
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Polimorfisme genetice și profilul metabolomic în insuficiența cardiacă

Doctorand **Mălina Petrescu (căs. Suciu-Petrescu)**

Conducător de doctorat Prof. dr. **Anca Dana Buzoianu**

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Date generale despre insuficiența cardiacă.	17
Epidemiologie	
2. Comorbidități asociate insuficienței cardiace	19
3. Biomarkeri în insuficiența cardiacă	23
3.1. Troponinele	23
3.2. Proteina C reactivă	24
3.3. Peptidele natriuretice	24
3.4. ST2	26
3.5. Galectin 3	27
3.6. Matrix metalloproteinazele (MMP) și inhibitorii tisulari ai metalloproteinazei (TIMP)	28
3.7. MicroARN-uri	28
3.8. Cystatin C	30
3.9. Polimorfismul <i>ACE</i> și <i>ACE2</i>	31
3.10. Polimorfismul <i>MCP-1</i>	32
3.11. Biomarkeri metabolomici	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
2. Metodologie generală	39
3. Studiul 1 - Corelații ale polimorfismelor genetice <i>ACE2</i> și <i>MCP-1</i> cu parametrii ecocardiografici în insuficiența cardiacă	43
3.1. Introducere	43
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	44
3.3. Material și metodă	44
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	54
3.6. Concluzii	56
4. Studiul 2 - Profilul comorbidităților non-cardiace și al altor parametri în insuficiența cardiacă cu fracție de ejeție redusă, ușor redusă și prezervată.	59
4.1. Introducere	59
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	59
4.3. Material și metodă	59

4.4. Rezultate	61
4.5. Discuții	69
4.6. Concluzii	74
5. Studiul 3 - Profilul metabolomic în insuficiența cardiacă	75
5.1. Introducere	75
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	76
5.3. Material și metodă	76
5.4. Rezultate	80
5.5. Discuții	93
5.6. Concluzii	95
6. Concluzii generale (sinteză)	97
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	101
REFERINȚE	103

Cuvinte cheie: insuficiență cardiacă, biomarkeri, polimorfisme genetice ale *ACE2* și *MCP-1*, profil metabolomic, comorbidități

Introducere

Insuficiența cardiacă rămâne o problemă majoră de sănătate publică. În ciuda progreselor înregistrate în domeniul cardiologiei, această patologie prezintă o morbiditate și mortalitate crescută, necesitând frecvent spitalizări repetate cu repercursiuni economice importante asupra sistemului de sănătate.

Clasificarea insuficienței cardiace în cele trei tipuri în funcție de fracția de ejeție a ventriculului stâng (insuficiență cardiacă cu fracție de ejeție redusă, ușor redusă și preservată) este lipsită de sensibilitate și specificitate și se bazează pe date ecocardiografice. Biomarkerii de diagnostic utilizați în insuficiența cardiacă sunt reprezentați de peptidele natriuretice de tip BNP sau NT-proBNP, dar acestea nu pot distinge între cele trei tipuri de insuficiență cardiacă. De asemenea există mulți factori care pot influența secreția peptidelor natriuretice.

Polimorfismele genetice sunt implicate în patogeneza insuficienței cardiace, în evoluția acesteia, dar pot influența și prognosticul sau răspunsul la tratament. Este bine cunoscut faptul că sistemul renină-angiotensină-aldosteron joacă un rol important în progresia insuficienței cardiace. Hiperactivitatea sistemului renină-angiotensină-aldosteron prezintă un efect profibrotic important, fiind implicat în promovarea remodelării cardiace adverse. Hipertrofia ventriculară stângă rămâne un factor de risc major în dezvoltarea disfuncției miocardice.

S-a studiat influența variantelor genetice implicând sistemul renină-angiotensină-aldosteron și a altor căi fiziopatologice și susceptibilitatea de a dezvolta insuficiență cardiacă, dar studiile sunt limitate în ceea ce privește impactul asupra remodelării cardiace din insuficiența cardiacă.

Studierea profilului metabolomic în insuficiența cardiacă câștigă un interes semnificativ în domeniul cardiologiei prin potențialul evidențierii unor noi căi moleculare fiziopatologice în insuficiența cardiacă. Prin cuantificarea simultană a unei varietăți mari de metaboliți plasmatici, analizele metabolomice își propun identificarea unor noi biomarkeri cu scop prognostic și diagnostic independent de BNP/NTproBNP atât pentru diferențierea între HFpEF, HFmrEF și HFrEF, pentru un tratament mai specific în special pentru HFpEF/HFmrEF și nu în ultimul rând pentru o mai bună înțelegere a acestui sindrom complex.

În concluzie, identificarea unor noi biomarkeri prognostici și diagnostici în insuficiența cardiacă cu aplicabilitate clinică rămâne imperativă.

Contribuția personală

Ipoteza de lucru/obiective

Lucrarea de față își propune identificarea unor noi biomarkeri moleculari genetici și metabolomici în insuficiența cardiacă, precum și caracterizarea factorilor de risc, a comorbidităților asociate și a terapiei pacienților cu insuficiență cardiacă cu fracție de ejeție redusă (HFrEF), ușor redusă (HFmrEF) și prezervată (HFpEF).

Studiile cercetării de față au următoarele obiective principale:

1. Evaluare polimorfismelor uninucleotidice ale *ACE2* (rs4646156, rs4646174) și *MCP-1* (rs1024611) și impactul asupra remodelării cardiace la pacienți diagnosticați cu insuficiență cardiacă.

2. Evaluarea profilului comorbidităților non-cardiace și a factorilor de risc în funcție de tipul de insuficiență cardiacă (HFrEF, HFmrEF, HFpEF).

3. Realizarea profilului metabolic plasmatic de acilcarnitine la pacienți cu insuficiență cardiacă și la grupul control, identificarea acilcarnitinelor care diferă semnificativ statistic între grupurile cu diferite tipuri de IC luate în studiu (HFpEF, HFmrEF, HFrEF) versus grup control, respectiv identificarea acilcarnitinelor care au potențialul să discrimineze între grupurile de pacienți luate în studiu și au potențial de biomarkeri de diagnostic sau prognostic

Studiul 1- Corelații ale polimorfismelor genetice *ACE2* și *MCP-1* cu parametrii ecocardiografici în insuficiența cardiacă

Obiective. Studiul de față își propune să evalueze trei polimorfisme uninucleotidice (SNP) ale genelor *ACE2* (rs4646156, rs4646174) și *MCP-1* (rs1024611) și posibilele lor corelații cu parametrii ecocardiografici implicați în remodelarea cardiacă la pacienți diagnosticați cu insuficiență cardiacă.

Material și metodă. Studiul a inclus 116 pacienți cu vârsta medie 69±8 ani diagnosticați cu insuficiență cardiacă în clasa funcțională New York Heart Association (NYHA) II-IV, care au fost evaluați clinic, biologic, ECG, ecocardiografic. Genotiparea SNP-urilor s-a efectuat prin metoda PCR în timp real (Real Time Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) utilizând sonde TaqMan prefabricate standard pentru fiecare SNP în parte.

Rezultate și concluzii. Studiul nostru a arătat o asociere între parametrii ecocardiografici ai remodelării cardiace și polimorfismele uni-nucleotidice ale genelor *ACE2* și *MCP-1* la pacienți caucazieni cu insuficiență cardiacă. Pentru modelul dominant, purtătorii AA ai polimorfismului rs1024611 al *MCP-1* au prezentat o hipertrofie ventriculară stângă semnificativă. Am observat o asociere între masa indexată a ventriculului stâng, dimensiunile atriului și ventriculului stâng cu polimorfismul rs4646156 al *ACE2*, cu semnificație statistică pentru modelul codominant. Pacienții cu genotipul CC al rs 4646174 al *ACE2* au prezentat dimensiuni crescute ale ventriculului stâng și o masă a ventriculului stâng mai mare cu semnificație statistică. Purtătorii genotipului CC al rs 4646174 al *ACE2* au avut tendință către o fracție de ejeție redusă, dar fără semnificație statistică.

Studiul 2- Profilul comorbidităților non-cardiace și al altor parametri în insuficiența cardiacă cu fracție de ejeție redusă, ușor redusă și prezervată.

Obiective. Studiul de față își propune analiza profilului comorbidităților non-cardiace într-un grup mixt de pacienți diagnosticați cu insuficiență cardiacă cu fracție de ejeție redusă, ușor redusă și prezervată.

Material și metodă. Studiul a inclus 126 pacienți diagnosticați cu insuficiență cardiacă în clasa funcțională NYHA II-IV, care au fost evaluați d.p.d.v clinic, biologic, ECG, ecocardiografic, al comorbidităților asociate, al tratamentului medicamentos.

Rezultate și concluzii.

Am studiat nouă comorbidități non-cardiace într-un grup mixt de pacienți cu insuficiență cardiacă cu fracție de ejeție redusă, ușor redusă și prezervată: anemia, boala cronică de rinichi, diabetul zaharat de tip II, boala cronică obstructivă pulmonară, obezitatea, disfuncția hepatică și tiroidiană, boala arterială periferică, atacul vascular cerebral.

Cele mai frecvente comorbidități non-cardiace au fost diabetul zaharat tip II, boala cronică de rinichi și obezitatea.

Cu excepția BPOC, care a avut cea mare prevalență în HFrEF, majoritatea comorbidităților evaluate au fost mai frecvente în HFpEF. Prevalența comorbidităților studiate în HFmrEF s-a situat între HFpEF și HFrEF. Nivelul NTpro-BNP-ului a fost semnificativ mai mic în grupul pacienților HFpEF. Nu au existat variații semnificative ale NT-proBNP-ului în funcție de comorbiditățile asociate.

Pacienții au prezentat o prevalență crescută a diabetului zaharat tip II, comparativ cu alte studii citate în literatură de specialitate.

Fibrilația atrială a avut cea mai crescută prevalență în HFpEF, cu semnificație statistică.

Studiul 3- Profilul metabolomic în insuficiența cardiacă

Obiective. Studiul de față își propune realizarea profilului metabolic plasmatic al acilcarnitinelor la pacienți cu insuficiență cardiacă și la grupul control, identificarea acilcarnitinelor care diferă semnificativ statistic între grupurile cu diferite tipuri de IC luate în studiu (HFpEF, HFmrEF, HFrEF) versus grup control, respectiv identificarea acilcarnitinelor care au potențialul să discrimineze între grupurile de pacienți luate în studiu și au potențial de biomarkeri de diagnostic sau prognostic.

Material și metodă. Studiul a inclus 92 pacienți diagnosticați cu insuficiență cardiacă cu fracție de ejeție redusă, ușor redusă, prezervată și un grup de 30 martori. Analizele moleculare de metabolomică s-au efectuat utilizând spectrometria de masă cu mobilitate ionică cuplată cu cromatografie de lichide (UPLC-MS).

Rezultate. În cazul primului model, control vs HFpEF, acilcarnitinele C9:1.1, C20:4.1, C20:2, C11:2.1, C18:2-OH prezintă valori AUC între 0.84 și 0.97 ceea ce le conferă o acuratețe diagnostică excelentă sau foarte bună.

Pentru cel de-al doilea model, control vs HFmrEF, acilcarnitinele C9:1.1, C20:4.1, C11:2.1, C12:1, C6:1 prezintă valori AUC între 0.87 și 0.98, ceea ce le conferă o acuratețe diagnostică excelentă sau foarte bună.

Pentru cel de-al treilea model, control vs HFrEF, acilcarnitinele C18:2-OH, C20:4, C8:1-OH.4, C18:1-OH.1 au prezentat AUC între 0.83 și 0.98.

La analiza biomarkerilor cu potențial prognostic, C20:4 s-a corelat semnificativ cu agravarea disfuncției sistolice a ventriculului stâng în insuficiența cardiacă, fiind un potențial biomarker prognostic în insuficiența cardiacă.

Concluzii. A fost identifiat un grup de acilcarnitine cu lanțuri de diferite lungimi care are potențial de biomarkeri de discriminare între grupurile de pacienți cu HFpEF, HFmrEF, HFrEF și control având o acuratețe diagnostică excelentă sau foarte bună. C20:4 reprezintă un potențial biomarker cu valoare prognostică în insuficiența cardiacă.

PHD THESIS SUMMARY

Genetic polymorphism and metabolomic profiling in heart failure

PhD fellow: **Mălina Petrescu (Suciu-Petrescu)**

PhD scientific coordinator: Prof. dr. **Anca Dana Buzoianu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of contents

Introduction	13
Current state of art	
1. General data on heart failure. Epidemiology	17
2. Comorbidities associated with heart failure	19
3. Biomarkers in heart failure	23
3.1. Troponins	23
3.2. C reactive protein	24
3.3. Natriuretic peptides	24
3.4. ST2	26
3.5. Galectin 3	27
3.6. Matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)	28
3.7. MiRNAs	28
3.8. Cystatin C	30
3.9. Genetic polymorphism of <i>ACE</i> and <i>ACE2</i>	31
3.10. Genetic polymorphism of <i>MCP-1</i>	32
3.11. Metabolomic biomarkers	33
Personal contribution	
1. Work hypothesis and objectives	39
2. General methodology	39
3. Study 1 - Correlations of genetic polymorphism of <i>ACE2</i> and <i>MCP-1</i> with echocardiography parameters in heart failure	43
3.1. Introduction	43
3.2. Work hypothesis/objectives	44
3.3. Materials and methods	44
3.4. Results	46
3.5. Discussion	54
3.6. Conclusion	56
4. Study 2 - Non-cardiac comorbidity profile and other parameters in heart failure with reduced, mid-range and preserved ejection fraction.	59
4.1. Introduction	59
4.2. Work hypothesis/objectives	59
4.3. Materials and methods	59
4.4. Results	61
4.5. Discussion	69
4.6. Conclusion	74
5. Study 3 - Metabolomic profiling in heart failure	75
5.1. Introduction	75

5.2. Work hypothesis/objectives	76
5.3. Materials and methods	76
5.4. Results	80
5.5. Discussion	93
5.6. Conclusion	95
6. General conclusion	97
7. Originality and innovative contribution	101
References	103

Key words: heart failure, biomarkers, genetic polymorphism of *ACE2* and *MCP-1*, metabolomic profiling, comorbidities

Introduction

Heart failure remains a major public health problem. Despite the progress recorded in the field of cardiology, this pathology presents an increased morbidity and mortality, frequently requiring repeated hospitalizations, having important economic repercussions on the health system.

The classification of heart failure into the three types according to the ejection fraction of the left ventricle (heart failure with reduced, mid-range and preserved ejection fraction) is lacking in sensitivity and specificity and is based on echocardiographic data.

BNP or NT-pro-BNP are the diagnostic biomarkers used in heart failure, but they can't distinguish between the three types of heart failure. Moreover, there are multiple factors that can influence the secretion of natriuretic peptides. Having this context, the identification of new diagnostic and prognostic biomarkers in heart failure, especially in heart failure with preserved/mildly-reduced ejection fraction, remains imperative.

Genetic polymorphisms are involved in the pathogenesis of heart failure, in its evolution, but they can also influence the prognosis or the response to treatment. It is well known that the renin-angiotensin-aldosterone system plays an important role in the progression of heart failure. Hyperactivity of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays an important role for the progression of heart failure. Hyperactivity of RAAS has a profibrotic effect, being involved in the promotion of adverse cardiac remodeling. Left ventricular hypertrophy remains a major risk factor for the development of myocardial dysfunction.

The influence of genetic variants involving RAAS or other pathophysiologic pathways and the susceptibility for developing heart failure was studied, but studies are limited regarding the impact on cardiac remodeling in heart failure.

The study of metabolomic profiling in heart failure is gaining significant interest in the field of cardiology by its potential for revealing new pathophysiological molecular pathways. By simultaneously quantifying a large variety of plasma metabolites, metabolomic analysis aims to identify new biomarkers with prognostic and diagnostic significance, independent of BNP/NT-pro-BNP, targeting a better differentiation between heart failure with preserved (HFpEF)/mildly reduced (HFmrEF) /reduced ejection fraction (HFrEF), a more specific treatment, especially for HFmrEF/HFpEF and for a better understanding of this complex syndrome.

In conclusion, identification of new prognostic and diagnostic biomarkers with clinical applicability in heart failure

Personal contribution

Work hypothesis and objectives

The present work aims to identify new genetic and metabolic biomarkers in heart failure, to characterize the risk factors and the associated comorbidities and therapies of patients with heart failure with reduced (HFmrEF), mildly reduced (HFmrEF) and preserved ejection fraction (HFpEF).

The present research studies have the following main objectives:

1. Evaluation of uninnucleotide genetic polymorphism of *ACE2* (rs4646156, rs4646174) and *MCP-1* (rs1024611) and their impact on cardiac remodeling in patients with heart failure.
2. Evaluation of non-cardiac comorbidities and risk factors depending on heart failure type (HFrEF, HFmrEF, HFpEF).
3. Evaluation of plasma metabolic profiling of acylcarnitines in patients with heart failure and controls, identification of acylcarnitines which differ significantly between groups and have a potential diagnostic or prognostic significance.

Study 1- Correlations of genetic polymorphism of *ACE2* and *MCP-1* with echocardiography parameters in heart failure

Objectives. The present study aims to evaluate three single nucleotide polymorphisms (SNP) of *ACE2* (rs4646156, rs4646174) and *MCP-1* (rs1024611) genes and their possible correlations with echocardiographic parameters involved in cardiac remodeling in patients diagnosed with heart failure.

Materials and methods. The study included 116 patients with an average age of 69±8 years diagnosed with heart failure in functional class NYHA II-IV, who were evaluated clinically, biologically, with the use of echocardiography and electrocardiography. Genotyping of SNPs was performed by real-time PCR method (Real Time Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) using standard prefabricated TaqMan probes for each SNP.

Results and conclusions.

1. Our study showed an association between echocardiographic parameters of cardiac remodeling and SNPs of *ACE2* and *MCP-1* genes in Caucasian patients with heart failure.
2. For the dominant model, AA carriers of rs1024611 of *MCP-1* showed a significant left ventricular hypertrophy.
3. For the codominant model we observed an association between LV mass, the dimensions of LA, LV and rs4646156 of *ACE2*.
4. Patients with CC genotype of rs4646174 of *ACE2* showed increased LV dimensions and statistically significant larger LV mass.

Study 2 - Non-cardiac comorbidity profile and other parameters in heart failure with reduced, mid-range and preserved ejection fraction.

Objectives. The present study aims to analyze the profile of non-cardiac comorbidities in a mixed group of patients diagnosed with heart failure with reduced, mildly reduced and preserved ejection fraction.

Materials and methods. The study included 126 patients diagnosed with heart failure in NYHA class II-IV, who were evaluated based on clinical, biological, ECG and echocardiography data, associated comorbidities and drug treatment.

Results and conclusions. We studied nine non-cardiac comorbidities in a mixed group of patients with heart failure with reduced, mildly reduced and preserved ejection fraction: anemia, chronic

kidney disease, type II diabetes, chronic obstructive pulmonary disease, obesity, liver and thyroid dysfunction, peripheral arterial disease, stroke.

The most frequent non-cardiac comorbidities were type II diabetes, chronic kidney disease and obesity. With exception of COPD, which had the highest prevalence in HFrEF, most of the assessed comorbidities were more frequent in HFpEF.

The prevalence of the studied comorbidities in HFmrEF was between HFpEF and HFrEF.

The NT-proBNP level was significantly lower in the HFpEF group. There were no significant variations of NT-proBNP depending on the associated comorbidities.

Patients presented an increased prevalence of type II diabetes, compared to other studies.

Atrial fibrillation had the highest prevalence in HFpEF, with statistical significance.

Study 3- Metabolomic profiling in heart failure

Objectives. The present study performs the plasma metabolic profile of acylcarnitines in patients with heart failure (HFpEF, HFmrEF, HFrEF) and a control group with the aim to identify the acylcarnitines that differ statistically between groups or have the potential for a diagnostic or prognostic biomarker.

Material and methods. The study included 92 patients diagnosed with HFrEF, HFmrEF, HFpEF and a group of 30 controls. Molecular metabolomic analyses were performed using liquid chromatography-coupled ion mobility mass spectrometry (UPLC-MS).

Results. For the first model, controls vs HFpEF, acylcarnitines C9:1.1, C20:4.1, C20:2, C11:2.1, C18:2-OH presented AUC values between 0.84 and 0.97, which confers them an excellent or very good diagnostic accuracy.

For the second model, controls vs HFmrEF, acylcarnitines C9:1.1, C20:4.1, C11:2.1, C12:1, C6:1 presented AUC between 0.87 and 0.98, which confers them an excellent or very good diagnostic accuracy.

For the third model, controls vs HFrEF, acylcarnitines C18:2-OH, C20:4, C8:1-OH.4, C18:1-OH.1 presented AUC between 0.83 and 0.98.

Analysing the prognostic potential, C20:4 was significantly correlated with worsening left ventricular systolic dysfunction, being a potential prognostic biomarker in heart failure.

Conclusions. A group of acylcarnitines with different chain lengths having the potential of a discriminating biomarker with excellent or good accuracy was identified between patients with HFpEF, HFmrEF, HFrEF and a control group.

C20:4 may have a potential as a prognostic biomarker in heart failure.