

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTUL DE CARDIOLOGIE**

**IONCU DANA SIMONA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

## **-REZUMAT-**

**FACTORII DE RISC CARDIOVASCULAR ȘI POLIMORFISMELE GENEI  
MTHFR IMPLICATE ÎN ACCIDENTUL VASCULAR CEREBRAL  
CARDIOEMBOLIC SECUNDAR FIBRILATIEI ATRIALE NON-  
VALVULARE**

Cordonator științific:  
**PROF. UNIV. DR. SIMONA DRĂGAN**

**Timișoara  
2020**

## CUPRINS

### PARTEA GENERALĂ

#### Capitolul 1. Factorii de risc implicați în fibrilația atrială non-valvulară și accidentul vascular cerebral cardioembolic..... 1

|  |    |
|--|----|
| 1.1. Fibrilația atrială non-valvulară.....   | 1  |
| 1.1.1. Definiția, prevalența și clasificarea FANV.....   | 1  |
| 1.1.2. Fiziopatologia fibrilației atriale.....   | 2  |
| 1.1.3. Trombogeneza legată de FA.....  | 4  |
| 1.1.4. Evaluarea clinică a FA nevalvulare. Parametrii ecocardiografici.....  | 5  |
| 1.1.5. Factori de risc și scoruri de risc în FA.....   | 7  |
| 1.2. Contextul științific actual privind accidentul vascular cerebral cardioembolic.....                             | 11 |
| 1.2.1. Definiția și epidemiologia accidentului vascular cerebral cardioembolic.....                                  | 11 |
| 1.2.2. Clasificarea subtipurilor de accident vascular cerebral ischemic.....   | 12 |
| 1.2.3. Evaluarea caracteristicilor clinice în AVC cardioembolic.....   | 15 |
| 1.2.3.1. Tabloul clinic al unui AVC cardioembolic acut.....  | 15 |
| 1.2.3.2. Neuroimagingistica în accidentul vascular cerebral cardioembolic.....                                       | 16 |
| 1.2.4. Evaluarea severității AVC prin scoruri clinice.....   | 19 |
| 1.2.4.1. Scala NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale) .....   | 19 |
| 1.2.4.2. Scala Rankin modificată (mRS).....  | 20 |
| 1.2.5. Aspecte privind mortalitatea, riscul de recurență embolică timpurie și prognosticul în AVC cardioembolic..... | 20 |
| 1.3. Polimorfismele MTHFR ca factori de risc genetic cardiovascular.....   | 21 |
| 1.3.1. Gena MTHFR și metabolismul folatului.....   | 21 |
| 1.3.2. Polimorfismele genei MTHFR și implicarea lor clinică în diferite boli cardiovasculare..                       | 23 |
| 1.3.2.1. Hipertensiune arterială.....  | 23 |
| 1.3.2.2. Boala coronariană.....  | 24 |
| 1.3.2.3. Diabetul zaharat de tip II.....   | 24 |
| 1.3.2.4. Ateromatoza carotidiană.....  | 24 |
| 1.3.2.5. Dislipidemie.....   | 25 |
| 1.3.3. Polimorfismele MTHFR și fibrilație atrială.....   | 25 |
| 1.3.4. Polimorfismele MTHFR și accidentul vascular cerebral.....   | 26 |

### PARTEA SPECIALĂ

#### Capitolul 2 MOTIVELE CERCETĂRII.....28

|   |    |
|---|----|
| 2.1. Proiect de cercetare pentru relația dintre factorii de risc cardiovascular-polimorfisme MTHFR-fibrilație atrială non-valvulară-accident vascular cerebral cardioembolic..... | 29 |
| 2.2. Materiale și metode.....   | 33 |
| 2.2.1. Selecția pacienților.....  | 33 |
| 2.2.2. Colectarea datelor.....  | 35 |
| 2.2.3. Analiza statistică.....  | 36 |

#### Capitolul 3

#### REZULTATE.....37

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Contribuția personală: Studiul relației dintre parametrii ecocardiografici și factorii de risc cardiovascular privind incidența accidentului vascular cerebral în FA non-valvulară..... | 37 |
| 3.1.1. Contextul științific actual.....  | 37 |
| 3.1.2. Obiectivele cercetării.....   | 38 |
| 3.1.3. Materiale și metode.....  | 39 |
| 3.1.3.1. Protocol de studiu.....   | 40 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.3.1.1. Evaluarea clinică.....  | 41 |
| 3.1.3.1.2. Evaluarea biochimică.....   | 43 |
| 3.1.3.1.3. Evaluarea ecocardiografică.....   | 44 |
| 3.1.3.1.4. Ecografie Doppler a arterelor carotide.....   | 45 |
| 3.1.3.1.5. Evaluarea riscului de AVC.....  | 45 |
| 3.1.4. ....  |    |
| Rezultate.....   | 47 |
| 3.1.5. Discuții.....   | 56 |
| 3.1.6. Concluzii.....  | 58 |
| 3.2. Contribuție personală: Studiul prevalenței polimorfismelor genei MTHFR și a factorilor de risc cardiovascular implicați în tipul și severitatea accidentului vascular cerebral cardioembolic..... | 59 |
| 3.2.1. Contextul științific actual.....  | 59 |
| 3.2.2. Obiectivele studiului.....  | 61 |
| 3.2.3. Materiale și metode.....  | 62 |
| 3.2.3.1. Populația de pacienți.....  | 62 |
| 3.2.3.2. Evaluarea clinică și biochimică.....  | 63 |
| 3.2.3.2.1. Evaluarea clinică.....  | 63 |
| 3.2.3.2.2. Electrocardiogramă.....   | 63 |
| 3.2.3.2.3. Evaluarea biochimică.....   | 63 |
| 3.2.3.2.4. Evaluarea comorbidităților cardiovasculare.....   | 64 |
| 3.2.3.2.5. Evaluarea stării inflamatorii.....  | 64 |
| 3.2.3.2.6. Scorurile riscului tromboembolic și de sângerare.....   | 65 |
| 3.2.3.2.7. Determinarea INR.....   | 65 |
| 3.2.3.3. Evaluarea severității accidentului vascular cerebral.....   | 65 |
| 3.2.3.4. Evaluarea imagistică.....   | 66 |
| 3.2.3.5. Testarea genetică a polimorfismelor MTHFR (C677T și A1298C).....  | 66 |
| 3.2.3.6. Evaluarea cu ultrasunete a inimii și a arterelor carotide.....  | 68 |
| 3.2.4. Rezultate.....  | 70 |
| 3.2.5. Discuții.....   | 82 |
| 3.2.6. Concluzii.....  | 88 |
| 3.3. Contribuție personală: Trombofilie și accident vascular cerebral cardioembolic la un pacient tânăr. Prezentare de caz.....  | 89 |
| 3.3.1. Contextul științific actual.....  | 89 |
| 3.3.2. Prezentarea cazului.....  | 89 |
| 3.3.3. Discuții.....   | 94 |
| 3.3.4. Concluzii.....  | 95 |
| <b>Capitolul 4 CONCLUZII GENERALE</b> .....  | 96 |
| <b>BIBLIOGRAFIE</b> .....  | 98 |
| <b>ANEXE</b> .....   | I  |

**Cuvinte cheie:** fibrilația atrială non-valvulară, accidentul vascular cerebral cardioembolic, factori de risc cardiovascular, polimorfismele genei MTHFR A1298C și C677T, trombofilia

## Partea generala

Fibrilația atrială (FA) este cunoscută ca cea mai frecventă aritmie cardiacă asociată cu o rată ridicată de morbiditate și mortalitate (1). Pe măsură ce incidența FA crește în țările civilizate asociate cu stilul actual de viață al populației, consecințele FA devin o povară socială și economică pentru majoritatea statelor. România este încă o țară asociată cu o rată a mortalității cardiovasculare foarte ridicată, în principal datorită predominanței zonelor rurale cu populație care are dificultăți în accesarea îngrijirilor medicale.

Modificările structurale și funcționale ale substratului atrial împreună cu staza și starea protrombotică sunt principalele mecanisme patogene care duc la trombogeneză în FA. În timp ce dimensiunea atriului stâng (AS) este considerată un factor de risc independent de accident vascular cerebral (2), disfuncția ventriculului stâng (VS) este, de asemenea, considerată un factor de risc trombogen în FA prin remodelarea VS și presiunile crescute de umplere diastolică ale VS. O creștere a D-dimerilor favorizează evenimentele tromboembolice prin generarea formării de trombi în VS (3). Rolul inflamației în trombogeneză este încă în dezbatere, cu toate acestea, anumiți biomarkeri inflamatori au fost legați atât de inițierea cât și de perpetuarea FA, cum ar fi hs-CRP (proteină C reactivă înalt sensibilă) și IL-6 (interleukina 6). Valorile crescute ale hs-CRP ar putea fi legate de riscul apariției accidentului vascular cerebral precum și de prognosticul acestuia (4).

Mai mulți factori de risc cardiovascular au fost studiați în raport cu FA non-valvulară (FANV), iar unii dintre aceștia sunt considerați factori de risc specifici pentru AVC. Cu toate acestea, profilul general al pacienților cu FANV este încă incomplet, deoarece unele cazuri pot avea cauze multiple de accident vascular cerebral asociate cu stări protrombotice care pot rămâne nedetectate de scorurile de risc utilizate în practica curentă. Numeroase comorbidități, cum ar fi insuficiența cardiacă, hipertensiunea arterială, obezitatea, boala coronariană, diabetul zaharat și valvulopatiile, care apar odată cu îmbătrânirea populației și sunt corelate cu stilul de viață actual, cresc prevalența FA. Naser și colab. au studiat impactul factorilor de risc și comorbiditățile implicate în incidența FA și au observat că obiceiurile precum fumatul sau consumul de alcool pot declanșa fibrilația atrială (5). Insuficiența cardiacă urmată de accident vascular cerebral sunt principalele consecințe ale FA (6), în timp ce moartea subită cardiacă

este principala cauză de deces cardiovascular pentru această boală, care poate fi prezisă prin detectarea prezenței infarctului miocardic anterior, a hipertrofiei VS, a tratamentului cu digitală și lipsa utilizării beta-blocantelor, insuficiență cardiacă, fracția de ejeecție (FE) scăzută, frecvență cardiacă crescută și sexul masculin (7).

Accidentul vascular cerebral cardioembolic (AVC CE), de asemenea cunoscut ca fiind cel mai sever subtip de AVC ischemic, este asociat cu o rată crescută de invaliditate și mortalitate (8). De asemenea, deoarece AVC cardioembolic este asociat cu o rată mai mare a recidivelor AVC, iar durata spitalizării și costurile de îngrijire sunt semnificativ mai mari decât în alte subtipuri de accident vascular cerebral (9). Prevalența AVC cardioembolic este de 14-30% din toate subtipurile de accidente vasculare cerebrale (10,11). Arboix și colab. au studiat, de asemenea, incidența AVC CE și au constatat o incidență mai mare la populația începând cu vârsta de 85 de ani, respectiv de 36%, în principal datorită prevalenței mai mari a FA la această grupă de vârstă. O complicație frecventă a AVC cardioembolic și, de asemenea, o caracteristică clinică sugestivă este transformarea hemoragică unui infarct inițial ischemic (12).

Evaluarea clinică a unui pacient cu AVC ischemic necesită o asociere complexă de date clinice privind starea neurologică, rezultatele de neuroimagnostică și răspunsul la tratament. Scala cea mai complexă și utilizată în practica neurologică este scala NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale). Complexitatea elementelor neurologice analizate face ca această scală să fie instrumentul principal în evaluarea evoluției clinice pentru tehnici de recanalizare, cum ar fi tromboliza și trombectomia mecanică, dar și în studiile de cercetare clinică. Scala Rankin modificată (Mrs) este un bun predictor al rezultatului clinic global și al dizabilității și, prin urmare, este frecvent utilizat în monitorizarea clinica de lungă durată. Totuși, această scală este utilă în evaluarea primară a răspunsului la tratament la pacienții cu AVC (13,14).

Factorii de risc genetici, ca predictor ai AVC cardioembolic în FANV, ar putea determina un pas înainte în noua generație de tratamente, incluzând probabil terapii genetice viitoare. Gena metilentetrahidrofolat reductazei (MTHFR), care are un rol important în metabolismul folatului, ar putea juca, de asemenea, un rol esențial în fenotipul diferitelor boli cardiovasculare. Metabolismul folatului joacă un rol important în sinteza aminoacizilor, respectiv în procesul de metabolizare al atomilor de carbon și în căile de metilare ale ADN-ului. (15) Principala formă circulantă de folat, 5-metiltetrahidrofolat, este, de asemenea, implicată în procesul de transformare al homocisteinei (Hcy) în metionină. Mai mult, metionina este principalul precursor al S-adenosilmetioninei, principalul donator de metil care se găsește în diferite reacții ale metabolismului celular. Aportul alimentar sau din suplimente de acid folic este foarte important, deoarece corpul uman nu este capabil să sintetizeze acidul folic și astfel pot fi prevenite unele

dintre condițiile clinice asociate cu deficitul de folați (16). 5-metilentetrahidrofolat reductaza (MTHFR) este enzima principală care catalizează reducerea 5,10-metilentetrahidrofolatului în 5-metil-tetrahidrofolat. Această enzimă specială este un element esențial implicat în metabolismul Hcy, prin urmare, deficiențele MTHFR conduc la numeroase boli asociate cu acumularea unor nivelele crescute de homocisteină plasmatică (tHcy).

Genei MTHFR este localizată pe poziția 1p36.3 a cromozomului 1. Principalele variante genetice ale MTHFR sunt C677T și A1298C și au o prevalență globală de 10% atât pentru forma homozigotă cât și pentru cea heterozigotă, în timp ce restul populației (60- 70%) moștenește cel puțin o variantă genetică (17). Polimorfismele uninucleotidice (SNP) ale genei MTHFR (A1298C și C677T) s-au dovedit a fi indicatori importanți ai riscului cardiovascular în diferite boli (18). Implicațiile clinice ale acestor SNP rezultă într-o afectare discretă a activității enzimatice a MTHFR care duce la creșterea moderată a homocisteinei.

Studiile realizate până în prezent au indicat faptul că în FA ar putea fi implicați mulți potențiali factori de risc genetici(19). Cu toate acestea sunt puține date în literatură despre implicarea polimorfismelor genei MTHFR în determinismul FA. Doar câteva studii au cercetat această conexiune, iar unele rezultate ale acestora au arătat o asociere importantă între FA și valorile tHcy crescute ca factor de risc genetic în FA (20). Deși s-au efectuat numeroase studii asupra diferitelor polimorfisme și implicarea lor în AVC ischemic ca factori de risc genetic, nu există datele clinice în literatură legate de rolul polimorfismelor genei MTHFR în AVC cardioembolic. Deoarece informațiile despre rolul acestor SNP în gena MTHFR sunt insuficiente, sunt necesare mai multe studii clinice pe cohorte mai mari pentru a stabili rolul acestor polimorfisme moștenite în FANV și AVC cardioembolic.

Studiul actual își propune să găsească un profil general al pacienților cu FANV, care include parametri ecocardiografici ca predictor pentru AVC cardioembolic. Un alt scop al studiului este de a găsi dacă alte comorbidități cardiovasculare, cum ar fi boala coronariană, hipertensiunea arterială, insuficiența cardiacă, diabetul zaharat de tip II și dislipidemia sunt asociate cu apariția accidentelor vasculare cerebrale în FANV. În ceea ce privește riscul genetic, această cercetare investighează dacă polimorfismele A1298C și C677T ale genei MTHFR sunt corelate cu apariția de AVC cardioembolic în FANV. Premisa de la care pleacă acest studiu este că dacă se dovedesc a fi implicate, aceste gene ar putea fi utilizate în viitor ca predictorii genetici pentru prevenția apariției de accidente vasculare cerebrale la pacienții cu FA non-valvulară. Am cercetat de asemenea conexiunile suplimentare ale acestor SNP din gena MTHFR cu AVC cardioembolic și am analizat rolul lor în determinarea tipului de accident vascular cerebral, precum și severitatea și localizarea acestuia.

## Partea speciala

În timp ce sunt disponibile în prezent în literatura de specialitate noi abordări clinice privind opțiunile de diagnostic și tratament în FA non-valvulară și AVC cardioembolic, iar rolul polimorfismelor MTHFR a fost studiat în numeroase boli cardiovasculare, datele cu privire la implicarea polimorfismelor genei MTHFR în AVC cardioembolic ca urmare a FA non-valvulare sunt insuficiente.

Acest studiu își propune să găsească răspunsuri la următoarele aspecte din practica clinică:

- Există anumiți parametri ecocardiografici precum VAS, VTDVS și FEVS legați de apariția accidentului vascular cerebral în FANV?
- Există alte comorbidități cardiovasculare, cum ar fi boala coronariană, hipertensiunea arterială, insuficiența cardiacă, diabetul zaharat de tip II și dislipidemia asociate cu apariția accidentului vascular cerebral în FANV?
- Pot fi asociate polimorfismele genei MTHFR A1298C și C677T cu apariția accidentului vascular cerebral cardioembolic la pacienții cu FANV? Ar putea aceste variante genetice să fie utilizate în practica clinică din viitor ca predictorii genetici pentru apariția accidentelor vasculare cerebrale la pacienții cu FANV?
- Sunt polimorfismele genei MTHFR asociate cu severitatea clinică în accidentele vasculare cerebrale cardioembolice și cu o anumită localizare a leziunii? Există, de asemenea, o legătură între prezența acestor mutații și transformarea hemoragică a AVC-urilor cardioembolice la pacienții cu FANV?

**Contextul studiului:** Cercetarea actuală s-a efectuat pornind de la următoarele premise:

- În timp ce FANV este cea mai frecventă cauză a accidentului vascular cerebral cardioembolic, iar incidența FANV este în continuă creștere în fiecare an, provocând o creștere a mortalității globale a bolilor cardiovasculare, prezentul studiu încearcă să găsească o asocieră între anumiți parametri clinici și ecocardiografici care ar putea fi predictorii ai accidentului vascular cerebral la pacienții cu FANV.

- Au fost efectuate mai multe studii cu privire la factorii de risc genetici implicați în accidentul vascular cerebral ischemic, dar nu există suficiente date în literatură cu privire la implicarea polimorfismelor genei MTHFR în AVC cardioembolic datorat FANV. Polimorfismele genei MTHFR au fost studiate în numeroase patologii (18), iar studiile efectuate au dovedit o legătură importantă cu bolile cardiovasculare, dar nu există studii cu privire la rolul acestor variante genetice în AVC cardioembolic și FANV.

**Tipul de studiu:** retrospectiv (pentru pacienții din ambulator) și prospectiv (pentru pacienții din spital), transversal, analitic și interdisciplinar

**Populații studiate:**

- Pacienți cu FANV cu sau fără AVC în ambulator, selectați conform Ghidurilor ESC pentru diagnosticul și tratamentul fibrilației atriale (21).
- Pacienții cu FANV și AVC cardioembolic în spital, selectați conform criteriilor TOAST pentru accident vascular cerebral ischemic (22) și criteriilor ECASS pentru transformarea hemoragică a AVC cardioembolic (23).
- Din grupul de pacienți care au avut spitalizare pentru AVC, un pacient cu trombofilie, FA paroxistică și accident vascular cerebral cardioembolic a fost selectat pentru prezentare de caz clinic.

**Obiective generale:** Scopul studiului actual a fost de a identifica o legătură între:

- Parametrii ecocardiografici, factorii de risc cardiovascular și apariția accidentului vascular cerebral în FANV
- Prevalența polimorfismelor genei MTHFR și accidentul vascular cerebral cardioembolic, ca o consecință a FANV

**Obiective specifice:**

- Corelații între parametrii ecocardiografici și factorii de risc cardiovascular, tipurile de FANV și prezența leziunilor cerebrale ischemice cronice
- Asocieri între polimorfisme genei MTHFR A1298C și C677T și AVC cardioembolic la pacienții cu FANV, prevalența acestor variante ale genei MTHFR și tipul de leziuni cerebrale ischemice în AVC cardioembolic și localizarea acestora



- Prevalența polimorfismelor genei MTHFR A1298C și C677T și a factorilor de risc cardiovascular în AVC cardioembolic datorat NVA

#### **Parametrii studiați:**

- 1. Evaluare clinică:** vârstă, sex, indicele de masă corporală (IMC), antecedente personale de hipertensiune (HTA), boală coronariană (BC), boală arterială periferică (BAP), diabet zaharat tip II (DZtipII), insuficiență cardiacă (IC)
- 2. Parametrii de risc hemodinamic:** tensiunea arterială sistolică (TAS), tensiunea arterială diastolică (TAD)
- 3. Parametri ecocardiografici:** volumul atriului stâng (VAS), volumul telediastolic al ventriculului stâng (VTDVS) și fracția de ejeție a ventriculului stâng (FEVS)
- 4. Indicatori de ateromatoză carotidiană:** grosimea intimă medie (IMT) și prezența plăcilor carotidiene la explorarea ecografică Doppler a arterelor carotide
- 5. Factori de risc de AVC:** scoruri CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC, HASBLED
- 6. Indicatori de severitate a AVC:** National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) și scala Rankin modificată (mRS)
- 7. Biomarkeri serici ai riscului cardiovascular:** valori ale profilului lipidic (colesterol total - CT, trigliceride-TGL, lipoproteina cu densitate scăzută- LDLc, lipoproteina cu densitate crescută- HDLc) și hemoglobina glicozilată (HbA1c)
- 8. Biomarker inflamator:** proteină C reactivă înalt sensibilă (hsCRP)
- 9. Indicatori ai riscului genetic:** polimorfismele genei MTHFR A1298C și C677T

**Prima parte a cercetării: „Contribuția personală: Studiul relației dintre parametrii ecocardiografici și factorii de risc cardiovascular privind incidența accidentului vascular cerebral în FA non-valvulară”** a vizat determinarea unui profil general al pacienților din ambulator cu FANV în ceea ce privește incidența accidentului vascular cerebral prin analiza anumitor parametri ecocardiografici și aplicarea scorurilor CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC și HASBLED, evaluarea profilului lipidic și a HbA1c și prezența bolii coronariene și / sau ateromatozei carotidiene. Au fost analizate asocierile dintre tipurile de FANV (FA paroxistică, intermitentă și permanentă) și prezența leziunilor cerebrale ischemice cronice (istoricul personal de accident vascular cerebral) cu prezența factorilor de risc cardioembolic și parametri ecocardiografici. Rezultatele noastre indică faptul că parametrii precum VAS, VTDVS și FEVS% sunt asociați

riscului de cardioembolism cerebral în FANV (în special VTDVS), dar sunt, de asemenea, utili și în detectarea pacienților cu risc crescut de a dezvolta insuficiență cardiacă ischemică (VAS în special). De asemenea, valorile profilului lipidic modificate și prezența comorbidităților, precum boala coronariană și DZ tip II, sunt indicatori importanți pentru probabilitatea apariției accidentului vascular cerebral în FANV.

**A doua parte a cercetării: „Contribuția personală: Studiul prevalenței polimorfismelor genei MTHFR și al factorilor de risc cardiovascular implicați în tipul și severitatea accidentului vascular cerebral cardioembolic”** este un studiu original cu scopul de a determina prevalența ambelor polimorfisme uninucleotidice (SNP) ale genei MTHFR, C677T și A1298C, în AVC cardioembolic secundar fibrilației atriale non-valvulare și a corelațiilor acestora cu factorii de risc cardiovascular, precum și cu localizarea și severitatea accidentului vascular cerebral. Rezultatele acestui studiu indică prevalența polimorfismelor genei MTHFR la o populație cu AVC cardioembolic și FANV. Mutația C677T a fost asociată în mod semnificativ cu tipul și localizarea AVC, dar și cu severitatea și recidivele accidentelor vasculare cerebrale. De asemenea, această mutație din gena MTHFR este asociată cu o incidență mai mare a comorbidităților cardiovasculare (HTA, IC, dislipidemie, DZ tip II cu HbA1c crescută și status proinflamator), risc tromboembolic și de sângerare crescut comparativ cu pacienții fără această mutație. Mutația A1298C a fost asociată cu o incidență mai mare a leziunilor vasculare cerebrale ischemice de tip lacunar preexistente și de recidivă a accidentelor vasculare cerebrale, iar dislipidemia a fost principala comorbiditate cardiovasculară. Deși sunt necesare studii de cohortă pe loturi mai mari de pacienți pentru a confirma aceste constatări, aceste rezultate evidențiază importanța acestui studiu în scopul evaluării riscului genetic la pacienții cu AVC cardioembolic și FANV ca punct de plecare pentru posibile terapii genice viitoare.

**Prezentarea cazului: „Contribuția personală: Prezentarea unui de caz de trombofilie și accident vascular cerebral cardioembolic la un pacient tânăr”** este o prezentare de caz a unui pacient relativ tânăr cu multiple comorbidități, cum ar fi FA paroxistică, accident vascular cerebral ischemic repetitiv cu hemipareză dreaptă ataxică și dizartrie, trombofilie cu mutația PAI-1 4G / 4G homozigotă, mutația genei MTHFR A1298C heterozigotă și mutația de Factor II G20210A heterozigotă și hipertensiune arterială cronică. Particularitatea cazului pentru acest pacient este coexistența multiplelor cauze de accident vascular cerebral la o vârstă relativ tânără. Decizia de a prezenta acest caz a fost motivată de lipsa datelor clinice

privind interferența acestor comorbidități care determină apariția statusului protrombotic la această categorie de pacienți.

### **Selecția pacienților**

Studiul de față a împărțit pacienții selectați în două categorii distincte: pacienți cu FA non-valvulară din ambulator, selectați din baza de date a Ambulatorului de Cardiologie al Centrului Medical Rubio din Arad și pacienți cu FANV din spital, selectați din baza de date a Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad. Aceste două studii au fost realizate în perioada octombrie 2018 - martie 2020.

Prima parte a acestei cercetări este un studiu retrospectiv, transversal, iar pacienții au fost selectați în conformitate cu criteriile de includere / excludere predefinite pentru a îndeplini obiectivele studiului. A doua parte a cercetării este un studiu prospectiv, transversal, iar pacienții eligibili au fost selectați consecutiv pe baza criteriilor predefinite de includere / excludere. Selecția pacienților pentru acest studiu este ilustrată în Fig.1.

Acest studiu a fost aprobat de către Comisia de Etică a Cercetării Științifice a Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara și de Comisia de Etică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad și a fost efectuat în conformitate cu Declarația de la Helsinki. Toți pacienții care au fost incluși în și-au dat consimțământul în scris.

### **Definițiile studiului:**

- FANV cu sau fără AVC în ambulator, conform ghidurilor ESC pentru diagnosticul și tratamentul fibrilației atriale (21)
- FANV cu AVC CE în spital, conform criteriilor TOAST pentru accident vascular cerebral ischemic (22) și criteriilor ECASS pentru transformare hemoragică a AVC CE (23)
- Prezentare de caz al unui pacient cu trombofilie, FANV paroxistică și AVC CE

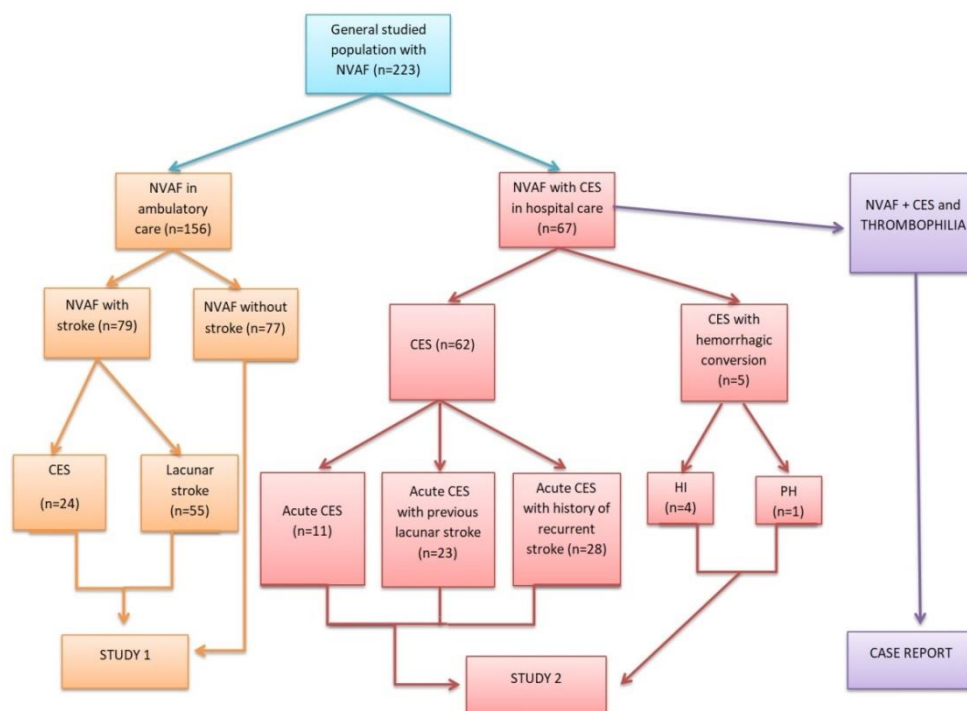


Fig.1 Selectia pacientilor din studiu

## Studiul 1

Valorile VAS și scorurile  $CHA_2DS_2\_VASC$  au fost semnificativ crescute la pacienții cu FANV permanentă vs. paroxistică ( $p = 0,016$  în cazul VAS,  $p = 0,017$  pentru  $CHA_2DS_2\_VASC$ , testul non-parametric Mann-Whitney U). Grupul de pacienți cu AVC cardioembolic vs. non-AVC au avut valori semnificativ crescute pentru HDLc ( $p=0.011$ ) și valori crescute ale VAS ( $p=0.043$ ). Au fost găsite valori semnificativ crescute ale LDLc la pacienții cu AVC lacunar față de cei non-AVC ( $p = 0,039$ , test non-parametric Mann-Whitney).

Regresia multivariată s-a efectuat folosind accidentul vascular cerebral ca variabilă independentă legată de VAS, VDTV, FEVS%, IMT și HbA1c și s-a demonstrat o corelație directă semnificativă statistic cu VAS ( $\rho = 0,274$ ,  $p = 0,015$ ). HbA1c și IMT au fost corelate semnificativ și direct cu scorurile  $CHA_2DS_2\_VASC$  ( $\rho = 0,246$ ,  $p = 0,001$  pentru HbA1c și  $\rho = 0,196$ ,  $p = 0,007$  pentru IMT). În ambele cazuri, corelațiile dintre scorurile  $CHA_2DS_2\_VASC$  și

VTDVS, respectiv FEVS%, au fost negative ( $\rho = -0.134$  cu  $p = 0,038$  în cazul VTDVS și  $p < 0,001$ ,  $\rho = -0,266$  în cazul FEVS%).

Pentru comparația pacienților cu AVC și non-AVC s-au folosit teste Chi2. Valorile crescute ale CT ( $p = 0,014$ ; OR = 2,51 cu interval de încredere de 95% 1,19; 5,27), LDLc ( $p = 0,026$ , OR = 4,22 cu încredere interval de 95% 1,13; 15,78), TGL ( $p = 0,020$ ; SAU = 3,45 cu 95% interval de încredere 1,28; 9,29) și valori scăzute ale HDLc ( $p = 0,022$ ; SAU = 2,18 cu 95% interval de încredere 1,12; 4,28) s-au dovedit a fi factori de risc importanți pentru incidența accidentului vascular cerebral în FANV.

În ceea ce privește parametrii ecocardiografici, pacienții cu valori ale VTDVS crescute au avut o incidență mai mare a accidentului vascular cerebral (test Chi2,  $p = 0,031$ ; OR = 2,05 cu un interval de încredere de 95% 1,06; 3,94). Un alt factor important de risc pentru apariția AVC la pacienții cu FANV a fost HbA1c cu valori de peste 6,5% (testul Chi2,  $p = 0,019$ ; OR = 2,2 cu un interval de încredere de 95% 1,13; 4,27). Incidența AVC a fost semnificativ mai mare la pacienții cu boală coronariană (testul Chi2,  $p = 0,004$ ).

## Studiul 2

Valori semnificativ crescute pentru TAD ( $p = 0,007$ ), CT ( $p = 0,003$ ), LDLc ( $p = 0,003$ ), HbA1c ( $p = 0,004$ ), TGL ( $p < 0,001$ ), FEVS ( $p = 0,047$ ) și hsCRP ( $p = 0,015$ ) au fost găsite în grupul de pacienți cu mutația C677T față de grupul fără mutații. În plus, valorile pentru scorurile NIHSS ( $p = 0,001$ ), mRS ( $p = 0,003$ ), CHA2DS2VASC ( $p = 0,029$ ) și scorurile HASBLED ( $p = 0,025$ ) au fost semnificativ crescute la acest grup de pacienți.

Testele Chi2 au arătat că proporția pacienților cu AVC CE ischemic în teritoriul arterei sylvienne a fost semnificativ crescută în grupul fără mutații ( $p = 0,002$ ), în timp ce proporția AVC CE în teritoriul vertebrobazilar ( $p = 0,002$ ), transformarea hemoragică a AVC CE, respectiv subtipul infarctului hemoragic ( $p = 0,020$ ) și AVC lacunar preexistent ( $p = 0,003$ ) au fost semnificativ mai mare la pacienții cu mutația C677T. De asemenea, frecvența accidentelor vasculare cerebrale repetitive a fost crescută semnificativ la pacienții cu mutația C677T ( $p < 0,001$ ).

La pacienții cu mutația MTHFR A1298C, severitatea accidentului vascular cerebral a fost semnificativ crescută cu scoruri mai mari pe scalele NIHSS ( $p = 0,006$ ) și mRS ( $p = 0,020$ ). De asemenea, s-au găsit diferențe semnificative la pacienții cu mutație A1298C în ceea ce privește proporția leziunilor vasculare cerebrale de tip lacunar preexistente ( $p = 0,019$ ) și prezența accidentului vascular cerebral repetitiv ( $p = 0,024$ ). Valorile profilului lipidic la pacienții cu

mutația A1298C au fost semnificativ crescute comparativ cu cei fără această mutație: CT ( $p = 0,001$ ), LDLc ( $p < 0,001$ ) și TGL ( $p < 0,001$ ) și HDLc semnificativ mai scăzut ( $p = 0,001$ ).

Regresia logistică (metoda Forward Stepwise (Wald)) a fost realizată luând în considerare mutația C677T ca o variabilă dependentă și variabile precum TAD, HbA1c și TGL au fost asociate semnificativ cu mutația MTHFR C677T atât la cei homozigoti, cât și la cei heterozigoti. Pacienții cu mutație C677T au prezentat risc mai mare pentru valori ale HbA1c crescute (OR = 1,982, 95% CI = (1,171, 7,799)) și hipertrigliceridemie (OR = 1,392, 95% CI = (1,192, 3,994)). Testul Mann-Whitney U a relevat, de asemenea, că pacienții cu mutație C677T au fost asociați cu valori semnificativ crescute ale HbA1c ( $p = 0,004$ ) și TGL ( $p < 0,001$ ) comparativ cu cei fără această mutație.

Regresia logistică efectuată utilizând mutația MTHFR A1298C ca variabilă dependentă (metoda Forward Stepwise (Wald)) a arătat că pacienții cu mutația A1298C prezintă risc de a dezvolta valori crescute ale TGL (OR = 2.983, 95% CI = (1.972, 7.994)). De asemenea, s-au găsit valori semnificativ crescute ale TGL la pacienții cu mutația A1298C comparativ cu cei fără această mutație (Mann-Whitney U Test,  $p < 0,001$ ).

Metoda comparațiilor multiple a arătat o asociere semnificativă între AVC lacunar preexistent ( $p = 0,001$ , test Chi2), respectiv AVC repetitiv și prezența polimorfismelor genei MTHFR (test Chi2,  $p < 0,001$ ). Scorurile NIHSS și mRS au fost semnificativ mai mici la pacienții fără polimorfismele genei MTHFR în comparație cu pacienții cu una sau ambele variante genetice (testul Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ).

## **Prezentarea de caz**

Particularitatea cazului constă în faptul că are multiple cauze ale accidentului vascular cerebral la o vârstă relativ tânără, cu un scor CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC relativ scăzut la internare, în ciuda faptului că are status protrombotic datorită trombofiliei (cu PAI-1 4G / 4G homozigot, MTHFR A1298C heterozigot și mutație heterozigotă Factor II G20210A). De asemenea, o severitate clinică moderată a accidentului vascular cerebral la internare cu o recuperare foarte bună în spital și la domiciliu reprezintă o altă particularitate a acestui caz clinic.

## **Discuții**

Volumul atriului stâng are o valoare superioară ca predictor în evoluția FA, iar parametrii ecocardiografici legați de riscul de AVC sunt diametrele diastolice și sistolice crescute ale VS, dimensiunea AS crescută, raport E / A crescut și FEVS% redusă (24). Studiul ENGAGE AF-TIMI 48 a evidențiat că FA paroxistică a fost asociată cu mai puține evenimente tromboembolice decât FA permanentă și că scorurile CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC crescute s-au găsit la pacienții cu FANV

care au o afectare importantă a funcțiilor diastolice ale inimii stângi (25). În studiul nostru, pacienții cu FA permanentă au avut șanse mai mari să dezvolte volume crescute ale AS și scoruri CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>\_VASC mai mari. De asemenea, volumele AS crescute au fost corelate cu valori ale VTDVS crescute și cu valori ale FEVS% mai scăzute, dar și cu scoruri CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>\_VASC semnificativ mai mari. Acest studiu confirma ca parametrii ecocardiografici precum VAS, VTDVS și FEVS% sunt asociați riscului de cardioembolism în FANV (în special VTDVS), dar sunt utili și în detectarea pacienților mai predispuși la apariția insuficienței cardiace ischemice (VAS în special).

Studiile au arătat asocieri între un profil lipidic modificat și diferite tipuri de AVC, de exemplu accidentele vasculare cerebrale la nivelul vaselor mari sunt asociate cu dislipidemie, în timp ce AVC lacunar și embolic par să fie foarte puțin sau aproape deloc asociate (26). Ambele grupuri de pacienți cu AVC au prezentat un profil lipidic modificat, care poate fi explicat printr-o complianță scăzută a lotului de studiu la tratamentul hipolipemiant. Boala coronariană poate fi întâlnită cu o frecvență foarte ridicată la pacienții cu FA (17% până la 46,5%), iar studiile efectuate indică faptul că o stentare viitoare ar putea fi necesară pentru 5% -15% dintre pacienții cu FA (27). Rezultatele studiului 1 au arătat că un profil lipidic modificat, prezența bolii coronariene și diabetul zaharat tip II sunt indicatori importanți pentru probabilitatea apariției accidentului vascular cerebral în FANV.

Studiul 2 a demonstrat prevalența polimorfismelor genei MTHFR într-o populație de pacienți cu AVC cardioembolic și FANV. Acest studiu a evidențiat relația dintre mutația C677T și tipul de leziune vasculara cerebrala și localizarea acesteia (în special AVC vertebrobazilar, transformarea hemoragică a AVC și AVC lacunar preexistent), dar și cu recidivele accidentelor vasculare cerebrale (AVC repetitive) și severitatea AVC (scoruri NIHSS și mRS crescute). Un studiu a demonstrat că mutația C677T a fost asociată cu un risc crescut de AVC hemoragic, în special purtătorii alelei T (28), dar alți autori au demonstrat că ambele variante genetice ale MTHFR sunt factori de risc genetici independenți pentru accident vascular cerebral, atât ischemic, cât și hemoragic (29).

Mutația C677T la pacienții cu FANV a fost asociată cu o incidență mai mare a comorbidităților cardiovasculare (HTA, IC, dislipidemie, DZ tip II cu HbA1c crescută și status proinflamator), risc tromboembolic și de sângerare crescut comparativ cu pacienții fără această variantă genetică. Alt studiu a demonstrat, de asemenea, legătura dintre polimorfismul C677T și riscul de AVC ischemic la pacienții cu DZ tip II. (30). Severitatea clinică a accidentului vascular cerebral a fost, de asemenea, mai mare la pacienții cu mutație C677T având scoruri semnificativ crescute ale NIHSS ( $p = 0,001$ ) și mRS ( $p = 0,003$ ).

O meta-analiză efectuată de Kang S. și colab. a demonstrat o legătură între riscul crescut de AVC ischemic și prezența polimorfismului A1298C (31). În studiul nostru mutația A1298C a fost, de asemenea, asociată cu o incidență crescută a AVC lacunare și repetitive, dislipidemia fiind principala comorbiditate cardiovasculară.

Factorii de risc cardiovascular, precum TAD, hipertrigliceridemia și creșterea HbA1c, au fost factori de risc importanți asociați mutației C677T, în timp ce doar hipertrigliceridemia a fost asociată cu mutația A1298C.

## Concluzii generale

- Fibrilația atrială non-valvulară este o entitate clinică care trebuie evaluată cu mare atenție pentru a aprecia care sunt factorii predictorii asociați cu mortalitatea ridicată, precum accidentul vascular cerebral cardioembolic și moartea subită cardiacă. Unii parametri ecocardiografici s-au dovedit a fi ulti ca predictorii pentru riscul cardioembolic: VAS, VTDVS și FEVS%.
- VTDVS este mai puternic asociat cu riscul cardioembolic, în timp ce VAS este mai util în detectarea pacienților mai predispuși la insuficiență cardiacă ischemică.
- Comorbiditățile cardiovasculare, cum ar fi boala coronariană, diabetul zaharat de tip II și profilul lipidic modificat, sunt predictorii importanți ai accidentului vascular cerebral la pacienții cu FANV.
- Riscul genetic în AVC cardioembolic datorat FANV ar trebui serios luat în considerare, deoarece studiul nostru indică prevalența polimorfismelor genei MTHFR A1298C și C677T la pacienții cu aceste două patologii intricate.
- Polimorfismul C677T din gena MTHFR a fost semnificativ asociat cu tipul de leziune a AVC (transformarea hemoragică a AVC CE și AVC lacunar preexistent) și localizarea acestuia (sistemul arterial vertebrobazilar).
- Mutația C677T este, de asemenea, asociată semnificativ cu recidivele accidentelor vasculare cerebrale și cu scoruri NIHSS și mRS mai mari.
- O incidență mai mare a comorbidităților cardiovasculare, precum hipertensiunea arterială, insuficiența cardiacă, dislipidemia și DZ tip II cu HbA1c crescută a fost observată la pacienții cu mutație C677T în studiul nostru.
- Polimorfismul C677T a fost, de asemenea, asociat cu statusul proinflamator (valori mai mari ale hsCRP).
- La pacienții cu mutație C677T riscul tromboembolic și de sângerare a fost semnificativ crescut, având scoruri CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC și HASBLED mai mari.



- Mutația A1298C a fost asociată cu o incidență crescută a accidentelor vasculare cerebrale lacunare preexistente precum și a accidentelor vasculare cerebrale repetitive.
- TAD, hipertrigliceridemia și creșterea HbA1c au fost factori de risc importanți asociați cu mutația C677T, hipertrigliceridemia fiind singura comorbiditate asociată mutației A1298C.
- Pacienții cu trombofilie și polimorfisme ale genei MTHFR pot avea cauze multiple de accident vascular cerebral și, prin urmare, investigațiile clinice ar trebui realizate mai amanunțit. Tulburările de ritm cardiac pot fi asociate acestor pacienți și, prin urmare, pot reprezenta factori suplimentari de risc pentru apariția accidentului vascular cerebral.

## Bibliografie

1. Chugh SS, Roth GA, Gillum RF, Mensah GA. Global burden of atrial fibrillation in developed and developing nations. *Glob Heart*. 2014;9(1):113-9.
2. January CT, Wann LS, Alpert JS, Calkins H, Cigarroa JE, Cleveland JC, Jr., et al. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2014;130(23):2071-104.
3. Lip GYH, Rumley A, Dunn FG, Lowe GDO. Plasma fibrinogen and fibrin D-dimer in patients with atrial fibrillation: effects of cardioversion to sinus rhythm. *International Journal of Cardiology*. 1995;51(3):245-51.
4. Conway DSG, Buggins P, Hughes E, Lip GYH. Relationship of interleukin-6 and C-Reactive protein to the prothrombotic state in chronic atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(11):2075-82.
5. Naser N, Dilic M, Durak A, Kulic M, Pepic E, Smajic E, et al. The Impact of Risk Factors and Comorbidities on The Incidence of Atrial Fibrillation. *Mater Sociomed*. 2017;29(4):231-6.
6. Naser N, Kulic M, Dilic M, Dzubur A, Durak A, Pepic E, et al. The Cumulative Incidence of Stroke, Myocardial infarction, Heart Failure and Sudden Cardiac Death in Patients with Atrial Fibrillation. *Med Arch*. 2017;71(5):316-9.
7. Eisen A, Ruff CT, Braunwald E, Nordio F, Corbalán R, Dalby A, et al. Sudden Cardiac Death in Patients With Atrial Fibrillation: Insights From the ENGAGE AF-TIMI 48 Trial. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(7).
8. Arboix A, García-Eroles L, Massons J, Oliveres M. Predictive clinical factors of in-hospital mortality in 231 consecutive patients with cardioembolic cerebral infarction. *Cerebrovasc Dis*. 1998;8(1):8-13.
9. Winter Y, Wolfram C, Schaeg M, Reese JP, Oertel WH, Dodel R, et al. Evaluation of costs and outcome in cardioembolic stroke or TIA. *J Neurol*. 2009;256(6):954-63.
10. Arboix A, Alió J. Cardioembolic stroke: clinical features, specific cardiac disorders and prognosis. *Curr Cardiol Rev*. 2010;6(3):150-61.
11. Murtagh B, Smalling RW. Cardioembolic stroke. *Curr Atheroscler Rep*. 2006;8(4):310-6.
12. Laszlj JM HT. Hemorrhagic transformation of ischemic stroke. *Vascul Dis Ther*. 2017;Volume 2(4): 1-25.
13. Antipova D, Eadie L, Macaden A, Wilson P. Diagnostic accuracy of clinical tools for assessment of acute stroke: a systematic review. *BMC Emerg Med*. 2019;19(1):49-.
14. Zhelev Z, Walker G, Henschke N, Fridhandler J, Yip S. Prehospital stroke scales as screening tools for early identification of stroke and transient ischemic attack. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;4(4):Cd011427.
15. Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2017;57(5):142-9.
16. Steluti J, Carvalho AM, Carioca AAF, Miranda A, Gattás GJF, Fisberg RM, et al. Genetic Variants Involved in One-Carbon Metabolism: Polymorphism Frequencies and Differences in Homocysteine Concentrations in the Folic Acid Fortification Era. *Nutrients*. 2017;9(6):539.
17. Long S, Goldblatt J. *MTHFR* genetic testing: Controversy and clinical implications. *Australian family physician*. 2016;45 4:237-40.
18. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet*. 2015;58(1):1-10.
19. Smith JG, Newton-Cheh C, Almgren P, Melander O, Platonov PG. Genetic polymorphisms for estimating risk of atrial fibrillation in the general population: a prospective study. *Arch Intern Med*. 2012;172(9):742-4.
20. Marcucci R, Betti I, Cecchi E, Poli D, Giusti B, Fedi S, et al. Hyperhomocysteinemia and vitamin B6 deficiency: new risk markers for nonvalvular atrial fibrillation? *Am Heart J*. 2004;148(3):456-61.

21. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. [2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS]. *Kardiol Pol.* 2016;74(12):1359-469
22. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993;24(1):35-41
23. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet.* 1998;352(9136):1245-51.
24. Kim T-S, Youn H-J. Role of echocardiography in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Ultrasound.* 2011;19(2):51-61
25. Link MS, Giugliano RP, Ruff CT, Scirica BM, Huikuri H, Oto A, et al. Stroke and Mortality Risk in Patients With Various Patterns of Atrial Fibrillation: Results From the ENGAGE AF-TIMI 48 Trial (Effective Anticoagulation With Factor Xa Next Generation in Atrial Fibrillation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 48). *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2017;10(1)
26. Yaghi S, Elkind MSV. Lipids and Cerebrovascular Disease: Research and Practice. *Stroke.* 2015;46(11):3322-8
27. Michniewicz E, Mlodawska E, Lopatowska P, Tomaszuk-Kazberuk A, Malyszko J. Patients with atrial fibrillation and coronary artery disease - Double trouble. *Adv Med Sci.* 2018;63(1):30-5
28. Kang S, Zhao X, Liu L, Wu W, Zhang D. Association of the C677T polymorphism in the *MTHFR* gene with hemorrhagic stroke: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17(5):412-7
29. Sazci A, Ergul E, Tuncer N, Akpinar G, Kara I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of *MTHFR* polymorphisms C677T and A1298C. *Brain Res Bull.* 2006;71(1-3):45-50
30. Hermans MP, Gala JL, Buysschaert M. The *MTHFR* CT polymorphism confers a high risk for stroke in both homozygous and heterozygous T allele carriers with Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* 2006;23(5):529-36
31. Kang S, Wu Y, Liu L, Zhao X, Zhang D. Association of the A1298C polymorphism in *MTHFR* gene with ischemic stroke. *J Clin Neurosci.* 2014;21(2):198-202