

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**ROLUL METALOPROTEINAZELOR ÎN PROGRESIA
CARDIOMIOPATIEI DILATIVE**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

PROF.UNIV. DR. SIMIONESCU CRISTIANA EUGENIA

STUDENT-DOCTORAND:

MITRUȚ RADU

CRAIOVA

2019

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. Epidemiologia și etiologia cardiomiopatiei dilatative

CAPITOLUL II. Biomarkeri ai matrixului extracelular cu rol în cardiomiopatia dilatativă

CAPITOLUL III. Rolul matrix metaloproteinazelor și al inhibitorilor acestora în progresia fibrozei din cardiomiopatia dilatativă

CAPITOLUL IV. Factori de prognostic în cardiomiopatia dilatativă

CONTRIBUȚII PROPRII

Motivația și scopul studiului

CAPITOLUL V. Material și metode

CAPITOLUL VI. Rezultate

VI.A. Studiul histopatologic al miocardului în cardiomiopatia dilatativă

VI.B. Studiul imunohistochimic al expresiei MMP și TIMP în cardiomiopatia dilatativă

CAPITOLUL VII. Discuții

VII.A. Discuții asupra studiului histopatologic în cardiomiopatia dilatativă

VII.B. Discuții asupra studiului imunohistochimic privind expresia MMP și TIMP în cardiomiopatia dilatativă

CAPITOLUL VIII. Concluzii

BIBLIOGRAFIE

INTRODUCERE

Cardiomiopatiadilatativă (CMD) este caracterizată în principal prin mărirea sau dilatarea cavităților ventriculare cu disfuncție sistolică și creșterea grosimii peretelui ventricular stâng, constituind cea mai comună formă de cardiomiopatie și în mare parte o cauză comună a leziunilor miocardice ireversibile. Este indusă de factori genetici sau de mediu și se manifestă clinic de cele mai multe ori în deceniul al treilea sau al patrulea de viață, dar și în cazul copiilor. Are o prevalență estimată de 1 / 2500, și o incidență de 1 / 15.000-18.000 pe an la adulți și o prevalență estimată de la copiii de 2 / 3 [20, 44].

CMD se caracterizează prin remodelare și disfuncție cardiacă, constituind o cauză majoră a insuficienței cardiace [47]. Din punct de vedere fiziopatologic, fibrogeneza este considerată factorul pivot ce conduce la maladaptarea și insuficiența cardiacă [22]. Matricea extracelulară (MEC) a cordului este o entitate dinamică care suferă o fluctuație constantă, iar integritatea structurii sale este menținută în echilibru de funcția metaloproteinazelor matriceale (MMP) și a inhibitorilor tisulari (TIMP). În CMD nivelele MMP și TIMP sunt modificate, rezultând un dezechilibru între aceste două familii de proteine.

În acest studiu ne-am propus investigarea imunoexpresiei MMP și TIMP în CMD. Caracterizarea imunohistochimică a markerilor selecționați în raport cu caracteristicile histopatologice, poate duce la clarificarea unor aspecte privind comportamentul biologic al pacienților cu CMD, în vederea unei mai bune stratificări a pacienților pentru identificarea posibilelor terapii personalizate.

Cuvinte cheie: cardiomiopatia dilatativă, histopatologie, imunohistochimie, matrix metaloproteinaze

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. Epidemiologia și etiologia cardiomiopatiei dilatative. Grupul de lucru al Societății Europene de Cardiologie a definit CMD ca pe o afecțiune miocardică progresivă și de obicei ireversibilă, caracterizată prin dilatarea ventriculului stâng sau a ambilor ventriculi și disfuncție contractilă sistolică globală, care nu este explicată prin condiții de supraîncărcare cronică cum ar fi hipertensiunea și tulburările valvulare sau boala arterială coronariană pentru a provoca o afecțiune sistolică globală [26]

Date exacte în ceea ce privește epidemiologia CMD sunt dificil de obținut, ceea ce face ca prevalența și incidența bolii să fie greu de apreciat [28], deoarece diagnosticul bolii nu are orientări clinice stricte, faza subclinică este asimptomatică și de obicei ramâne nedagnosticată. În plus, CMD are o frecvență redusă raportat la populația generală, multe rapoarte stabilind diagnosticul după efectuarea autopsiei [14]. În Europa, rata incidenței CMD estimată cu ocazia autopsiei este de 4,5 cazuri la 100.000 de persoane / an, iar incidența clinică este de 6,95 la 100 000 de persoane/an [28]. Boala este mai frecventă la bărbați decât femeii (3 / 1: bărbați / femeii) și se manifestă clinic într-un interval larg de vârstă, dar apare cel mai frecvent în decadele a treia și a patra de viață [20 24].

Bazat pe implicarea predominantă a organelor, American Heart Association clasifică CMD ca pe o cardiomiopatie primitivă atunci când boala afectează numai miocardul și ca pe o cardiomiopatie secundară atunci când face parte dintr-o boală ce afectează mai multe organe [5]. Societatea Europeană de Cardiologie clasifică CMD într-o formă familială genetică și o formă familială non-genetică [26]. Astfel de diferențe în clasificarea CMD au implicații clinice importante privind diagnosticul, tratamentul și prognosticul bolii.

CAPITOLUL II. Biomarkeri ai matrixului extracelular cu rol în cardiomiopatia dilatativă. Pentru a implementa cu maximă utilitate diferitele strategii terapeutice, trebuie înțeleasă în primul rând diversitatea mecanismelor care stau la baza CMD, prin studiul numeroșilor biomarkeri implicați în progresia bolii. Ca urmare, descoperirea genelor și biomoleculilor care reglează remodelarea cardiacă va permite dezvoltarea de noi terapii clinice. Astfel, biomarkerii implicați în apariția și progresia CMD reflectă de fapt diferitele procese patobiologice care intervin în evoluția bolii, incluzând: activarea neurohormonală, stresul oxidativ, remodelarea matricială, inflamația, etc. (tabel 3).

Tabel 3. Biomarkerii implicați în CMD [6, 13]

CATEGORII DE BIOMARKERI	BIOMARKERI
Biomarkeri ai remodelării MEC	MMP, TIMP, Peptidele colagenului, Cardiotrofina-1
Biomarkeri neurohormonali	Renina, Angiotensina, Aldosteron, Endotelina-1, Vasopresina
Biomarkeri ai inflamației	Proteina C reactivă, peptide natriuretice de tip B, mieloperoxidaza, galectina-3, chemerina, α -TNF, IL 1, IL 6, IL 18
Biomarkeri ai stresului oxidativ	Oxidul nitric, Radicalii liberi de oxigen
Alți biomarkeri	Tenascina-C, miARN, TLR

CAPITOLUL III. Rolul matrix metaloproteinazelor și a inhibitorilor acestora în progresia fibrozei din cardiomiopatia dilatativă. MMP sunt o familie de enzime latente de zinc și de calciu, care atunci când sunt activate, sunt responsabile de distrugerea MEC în multe boli [30]. Deși fibroza MEC face parte din patologia CDM, procesul de formare și progresie al acesteia nu este pe deplin înțeles. Progresia remodelării ventriculare este mediată prin distrugerea de către MMP a colagenului și elastinei, conducând la hipertrofie și dilatare ventriculară, a cărei consecință ar putea fi insuficiența cardiac congestivă severă. S-a constatat că MMP cu rol în remodelarea miocardică sunt colagenazele (MMP-1 și MMP-13), gelatinazele (MMP-2 și MMP-9), stromelizina (MMP-3) tip MMP (MMP-14) [21, 36, 37] (tabel 4).

Tabel 4. MMP potențial relevante în CMD

Tip	Subtip	Număr	Substrat
Colagenaze	Colagenaza interstițială	MMP-1	Colagenul I, II, III, VII și componente ale membrane bazale
	Colagenaza neutrofilă	MMP-8	Colagenul I, II, III
	Colagenaza 3	MMP-13	Colagenul I, II, III
Gelatinaze	Gelatinaza A	MMP-2	Gelatinele, colagenul I, II, III, VII și componente ale membrane bazale
	Gelatinaza B	MMP-9	Gelatinele, colagenul I, II, III, VII și componente ale membrane bazale
Stromelizina	Stromelizina 1	MMP-3	Fibronectina, laminina, colagenul III, IV, IX, și activarea MMP
MMP de tip membranar	MT1-MMP	MMP-14	Colagenul I, II, III, fibronectina, laminina și activarea proMMP-2 și proMMP-13

În condiții normale, sistemul MMP / TIMP se află într-un echilibru dinamic, dar în condiții patologice există o supraexpresia MMP și scăderea expresiei TIMP [27]. Numeroase MMP și TIMP s-au dovedit a fi asociate cu prognosticul pe termen lung în insuficiența cardiacă și CMD, dar asocierea cu fibroza cardiacă nu a fost demonstrată [15]. TIMP se leagă la MMP și formează complexe MMP-TIMP care au rol de control inhibitor asupra MMP. Mai multe studii au evidențiat relația dintre MMP și TIMP și faptul că modificările aportului MMP / TIMP se corelează cu hipertrofia și dilatarea ventriculului stâng [48]. Pierderea controlului inhibitor al TIMP asupra MMP se corelează cu progresia remodelării ventriculului stâng prin creșterea activității MMP, a proteolizei MEC și al remodelării miocardice [34].

CAPITOLUL IV. Factori de prognostic în cardiomiopatia dilatativă. Pentru elaborarea unui prognostic cât mai fidel al pacienților cu CMD, este necesară o stratificare mai precisă a riscului de deces. Mai multe studii pe cazuistici mai ample, au raportat ca principali predictorii ai prognosticului CMD caracteristicile morfologice, clinice, hemodinamice și electrocardiografice, alături de variabile de laborator și terapia aplicată [1, 11, 13, 25] (tabel 5).

Tabel 5. Caracteristici ale prognosticului nefavorabil în CMD

CARACTERISTICI	PARAMETRI
Caracteristici clinice	Sexul, Vârsta, clasa NYHA, Istoricul, Semne de insuficiență cardiacă dreaptă

Caracteristici ventriculografice	Scăderea raportului masa/volum ventricular, Anomaliaglobală a mișcării peretelui ventricular, Scăderea fracției de ejeecție a ventriculului stâng, Dimensiunea diastolică mare a ventriculului stâng, Dilatarea ventriculului drept, Geometria sferică a ventriculului stâng
Caracteristicile electrocardiografice	Fibrilație atrială, Bloc AV de gradul I / II, Bloc de ramură stânga Tahicardie ventriculară
Caracteristici hemodinamice	Indicele cardiac, Creșterea presiunii atriale drepte, Presiune arterială medie scăzută, Presiunea capilară pulmonară > 20 mm Hg
Variabilele de laborator	Angiotensina II, Factorul natriuretic atrial, Epinefrina (adrenalina), Norepinefrina (noradrenalina)
Terapia aplicată	Enzimele de conversie a angiotensinei, blocantele receptorilor angiotensinei II, β -blocantele, transplantul cardiac, etc

CONTRIBUȚII PROPRII

MOTIVAȚIA ȘI SCOPUL STUDIULUI. Identificarea relațiilor dintre expresia markerilor analizați și amploarea modificărilor evaluate histopatologic, pot permite elaborarea de noi criterii de stratificare a pacienților cu această boală în vederea aplicării de terapii eficiente.

Obiectivele specifice studiului includ:

1. Extinderea cunoștințelor legate de modificările histopatologice și imunohistochimice implicate în CMD, cu scopul de a aprofunda patofiziologia bolii;
2. Identificarea relațiilor dintre expresia MMP și TIMP în CMD.
3. Stabilirea utilității markerilor imunohistochimici investigați în raport cu parametrii histopatologici de agresivitate ai CMD, în vederea unei mai bune stratificări a pacienților pentru identificarea posibilelor terapii personalizate.

CAPITOLUL V. Material și metode. Studiul efectuat, de tip analitic retrospectiv și prospectiv, a cuprins un număr de 48 de cazuri, care au provenit de la pacienți cu diagnosticul de CMD internați și decedați în cadrul secției de Cardiologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova. În plus, am introdus în studiu și 6 cazuri de fragmente de cord normal recoltate cu ocazia necropsiei de decedați fără patologie cardiacă.

- Studiul **histopatologic** al cazurilor investigate, a urmărit identificarea amplitudinii modificărilor atât ale miocitelor cât și ale componentelor interstițiului miocardic. Fragmentele de cord prelevate au fost fixate în formol 10% tamponat, prelucrate prin tehnica uzuală de includere la parafină (procesorul automat de țesuturi BioOptica), urmată de secționarea la 3-5 μ m și colorarea cu Hemalaun-Eozină (kit BioOptica), tricromic Masson (kit BioOptica), PAS albastru-alcian (kit BioOptica) (automat de colorare BioOptica). Parametrii histopatologici au fost reprezentați de:
 - la nivelul miocitelor: modificări ale volumului miocitelor, dimensiunilor și formei acestora, precum și modificări structurale ale citoplasmei și nucleului;
 - la nivel interstițial: fibroza, lipomatoza și a infiltratului inflamator.

Pentru evaluarea semicantitativă am urmărit aprecierea conform unei scale cu 3 grade: gradul 1 – focal \leq 10% gradul 2 - zonal 10-50%, gradul 3 – difuz \geq 50%. Am considerat un SHC scăzut pentru valoarea cuprinsă între 1-6 și SHC înalt pentru cazurile cu valori cuprinse între 8-12.

Pentru prelucrarea **imunohistochimică** au fost selectate 46 de cazuri, reprezentate de fragmente de cord normal (6 cazuri) și de la pacienți cu diagnosticul clinic de CMD (40 cazuri) cu

SHC scăzut sau înalt. Studiul imunohistochimic a fost unul de tip *cu detecție enzimatică* folosind ca metodă de lucru tehnica LSAB-HRP (Labelled Streptavidin-Biotin2 System Horseradish Peroxidase, Dako, cod K0675). Anticorpul utilizat în acest studiu sunt redați în tabelul 6 împreună cu clona și sursa lor, diluția utilizată, modul de demascare și țesutul folosit pentru controlul extern.

Tabel 6. Panel cu anticorpul utilizat în studiul imunohistochimic

Anticorp	Clona / Sursa	Diluția	Demascarea	Control extern
MMP-1	EP1247y	1/50	Tris-EDTA buffer pH 9.0	Testicul
MMP-2	A-Gel VC2	1/50	Citrat, pH 6	Placenta
MMP-3	1B4	1/50	Citrat, pH 6	Prostata
MMP-8	Policlonal	1/50	Citrat, pH 6	Splina
MMP-9	2C3	1/50	Citrat, pH 6	Plămân
MMP-14	113 – 5B7	1/50	Citrat, pH 6	carcinom mamar
TIMP-1	EPR18352	1/500	Tris-EDTA buffer pH 9.0	Ficat
TIMP-2	3A4	1/500	Citrat, pH 6	Rinichi

Pentru cuantificarea semicantitativă a markerilor analizați, am folosit un sistem de notare care a evaluat intensitatea reacțiilor: scor 3 (intens), scor 2 (moderat), scor 1 (slab).

Scorurile obținute au fost apoi raportate la valorile SHC. Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul pachetului de programe Microsoft Excel (Microsoft Office 2007), folosind testul –” χ^2 ” (chi- pătrat) pentru evidențierea diferențelor semnificative dintre diversele grupuri.

CAPITOLUL VI. Rezultate. Caracteristicile **histopatologice** ale miocardului de la cei 48 de pacienți decedați cu diagnosticul de CMD au fost variate, dar destul de nespecifice.

Caracteristici		Gradul 1	Gradul 2	Gradul 3	Absență
Reducerea masei miocitare	Nr. cazuri	26	8	0	14
	Procente%	54,2	16,3	0	28,5
Atrofia	Nr. cazuri	29	8	2	9
	Procente%	60,4	8,3	4,2	18,7
Degenerescenta vacuolară	Nr. cazuri	19	11	3	15
	Procente%	39,6	22,9	6,2	31,3
Miocitoliza	Nr. cazuri	7	0	0	41
	Procente%	14,6	0	0	85,4
Acumulare de mucină	Nr. cazuri	7	1	0	40
	Procente%	14,5%	2,1	0	83,4
Pleiomorfismul nuclear	Nr. cazuri	22	5	2	19
	Procente%	45,8	10,4	4,2	25
Fibroza	Nr. cazuri	11	27	10	0
	Procente%	22,9	56,2	16,6	0

Miocitele au avut dispoziție arhitecturală normală, dar au prezentat modificări ale volumului masei miocitare, ale dimensiunilor și formei, precum și modificări structurale ale citoplasmei și nucleului. Citoplasma miocitelor a prezentat numeroase modificări, cum sunt: degenerescenta vacuolară, miocitoliza, reducerea numărului de miofibrile, acumularea de pigment

lipofuscinic sau de mucină. Nucleii miocitelor au avut de asemenea modificări, atât de formă cât și de tinctorialitate. În plus, am analizat mai mulți indicatori morfometrici în cordul normal și cu CMD, cu scopul de a identifica indicatorii ce pot caracteriza modificările nucleare din cordul cu CMD (aria nucleară, perimetrul nuclear, raportul diametrelor, rotunjimea nucleară).

Pentru cele 48 de cazuri de CMD luate în studiu am calculat scorul histopatologic compozit (SHC) prin însumarea valorilor acordate fiecărui parametru histopatologic analizat (tabel 18).

Tabel 18. Distribuția cazuisticii în funcție de valoarea SHC

	SHC scăzut	SHC înalt
Nr. cazuri	39	9
Procente%	81,2	18,8

Am analizat **imunohistochimic** un număr de 46 de cazuri reprezentate de fragmente de cord normal (6 cazuri) și provenite de la pacienți cu diagnosticul clinic de CMD (40 cazuri) cu SHC scăzut sau înalt. Pentru toate cazurile luate în studiu am urmărit expresia:

- collagenazelor: MMP-1, MMP-8
- stromelizinelor: MMP-3
- gelatinazelor: MMP-2, MMP9,
- MMP – membranare: MMP-14,
- Inhibitorilor tisulari ai MMP: TIMP1 și TIMP2.

- Imunoreacția pentru MMP-1 a fost identificată în toate cazurile investigate, atât în cordul normal cât și în cele cu CMD selectate. Am constatat că intensitatea crescută a reacției pentru MMP-1 a fost prezentă doar la nivelul elementelor stromale. Analiza intensității MMP1 în raport cu SHC a indicat diferențe nesemnificative ($p=0.081$, χ^2 test). Cu toate acestea am constatat o asociere a intensității crescute a marcajelor cu SHC scăzute.

- Imunoreacția pentru MMP-8 a fost identificată în toate cazurile control, precum și în toate cazurile de CMD selectate. Intensitatea imunoexpresiei MMP-8 au fost moderată în cordul normal comparativ cu cel cu CMD în care intensitatea colorării a fost moderată sau crescută. Analiza intensității MMP8 în raport cu nivelul SHC a indicat diferențe semnificative ($p<0.001$, χ^2 test), intensitatea crescută a marcajelor fiind asociate SHC scăzute.

- Imunocolorarea pentru MMP-3 a fost identificată în toate cazurile de cord normal, precum și în toate cu cele cu CMD. Paternul expresiei MMP-3 a fost asemănător în cordul normal comparativ cu cel cu CMD, cu imunocolorare la nivel citoplasmatic, doar în miocardocite. Analiza intensității MMP3 în raport cu nivelul SHC a indicat diferențe nesemnificative ($p=0.083$, χ^2 test). Cu toate acestea am constatat o asociere a intensității slabe și moderate a marcajelor cu SHC scăzute.

- Imunoreacția pentru MMP-2 a fost identificată în 31 din cazuri cu CMD (90%) analizate și în toate cazurile de cord normal. Colorarea pentru MMP-2 a fost prezentă la nivelul miocardocitelor și stromei, cu intensitate predominant moderată. Analiza intensității MMP2 în raport cu nivelul SHC a indicat diferențe semnificative ($p=0.002$, χ^2 test), intensitatea crescută a marcajelor fiind asociată SHC scăzut.

- Imunoreacția pentru MMP-9 a fost identificată în 37 din cazurile de CMD selectate (92,5%) și în toate cazurile de cord normal. Colorarea pentru MMP-9 a avut intensitate predominant moderată, localizată la nivelul miocardocitelor cât și al celulelor stromale. Analiza intensității MMP-9 în raport cu nivelul SHC a indicat diferențe nesemnificative ($p=0.062$, χ^2 test).

Cu toate acestea am constatat o asociere a intensității crescute și moderate a marcajelor cu SHC scăzut.

- Imunoreacția pentru MMP-14 a fost identificată în 33 din cazurile de CMD selectate (82,5%) și absentă în cazurile de cord normal. Colorarea pentru MMP-14 a fost prezentă doar la nivelul miocardocitelor, cu intensitate predominant moderată. Analiza intensității MMP14 în raport cu nivelul SHC a indicat diferențe semnificative ($p < 0.001$, χ^2 test), intensitatea slabă sau moderată a marcajelor fiind asociată cu SHC scăzut.

- Imunoreacția pentru TIMP-1a fost identificată în 34 din cazurile de CMD selectate (85%) și în toate cazurile de cord normal. TIMP-1 a prezentat colorare cu intensitate predominant moderată, localizată la nivelul miocardocitelor și al celulelor stromale. Analiza intensității TIMP1 în raport cu nivelul SHC a indicat diferențe semnificative ($p < 0.001$, χ^2 test), intensitatea moderată a marcajelor fiind asociată cu SHC scăzut.

- Imunoreacția pentru TIMP-2a fost identificată în toate cazurile de CMD selectate, precum și în toate cazurile control. TIMP2 a prezentat colorare cu intensitate predominant moderată la nivelul miocardocitelor și stromei. Analiza intensității TIMP-2 în raport cu nivelul SHC a indicat diferențe semnificative ($p < 0.001$, χ^2 test), intensitatea moderată și crescută a marcajelor fiind asociată cu SHC scăzut.

CAPITOLUL VII. Discuții. *Discuții asupra studiului histopatologic în cardiomiopatia dilatativă.* Caracteristicile histopatologice ale cardiomiopatiei dilatative sunt nespecifice, diagnosticul fiind unul de excludere [7]. Prin urmare, rolul biopsiei endomiocardice în elaborarea diagnosticului de CMD este unul de excludere a cauzelor secundare. Aspectele descrise pe biopsiile endomiocardice provenite de la pacienții cu CMD variază de la diferențe minime ale dimensiunilor miocitelor la cele destul de tipice ale bolii, cu variații marcate ale dimensiunii miofibrilelor, pierderea miofibrilelor și fibroză interstițială [7, 18]. Într-un studiu, autorii au raportat asocierea fibrozei interstițiale, cu hipertrofia miofibrilelor, alături de degenerarea și atrofia miocitelor în 60% din cazurile de CMD investigate [2]. Atrofia miocitară este frecvent menționată între trăsăturile histopatologice ale CMD [18], fiind definită prin prezența de miocite alungite, subțiri, cu o bordură citoplasmatică îngustă, aspectul ondulat al acestora constituind o imagine ce indică supraîntinderea lor. Degenerescența vacuolară are valoare diagnostică redusă, dar poate avea implicații clinice importante în funcție de conținutul vacuolelor, care analizate electronoptic pot evidenția conținutul acestora și pot conduce la diagnosticul corect [41]. Una din modificările frecvent menționate la nivelul citoplasmei miocardiocitelor din CMD, o reprezintă acumularea de pigment lipofuscinic [9, 32, 35]. Pleiomorfismul nuclear este frecvent descris în CMD, prin prezența demiocite care au nucleei dismetrici și dismorfici [3, 18, 29, 31]. Cea mai tipică modificare din CMD este dezvoltarea fibrozei interstițiale și perivasculare, de diferite grade [18, 33]. În CMD formarea fibrozei este un proces continuu, spre deosebire de ischemia miocardică și de cardiomiopatia hipertrofică în care formarea acesteia se oprește după atingerea unui anumit grad [4, 16, 42]. Fibroza miocardică observată în cardiomiopatia dilatativă este o acumulare reactivă a țesutului conjunctiv în spațiul interstițial al miocardului cu scopul de a umple spațiul restant în urma pierderii miocitelor [10].

Discuții asupra studiului imunohistochimic privind expresia MMP și TIMP în cardiomiopatia dilatativă. Matrixul extracelular (MEC) este responsabilă pentru disponerea celulelor cardiace și asigură integritatea structurală a miocardului. În miocardul normal sinteza și degradarea MEC sunt procese echilibrate care se desfășoară strict controlat [45, 46]. În procesele patologice apare un dezechilibru al sistemelor proteinază / antiproteinază, având ca urmare

modificări cantitative și calitative ale structurii MEC [48]. În procesele de proteoliză sunt implicate toate cele patru categorii de proteinaze: serine, cisteine, proteinaze aspartice și MMP. Deoarece colagenul reprezintă proteina structurală majoră a MEC, MMP colagenolitice joacă rol esențial în remodelarea cardiacă.

Mai multe studii, au identificat anomalii ale expresiei și activității MMP miocardice în CMD, precum și o asocierea acestora cu progresia remodelării ventriculului stâng [8, 12, 17, 39, 40, 49]. Studiile pe modelele animale au indicat producție crescută de MMP odată cu inițierea dilatării ventriculului stâng și ar putea constitui un eveniment precoce în CMD. Ulterior, progresia CMD este caracterizată printr-o scădere a activității MMP, datorită creșterii producției TIMP [22]. Dintre cele 26 de MMP clonate și caracterizate la vertebrate, cele implicate în remodelarea miocardică sunt MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-28 și MMP de tip membranar (MT1-MMP / MMP-14) [40, 38, 23]. De obicei, colagenazele (MMP-1, MMP-8 și MMP-13) inițiază procesul de degradare prin scindarea tuturor celor trei lanțuri ale α -colagenului nativ de tip I, II și III [19]. Gelatinazele (MMP-2 și MMP-9) digeră aceste produse în peptide mai mici care sunt apoi scindate de proteazele nespecifice [19]. La pacienții cu CMD în stadiu final, analiza țesutului miocardic provenit din ventriculul stânga indicat scăderea expresiei MMP-1, creșterea expresiei MMP-3, MMP-9, TIMP-1 și TIMP-2 și lipsa modificării expresiei MMP-2 [43]. Se apreciază că diferențele de expresie între nivelurile MMP și TIMP favorizează o activare persistentă a MMP miocardice și contribuie probabil la procesul de remodelare al MEC din insuficiența cardiacă [39].

CAPITOLUL VIII. Concluzii. Studiul a inclus un număr de 48 de cazuri de cardiomiopatie dilatativă și a permis următoarele observații:

Analiza *histopatologică* a relevat modificări atât ale miocardocitelor cât și ale interstițiului miocardic, a căror amploare a permis calcularea SHC:

- pentru miocardocite am observat o combinație de miocardocite hipertrofice, atrofice și normale, frecvent asociate cu modificări citoplasmice și nucleare.
- modificările citoplasmice au fost reprezentate de degenerescența hidropică (68,7%), miocitoliză (14,6%), acumulare citoplasmică de lipofuscină (47,9%) și mucină (14,5%).
- modificările nucleare reprezentate de pleiomorfismul nuclear a fost observat în 60,4% din cazuri; analiza indicatorilor morfometrici nucleari cum sunt aria și perimetrul nuclear nu a relevat diferențe semnificative comparativ cu cordul normal, spre deosebire de rotunjimea nucleară și raportul diametrelor nucleare care au prezentat diferențe semnificative comparativ cu cordul normal.
- la nivel interstițial am observat modificări de fibroză (100%), lipomatoză (25%) și rareori prezența infiltratului limfocitar (16,6%) și mastocitar (10,4%).
- cea mai mare parte a cazurilor au corespuns unui SHC scăzut, respective 39 de cazuri (81,2 %), și doar 10 cazuri (18,8 %) au prezentat SCH înalt.

Analiza *imunohistochimică* a urmărit analiza intensității expresiei colagenazelor MMP-1 și MMP-8, stromelizinei MMP-3, gelatinazelor MMP-2 și MMP9, MMP– membranare MMP-14, precum și a inhibitorilor tisulari au MMP, respectiv TIMP1 și TIMP2.

- analiza intensității imunoexpresiei colagenazelor MMP-1 și MMP-8, în raport cu SHC a indicat pentru MMP-1 diferențe nesemnificative, cu asocierea intensității crescute a marcajelor în CMD cu SHC scăzut, spre deosebire de MMP-8 care a prezentat diferențe semnificative, intensitatea crescută a marcajelor fiind asociată SHC scăzut.

- identificarea unui semnal cu localizare nucleară pentru MMP-1, deschide un nou domeniu de cercetare în biologia celulară.
- analiza intensității imunoexpresiei stromelizinei MMP-3 în raport cu SHC a indicat diferențe nesemnificative, cu o asociere a intensității slabe și moderate a marcajelor cu SHC scăzut.
- analiza intensității imunoexpresiei gelatinazelor MMP-2 și MMP-9 în raport cu SHC, a indicat pentru ambele gelatinize diferențe semnificative, intensitatea crescută a marcajelor fiind asociate SHC scăzut pentru MMP-2, spre deosebire de MMP-9 care a prezentat o asociere a intensității crescute și moderate a marcajelor cu SHC scăzut.
- analiza intensității imunoexpresiei MMP-14 în raport cu SHC, a indicat diferențe semnificative, intensitatea slabă sau moderată a marcajelor fiind asociate SHC scăzut.
- analiza intensității imunoexpresiei TIMP-1 și TIMP-2 în raport cu SHC, a indicat diferențe semnificative, intensitatea moderată a marcajelor fiind asociate SHC scăzut.
- expresia MMP și TIMP în miocardul pacienților cu CMD este strâns asociată cu remodelarea miocardică și deteriorarea ulterioară a performanței cardiace.
- raportul MMP / TIMP servește ca un marker al dezvoltării fibrozei în matricea extracelulară, cu valoare prognostică în bolile cardiovasculare
- aceste corelații pot fi utile pentru o mai bună stratificare a pacienților în vederea evaluării prognosticului și a identificării de posibile ținte terapeutice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Albakri A. Dilated cardiomyopathy: A review of literature on clinical status and meta-analysis of diagnostic and clinical management *J Clin Invest Stud.* 2018;1(1):1-13
2. Almazán A, Murillo H, Badui E. Usefulness of endomyocardial biopsy in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Arch Inst Cardiol Mex.* 1989;59(6):573-7
3. Basso C, Ronco F, Marcus F, et al., Quantitative assessment of endomyocardial biopsy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an in vitro validation of diagnostic criteria, *Eur Heart J.* 2008;29(22):2760-71
4. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, et al., The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:291–305
5. Bozkurt B, Colvin M, Cook J, et al., Current diagnostic and treatment strategies for specific dilated cardiomyopathies: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation,* 2016;134(23): e579-646
6. Braunwald, E. Biomarkers in heart failure. *New England Journal of Medicine.* 2008;358: 2148- 59
7. Burke AP, Dilated Cardiomyopathy Pathology, 2015; <http://emedicine.medscape.com/article/2017823-overview>
8. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, et al., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15:63-74
9. Czarnowska E, Bierła JB, Toczek M, et al., Narrow time window of metabolic changes associated with transition to overt heart failure in Tgaq*44 mice. *Pharmacol Rep.* 2016;68(4):707-14
10. de Leeuw N, Ruiters DJ, Balk AH, et al., Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy, *Transplant International,* 2001;14:299-306
11. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1994;331:1564

12. Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res.* 2006;69:666-76
13. Dookhun MN, Sun YL, Zou HYY, et al., Classification of New Biomarkers of Dilated Cardiomyopathy Based on Pathogenesis—An Update. *Health.* 2018;10, 300-12
14. Francone M. Role of cardiac magnetic resonance in the evaluation of dilated cardiomyopathy: diagnostic contribution and prognostic significance. *ISRN Radiology.* 2014;365404
15. Franz M, Berndt A, Neri D, et al., Matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, B γ tenascin-C and EDA γ fibronectin in dilated cardiomyopathy: potential impact on disease progression and patients' prognosis. *Int J Cardiol.* 2013;168:5344–51
16. Gabler U, Berndt A, Kosmehl H, et al. Matrix remodelling in dilated cardiomyopathy entails the occurrence of oncofetal fibronectin molecular variants. *Heart.* 1996;75:358–62
17. Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, et al., Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy: role of metalloproteinases and pyridinoline cross links *Am J Pathol.* 1996;148:1639-48
18. Hershberger RE, Morales A. Dilated Cardiomyopathy Overview, 2007; In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017
19. Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, et al., Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload *Cardiovascular Research.* 2006;69(3):657–65
20. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 2010;375:752–62
21. Kassiri Z, Khokha R. Myocardial extra-cellular matrix and its regulation by metalloproteinases and their inhibitors. *ThrombHaemost.* 2005;93:212-9
22. Louzao-Martinez L, Vink A, Harakalova M, et al., Characteristic adaptations of the extracellular matrix in dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology.* 2016;220:634-46
23. Ma Y, Chiao YA, Zhang J, Manicone AM, et al. Matrix metalloproteinase-28 deletion amplifies inflammatory and extracellular matrix responses to cardiac aging. *MicroscMicroanal.* 2012;18: 81-90
24. Merlo M, Pivetta A, Pinamonti B, et al. Long-term prognostic impact of therapeutic strategies in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: changing mortality over the last 30 years. *Eur J Heart Fail.* 2014;16:317–24
25. Moorthy A, Kallarakkal JT. Understanding Cardiomyopathy: Practical Guidelines. http://www.apiindia.org/medicine_update_2013/chap30.pdf
26. Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, et al., Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J.* 2016;37:1850-8
27. Polyakova V, Loeffler I, Hein S, et al. Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/ TIMP profiles. *Int J Cardiol.* 2011;151:18–33
28. Rakar S, Sinagra G, Di Lenarda A, et al., Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies. The Heart Muscle Disease Study Group. *Eur Heart J.* 1997;18(1):117-23

29. Rochael MC, Higuchi ML, Lopes EA. Bizarre nuclei of myocardial fibers in an infant with dilated cardiomyopathy. Light, electron-microscopic, and immunoperoxidase studies of a necropsy case. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1990;3(4):321-4
30. Rutschow S, Li J, Schultheiss HP, et al., Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res.* 2006;69:646–56
31. Ryan TD, Gupta A, Gupta D, et al., Dilated cardiomyopathy in a 32-year-old woman with Russell-Silver syndrome. *Cardiovasc Pathol.* 2014;23(1):21-7
32. Saito T, Asai K, Sato S, et al., Autophagic vacuoles in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy with initially decompensated heart failure predict improved prognosis. *Autophagy.* 2016;12(3):579-87
33. Sanderson JE, Olsen EG, Gatei D. Dilated cardiomyopathy and myocarditis in Kenya: an endomyocardial biopsy study. *Int J Cardiol.* 1993;41:157–63
34. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, et al., Tumor necrosis factor- α -converting enzyme and tumor necrosis factor- α in human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1999; 99: 3260–5
35. Schaper J, Kostin S, Hein S, et al., Structural remodelling in heart failure. *Exp Clin Cardiol.* 2002 Fall;7(2-3):64-8
36. Schupp DJ, Huck BP, Sykora J, et al., Right ventricular expression of extracellular matrix proteins, matrix-metalloproteinases, and their inhibitors over a period of 3 years after heart transplantation. *Virchows Arch.* 2006;448:184–19
37. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, et al., A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation.* 2000;102:1944-9
38. Spinale FG, Wilbur NM. Matrix metalloproteinase therapy in heart failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2009;11: 339-46
39. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002;90:520–30
40. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87:1285–342
41. Takemura G, Kanamori H, Okada H, et al., Ultrastructural aspects of vacuolar degeneration of cardiomyocytes in human endomyocardial biopsies. *Cardiovasc Pathol.* 2017;30:64-71
42. Tamura A, Kusachi S, Nogami K, et al., Tenascin expression in endomyocardial biopsy specimens in patients with dilated cardiomyopathy: distribution along margin of fibrotic lesions. *Heart.* 1996;75:291–4
43. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, et al., Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1998;97:1708-15
44. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, et al., Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA.* 2006;296(15):1867-76
45. Tyagi SC, Kumar SG, Alla SR, et al., Extracellular matrix regulation of metalloproteinase and antiproteinase in human heart fibroblast cells. *J Cell Physiol.* 1996 Apr;167(1):137-47
46. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, et al., Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:279–92
47. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 2017;22;390(10092):400-414
48. Woessner JF Jr. That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *J Clin Invest.* 2001;108:799–800

49. Yokoseki O, Yazaki Y, Imamura H, et al., Association of matrix metalloproteinase expression and left ventricular function in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J.* 2000;64(5):352-7