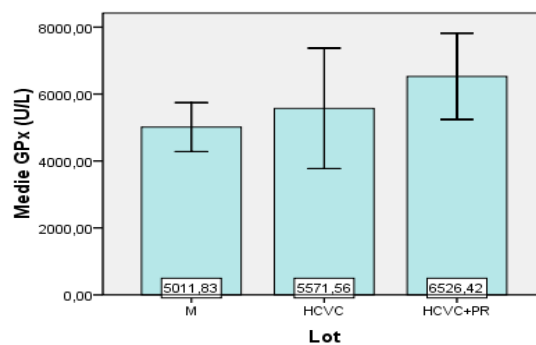


Fig. 25. Variația glutation peroxidazei

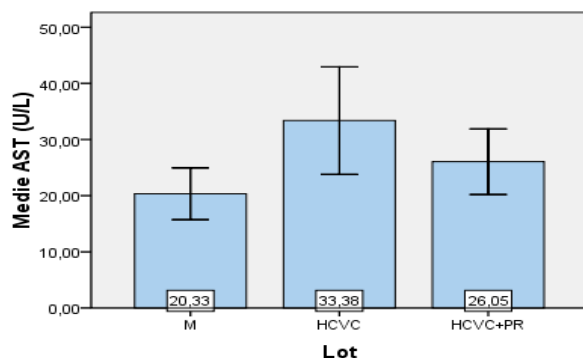


Fig.27. Variația aspartataminotransferazei

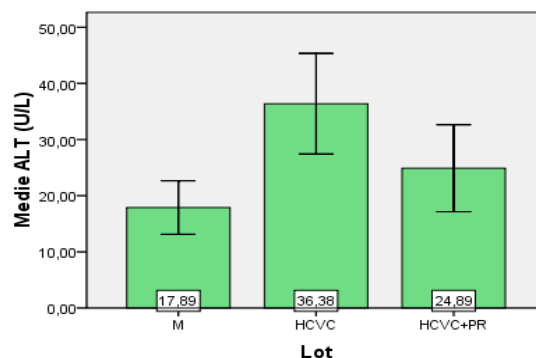


Fig. 28. Variația alaninmonotransferazei

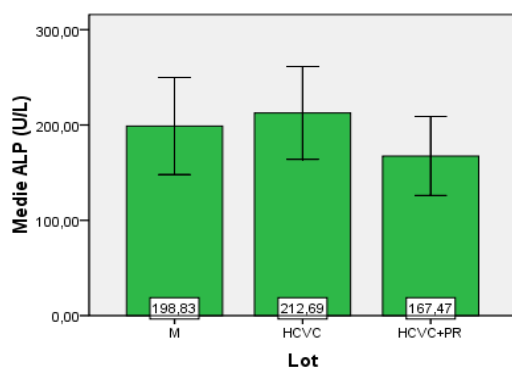


Fig.30. Variația gamaglutamiltranspeptidazei

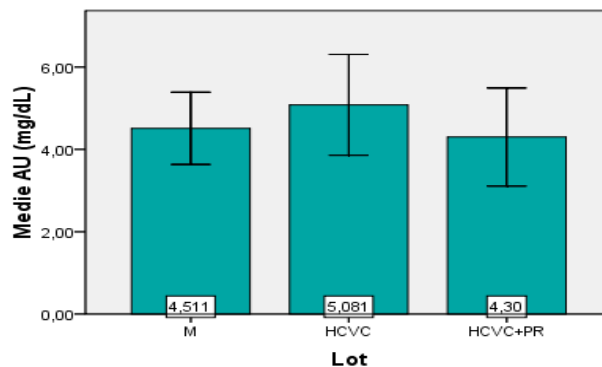


Fig.37. Variația acidului uric

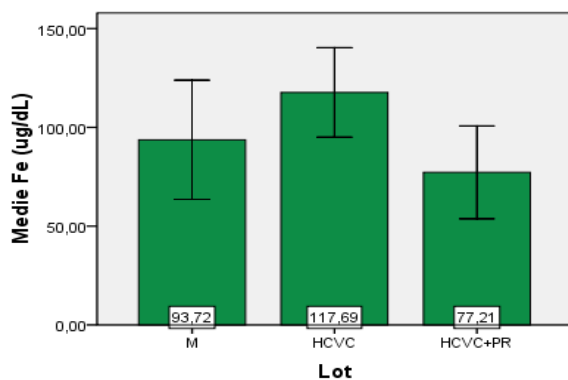


Fig. 40.Variația fierului seric

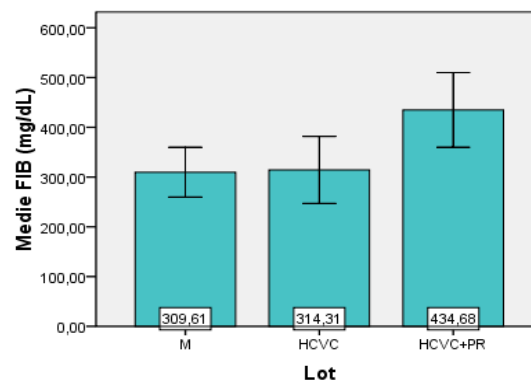


Fig. 41. Variația fibrinogenului

În aceste loturi patologice, HCVC și HCVC+PR, variațiile activității enzimelor SOD și GPx secundar producerii în exces de SRO, reflectă un dezechilibru între sistemele antioxidante și cele prooxidante, ceea ce pune în evidență prezența unui **stres oxidativ**.

Pacienții care asociază cele două comorbidități, HCVC+PR, prezintă un **stres global accentuat** prin scăderea activității SOD și creșterea mai accentuată a activității enzimei GPx.

S-au realizat corelații statistice între enzimele antioxidante și alți markeri biochimici. În lotul de pacienți HCVC s-au găsit corelații statistice pentru acidul uric și Fe seric. Fierul și acidul uric sunt implicați în mecanismele de stres oxidativ. În lotul de pacienți HCVC între activitatea enzimei SOD și concentrația serică a Fe s-a stabilit o corelație puternic negativă ($r = -0,312$, $p = 0,001 < 0,05$). În lotul de pacienți HCVC+PR nu sunt prezente corelații între SOD și Fe. Între GPx și Fe nu sunt prezente corelații la ambele loturi patologice.

În lotul de pacienți HCVC, între activitatea enzimei SOD și concentrația plasmatică a acidului uric este prezentă o corelație pozitivă, moderată ($r = 0,519$, $p = 0,039 < 0,05$), iar între activitatea GPx și concentrația serică de acid uric s-a stabilit deasemenea o corelație moderată pozitivă ($r = 0,618$, $p = 0,011 < 0,05$). Între cele trei loturi luate în studiu, nu există diferențe semnificativ statistice între valorile medii ale acidului uric. Aceste corelații pozitive pot indica faptul că acidul uric este un antioxidant și că creșterea concentrației lui indică o creștere a sistemelor antioxidante, fiind astfel un marker de **stres oxidativ**.

Fierul seric. Valorile medii ale sideremiei sunt între limitele normale, dar prin evaluarea statistică se acceptă ipoteza că există diferențe semnificativ statistic între lotul de pacienți HCVC și celelalte două loturi luate în studiu ($p < 0,05$), în sensul creșterii valorilor medii în lotul HCVC. În lotul HCVC+PR, fierul seric tinde să scadă către limita inferioară a normalului (fig.40). Studiile asupra sideremiei din infecția cu virus C consideră că există o alterare în mecanismele de reglare a homeostaziei Fe, hepcidina fiind implicat în aceste mecanisme. Secreția de hepcidină este modulată de diferiți factori care reglează activitatea ei prin mecanisme de feed-back negativ sau pozitiv (SABĂU și col., 2009). Un studiu recent (LIU și col., 2012) asupra implicațiilor hepcidinei în HCV arată că există o supresie a expresiei hepcidinei în hepatocitele infectate cu virus. Astfel, în lotul de pacienți HCVC tendința la hipersideremie ar putea indica un mecanism de inhibare a expresiei hepcidinei la nivel hepatic. În lotul de pacienți HCVC+PR se observă scădere a sideremiei către limitele inferioare ale normalului.

Transaminazele serice. Prin evaluare statistică se admite ipoteza că există diferențe semnificativ statistice între valorile medii ale activității enzimelor AST din lotul martor și loturile patologice HCVC ($p = 0,001 < 0,05$) și HCVC+PR ($p = 0,007 < 0,05$) cu creșterea valorii enzimei AST în loturile patologice. Deasemenea, se admite ipoteza că există diferențe semnificativ statistice și între cele două loturi patologice cu creșterea AST în lotul HCVC ($p = 0,001 < 0,05$). Aceleași ipoteze sunt valabile și pentru enzima ALT. Evaluarea statistică pentru raportul *de Ritis* admite ipoteza că este prezentă o diferență semnificativ statistică între lotul martor și lotul HCVC cu scăderea valorii raportului *de Ritis* față de valoarea normală de 1,3, în lotul HCVC ($p = 0,001 < 0,05$). Nu sunt prezente diferențe semnificativ statistice între loturile martor și HCVC+PR, între loturile HCVC+PR și HCVC ($p > 0,05$). În urma acestor evaluări statistice se constată o creștere a permeabilității membranei pentru aceste enzime, mai accentuată la lotul de pacienți HCVC. Sindromul de citoliză nu este prezent la lotul de pacienți HCVC+PR.

Glucoza serică. Valorile medii pentru aceste loturi se încadrează în limitele normale și nu există diferențe semnificativ statistice între loturile de pacienți luați în studiu ($p > 0,05$).

Gamaglutamiltranspeptidaza (GGT). Prin evaluarea statistică a valorilor medii a activității GGT în loturile studiate se admite ipoteza că există diferențe semnificativ statistice între lotul HCVC și loturile martor și HCVC+PR cu creșterea valorilor GGT în lotul HCVC ($p < 0,001 < 0,05$). Diferențe semnificativ statistice nu sunt prezente între lotul martor și lotul HCVC+PR ($p > 0,05$).

Fosfatasa alcalină (ALP). Evaluarea statistică a valorilor medii ale activității enzimei ALP confirmă faptul că există diferențe semnificativ statistic doar între loturile HCVC și HCVC+PR cu tendința de creștere a enzimei în lotul HCVC ($p = 0,020 < 0,05$). Între celelalte loturi nu sunt prezente diferențe semnificativ statistice ($p > 0,05$).

Bilirubinele serice. Concentrațiile bilirubinelor serice sunt modificate, astfel se constată că între valorile medii ale BD există diferențe semnificativ statistice între lotul martor și loturile patologice ($p < 0,05$) dar nu și între cele două loturi patologice ($p > 0,05$). Valorile medii ale bilirubinei totale prezintă diferențe semnificativ statistice între lotul HCVC+PR și celelalte loturi ($p < 0,05$), cu tendință de scădere a valorilor BT în lotul HCVC+PR. Între celelalte loturi, martor și HCVC nu sunt prezente

diferențe semnificativ statistice ($p > 0,05$). Bilirubina serică este considerată un antioxidant neenzimatic, plasmatic. Prin evaluare statistică pentru cele două loturi patologice nu s-au stabilit corelații între BT și enzimele SOD și GPx. ($p > 0,05$). În urma acestor evaluări se constată că există o tendință de creștere a enzimelor ALT, AST, GGT, ALP și a bilirubinelor serice în lotul de pacienți HCVC+PR care se datorează prezenței afecțiunii hepatice virale. Acești parametrii biochimici sunt mai pronunțați în lotul de pacienți HCVC, ceea ce ne permitem să considerăm că există o afectare mai profundă a hepatocitelor de prezența infecției virale (GHIDUȘ și col., 2013).

Tabel 88. Corelații statistice între SOD și GPx în loturile HCVC+PR și HCVC

Lot			SOD (U/mL)	GPx (U/L)
HCVC	SOD (U/mL)	Corelația Pearson (r)	1	0,707**
		Sig. (2-tailed) (p)		0,002
		N	16	16
	GPx (U/L)	Corelația Pearson	0,707**	1
		Sig. (2-tailed)	0,002	
		N	16	16
HCVC+R	SOD (U/mL)	Corelația Pearson	1	-0,491*
		Sig. (2-tailed)		0,033
		N	19	19
	GPx (U/L)	Corelația Pearson	-0,491*	1
		Sig. (2-tailed)	0,033	
		N	19	19

Tabel 89. Corelații statistice între SOD și acid uric în loturile HCVC+PR și HCVC

Lot			SOD (U/mL)	AU (mg/dL)
HCVC	SOD (U/mL)	Corelația Pearson	1	0,519*
		Sig. (2-tailed)		0,039
		N	16	16
	AU (mg/dL)	Corelația Pearson	0,519*	1
		Sig. (2-tailed)	0,039	
		N	16	16
HCVC+PR	SOD (U/mL)	Corelația Pearson	1	0,154
		Sig. (2-tailed)		0,529
		N	19	19
	AU (mg/dL)	Corelația Pearson	0,154	1
		Sig. (2-tailed)	0,529	
		N	19	19

*, Corelația este semnificativă la nivelul 0.05 (p) (2-tailed).

Tabel 92. Corelații statistice între SOD și Fe în loturile HCVC+PR și HCVC

Lot			SOD (U/mL)	Fe (ug/dL)
HCVC	SOD (U/mL)	Corelația Pearson	1	-0,731**
		Sig. (2-tailed)		0,001
		N	16	16
	Fe (ug/dL)	Corelația Pearson	-0,731**	1
		Sig. (2-tailed)	0,001	
		N	16	16
HCVC+PR	SOD (U/mL)	Corelația Pearson	1	0,150
		Sig. (2-tailed)		0,540
		N	19	19
	Fe (ug/dL)	Corelația Pearson	0,150	1
		Sig. (2-tailed)	0,540	
		N	19	19

Tabel 93. Corelații statistice între GPx și AU în loturile HCVC+PR și HCVC

Lot			GPx (U/L)	AU (mg/dL)
HCVC	GPx (U/L)	Corelația Pearson	1	0,618*
		Sig. (2-tailed)		0,011
		N	16	16
	AU (mg/dL)	Corelația Pearson	0,618*	1
		Sig. (2-tailed)	0,011	
		N	16	16
HCVC+PR	GPx (U/L)	Corelația Pearson	1	-0,085
		Sig. (2-tailed)		0,730
		N	19	19
	AU (mg/dL)	Corelația Pearson	-0,085	1
		Sig. (2-tailed)	0,730	
		N	19	19

*. Corelația este semnificativă la nivelul 0.05 (p) (2-tailed).

**. Corelația este semnificativă la nivelul 0.01 (p) (2-tailed).

Colesterol total (CT) și trigliceridele serice (TG). Evaluarea statistică a valorilor medii ale colesterolului total între loturile studiate, indică faptul că există diferențe semnificativ statistice între lotul HCVC+PR și lotul HCVC cu tendința de creșterea a CT în lotul HCVC+PR. Pentru celelalte loturi nu sunt prezente diferențe semnificativ statistice ($p > 0,05$). Între valorilor medii ale TG serice pentru cele trei loturi se constată că nu sunt prezente diferențe semnificativ statistice ($p > 0,05$). Concentrațiile serice de CT și TG reflectă capacitatea de sinteză a ficatului, afectarea acestei funcții hepatice poate duce la tulburări în metabolismul lipidic cu acumularea de lipide în hepatocite (steatoza hepatică) și alterarea nivelor lipidelor serice.

Urea și creatinina. Se constată că există diferențe semnificativ statistice între valorile medii ale ureei între lotul martor și lotul HCVC+PR ($p < 0,001 < 0,05$). Nu sunt prezente diferențe semnificativ statistice între lotul HCVC și loturile, martor și HCVC+PR. ($p > 0,05$). Prin evaluarea statistică a valorilor medii ale creatininei serice între loturile patologice, nu sunt prezente diferențe semnificativ statistice. Valorile medii ale acestor markeri biochimici sunt între limitele normale.

Fibrinogen. Prin evaluarea statistică a valorilor medii ale fibrinogenului se acceptă ipoteza că există diferențe semnificativ statistice între loturile HCVC+PR și loturile martor și HCVC ($p < 0,001 < 0,05$). Între celelalte loturi nu se constată diferențe semnificativ statistice ($p > 0,05$) (fig. 41). Nu se constată corelații statistice între fibrinogen și enzimele antioxidante SOD și GPx. Valoarea medie a fibrinogenului în lotul HCVC+PR depășește limita superioară a normalului și datorită considerațiilor statistice

de mai sus, se poate spune că prezența inflamației reflectată de nivelul plasmatic al fibrinogenului se datorează doar inflamației cronice din poliartrita reumatoidă, neexistând un proces inflamator hepatic suplimentar.

Proteine totale. Între valorile medii ale PT din loturile HCVC și HCVC+PR nu există diferențe semnificativ statistice ($p>0,05$). Între lotul HCVC+PR și lotul martor, există diferențe semnificativ statistice între valorile medii ale PT, dar acestea sunt în limitele normale ($p<0,05$).

Concluzii

1. În ambele loturi de pacienți majoritatea sunt femei, dar cu un procent mai ridicat în lotul HCVC+PR (68,42%) și se datorează faptului că PR este specifică sexului feminin.
2. Procentul cel mai crescut de pacienți HCVC+PR se constată la femeile de 61-70 de ani, fapt confirmat de datele de literatură, întrucât poliartrita reumatoidă este specifică femeilor cu vârsta cuprinsă în această decadă. În lotul cu hepatită cronică virală C procentul cel mai crescut de femei se constată în decada de viață 71-80 de ani.
3. Între cele două loturi există o diferență între decadele de vârstă, astfel, hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă afectează și pacienții mai tineri (41-80 de ani), iar hepatită cronică virală C apare la pacienții mai vârstnici (51-80 de ani).
4. Stresul oxidativ este prezent în ambele loturi patologice și este pus în evidență prin modificarea activității enzimelor SOD și GPx în loturile patologice față de lotul martor cu existența diferențelor semnificativ statistice.
5. Activitatea enzimei SOD tinde să scadă în ambele loturi, dar mult mai pronunțat în lotul de pacienți cu HCVC.
6. Activitatea enzimei GPx tinde să crească în ambele loturi patologice.
7. Corelația puternic pozitivă între SOD și GPx în lotul HCVC, indică un consum crescut acestor enzime antioxidante pentru neutralizarea SRO, ceea ce pune în evidență un stres oxidativ accentuat.
8. Corelațiile pozitive între SOD și acidul uric și între GPx și acidul uric în lotul HCVC, precum și corelația negativă dintre SOD și GPx, în lotul HCVC+PR, pune în evidență prezența unui stres oxidativ accentuat.
9. Scăderea activității enzimei SOD se datorează posibil consumului ei crescut pentru neutralizarea ionului superoxid și cu producerea în exces de peroxizi (H_2O_2). Creșterea activității enzimei GPx poate reflecta creșterea producției de peroxizi, deoarece cresc necesitățile intracelulare de enzimă GPx pentru neutralizarea peroxizilor.
10. În loturile HCVC+PR și HCVC, se constată că atunci când mecanismele de apărare primară (SOD) tind să scadă, apare un proces de amplificare a mecanismelor secundare de apărare antioxidantă (GPx).
11. Pacienții care asociază cele două comorbidități, HCVC+PR, prezintă un stres global accentuat prin scăderea activității SOD și creșterea mai accentuată a activității enzimei GPx.
12. Fierul seric prezintă diferențe semnificativ statistice între loturile patologice cu creșterea sideremiei în HCVC și tendința de scădere a sideremiei în HCVC+PR, acest lucru datorându-se mecanismelor de activare și de blocare a hepcidinei la nivel hepatic, cu modificarea homeostaziei fierului, sideremiei și reținerea Fe în diferite depozite tisulare.
13. Între activitate SOD și concentrația Fe seric este prezentă o corelație puternic negativă în lotul de pacienți HCVC. Fierul este implicat în stresul oxidativ, el fiind un factor prooxidant și prin corelația negativă cu SOD poate indica prezența unui stres oxidativ crescut ce duce la reducerea SOD datorită unui consum crescut al acestei enzime.
14. Se constată că ficatul este afectat, acest lucru este pus în evidență prin tendința de creștere a enzimelor ALT, AST, GGT, ALP, a raportului *de Ritis* și a bilirubinelor serice la pacienții cu HCVC+PR, se datorează prezenței afecțiunii hepatice virale. Acești markeri biochimici hepatici sunt mai pronunțați în lotul de pacienți HCVC la care afectarea hepatocitelor este mai profundă în prezența infecției virale.
15. Profilul lipidic (colesterol total și trigliceride) este parțial modificat prin tendința de creștere a valorilor CT, semnificativ statistică, în lotul HCVC+PR comparativ cu lotul martor, dar nu și comparativ cu lotul HCVC.
16. Funcția renală, apreciată prin uree și creatinină, nu este afectată în cele două loturi patologice. Se constată doar o tendință de creștere, semnificativ statistică, a ureei în lotul HCVC+PR față de lotul martor.

17. Glucoza serică nu prezintă diferențe semnificativ statistice între cele trei loturi.
18. Hiperfibrinogenemia este semnificativ statistică în lotul de pacienți HCVC+PR față de lotul martor și se datorează doar prezenței bolii infamtorii reumatismale și nu unui proces inflamator hepatic suplimentar.
19. Proteinele totale nu prezintă diferențe semnificativ statistice între valorile medii ale loturilor HCVC și HCV+PR.
20. La pacienții cu HCVC nu se constată corelații între SOD-FIB, SOD-BT, GPx-FIB, GPx-BT, GPx-Fe, iar în lotul de pacienți HCVC+PR nu se constată corelații între SOD-acid uric, SOD-FIB, SOD-Fe, SOD-BT, GPx-acid uric, GPx-FIB, GPx-BT, GPx-Fe.
21. Pacienții care asociază cele două comorbidități (HCVC+PR) au ficatul afectat într-o mai mică măsură față de pacienții cu HCVC, dar prezintă un stres oxidativ global crescut probabil coexistenței celor două patologii, ceea ce indică un efort din parte organismului de a combate excesul de SRO.
22. Pentru a reduce stresul oxidativ global considerăm că medicația antioxidantă trebuie să facă parte din terapia de bază.

Studiul 2. Compararea loturilor HCVC+PR; PR

Obiectivele studiului

- 1 Evaluarea unor markeri biochimici și a stresului oxidativ, prin determinarea unor antioxidanți enzimatici și neenzimatici la pacienții diagnosticați cu hepatită cronică C asociată cu poliartrită reumatoidă comparativ cu pacienții diagnosticați cu poliartrita reumatoidă și un lot martor
2. Analiza cantitativă comparată a rezultatelor obținute pentru observarea unor diferențe semnificative ca pondere între cele trei loturi studiate
3. Compararea valorilor obținute cu valorile referință din literatură și cu cele din studiile de referință
4. Stabilirea prezenței unor diferențe semnificative semnificativ statistice între cele trei loturi și în cadrul fiecărui lot patologic
5. Stabilirea prezenței sau absenței unor corelații statistice între SOD, GPx și alți parametri biochimici: acid uric, BT, fierul seric și fibrinogen, în loturile HCV+PR și PR.

Materiale și metode

Prezentul studiu s-a realizat în colaborare cu Spitalul Clinic Port Constanța, Secția Medicală II și cu un cabinet privat de medicină de familie, în perioada 2009-2012. Studiul include 38 de pacienți repartizați în două loturi și un lot de martori sănătoși:

- 19 pacienți diagnosticați cu poliartrită reumatoidă (**PR**)
- 19 pacienți diagnosticați cu HCVC asociată cu PR (**HCVC+PR**)
- 18 martori sănătoși (**M**)

Pacienții au fost diagnosticați pe baza criteriilor ACR de diagnostic pentru PR și pe baza diagnosticului imunologic de laborator de infecție cu virus hepatic C.

Probele biologice au fost recoltate în cadrul spitalului. Prelucrarea și dozarea markerilor biochimici s-a realizat în departamentul de laborator al spitalului. Dozarea probelor biochimice s-a realizat pe ser, plasmă și sânge integral, pe lizat eritocitar pentru SOD și sânge recoltat pe anticoagulant (heparină) pentru GPx, conform standardelor de laborator în vigoare.

Markerii biochimici dozați în acest studiu sunt următorii:

- Superoxid dismutaza (SOD) și glutatión peroxidaza (GPx) – markeri enzimatici ai stresului oxidativ
- Transaminazele serice: Aspartaminotransferaza (AST) alaninaminotransferaza (ALT) - sindromul de citoliză hepatică
- γ -glutamyltranspeptidaza (GGT), fosfataza alcalină (ALP); bilirubina serică totală, directă și indirectă (BT, BI, BD) - sindromul de colestază
- Sideremia (Fe seric)
- Fibrinogen (FIB) - sindromul inflamator
- Colesterol total (CT), triacilgliceroli (TG) - profilul lipidic

- Uree, creatinină, acid uric, proteine totale, Glucoza serică

Evaluarea statistică s-a realizat prin aplicarea testului ANOVA, cu expunerea ei în tabele și grafice. Criteriile de excludere din studiu sunt pacienții cu afecțiuni cronice renale și maligne, afecțiuni respiratorii, consumatori cronici de alcool și pacienții cu alte afecțiuni hepatice.

Rezultate și discuții

Analiza demografică în funcție de vârstă și sex evidențiază prezența dominantă a sexului feminin în ambele loturi, 13 paciente (68,42%) în lotul HCV+PR și 17 paciente (89,47%) în lotul PR. Pacienți de sex masculin sunt doar 6 (31,58%) de în lotul HCVC+PR și 2 (10,53%) în lotul PR. În lotul HCV+PR vârsta pacienților variază între 45 și 78 de ani, în lotul PR, distribuția vârstei este mai largă și este cuprinsă între decadele 31 și 81 de ani. Se observă o extindere spre decadele de vârstă mai mici a PR, prezența infecției virale asociată acestei boli ar putea fi implicată în manifestarea ei mai precoce.

Studiile de epidemiologie asupra prevalenței PR în funcție de vârstă și sexul pacientului indică o frecvență crescută la femei față de bărbați, mecanismul prin care sexul influențează susceptibilitatea la PR nu este cunoscut, dar se consideră că sunt implicați hormonii sexuali, perioada maximă de apariție a PR fiind în decada a 5-a de viață când se produc și modificări hormonale la femei.

Superoxid dismutaza (SOD) catalizează conversia ionului superoxid în peroxide (H_2O_2), constituind prima linie de apărare antioxidantă celulară (OLINESCU, 1994).

În urma analizei statistice a activității SOD se acceptă ipoteza că există diferențe semnificativ statistice între valorile medii ale lui SOD pentru cele trei loturi. Prin evaluarea activității SOD se observă o scădere semnificativă în loturile de pacienți HCVC+PR și PR comparativ cu lotul martor ($p < 0,05$), (fig.46). O scădere semnificativă a activității SOD este prezentă în lotul PR față de lotul de pacienți HCVC+PR ($p = 0,009 < 0,05$).

Glutation peroxidaza (GPx) catalizează peroxidul (H_2O_2) și alte forme de peroxizi, de exemplu peroxizii lipidici. Datorită unei distribuții enzimice diferite la nivel celular, GPx la nivelul peroxizomilor lucrează în tandem cu catalaza, iar în citoplasmă este cuplat cu activitatea enzimei SOD (OLINESCU, 1994).

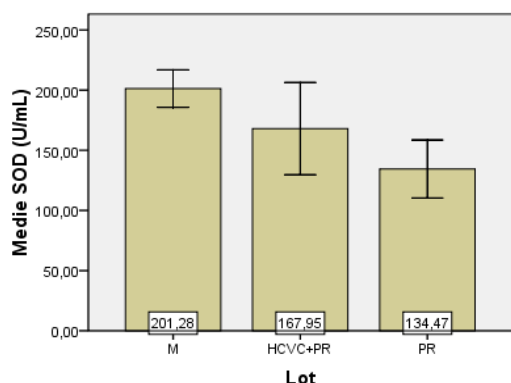


Fig. 45. Variația superoxid dismutazei

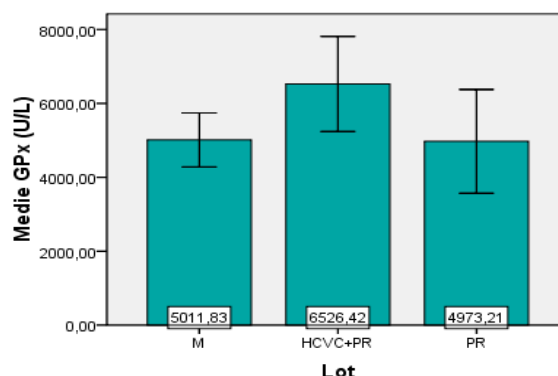


Fig.46. Variația Glutation peroxidazei

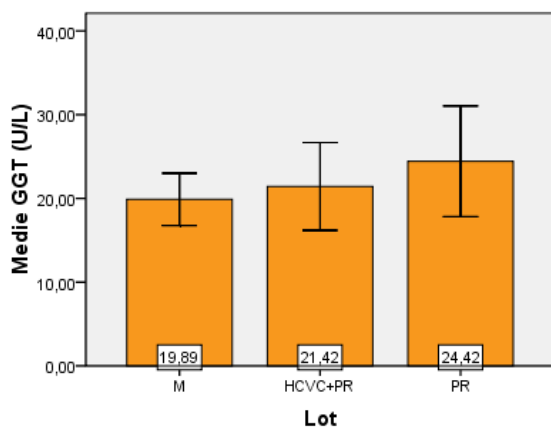


Fig.51. Variația gama-glutamiltranspeptidazei

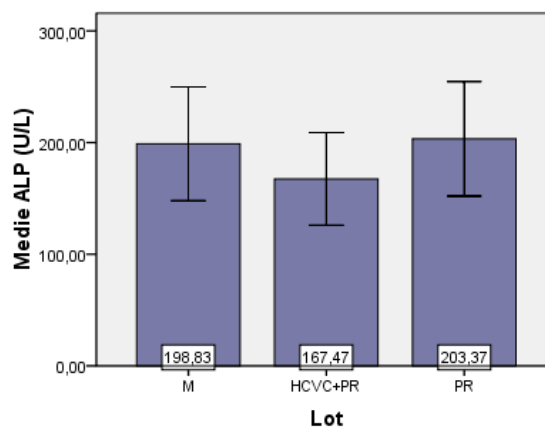


Fig.52. Variația fosfatazei alcaline

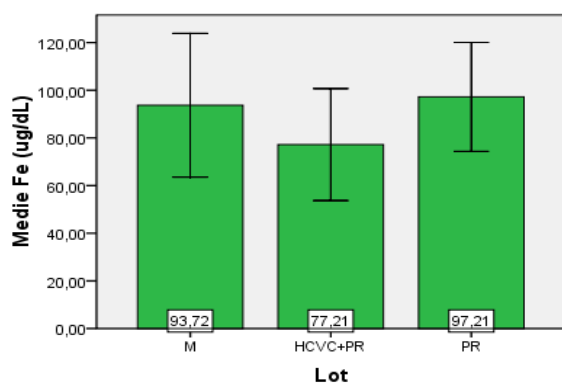


Fig.61. Variația fierului seric

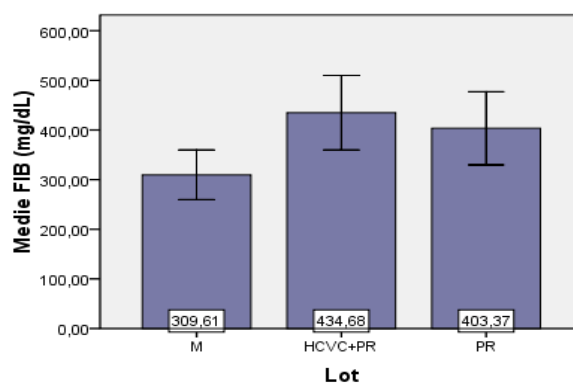


Fig.62. Variația fibrinogenului

În urma analizei statistice, se acceptă ipotezele că există diferențe semnificative statistice între valorile medii ale activității GPx pentru loturile de pacienți diagnosticați cu HCVC+PR și lotul martor ($p=0,001 < 0,05$). De asemenea, între valorile medii ale activității GPx și lotul de pacienți cu PR ($p=0,001 < 0,05$), există diferențe semnificativ statistice cu creșterea activității GPx în lotul HCVC+PR. Pentru loturile de pacienți diagnosticați cu PR și HCVC+PR s-au realizat corelații statistice între activitatea enzimelor SOD și GPx cu alți markeri biochimici considerați că ar fi implicați în mecanismele antioxidante plasmatiche, Fe și fibrinogenul. Corelațiile statistice au pus în evidență prezența unor corelații slab negative între activitățile enzimelor SOD și GPx în lotul de pacienți HCVC+PR ($r = -0,491$, $p = 0,033 > 0,05$). Corelații pozitive slab-moderate sunt prezente între activitatea SOD și concentrația serică de acid uric (AU) în lotul de pacienți diagnosticați cu PR ($r = -0,459$, $p = 0,048 < 0,05$). Nu sunt prezente corelații statistice pentru SOD și GPx cu ceilalți parametri biochimici.

Pe baza evaluării statistice a valorilor medii ale activității enzimelor SOD și GPx și a corelațiilor statistice găsite, în lotul de pacienți care asociază cele două comorbidități (HCVC+PR), stresul oxidativ este mult mai evident reflectat prin tendința de scădere a activității enzimei SOD și creșterea accentuată a activității enzimei GPx ca mecanism compensator celular. Asocierea a două stări patologice HCVC și PR determină un stres oxidativ global crescut la acești pacienți comparativ cu lotul PR.

Glucoza serică. Valorile medii ale glicemiei în aceste loturi se încadrează în limitele normale, deși se observă o valoare medie mai scăzută în lotul HCVC+PR, dar în urma analizei statistice se acceptă ipoteza că nu există diferențe semnificativ statistice între loturile martor, HCVC, HCVC+PR ($p < 0,05$).

Transaminazele serice AST și ALT sunt modificate în lotul de pacienți care asociază cele două comorbidități (HCVC+PR). Valorile medii ale ALT și AST prezintă o diferență semnificativ statistic față de lotul de martor și lotul PR ($p < 0,05$). **Raportul de Ritis (AST/ALT)** nu prezintă diferențe semnificativ statistic între aceste loturi ($p > 0,05$).

Bilirubinele serice (directă, indirectă și totală) sunt ușor modificate la lotul de pacienți care asociază HCVC+PR, cu creșterea ușoară a bilirubinei directe, există diferențe statistice între valorile medii ale BD între lotul martor și lotul de pacienți HCVC+PR ($p < 0,001 < 0,05$). Nu s-au stabilit corelații statistice între BT și enzimele SOD și GPx.

Gamaglutamiltranspeptidaza (GGT) și fosfataza alcalină (ALP), la pacienții cu HCV+PR nu sunt modificate, ceea ce nu indică prezența sindromului de colestază la acești pacienți.

Pentru lotul de pacienți cu PR s-a observat o tendință de scădere ale valorilor medii ale GGT și ALP către limitele superioare ale valorilor normale. Pentru valori ale concentrației serice a GGT există o diferență semnificativ statistică între loturile martor și PR ($p < 0,05$), dar nu și între celelalte loturi.

Colesterolul total (CT) și trigliceridele serice (TG). Se constată o hipercolesterolemie în loturile de pacienți PR și HCVC+PR cu o diferență semnificativ statistică față de lotul martor ($p < 0,001 < 0,05$). În lotul HCVC+PR se observă valori mai scăzute ale CT față de lotul PR, dar fără să se atingă pragul de semnificație statistică ($p > 0,05$). Între valorile medii ale TG serice nu este prezentă o diferență semnificativ statistică pentru cele trei loturi studiate. Valorile medii se încadrează între valorile de referință.

Urea, creatinina și acidul uric. Concentrația ureii serice nu prezintă diferențe semnificativ statistic între cele două loturi patologice, ($p>0,05$), deși, valorile medii ale ureii se încadrează între limitele normale. Se constată o creștere cu prezența unei diferențe semnificative pentru loturile PR și HCVC+PR față de lotul martor ($p<0,001$). Concentrațiile serice ale acidului uric și creatininei nu prezintă diferențe semnificativ statistice între loturile patologice față de lotul de martor ($p>0,05$). Nu se stabilesc corelații statistice între SOD-acid uric în lotul de pacienți HCVC+PR și între GPx-acid uric în loturile de pacienți PR, HCVC+PR.

Fierul seric (sideremia). Valorile medii ale fierul seric în aceste loturi sunt între limitele normale, dar cu tendință de scădere către limita inferioară a normalului în loturile patologice (fig.61). Deasemenea, nu este prezentă o diferență semnificativ statistică între lotul de martor și loturile PR și HCVC+PR.

Se constată o tendință de scădere a sideremiei în lotul HCVC+PR și se acceptă ipoteza că există o diferență semnificativ statistică între lotul de pacienți HCV+PR și lotul PR ($p=0,039<0,05$). Asocierea celor două comorbidități poate induce o hiposideremie prin alterarea mecanismelor expresiei a hepcidinei, printr-un joc al creșterii expresiei sau scăderii expresiei hepcidinei ce are ca rezultat scăderea sideremiei în lotul HCVC+PR, față de lotul PR. Nu s-au stabilit corelații între Fe și enzimele SOD și GPx, în loturile patologice.

Tabel 165. Corelații statistice între SOD și GPx în loturile HCVC+PR și PR

Lot			SOD (U/mL)	GPx (U/L)
HCVC+PR	SOD (U/mL)	Corelația Pearson (r)	1	-0,491*
		Sig. (2-tailed) (p)		0,033
		N	19	19
	GPx (U/L)	Corelația Pearson	-0,491*	1
		Sig. (2-tailed)	0,033	
		N	19	19
PR	SOD (U/mL)	Corelația Pearson	1	-0,166
		Sig. (2-tailed)		0,497
		N	19	19
	GPx (U/L)	Corelația Pearson	-0,166	1
		Sig. (2-tailed)	0,497	
		N	19	19

*. Corelația este semnificativă la nivelul 0.05 (p) (2-tailed).

Tabel 166. Corelații statistice între SOD și acid uric (AU) în loturile HCVC+PR și PR

Lot			SOD (U/mL)	AU (mg/dL)
HCVC+PR	SOD (U/mL)	Corelația Pearson	1	0,154
		Sig. (2-tailed)		0,529
		N	19	19
	AU (mg/dL)	Corelația Pearson	0,154	1
		Sig. (2-tailed)	0,529	
		N	19	19
PR	SOD (U/mL)	Corelația Pearson	1	0,459*
		Sig. (2-tailed)		0,048
		N	19	19
	AU (mg/dL)	Corelația Pearson	0,459*	1
		Sig. (2-tailed)	0,048	
		N	19	19

*. Corelația este semnificativă la nivelul 0.05 (p) (2-tailed).

Proteine totale. Între valorile medii plasmatice sunt nu există diferențe semnificativ statistice pentru grupurile studiate ($p=0,807>0,05$).

Fibrinogenul este un marker al prezenței sindromului inflamator în organism. Valorile medii ale fibrinogenului în cele două loturi de pacienți depășește limita superioară a normalului (400mg/dl). Între valorilor medii ale fibrinogenul în loturile HCVC+PR și PR, există diferențe statistice față de lotul martor ($p<0,001<0,05$). Se constată că la bolnavii din lotul HCVC+PR fibrinogenul este mai crescut față de lotul de pacienți cu PR, nu a se atinge pragul de semnificație statistică ($p=0,477>0,05$) (fig. 62). Sindromul inflamator este prezent în cele două loturi de pacienți. Deși există o creștere a fibrinogenului în lotul de pacenți care asociază cele două comorbidități, față de lotul PR, nu s-a atins pragul de semnificație statistică, care să indice un proces inflamator datorită prezenței patologiei hepatice. Nu s-au stabilit corelații statistice între fibrinogenul plasmatic și enzimele antioxidante SOD și GPx.

Concluzii

1. Poliartrita reumatoidă afectează predominant femeile, cu manifestarea bolii în perioada 50-70 de ani și datorită statusului hormonal modificat care corespunde perioadei de menopauză.
2. Pacienții diagnosticați cu HCV+PR în majoritate sunt femei cu vârste cuprinse între 40 și 80 de ani, manifestarea mai precoce a PR s-ar putea datora prezenței prezența infecției virale asociată acestei boli.
3. **Stresul oxidativ** este prezent în loturile patologice HCVC+PR și PR, și este pus în evidență de variații ale activității enzimelor SOD și GPx, prin producerea în exces de SRO cu depășirea capacității sistemelor de apărare antioxidantă. Această modulare a activității sistemelor antioxidante secundar excesului de SRO, se reflectă și prin corelația pozitivă dintre SOD și acidul uric prezentă în lotul PR.
4. Asocierea celor două comorbidități hepatita virală C și poliartrită reumatoidă (HCVC+PR), determină un stres oxidativ mult mai accentuat, reflectat prin tendința de scădere a activității enzimei SOD și creșterea accentuantă a activității enzimei GPx, ca un mecanism compensator celular, pus în evidență prin prezența unei corelație negativă dintre SOD și GPx. Deci, cresc mecanismele secundare de apărare antioxidantă (GPx) atunci când prima linie de apărare (SOD) scade.
5. Asocierea a două stări patologice HCVC și PR la acești pacienți determină prezența unui stres oxidativ suplimentar, a unui **stres oxidativ global crescut** comparativ cu lotul de pacienți PR.
6. Sindromul inflamator este prezent în ambele loturi patologice, prin valorile medii crescute ale fibrinogenului, dar nu există diferențe semnificativ satistică între lotul de pacienți HCVC+PR și lotul de pacienți PR, ceea ce se poate spune că prezența patologiei hepatitice virale nu induce un proces inflamator suplimentar.
7. În lotul de pacienți HCVC+PR nu se remarcă un sindrom de colestază. Alterarea bilirubinemiei se poate explica prin alterarea hepatocitului; semn de alterare hepatocelulară o reprezintă tendința de creștere a transaminazelor serice, prin creșterea permeabilității membranei celulare.
8. Lotul de pacienți diagnosticați cu PR prezintă tendință de modificare a enzimelor GGT și ALP. Se constată o creștere semnificativ statistică a activității enzimei GGT față de lotul martor. Creșterea activității enzimei GGT poate reflecta scăderea GSH intracelular și prezența stresului oxidativ la pacienții diagnosticați cu PR.
9. Dislipidemia prin hipercolesterolemie este prezentă în cele două loturi patologice. Colesterolul total tinde să crească în cele două loturi, mai accentuat în lotul PR față de lotul HCVC+PR. Valorile medii ale trigliceridelor serice nu sunt modificate. Dislipidemiile sunt importante în PR și stau la baza manifestărilor bolilor cardiovasculare din poliartrita reumatoidă și deasemenea sunt implicate în procesul de infecțiozitate a virusului hepatic C.
10. Ambele patologii hepatită cronică virală C și poliartrita reumatoidă asociază tulburări în metabolismul lipidic cu alterarea profilului lipidic și deasemenea, pot să asocieze steatoză hepatică non alcoolică.
11. Studiarea dislipidemiilor în contextul unei patologii asociate poate constitui un punct de plecare pentru studiile viitoare, pentru a se observa care sunt implicațiile asocierii poliartritei reumatoidă, hepatitei virale C și steatozei hepatice non-alcoolică asupra viremiei și terapiei medicamentoase din aceste boli.

12. Hiposideremia este mai accentuată în lotul de pacienți HCVC+PR față, de lotul PR, între care există diferențe semnificativ statistice. Asocierea celor două comorbidități poate induce o hiposideremie suplimentară.
13. Prin evaluarea valorilor medii, glucoza serică, proteine totale serice, uree serică, acid uric și creatinina serică nu prezintă diferențe semnificative statistice.
14. În lotul de pacienți HCVC+PR nu se constată corelații între SOD-acid uric, SOD-FIB, SOD-Fe, SOD-BT, GPx-acid uric GPx-FIB, GPx-BT, GPx-Fe.
15. În lotul de pacienți PR nu se constată corelații între SOD-GPx, SOD-FIB, SOD-Fe, SOD-BT, GPx-acid uric GPx-FIB, GPx-BT, GPx-Fe.

CONCLUZII GENERALE

Luând în considerare rezultatele obținute în urma studiilor realizate în această teză și pe baza concluziilor elaborate la sfârșitul fiecărui studiu, se pot emite următoarele aprecieri, comentarii și concluzii.

1.Pacienții diagnosticați cu poliartrită reumatoidă și care asociază diferite patologii hepatice cronice prezintă unele modificări față de pacienții diagnosticați cu o monopatologie virală sau reumatismală.

2.Datele demografice. Analiza demografică pe sexe și vârstă confirmă că patologia reumatismală este specifică sexului feminin, care dominează loturile de pacienți cu poliartrită reumatoidă cu sau fără boală cronică hepatică. În lotul de pacienți cu poliartrită reumatoidă se constată un număr maxim de pacienți în decadele de vârstă cuprinse între 50-70 de ani.. Pacienții diagnosticați cu poliartrită reumatoidă asociată cu steatoză hepatică au valoarea medie cuprinsă între 61-70 de ani. Se constată că există un interval de vârstă mai extins la pacienții cu hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă, dar mai mic față de pacienții cu poliartrită reumatoidă cu menținerea unui procent destul de ridicat de pacienți pe aceste intervale, cu un maxim în decada 61-70 de ani. Aceste intervale de vârstă corespund perioadei de modificări hormonale la femei. Procentele crescute de pacienți diagnosticați cu hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă în diferite decade se poate datora prezenței infecției virale.

3.Stresul oxidativ. În lotul de pacienți diagnosticați cu poliartrită reumatoidă asociată cu steatoză hepatică, stresul oxidativ este pus în evidență prin scădere a TAS-ului. Prezența steatozei hepatice determină o creștere a sensibilității ficatului la un stres suplimentar. Pacienții diagnosticați cu hepatită cronică virală C asociată cu poliartrită reumatoidă, prezintă un stres oxidativ mult mai accentuat comparativ cu stresul oxidativ din monopatologiile poliartrită reumatoidă, hepatită cronică virală C și față de lotul martor. Scăderea activității enzimei SOD și creșterea activității enzimei GPx sugerează că atunci când mecanismele antioxidante primare (SOD) scad, apare o supraexprimare a mecanismelor antioxidante secundare, ca un mecanism compensator celular. Aceste procese sunt puse în evidență și prin prezența corelației negative dintre enzimele antioxidante SOD și GPx. În lotul de pacienți diagnosticați cu **hepatită cronică virală C** și în lotul de pacienți cu **poliartrită reumatoidă**, prin modificarea enzimelor SOD și GPx față de lotul martor și prin prezența unor corelații între aceste enzime, ceea ce confirmă implicarea stresului oxidativ în patologia reumatismală și în patologia virală. În studiul 2 (HCVC+PR; PR), în lotul de pacienți cu poliartrită reumatoidă, stresul oxidativ este pus în evidență prin scăderea activității enzimei SOD, creșterea activității GPx și prin prezența corelației pozitive între SOD și acidul uric. Prezența stresului oxidativ din poliartrită reumatoidă, HCVC și în patologiiile asociate pun în evidență o modulare a sistemelor antioxidante primare și secundare care se manifestă datorită excesului de SRO. Asocierea celor două patologii determină un stres oxidativ global crescut care reprezintă un stres suplimentar la care organismul trebuie să facă față.

4.Afectarea hepatică. În lotul cu PR+SH se constată o creștere a AST și ALT față de lotul cu PR semnificativ statistic, acest fapt demonstrând existența unui anumit grad de afectare hepatică cu creșterea permeabilității membranelor hepatocelulare față de aceste enzime. În lotul cu HCVC+PR și lotul cu HCVC se constată o tendință de creștere a enzimelor AST, ALT, GGT, ALP, raportului *de Ritis*, bilirubinelor serice, dar care este mai accentuată în lotul HCVC. Această tendință de creștere a

markerilor hepatici arată că în lotul cu HCVC+PR este prezent un grad de afectare hepatică mai mare care se datorează prezenței infecției virale. În lotul cu PR se constată o creștere a ALP și GGT, Creșterea ALP se datorează probabil mai mult afecțiunii reumatismale, iar creșterea GGT reprezintă un semnal de stres oxidativ în această patologie.

5. Concentrația fierului seric prezintă variații în funcție de patologia asociată. Se constată o tendință la hiposideremie în lotul de pacienți cu PR+SH și HCVC+PR. Hiposideremia însoțește afecțiunile reumatismale și studiile arată că steatoza hepatică poate determina o creștere a depozitelor hepatice de Fe. Sechestrarea Fe în diferite țesuturi inclusiv la nivel hepatic, are efecte citotoxice, fierul fiind implicat în mecanismele prooxidante cu creșterea stresului oxidativ. Împlicarea Fe în stresul oxidativ se poate vedea din corelația puternic negativă prezentă între activitatea enzimei antioxidante SOD și Fe în lotul de pacienți cu HCVC. Se constată o hiposideremie mai accentuată în lotul de pacienți cu HCVC+PR față de lotul cu poliartrită reumatoidă și lotul de pacienți cu hepatită cronică virală C. Aceste modificări arată că există o alterare a mecanismelor de reglare a homeostaziei Fe în care hepcidina, polipeptid sintetizat în ficat, joacă un rol important. Alterare a mecanismelor de expresie a hepcidinei poate avea ca rezultat scăderea sideremiei în loturile de pacienți cu poliartrită reumatoidă simplă și PR asociată cu boli cronice hepatice. Este important monitorizarea acestor pacienților pentru a evita apariția unor anemii feriprive grave care ar putea duce la diferite complicații hematologice și metabolice.

6. Evaluarea profilului lipidic în loturile patologice a pus în evidență unele modificări ale concentrației markerilor lipidici precum, colesterolul, trigliceridele serice, HDL, LDL. S-a constatat că poliartrita reumatoidă se asociază cu diferite dislipidemii. Studiile asupra metabolismului lipidic la pacienții cu poliartrită reumatoidă propun diferite modele dislipidemice. Prin evaluarea markerilor lipidici în lotul cu poliartrită reumatoidă asociată cu steatoză hepatică (PR+SH) nu s-au găsit diferențe semnificativ statistice, față de lotul cu poliartrită reumatoidă. Raportul de risc aterogen CT/HDL prezintă o diferență semnificativ statistică cu creșterea raportului de risc aterogen mult mai mult în lotul cu poliartrită reumatoidă față de lotul cu poliartrită reumatoidă asociată cu steatoză hepatică..

Prin evaluarea întregului lot de pacienți (PR+SH și PR) s-a constatat existența unui model dislipidemic caracterizat prin hipercolesterolemie, LDL crescut și un raport de risc aterogen CT/HDL nefavorabil la pacienții diagnosticați cu poliartrită reumatoidă cu sau fără steatoză hepatică. Acești pacienți prezintă un risc crescut de ateroscleroză și de a dezvolta boli cardiovasculare, jumătate dintre acești pacienți prezentând valori crescute pentru CT, LDL și $RA=CT/HDL$. Valorile colesterolului total la lotul de pacienți cu HCVC+PR și lotul cu PR prezintă diferențe semnificativ statistice față de lotul martor, cu creșterea CT în aceste loturi, dar fără să fie prezentă o diferență semnificativ statistică pentru CT între loturile HCVC și HCVC+PR. Putem spune că se conturează un model dislipidemic în loturile de pacienți cu HCVC+PR și cu PR, dar mai accentuat în lotul cu poliartrită reumatoidă. Creșterea nu atât de marcantă a colesterolului în lotul HCVC+PR se poate datora infecției virale, care poate afecta într-un anumit grad anabolismul ficatului.

7. Prezența procesului inflamator. Fibrinogenul și VSH-ul sunt crescute în loturile cu poliartrită reumatoidă și poliartrită reumatoidă asociată cu steatoză hepatică, dar nu sunt prezente diferențe semnificative statistice, ceea ce indică faptul că nu există un proces inflamator suplimentar indus de prezența steatozei hepatice și că valorile crescute se datorează patologiei reumatismale. Prin evaluarea întregului lot de pacienți s-a constatat că fibrinogenul crescut se asociază cu diferite dislipidemii, la jumătate din pacienți se asociază hiperfibrinogenemie. Sunt prezente corelații negative între fibrinogen și CT, LDL și $RA=CT/HDL$, ceea ce confirmă ipoteza că există o asociere inversă între markerii inflamatori și markerii lipidici. Hiperfibrinogenul este prezent în loturile de pacienți cu HCVC+PR și cu PR. Nu sunt prezente diferențe semnificativ statistice între cele două loturi, ceea ce sugerează că procesul inflamator crescut din HCVC+PR se datorează afecțiunii reumatismale și nu procesului inflamator suplimentar indus de prezența hepatitei virale C.

8. Considerăm că rezultatele acestui studiu asupra implicării prezenței afecțiunilor cronice hepatice în poliartrita reumatoidă, constituie o bază de date pentru aprofundarea și extinderea cercetărilor în acest domeniu. Astfel, se conturează necesitatea de cercetări pe loturi mult mai extinse de pacienți, pentru a identifica și a elucida modificările care au loc la nivel molecular a proceselor biochimice în poliartrita reumatoidă asociată cu steatoză hepatică și hepatită cronică virală C.

9. Considerăm necesitatea extinderii acestor studii care să conducă la asocierea terapiei antioxidante cu terapia convențională prin aplicarea unui tratament țintit cât mai adecvat și cât mai personalizat pentru creșterea calității vieții pacientului.

10. Elementele de originalitate a prezentei teze de doctorat constau în:

- Abordarea patologiei asociate bolii hepatice cronice cu poliartrita reumatoidă se încadrează în tendințele actuale de studii medicale asupra prezenței și influenței comorbidităților în poliartrita reumatoidă.
- Studiile din această teză încearcă să identifice și să explice unele mecanisme patologice din patologia asociată boli cronice hepatice în corelație cu inflamația cronică prin confirmarea sau infirmarea unor ipoteze emise care în prezent sunt de mare actualitate.
- Prin evaluarea stresului oxidativ global în patologia hepatică asociată cu poliartrită reumatoidă, această lucrare aduce noi date prioritare pentru completarea stadiului cunoașterii în acest domeniu de mare importanță biomedicală.
- În literatură accesibilă de specialitate, nu am găsit studii prin care să realizeze o evaluare a sistemului antioxidant și a stresului oxidativ în patologia asociată bolii hepatice cronice cu poliartrită reumatoidă, în special pentru patologia hepatică de etiologie virală. În acest sens, considerăm că această teză aduce o contribuție meritorie la aprofundarea și lărgirea cunoștințelor din acest domeniu biomedical de mare actualitate, constituind o sursă de informare deosebit de utilă pentru specialiștii interesați în problematica abordată.

Conceperea, diversificarea și aplicarea corelativă a unor metode și tehnici de investigații specifice au implicații majore pentru dezvoltarea biochimiei analitice în clinica medicală, contribuind evident la fundamentarea și evaluarea în scopuri medicale a cunoștințelor la nivel molecular și de sistem.

În concluzie, datele obținute în această teză, cât și prelucrarea aprofundată a unei bogate literaturi de specialitate, constituie un aport meritoriu la fundamentarea și lărgirea sferei cunoștințelor actuale privind tematica abordată scoțând în evidență importanța datelor de laborator clinic în elucidarea mecanismelor biochimice în poliartrita reumatoidă asociată cu boli cronice de ficat.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Cojocaru M., Cojocaru I. M., Silosi I., Vrabie C.D. Metabolic Syndrome in Rheumatoid Arthritis. Medica- A Journal of Clinical Medicine, vol.7, no.2, 148-152, (2012).
2. Gambino G., Musso G., Cassader M. Redox Balance in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Antioxidants & Redox Signaling. September 1, 15(5): 1325-1365, (2011).
3. Georgiadis A.N., Papavasiliou E.C., Lourida E.S., Alamanos Y., Kostara C., Tselepis A.D., Alexandros A., Drosos A.A. Atherogenic lipid profile is a feature characteristic of patients with early rheumatoid arthritis: effect of early treatment – a prospective, controlled study. Arthritis Research & Therapy, vol.8, no.3, 1-7, (2006).
4. Ghiduș D., Mihailov C., Verman I.G., Bașa M., Ion M.N., Hangan L.T., Roșoiu N. Biochemical profile in viral infection with hepatic virus C. Archives of Balkan Medical Union, no.1, vol.48, p.24-28, march, (2013).
5. Ghiduș D., Mihailov I. C., Verman I. G., Bașa M., Roșoiu N. Comparative study of the antioxidant enzymes in rheumatoid arthritis versus chronic hepatitis C associated with rheumatoid arthritis. Archives of Balkan Medical Union, no.2, vol.48, p.159-162, june, (2013).
6. Heldenberg D., Caspi., Levto O. Serum lipids and lipoprotein concentrations in women with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol, 2:387–391, (1983).
7. Hill A.G., Hill G.L. Metabolic response to severe injury. Br J Surg, 85:884–890, (1998).
8. Johnsson H., Panarelli M., Cameron A., Sattar N. Analysis and modelling of cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol changes across the range of C-reactive protein levels in clinical practice as an aid to better understanding of inflammation–lipid interactions. Ann Rheum Dis, online, May, (2013).
9. Kakafika A.I., Liberopoulos E.N., Karagiannis A., Athyros V.G., Mikhailidis D.P. Dyslipidaemia, hypercoagulability and the metabolic syndrome. Curr Vasc Pharmacol, 4:175-83, (2006).
10. Khovidhunkit W., Memon R.A., Feingold K.R., Feingold K.R., Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. J Infect Dis, 181(suppl 3):S462–S472, (2000).

11. Lee Y.H., Choi S.J., Ji J.D., Seo H.S., Song G.G. Lipoprotein(a) and lipids in relation to inflammation in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol., 19:324–325, (2000).
12. Liu H., Trinh T.L., Dong H., Keith R., Nelson D., Liu C. Iron regulator hepcidin exhibits antiviral activity against hepatitis C virus. PLoS One., 7, no. 10, e46631, (2012).
13. McInnes I.B. Rheumatoid arthritis: from bench to bedside. Rheum Dis Clin North Am., 27:373–38, (2001).
14. Minno M.N.D.R., Peluso R., Iervolino S., Lupoli R. Hepatic steatosis, carotid plaques and achieving MDA in psoriatic arthritis patients starting TNF- α blockers treatment: a prospective study. Arthritis Research & Therapy, 14:R211, (2012).
15. Nisar A., Rasheed U., Aziz W., Farooqi A.Z. Prevalence of Dyslipidemias in Autoimmune Rheumatic Diseases. Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan, vol. 22 (4): 235-239, (2012).
16. Olinescu R. Radicali liberi în fiziopatologia umană. Editura Tehnică, București, p.47-101, p.121-187. (1994).
17. Roșoiu N., Verman I.G. Biochimie clinică. Ed. Muntenia, p.162-184, Constanța, (2008)
18. Santiago G. D., Saturansky E., Poncino D., Ortiz V., Martínez A.Y., Rosenberg S., Abritta G., Palermo C., Enriquez N., Cravero A. Liver diseases in rheumatoid and psoriatic arthritis. Acta Gastroenterol Latinoam. Jun;42(2):112-9, (2012).
19. Sattar N., McCarey D. W., Capell H., McInnes I.B. „Explaining How "High-Grade" Systemic Inflammation Accelerates Vascular Risk in Rheumatoid Arthritis", Circulation. American Heart Association, 108:2957-2963, (2003).
20. Tracy R.P. „Inflammation, the metabolic syndrome and cardiovascular risk. Int J Clin Pract Suppl. 134:10-7, (2003).

A.LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE RECUNOSCUTE C.N.C.S.I.

1. Ghiduș D., Mihailov C., Ion M.N., Roșoiu N. Non-Alcoholic Fatty Liver And Rheumatic Disease. ARS Medica Tomitana, vol. XVII, no.1-January-March, (2011). **Revistă indexată COPERNICUS, www.arsmedtom.ro**
2. Ghiduș D., Mihailov C., Verman I.G., Bașa M., Ion M.N., Hangan L.T., Roșoiu N. Biochemical profile in viral infection with hepatic virus C. Archives of Balkan Medical Union, no.1, vol.48, p.24-28, March, (2013). **Revista indexată BDI (B+), in EMBASE/Excerpta Medica, Chemical Abstracts, SCOPUS, www.umbalk.org.**
3. Ghiduș D., Mihailov C.I., Verman I.G., Bașa M., Roșoiu N. Comparative study of the antioxidant enzymes in rheumatoid arthritis versus chronic hepatitis C associated with rheumatoid arthritis. Archives of Balkan Medical Union, no.2, vol.48, p.159-162, June, (2013). **Revista indexată BDI (B+), in EMBASE/Excerpta Medica, Chemical Abstracts, SCOPUS, www.umbalk.org**
4. Ghiduș D., Mihailov I.C. Verman I.G., Bașa M., Ion N.M., Roșoiu N. Correlations between oxidative stress markers in patients with multiple pathology rheumatoid arthritis and chronic viral hepatitis C. Archives of Balkan Medical Union, no.1, vol. 49, March, (2014), (in print). **Revista indexată BDI (B+), in EMBASE/Excerpta Medica, Chemical Abstracts, SCOPUS, www.umbalk.org**

B.LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE ȘI PUBLICATE SUB FORMA DE REZUMATE

1. Ghiduș D., Mihailov C., Roșoiu N., Verman I.G., Ion M.N. Biochemical Profile of Rheumatic Disease Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology & The Conference on „Cellular and Molecular Biology Biotechnologies on Medical Application”. Rom. J. Biochem, vol.48, supplementa. 28- 30 September, Craiova, Ed. Academiei Române, (2011). **Revistă indexată B+, indexată și cu abstracte în ISI Thomson Scientific Master Journal List, Biological Abstracts, Biosis Previews, CAB Abstracts Genamics Journal Seek, VetMet Resource, In-cites, www.journal.biochim.ro**
2. Ghiduș D., Mihailov C., Verman I.G., Bașa M., Roșoiu N. Biochemical profile in viral infection with hepatic virus C. „32nd Balkan Medical Week and ”80 Anniversary of Balkan Medical Union”. Archives of Balkan Medical Union, P138, 21-23

September, supplementa , University of Nis, Serbia (2012). **Revista indexată BDI (B+), in EMBASE/Excerpta Medica, Chemical Abstracts, SCOPUS, www.umbalk.org.**

3. Ghiduș D., Mihailov C. Verman I.G., Bașa M, Roșoiu N. Evaluation of the protein and mineral metabolism in chronic liver disease alcoholic and viral etology. „32nd Balkan Medical Week and 80 Anniversary of Balkan Medical Union”. Archives of Balkan Medical Union, P137, 21-23 September, supplementa, University of Nis, Serbia (2012).

Revista indexată BDI (B+), in EMBASE/Excerpta Medica, Chemical Abstracts, SCOPUS, www.umbalk.org

4. Verman I.G. Roșoiu N., Ghiduș D, Bașa M, Pleș D. Evaluation of the lipid status in patients with dyslipidemia under lipid-modifying treatment. „32nd Balkan Medical Week and 80 Anniversary of Balkan Medical Union”. Archives of Balkan Medical Union, P153, 21-23 September, supplementa, University of Nis, Serbia (2012). **Revista indexată BDI (B+), in EMBASE/Excerpta Medica, Chemical Abstracts, SCOPUS, www.umbalk.org**

5. Ghiduș D., Mihailov C.I., Verman I.G., Roșoiu N. Superoxid dismutase and glutathione peroxidase - enzymatic antioxidants in patients with chronic hepatitis with virus C and rheumatic arthritis. „2nd Congress of Romanian Association of Medical Laboratories with international participation. Under IFCC and EFLM auspices". Romanian Review of Laboratory Medicine, no.2/4, vol.21, supplementa, 5-8, June, Brașov, (2013). **Revista indexată A, indexată ISI, SCOPUS, EMCARE, COPERNICUS. www.rrml.ro**

6. Ghiduș D., Mihailov C.I., Roșoi N. Antioxidanți enzimatici și neenzimatici în poliartrita reumatoidă asociată cu hepatita cronică virală C. Sesiunea Științifică de Toamnă 2013 a Academiei Oamenilor de Știință din România. Eco – economia și Dezvoltarea Durabilă. Analele Academiei Oamenilor de Știință din România- rezumatul de lucrări, p.12, 20-21 septembrie, Brașov, (2013). **Revistă indexată B+, on-line ISSN, OPEN ACCES Journal. www.aos.ro**

C.PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE

1. Sesiunea de referate și comunicări științifice ale cadrelor didactice și studenților di facultatea de Medicină a univertității OVIDIUS Constanța (2010)-prezentare poster.

2. RSBMB Internațional Meeting (Craiova , România, 2011)- prezentare poster.

3. 32nd Balkan Medical Week and 80 Anniversary of Balkan Medical Union (Nis, Serbia, 2012)- prezentare poster.

4. 2nd Congress of Romanian Association of Medical Laboratories with international participation. Under IFCC and EFLM auspices (Brașov, România, 2013)- prezentare poster.

5. Sesiunea Științifică de Toamnă 2013 a Academiei Oamenilor de Știință din România. Eco – economia și Dezvoltarea Durabilă (Brașov, Români, 2013)- prezentare orală.