
Rezumatul Tezei de Doctorat

Biomarkeri noi și uzuali în cardiomiopia dilatativă

Doctorand Cristina Pop

Conducător de doctorat Prof. Dr. Felicia Loghin

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Cardiomiopatia dilatativă	19
1.1. Definiții, clasificări	19
1.2. Epidemiologie	22
1.3. Etiologie	22
1.4. Prezentare clinică	25
1.5. Investigații	25
1.6. Tratament	27
1.7. Prognostic	30
2. Biomarkeri în cardiomiopatia dilatativă	31
2.1. Necesitatea unor biomarkeri pentru cardiomiopatia dilatativă	31
2.2. Biomarkeri pentru insuficiența cardiacă	32
2.3. Strategii de identificare a biomarkerilor	36
2.4. Descoperirea de biomarkeri cu ajutorul proteomicii	39
2.5. Etapele descoperirii de biomarkeri	41
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Studiul 1. Variabile de prognostic pentru îmbunătățirea funcției sistolice a ventriculului stâng la pacienți cu cardiomiopatie dilatativă tratați cu medicație standard	44
1.1. Introducere	44
1.2. Ipoteza de lucru	44
1.3. Materiale și metodă	44
1.4. Rezultate	46
1.5. Discuții	50
1.6. Concluzii	52
2. Studiul 2. Markerii utilizați pentru caracterizarea și evoluția disfuncției ventriculului stâng într-un model experimental de insuficiență cardiacă	55
2.1. Introducere	55
2.2. Ipoteza de lucru	55

2.2. Materiale și metodă	55
2.3. Rezultate	58
2.4. Discuții	66
2.5. Concluzii	69
3. Studiul 3. Analiza proteomului miocardic din probe de biopsie utilizând compusul Trizol pentru extracția proteinelor	71
3.1. Introducere	71
3.2. Ipoteza de lucru	72
3.3. Materiale și metodă	72
3.4. Rezultate și discuții	74
3.5. Concluzii	83
4. Studiul 4. Biomarkeri-candidați de diagnostic și prognostic în cardiomiopatia dilatativă rezultați din analiza proteomului plasmatic	85
4.1. Introducere	85
4.2. Ipoteza de lucru	85
4.3. Materiale și metodă	85
4.4. Rezultate	88
4.5. Discuții	106
4.6. Concluzii	115
5. Concluzii generale	116
6. Originalitatea și caracterul inovativ al tezei	118
REFERINȚE	120
ANEXE	144

Cuvinte cheie: cardiomiopatie dilatativă, insuficiență cardiacă, biomarker, proteomică

INTRODUCERE

Una dintre cele mai importante cauze ale insuficienței cardiace sistolice (IC) și cea mai frecventă cauză de IC la pacienții aflați pe lista de așteptare pentru transplantul de cord este cardiomiopatia dilatativă (CMD). Evoluția clinică a pacienților cu CMD variază de la refacerea funcției sistolice la apariția complicațiilor sau chiar a decesului de origine cardiacă. Estimarea cât mai corectă a evoluției și a riscului pacienților este foarte importantă pentru alegerea terapiei.

Markerii biologici, numiți "biomarkeri", pot permite diagnosticul timpuriu, estimarea prognosticului sau pot asista managementul bolii. Deși mulți biomarkeri utilizați în IC sunt utilizați și în cazul pacienților cu CMD, aceștia nu prezintă specificitate față de CMD. Astfel, există o necesitate acută de identificare a unor biomarkeri specifici pentru diagnosticul și prognosticul CMD, dar și de optimizare a utilizării biomarkerilor pentru IC în CMD.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Variabile de prognostic pentru îmbunătățirea funcției sistolice a ventriculului stâng la pacienți cu cardiomiopatie dilatativă tratați cu medicație standard

Ipoteza de lucru: Scopul studiului a fost identificarea variabilelor cu valoare de prognostic pentru pacienții cu CMD printre datele colectate în mod uzual de la pacienții internați în spital.

Materiale și metode: Selectarea pacienților și colectarea datelor au fost realizate cu ajutorul bazei de date a spitalului Municipal Cluj-Napoca. Pacienții incluși în studiu aveau ca diagnostic principal CMD, fracția de ejeție a ventriculului stâng (FEVS) $\leq 40\%$, și cel puțin o reinternare în spital pentru monitorizare. Pacienții au fost clasificați în ameliorați sau neameliorați, pe baza valorilor FEVS la reinternare.

Rezultate: Dintre cei 95 de pacienți incluși în analiza finală, 26 (27.36%) au prezentat o ameliorare a funcției sistolice (grupul ameliorat, FEVS 48% [43.5 - 53]) și 69 (72.64%) nu au prezentat o ameliorare a funcției sistolice (grup neameliorat, FEVS 30% [25 - 35]). La analiza univariată, următoarele variabile au prezentat valoare de

prognostic: clasa NYHA, presiunea arterială sistolică, pulsul în repaus, NT-proBNP, hemoglobina, diabetul și etiologia ischemică. La analiza multivariată, următoarele variabile au prezentat valoare de prognostic: sexul, pulsul în repaus și hemoglobina.

Concluzii: Includerea acestor variabile în procesul de luare a deciziilor clinice la internarea pacientului ar fi benefică pentru clasificarea cât mai timpurie a pacienților în pacienți care vor răspunde pozitiv la terapia medicamentoasă standard și pacienți care vor trebui investigați suplimentar și vor necesita intervenții mai complexe pentru a asigura o evoluție pozitivă.

Studiul 2. Markerii utilizați pentru caracterizarea și evoluția disfuncției ventriculului stâng într-un model experimental de insuficiență cardiacă

Ipoteza de lucru: Scopul studiului a fost caracterizarea evoluției funcției cardiace la șobolanii supuși ligaturării aortei abdominale (LAA) cu ajutorul ecocardiografiei transtoracice, a analizei histopatologice și a markerilor biochimici.

Materialie și metode: LAA s-a realizat la șobolani Wistar (n=24; 130-170 g) sub anestezie cu ketamină (50 mg/kg) și xylazină (10 mg/kg). Șobolanii au fost investigați periodic timp de 24 de săptămâni (cântăriți, supuși ecocardiografiei). La 18 și la 24 de săptămâni, jumătate din șobolani au fost eutanasiați după o ultimă evaluare a greutateii și a funcției cardiace. S-au prelevat sânge și țesut miocardic pentru analize suplimentare (examen histopatologic, analiza biochimică a markerilor de stress oxidativ).

Rezultate: La 8, 18 și respectiv 24 de săptămâni, șobolanii LAA prezentau o greutate corporală inferioară șobolanilor martor. La momentul eutanasierii, șobolanii LAA prezentau o masă a miocardului superioară în comparație cu șobolanii martor.

Markerii hipertrofiei ventriculare cum ar fi: grosimea diastolică a peretelui anterior și posterior al ventriculului stâng, greutatea ventriculului stâng și indexul greutății ventriculului stâng, au crescut la grupul LAA în comparație cu șobolanii control. Diametrul tele-sistolic și tele-diastolic al ventriculului stâng erau similare la ambele grupuri la inițierea experimentului și au crescut gradual pe parcursul acestuia, semnificativ mai mult la șobolanii LAA. Markerii ai funcției sistolice cum ar fi fracția de ejeție a VS (FEVS) și fracția de scurtare a VS (FSVS) au scăzut semnificativ la 24 de săptămâni la grupul LAA.

Analiza histopatologică a țesutului miocardic a evidențiat hipertrofia cardiomiocitelor și fibroză perivasculară la șobolanii LAA la 24 de săptămâni.

La șobolanii LAA, nivelele plasmatiche ale MDA (malondialdehidă) și SOD (superoxid dismutază) au fost modificate semnificativ la 18 și 24 de săptămâni post-ligatură în comparație cu șobolanii martor. Nivelele MDA și SOD la 24 de săptămâni post-ligatură s-au corelat cu delta-FEVS.

Concluzii: Modelul experimental de IC dezvoltată datorită post-sarcinii crescute prezintă o relevanță clinică importantă, deoarece presiunea ventriculară crescută este dezvoltată gradual, determinând instalarea disfuncției ventriculare în timp și evoluția acesteia de la hipertrofie compensată la IC decompensată. Astfel, acest model experimental poate fi utilizat pentru studiul fiziopatologiei IC indusă de hipertensiune arterială și pentru descoperirea de noi biomarkeri translaționali pentru disfuncția sistolică.

Studiul 3. Analiza proteomului miocardic din probe de biopsie, utilizând compusul Trizol pentru extracția proteinelor

Ipoteza de lucru: Studiul a avut ca scop evaluarea capacității unui protocol modificat pentru Trizol de a extrage cu succes proteinele din probe de mici dimensiuni, cum ar fi biopsiile endomiocardice. Trizolul este folosit în mod curent pentru extragerea ARN-ului din probe. Modificarea protocolului pentru Trizol ar permite extragerea ARN-ului și a proteinelor din aceeași probă și corelarea rezultatelor.

Materiale și metode: În acest studiu s-au utilizat secțiuni de ventricul stâng murin, cantități mici de miocard murin (ventricul stâng și drept) și probe de biopsie endomiocardică umane (ventricul stâng și drept). Pentru secțiunile de ventricul stâng murin s-a realizat o comparație între metoda clasică de extracție a proteinelor (cu uree (8M) /tiuree (2M)) și protocolul cu Trizol. Proteinele din probele de cantități mici de miocard murin (ventricul stâng și drept) și din probele de biopsie endomiocardică umane (ventricul stâng și drept) au fost extrase doar cu Trizol. Protocolul modificat de extragere a proteinelor cu Trizol este prezentat în fig.1. Proteinele rezultate au fost analizate cu ajutorul electroforezei 2D și a spectrometriei de masă.

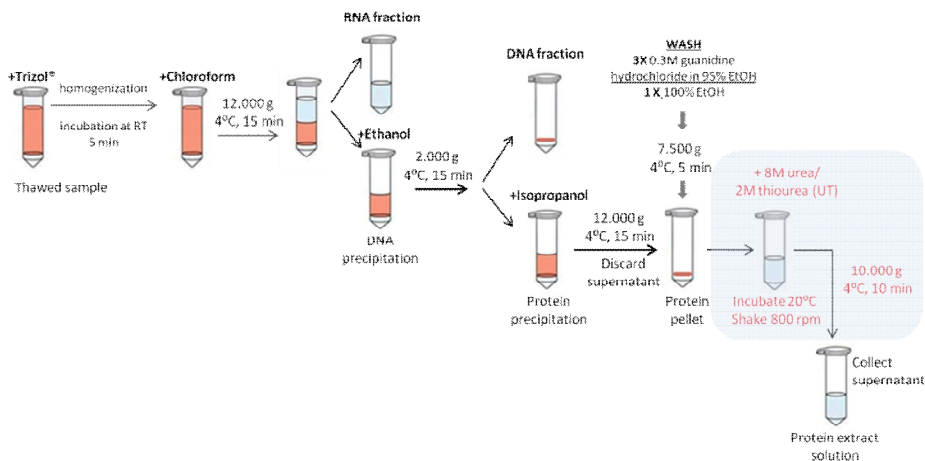


Fig.1. Protocolul de extragere a proteinelor cu Trizol. Modificarea adusă protocolului implică etapa de dizolvare a proteinelor în uree (8M) /tiuree (2M) (fundal albastru).

Rezultate: Extractele obținute cu Trizol au conținut o cantitate suficientă de proteine pentru analize ulterioare. În comparație cu metoda clasică de extragere a proteinelor (uree/tiouree), metoda cu Trizol a dus la identificarea mai multor proteine (pe baza a cel puțin unei sau a două peptide unice). Cele două metode de extragere a proteinelor au dus la identificarea de proteine în proporții similare în ceea ce privește componentele celulare reprezentate de proteine. Extractele realizate cu Trizol au dus la realizarea de tipare 2D de înaltă calitate și similare cu cele extrase cu uree-tiouree.

Aplicarea protocolului Trizol modificat pe o cantitate mai mică de probă de miocard murin a evidențiat rezultate similare cu cele obținute în cazul secțiunilor miocardice murine.

Protocolul modificat cu Trizol a fost aplicat și pentru extragerea proteinelor din biopsii endomiocardice umane. Analiza MS a evidențiat un număr mare de peptide și proteine identificate, în ciuda materialului disponibil limitat. Extractele realizate cu Trizol au dus la realizarea de tipare 2D de înaltă calitate și similare cu cele obținute în cazul secțiunilor miocardice murine.

Concluzii: Studiul de față a evidențiat faptul că protocolul modificat cu Trizol a dus la extragerea unei cantități suficiente de proteine pentru analize ulterioare, chiar și din probe de mici dimensiuni cum sunt biopsiile endomiocardice. Acest lucru permite extragerea din aceleași probe a ARN-ului și a proteinelor, permițând corelarea rezultatelor analizelor proteomice și transcriptomice chiar și în cazul probelor de mici dimensiuni.

Studiul 4. Biomarkeri-candidați de diagnostic și prognostic în cardiomiopatia dilatativă, rezultați din analiza proteomului plasmatic

Ipoteza de lucru: În studiul de față, proteomul plasmatic al pacienților cu cardiomiopatie dilatativă (CMD) și al pacienților control a fost analizat în scopul identificării biomarkerilor-candidați pentru diagnosticul și prognosticul CMD.

Materialie și metode: Pacienți diagnosticați cu CMD ($n=40$), cu fracția de ejeție a VS (FEVS) $\leq 40\%$ și diametrul telediastolic al VS (DtDVS) ≥ 55 mm, au fost incluși în studiu. Aceștia au fost comparați cu pacienți control, cu FEVS normal ($\geq 60\%$) și DtDVS (≤ 45 mm), de vârste și distribuție a sexelor similare ($n=22$).

Funcția ventriculului stâng a fost monitorizată prin ecocardiografie la începutul experimentului și după aproximativ 6 luni. Ameliorarea funcției sistolice a fost definită ca o creștere a FEVS cu $\geq 20\%$ relativ față de valoarea la începutul experimentului și cu 5% valoare absolută.

Probele de plasmă au fost colectate la începutul experimentului. Inițial, proteinele din probele de plasmă au fost fracționate prin îndepărtarea a șase dintre cele mai abundente proteine (albumina, IgG, antitrypsina, IgA, transferina și haptoglobina).

Apoi, proteinele plasmatice rămase au fost reduse, alchilate și digerate cu tripsină la peptide, pentru a fi analizate cu ajutorul spectrometrului de masă (MS). Datele generate de către MS au fost analizate ulterior cu programe speciale pentru a genera informații ușor de integrat.

Rezultate: Pe baza valorilor FEVS la începerea și la finalul perioadei de monitorizare, pacienții au fost clasificați în: pacienți control (n=22), ameliorați (n=29) și neameliorați (n=11).

Tabelul I. Proteine cu nivele diferite în plasma pacienților DCM și control

Proteine plasmatice clasice	Mannose-binding protein C	Matricea extracelulară
Metabolismul lipidelor	Platelet basic protein	72 kDa type IV collagenase
Apolipoprotein A-II	Altele	Thrombospondin-1
Apolipoprotein C-I	Angiotensinogen	Cystatin-C
Apolipoprotein M	Coagulation factor VII	ADN
Cholesteryl ester transfer protein	Corticosteroid-binding globulin	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Prenylcysteine oxidase 1	Neuroblast differentiation-associated protein	PHD finger protein 1
Serum paraoxonase/arylesterase 1	Ribonuclease pancreatic	Zinc finger protein 267
Platelet-activating factor acetylhydrolase	Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-like protein 1	Altele
Răspuns imun	Uncharacterized protein C1orf56	Actin, alpha skeletal muscle
Ig gamma-2 chain C region	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	Coiled-coil domain-containing protein 137
Ig kappa chain C region		Hornerin
Ig mu chain C region	Proteine pasagere în plasmă	Radial spoke head protein 4 homolog A
Collectin-11	Metabolismul celular	Rho-associated protein kinase 2
Lysozyme C	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	Sorting nexin-25
C-reactive protein	Fructose-bisphosphate aldolase A	Tripartite motif-containing protein 35

Comparația proteinelor plasmatice cu nivele diferite la pacienții control vs. CMD

Un număr de 38 de proteine au prezentat nivele diferite la pacienții cu CMD în comparație cu cei control. Dintre acestea, 18 au fost corelate cu FEVS, 20 cu DtDVS și 9 cu valorile NT-proBNP la începutul experimentului. Proteinele identificate aparțin fie grupului de proteine plasmatice clasice (n=23, 60.53%), fie proteinelor pasagere în plasmă (n=15, 39.47%) (Tabelul I). Rezultatele analizei arată că la pacienții cu CMD apare o activare a răspunsului imun, modificarea metabolismului lipidic cu creșterea riscului de ateroscleroză și modificări la nivelul proteinelor matricii extracelulare.

Comparația proteinelor plasmatice cu nivele diferite la pacienții ameliorați vs. neameliorați

Un număr de 7 proteine au prezentat nivele diferite la pacienții ameliorați în comparație cu cei neameliorați, reprezentând 1.43% din totalul proteinelor identificate.

Pacienții cu CMD care au prezentat o ameliorare a funcției sistolice au prezentat nivele plasmatiche crescute ale matricii extracelulare, nivele scăzute ale proteinelor răspunsului imun, nivele crescute ale proteinelor cu rol transportor și nivele scăzute ale factorului de coagulare X. Proteinele plasmatiche clasice identificate cu valori diferite la pacienții ameliorați au fost: factorul de coagulare X, insulin-like growth factor-binding protein 3, mannan-binding lectin serine protease 2, properdin și serum amyloid P-component. Proteinele pasagere au fost: fibrillin-1 and cysteine-rich secretory protein 3.

Concluzii: Proteinele identificate au potențialul de a servi ca markeri de diagnostic (pot face diferența între CMD și pacienți fără CMD) sau de prognostic (pot face diferența între pacienții cu CMD a căror funcție sistolică se va ameliora și cei la care nu se va ameliora doar în urma terapiei medicamentoase standard).

Concluzii generale

În lucrarea de față au fost utilizate diferite tipuri de studii, cu scopul comun de a permite identificarea unor biomarkeri pentru CMD. Astfel, a fost conceput un studiu retrospectiv de cohortă pentru a evalua valoarea de prognostic a biomarkerilor utilizați în IC pentru pacienții cu CMD. De asemenea, a fost dezvoltat un model experimental de CMD pentru a testa capacitatea markerilor de stres oxidativ (malondialdehida și superoxid dismutaza) de a distinge între hipertrofia VS (IC compensată) și dilatația VS (IC decompensată).

Cu ajutorul unei platforme de proteomică s-au explorat proteomul miocardic (murin și uman) și plasma umană. În lucrarea de față am demonstrat posibilitatea analizelor complexe de proteomica (dar și potențialul efectuării analizelor de transcriptomică) utilizând probe valoroase de mici dimensiuni cum sunt biopsiile endomiocardice. Această demonstrație încurajează utilizarea acestor biopsii pentru identificarea de biomarkeri cardiovasculari în timp real. De asemenea, utilizarea plasmei umane pentru identificarea de biomarkeri-candidați pentru CMD reprezintă "standardul de aur". Conceptul de bază în proteomică este analiza proteinelor dintr-un sistem. Această metodă de investigație deschide noi posibilități de descoperire a biomarkerilor.

Lucrarea de față subliniază utilitatea biomarkerilor uzuali în IC pentru pacienții cu CMD, dar propune și noi biomarkeri pentru diagnosticul și prognosticul CMD.

Originalitatea și caracterul inovativ al tezei

Lucrarea de față cuprinde patru studii originale care privesc biomarkerii cardiovasculari. Fiecare studiu scoate în evidență importanța biomarkerilor pentru

diagnosticul/prognosticul CMD. Studiul retrospectiv de cohortă este primul de acest fel în România și subliniază potențialul de prognostic al unor variabile înregistrate la internare dar și nevoia acută de biomarkeri specifici de prognostic pentru CMD. Cel de-al doilea studiu prezintă cum o modificare a modalității de inducere a IC prin LAA poate produce IC la șobolani în 24 de săptămâni. De asemenea, studiul pune în evidență pentru prima dată utilitatea MDA și SOD pentru diferențierea între IC compensată (hipertrofică) și decompensată (dilatativă). Implicațiile biomarkerilor-candidați identificați cu ajutorul proteomicii sunt importante deoarece unii dintre aceștia pot prezenta valoare de diagnostic sau prognostic, dovedite după analize ulterioare și ar putea să satisfacă o nevoie acută de biomarkeri pentru CMD.

Bibliografie selectivă

2. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2012 Aug;14(8):803–69.
38. Pop C, Crisan G, Loghin F, Mogosan C. Advances in the detection and quantification of candidate and established biomarkers in heart failure. *Rev Rom Med Lab.* 2013;21(3):255–65.
41. Anderson NL, Ptolemy AS, Rifai N. The riddle of protein diagnostics: future bleak or bright? *Clin Chem.* 2013 Jan;59(1):194–7.
42. Piran S, Liu P, Morales A, Hershberger RE. Where genome meets phenome: rationale for integrating genetic and protein biomarkers in the diagnosis and management of dilated cardiomyopathy and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2012 Jul 24;60(4):283–9.
74. Dubois E, Fertin M, Burdese J, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Cardiovascular proteomics: translational studies to develop novel biomarkers in heart failure and left ventricular remodeling. *Proteomics Clin Appl.* 2011 Feb;5(1-2):57–66.
76. Hammer E, Goritzka M, Ameling S, Darm K, Steil L, Klingel K, et al. Characterization of the human myocardial proteome in inflammatory dilated cardiomyopathy by label-free quantitative shotgun proteomics of heart biopsies. *J Proteome Res.* 2011 May 6;10(5):2161–71.
139. Pop C, Ameling S, Empen K, Rüdebusch J, Dhople VM, Felix SB, et al. Proteome analysis of heart biopsies using a TRIzol-based protein extraction. *Clin Chim Acta* 2015;438:246–7.
144. Pop C, Mogosan C, Loghin F. Evaluation of Rapigest efficacy for the digestion of proteins

Summary of the Doctoral Thesis

Novel and established biomarkers in
dilated cardiomyopathy

PhD Student **Cristina Pop**

Scientific Coordinator **Prof. Dr. Felicia Loghin**



TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
REVIEW OF THE LITERATURE	
1. Dilated cardiomyopathy	19
1.1. Definitions, classifications	19
1.2. Epidemiology	22
1.3. Etiology	22
1.4. Clinical presentation	25
1.5. Investigations	25
1.6. Treatment	27
1.7. Prognosis	30
2. Biomarkers in dilated cardiomyopathy	31
2.1. The need for biomarkers	31
2.2. Biomarkers for heart failure	32
2.3. Biomarker identification strategies	36
2.4. Proteomics for biomarker discovery	39
2.5. Biomarker development phases	41
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Study 1. Prognostic variables for the improvement of left ventricular systolic function with medical therapy alone in dilated cardiomyopathy patients	44
1.1. Introduction	44
1.2. Work hypothesis	44
1.3. Materials and method	44
1.4. Results	46
1.5. Discussions	50
1.6. Conclusions	52
2. Study 2. Markers for the characterization and evolution of left ventricular systolic dysfunction in an animal model of induced heart failure	55
2.1. Introduction	55
2.2. Work hypothesis	55
2.3. Materials and method	55
2.4. Results	58

2.5. Discussions	66
2.6. Conclusions	69
3. Study 3. Proteome analysis of heart biopsies using a Trizol-based protein extraction	71
3.1. Introduction	71
3.2. Work hypothesis	72
3.3. Materials and method	72
3.4. Results and discussions	74
3.5. Conclusions	83
4. Study 4. Proteomics-derived plasma candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of idiopathic dilated cardiomyopathy	85
4.1. Introduction	85
4.2. Work hypothesis	85
4.3. Materials and method	85
4.4. Results	88
4.5. Discussions	106
4.6. Conclusions	115
5. General conclusions	116
6. Originality and innovative contributions of the thesis	118
REFERENCES	120
ANNEXES	144

Keywords: dilated cardiomyopathy, heart failure, biomarker, proteomics

INTRODUCTION

One of the most important causes of systolic heart failure (HF) and the most common cause of HF in people referred for cardiac transplantation is dilated cardiomyopathy (DCM). The clinical course of DCM patients varies from recovery of ventricular function to complications or even cardiac death. Accurate predictions of outcome and risk stratification are very important in correctly assigning therapy.

Biological markers, known as “biomarkers” may allow early diagnosis, predict outcomes and guide disease management. Although many HF biomarkers are also being used in DCM, they lack specificity to DCM. Thus, there is an acute need for new specific biomarkers for DCM diagnosis and prognosis, but also for a more effective use of already established biomarkers.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1. Prognostic variables for the improvement of left ventricular systolic function with medical therapy alone in dilated cardiomyopathy patients

Work hypothesis: The aim of the study was to identify, among the routinely collected data from the charts of patients admitted to hospital, those variables with a possible prognostic value for DCM patients.

Materials and method: Patient selection and data collection were performed using the Cluj-Napoca County Hospital general patient database. Patients included in the study had a primary diagnosis of DCM, a baseline left ventricular ejection fraction (LVEF) $\leq 40\%$, and at least one follow-up visit to the hospital. Based on the LVEF values at follow-up, patients included in the study were either improved or not improved.

Results: Of all the 95 patients included in the final analysis of the study, 26 (27.36%) improved their systolic function (improved group, follow-up median LVEF 48% [43.5 - 53]) and 69 (72.64%) did not (not improved group, follow-up median LVEF 30% [25 - 35]). Upon univariate analysis NYHA functional classification, systolic blood pressure, resting pulse, NT-proBNP, hemoglobin, diabetes and ischemic etiology had prognostic value. Moreover, in the multivariate analysis gender, resting pulse and hemoglobin presented prognostic value.

Conclusions: The inclusion at baseline of these variables in the decision making of the clinician would be beneficial in the dissociation between patients who will likely respond well to standard therapy, with high odds of a positive evolution, and those

who will require referral to further investigations and more aggressive interventions in order to ensure a positive evolution.

Study 2. Markers for the characterization and evolution of left ventricular systolic dysfunction in an animal model of induced heart failure

Work hypothesis: The aim of the study was to characterize the evolution of the cardiac function in AAB rats with the help of transthoracic echochardiography, histology and biochemistry markers.

Materials and method: Abdominal aorta banding (AAB) was performed under anesthesia by intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) using Wistar rats (n=32; weighing 130-170 g). Rats were evaluated periodically for 24 weeks by performing echocardiography and weight measurement. At 18 and at 24 weeks, AAB and sham rats were weighed and then anesthetized. Blood and heart tissue were sampled for further analysis (histology analysis, assessment of oxidative stress plasma markers).

Results: AAB rats presented an inferior body weight in comparison to sham rats at 8, 18 and 24 weeks, respectively. At the time of euthanasia, aortic banding rats displayed an increase in heart weight in comparison to sham rats.

Markers of ventricular hypertrophy such as diastolic thickness of the anterior (AWTd) and the posterior (PWTd) left ventricular wall, left ventricular mass (LVmass) and LVmass-index increased significantly over time in the AAB group in comparison to the sham group. Left ventricular diameters in diastole (LVEDd) and in systole (LVEDs) were similar in the two groups at baseline and increased gradually in the AAB group over time. Markers of systolic function such as fractional shortening (FS%) and ejection fraction (EF%) were both decreased significantly in the AAB group at 24 weeks.

Histological examination of the AAB rat hearts (at 24 weeks post-operation) showed hypertrophy of the cardiomyocytes and myofibrillar disarray on hematoxylin-eosin staining.

In the AAB rats, plasma levels of MDA (malondyaldehyde) and SOD (superoxide dismutase) were significantly modified in the AAB compared to sham rats at 18 and 24 weeks post-ligature. MDA and SOD levels at 24 weeks post-operation correlated with delta EF (%).

Conclusions: The pressure overload model of HF is potentially clinically relevant to HF progression in humans as the stimulus for HF (high afterload) developed gradually, determining the pathological process to evolve from compensated hypertrophy to decompensated HF, as is the case in humans. Therefore this model could be useful for

the study of the pathophysiology of HF induced by hypertension and the discovery of translational biomarkers of systolic dysfunction.

Study 3. Proteome analysis of heart biopsies using a Trizol-based protein extraction

Work hypothesis: The aim of the study was to see if the popular RNA-extraction solution (Trizol) can also be used successfully for protein extraction from small amounts of heart tissue, such as from endomyocardial biopsies (EMBs), which would enable RNA and protein extraction from the same sample and thus save sample quantity or be able to do analysis of both macromolecules on very small and valuable samples.

Materials and method: Study materials constituted of murine left ventricular tissue sections, small quantities of murine heart (left and right ventricle) and human endomyocardial biopsy (left and right ventricle). For the murine left ventricular tissue sections a comparison between the standard method of protein extraction (with urea (8M) /thiourea (2M)) and the Trizol protocol was done. Proteins from the small quantities of murine heart (left and right ventricle) and the human endomyocardial biopsy (left and right ventricle) were extracted only with the modified Trizol protocol. Trizol protein extraction protocol is depicted in fig.1. Resulted proteins were analyzed by 2D electrophoresis and mass spectrometry.

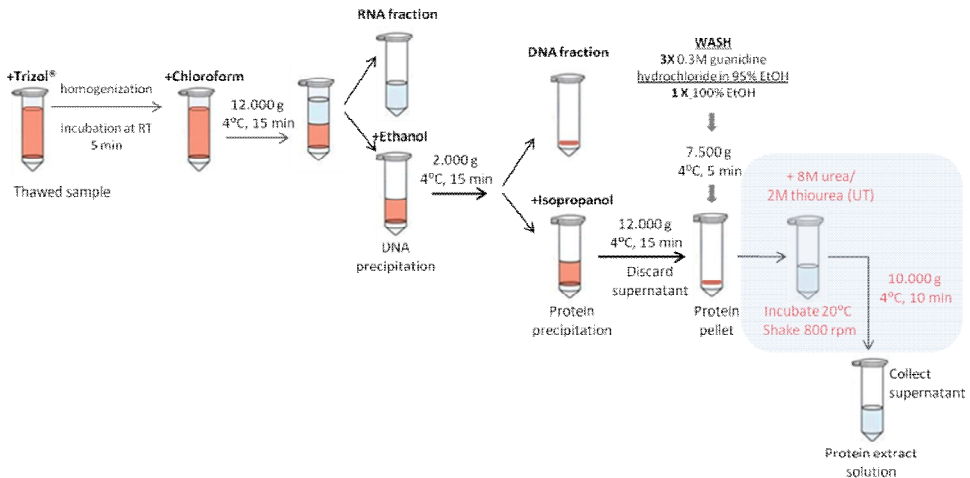


Fig. 1. The Trizol protocol according to the manufacturer's protocol with a modified protein extraction workflow. The modified steps focus on an improved reconstitution of the protein pellet in 8M urea/2M thiourea (UT) and are highlighted by blue background.

Results: The improved Trizol protocol was tested on murine left ventricular tissue sections and then applied to small quantities of murine heart and finally to endomyocardial biopsies. The Trizol extractions revealed sufficient protein for

downstream applications. Compared to classic UT protein extraction, Trizol seemed to provide a broader view on the protein composition, because a significantly higher number of proteins were identified when all proteins, including one-peptide and two-peptide identifications, were considered. Cellular components coverage of the identified proteins was similar for the two methods of extraction. Also, a comparative view on the 2D spot pattern of UT- and Trizol-derived samples showed the high quality and the similarity of both protein extracts.

The application of the method to less tissue material revealed similar results to the analysis of mouse heart tissue sections.

The Trizol protocol was applied to human EMBs. MS analysis yielded a high number of identified peptides and proteins, despite the low amount of sample available for analysis. 2D-PAGE from HLV and HRV displayed the high quality of the protein extracts, as it was also observed for the mouse samples.

Conclusions: The study showed that sufficient amount and high quality protein for further analysis can be extracted using a modified Trizol protocol, even from small amounts of mouse heart tissue and human endomyocardial biopsies, which enables parallel transcriptome and proteome analyses from the same specimen, allowing the discovery of comprehensive cardiovascular biomarkers.

Study 4. Proteomics-derived plasma candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of idiopathic dilated cardiomyopathy

Work hypothesis: In the present study, the plasma proteome of DCM and control patients was analyzed in order to identify candidate biomarkers for the diagnosis and the prognosis of DCM.

Materials and Methods: Patients (n=40) diagnosed with idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) presenting with low left ventricle ejection fraction (LVEF \leq 40%) and high left ventricular end-diastolic diameter (LVEDd \geq 55 mm) were included in the study. The study population was age and gender matched to patients with normal LVEF (\geq 60%) and LVEDd (\leq 45 mm), considered the control group (n=22). Left ventricular function was monitored by echocardiography at baseline and at follow up (after six months).

The recovery of left ventricular function was defined as an increase of the follow-up LVEF (\geq 20% relative to the baseline value and 5% absolute value).

Plasma samples were collected at baseline. At first, plasma samples were depleted of the six most abundant plasma proteins (albumin, IgG, antitrypsin, IgA, transferrin and haptoglobin). Next, plasma proteins were reduced, alkylated, and digested with trypsin to peptides, which were analyzed in a mass spectrometer (MS). Data generated by the

MS were further analyzed by different software to generate comprehensive information.

Results: Based on the echocardiographic findings at baseline and follow-up, patients were classified into three groups: control (n=22), improved (n=29) and not improved (n=11).

Table I. Proteins differentially abundant in plasma of the DCM and control groups

Classical plasma proteins	Mannose-binding protein C	Extracellular matrix
Lipid metabolism	Platelet basic protein	72 kDa type IV collagenase
Apolipoprotein A-II	Miscellaneous	Thrombospondin-1
Apolipoprotein C-I	Angiotensinogen	Cystatin-C
Apolipoprotein M	Coagulation factor VII	DNA
Cholesteryl ester transfer protein	Corticosteroid-binding globulin	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Prenylcysteine oxidase 1	Neuroblast differentiation-associated protein	PHD finger protein 1
Serum paraoxonase/arylesterase 1	Ribonuclease pancreatic	Zinc finger protein 267
Platelet-activating factor acetylhydrolase	Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-like protein 1	Miscellaneous
Immune response	Uncharacterized protein C1orf56	Actin, alpha skeletal muscle
Ig gamma-2 chain C region	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	Coiled-coil domain-containing protein 137
Ig kappa chain C region		Hornerin
Ig mu chain C region	Transient proteins	Radial spoke head protein 4 homolog A
Collectin-11	Cellular metabolism	Rho-associated protein kinase 2
Lysozyme C	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	Sorting nexin-25
C-reactive protein	Fructose-bisphosphate aldolase A	Tripartite motif-containing protein 35

Comparative plasma proteomics of DCM vs. controls

Comparing the plasma protein profiles of controls (n=22) with those of all DCM patients (n=40), a total of 38 proteins passed the set filtering criteria. Out of the 38 proteins, 18 correlated with baseline LVEF (%), 20 with baseline LVEDd (mm) and 9 with baseline NT-proBNP (pg/ml). As expected with plasma proteins analysis, differentially abundant proteins belonged either to the classical plasma proteins (n=23, 60.53%), or to the transient plasma proteins (n=15, 39.47%) (Table I). Based on the identified proteins, it seems that DCM patients exhibited an augmentation in innate immune response, altered lipid metabolism, leaning towards an atherosclerotic profile and modifications in the extracellular matrix, in comparison to control patients.

Comparative plasma proteomics of improved vs. not improved DCM patients

A total of 7 proteins passed the Elucidator-set filtering criteria, representing 1.43% of all quantified proteins. Improved DCM patients presented with a higher abundance of extracellular matrix proteins, lower abundance of innate immunity proteins, augmented abundance of carrier proteins and low abundance of coagulation factor X.

Classical plasma proteins identified were: coagulation factor X, insulin-like growth factor-binding protein 3, mannan-binding lectin serine protease 2, properdin and serum amyloid P-component. Transient plasma proteins identified were: fibrillin-1 and cysteine-rich secretory protein 3.

Conclusions: The identified proteins and their associated pathways may help widen the understanding on the pathophysiology of DCM and differentiate between DCM patients and controls, and also patients who will benefit from drug therapy alone or those who will necessitate more aggressive therapy. Although results are encouraging, all findings must be further subjected to thorough evaluation in larger sample-sets and determine whether these hypothesis-free candidate biomarkers can present with additional useful information concerning disease.

General conclusions

In the present work, several types of study designs have been used to allow the identification of biomarkers for DCM. Thus, a retrospective cohort study was designed to evaluate the potential prognostic usefulness of established HF biomarkers in a cohort of DCM patients. Next, an animal model of dilated cardiomyopathy was developed and characterized and markers of oxidative stress were determined in order to evaluate their capacity of distinguishing between compensated and decompensated heart failure.

Also, a proteomics platform was used to probe human heart tissue and plasma for biomarkers. The key concept of proteomics is looking at many proteins at once. This method of investigation opens new possibilities of research for clinically useful biomarkers of disease and prognosis, as candidate biomarkers are being discovered in a hypothesis-free way, which implies no knowledge of an *a priori* pathophysiologic mechanism and thus reduces the bias in the identification of new biomarkers.

The present work highlights the usefulness of already established HF biomarkers for DCM and also proposes new candidate biomarkers for DCM diagnosis and prognosis.

Originality and innovative contributions of the thesis

The present work consists of four original studies that revolve around cardiovascular biomarkers. Each study points out the importance of biomarkers for DCM in its original way.

The first study is a retrospective database study. This study is the first in Romania because it highlights the usefulness of some routinely used HF markers for prognosis in DCM, but also the need for new and specific DCM markers to facilitate clinical decision-making.

The second study presents the development of an animal model of heart failure by abdominal aortic banding. Its originality consists of a modification produced during

AAB that leads to the development of decompensated HF in 24 weeks in rats. Also, the usefulness of malondyaldehyde and superoxide dismutase has been tested in order to differentiate between compensated and decompensated HF.

The implications of the proteomics-identified candidate-biomarkers are tremendous, as some of them may prove to present diagnostic or prognostic value after further testing and supply the much needed biomarkers for DCM.

Selective references

2. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2012 Aug;14(8):803–69.

38. Pop C, Crisan G, Loghin F, Mogosan C. Advances in the detection and quantification of candidate and established biomarkers in heart failure. *Rev Rom Med Lab.* 2013;21(3):255–65.

41. Anderson NL, Ptolemy AS, Rifai N. The riddle of protein diagnostics: future bleak or bright? *Clin Chem.* 2013 Jan;59(1):194–7.

42. Piran S, Liu P, Morales A, Hershberger RE. Where genome meets phenome: rationale for integrating genetic and protein biomarkers in the diagnosis and management of dilated cardiomyopathy and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2012 Jul 24;60(4):283–9.

74. Dubois E, Fertin M, Burdese J, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Cardiovascular proteomics: translational studies to develop novel biomarkers in heart failure and left ventricular remodeling. *Proteomics Clin Appl.* 2011 Feb;5(1-2):57–66.

76. Hammer E, Goritzka M, Ameling S, Darm K, Steil L, Klingel K, et al. Characterization of the human myocardial proteome in inflammatory dilated cardiomyopathy by label-free quantitative shotgun proteomics of heart biopsies. *J Proteome Res.* 2011 May 6;10(5):2161–71.

139. Pop C, Ameling S, Empen K, Rüdebusch J, Dhople VM, Felix SB, et al. Proteome analysis of heart biopsies using a TRIzol-based protein extraction. *Clin Chim Acta* 2015;438:246–7.

144. Pop C, Mogosan C, Loghin F. Evaluation of Rapigest efficacy for the digestion of proteins from cell cultures and heart tissue. *Clujul Med.* 2014; DOI: 10.15386/cjmed-367