
TEZĂ DE DOCTORAT

Valoarea diagnostică și prognostică a biomarkerilor și a polimorfismului genetic la pacienții cu insuficiență cardiacă și diabet zaharat tip 2

Doctorand **Raluca-Diana Ianoș**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Lucia Maria Procopciuc**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	14
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Insuficiența cardiacă și diabetul zaharat de tip 2. Date epidemiologice	19
2. Fiziopatologia insuficienței cardiace la pacienții cu diabet zaharat tip 2	23
3. Diagnosticul cardiomiopatiei diabetice în stadiu subclinic și clinic	27
4. Biomarkeri pentru stabilirea diagnosticului și a prognosticului insuficienței cardiace la pacienții cu diabet zaharat tip 2	31
4.1 Peptidele natriuretice	31
4.2 Factorul de creștere al fibroblaștilor-21	32
4.3 Galectina-3	35
4.4 Copeptina	37
5. Sistemul renină-angiotensină-aldosteron (SRAA)	39
5.1 Fiziologia SRAA	39
5.2 Activarea SRAA în cardiomiopatia diabetică	40
5.3 Activarea SRAA în obezitate	
6. Polimorfismul genetic al angiotensinogenului	43
6.1 Polimorfismul M235T	43
6.2 Polimorfismul T174M	44
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	49
2. Metodologie generală	51
3. Studiul 1 - Performanța diagnostică a biomarkerilor serici FGF 21, galectina 3 și copeptina pentru insuficiența cardiacă cu fracție de ejeție păstrată la pacienții cu diabet zaharat tip 2	59
3.1. Introducere	59
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	62
3.3. Material și metodă	63
3.4. Rezultate	65
3.5. Discuții	72
3.6. Concluzii	76
Studiul 2 - Valoarea predictivă a NT-proBNP, FGF21, Galectina-3 și Copeptina în insuficiența cardiacă moderată/severă la pacienții cu fracție de ejeție păstrată sau ușor redusă și diabet zaharat tip 2	79
4.1. Introducere	79
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	81
4.3. Material și metodă	82
4.4. Rezultate	84

4.5. Discuții	95
4.6. Concluzii	
5. Studiul 3-Analiza polimorfismelor M235T și T174M în gena angiotensinogenului ca factori de risc pentru insuficiența cardiacă severă	101
5.1. Introducere	101
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	102
5.3. Material și metodă	102
5.4. Rezultate	104
5.5. Discuții	112
5.6. Concluzi	115
7. Concluzii generale	117
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	121
REFERINȚE	123

INTRODUCERE

Insuficiența cardiacă și diabetul zaharat de tip 2 sunt două patologii puternic interconectate, a căror asociere implică un risc crescut de morbiditate și mortalitate. Identificarea pacienților diabetici cu risc de a dezvolta insuficiență cardiacă, precum și diagnosticul acestui sindrom în stadii incipiente, sunt de mare importanță în vederea inițierii tratamentului pentru întârzierea progresiei clinice, scăderea riscului de evenimente cardiovasculare majore și a mortalității.

Cardiomiopatia diabetică (CMPD) reprezintă o condiție fiziopatologică unică, definită de modificări structurale și funcționale, inclusiv hipertrofie ventriculară stângă, fibroză și semnalizarea celulară alterată. Primele două stadii sunt de obicei asimptomatice sau oligosimptomatice și constau în fenotipuri atribuite exclusiv diabetului, în timp ce ultimele două stadii sunt definite de boala cardiacă manifestă clinic, pe fondul deteriorării micro și macrovasculare și asociază frecvent patologii suplimentare cum ar fi hipertensiunea arterială sau boala coronariană ischemică.

Fiind o entitate din ce în ce mai recunoscută, este necesară o bună înțelegere a mecanismelor fiziopatologice pentru diagnosticarea precoce și dezvoltarea strategiilor terapeutice menite să reducă riscul de dezvoltare a insuficienței cardiace la pacienții diabetici .

Prevalența CMPD este în creștere, în tandem cu ascensiunea alarmantă a prevalenței diabetului zaharat tip 2 .

Datele epidemiologice recente arată că cele mai comune fenotipuri ale CMPD sunt disfuncția diastolică ventriculară stângă asimptomatică și insuficiența cardiacă cu fracție de ejeție păstrată (ICFEp).

Cercetările indică faptul că citokinele, inclusiv diverși biomarkeri serici, suferă modificări semnificative în stadiile incipiente ale dezvoltării CMPD, sugerând posibilitatea utilizării lor în diagnosticarea precoce. Prin urmare, este esențială identificarea unor biomarkeri cu specificitate și sensibilitate ridicate pentru a stabili o metodă eficientă de diagnostic precoce.

În această cercetare ne-am îndreptat atenția asupra insuficienței cardiace cu fracție de ejeție păstrată (ICFEp) și ușor scăzută (ICFEur) asociate diabetului zaharat tip 2. Considerăm că abordarea acestei tematici este de actualitate în contextul epidemiologic prezent din numeroase motive.

S-a demonstrat că rata de mortalitate la această categorie de pacienți este mai mare decât la pacienții diabetici cu insuficiență cardiacă redusă (ICFEr), prin încărcătura comorbidităților asociate.

În al doilea rând, diagnosticul ICFEp reprezintă o provocare, metoda "gold standard" pentru o evaluare exhaustivă fiind una invazivă și anume cateterismul cardiac drept. Algoritmii de diagnostic ai ICFEp propuși încadrează de cele mai multe ori pacienții într-o clasă de probabilitate intermediară a acestui diagnostic. Astfel, până la o treime dintre pacienții cu ICFEp rămân nediagnosticsați. Peptidele natriuretice de tip B sunt biomarkerii convenționali recomandați în ghidurile actuale pentru aprecierea diagnosticului, severității și al prognosticului. Cu toate acestea, utilizarea lor prezintă limitări, valoarea acestora fiind influențată în anumite condiții. De asemenea, studiile recente au demonstrat o suprapunere a valorilor peptidelor natriuretice între clasele funcționale NYHA. În ultimii ani s-au efectuat cercetări cu privire la implicarea noilor biomarkeri în insuficiența cardiacă, însă majoritatea au înrolat pacienți cu ICFEr.

În această lucrare am evaluat rolul biomarkerilor FGF-21, galectina-3, copeptina în diagnosticul ICFEp la pacienții cu DZ tip 2, performanța acestora și a biomarkerului convențional NT-pro BNP în a distinge sau a prezice formele moderate sau severe de ICFEp/ICFEur, evaluarea profilului acestor pacienți din punct de vedere clinic, biologic și ecografic și corelațiile biomarkerilor cu acești parametri.

În ultima parte a cercetării am evaluat o posibilă asociere a polimorfismelor *M235T* și *T174M* din gena angiotensinogenului cu dezvoltarea insuficienței cardiace cu fracție de ejeție păstrată forma severă.

Studiu 1. Performanța diagnostică a biomarkerilor serici FGF 21, galectina 3 și copeptina pentru insuficiența cardiacă cu fracție de ejeție păstrată la pacienții cu diabet zaharat tip 2

Introducere

Mortalitatea datorată cardiomiopatiei asociată DZ este relativ ridicată, cardiomiopia diabetică (CMPD) fiind evidentă până la 60% din cazurile de DZ de tip 2. Definierea precisă a acestei boli este destul de provocatoare, având în vedere că majoritatea pacienților cu diabet zaharat (DZ) de tip 2 prezintă boli cardiovasculare asociate. În stadiile incipiente, aceasta include o perioadă subclinică definită de modificări structurale și funcționale, inclusiv hipertrofie ventriculară stângă, fibroză și alterări în semnalizarea celulară. Aceste modificări fiziopatologice evoluează adesea către insuficiență cardiacă. Printre pacienții cu semne și simptome de insuficiență cardiacă (IC), aproximativ 50% au fracția de ejeție a ventriculului stâng păstrată (ICFEp). Majoritatea studiilor observaționale au arătat un risc similar de mortalitate în ICFEp comparativ cu ICFEr, sugerând importanța acestei patologii.

Comparativ cu ICFEr, identificarea optimă a ICFEp rămâne o provocare, mulți pacienți care acuză dispnee fiind subdiagnosticsați. Mai mulți algoritmi de diagnostic, precum scorul H2FPEF, scorul HFA-PEFF și ghidurile Societății Americane de Ecocardiografie (ASE) / Asociația Europeană de Imagistică Cardiovasculară (EACVI), au fost propuși pentru a diagnostica ICFEp. În cazurile în care diagnosticul rămâne incert (obținerea unui punctaj intermediar după calcularea scorurilor), se recomandă teste suplimentare de stres diastolic, cum ar fi ecocardiografia de efort sau cateterismul cardiac drept. Există studii care au demonstrat existența ICFEp prin măsurători hemodinamice invazive ale presiunilor de umplere ale ventriculului stâng la aproximativ 20%-30% dintre pacienții care aveau niveluri ale peptidelor natriuretice sub limitele de diagnostic

Dereglările metabolice prezente la pacienții diabetici sunt adesea însoțite de modificări cardiace care constau în inflamație locală, stres oxidativ, fibroză miocardică și apoptoza cardiomiocitelor. Este de mare interes și utilitate descoperirea unor biomarkeri specifici care să integreze aceste procese, pentru a detecta cardiomiopatia diabetică într-un stadiu incipient și pentru a evalua rolul lor potențial în introducerea unor terapii țintite în vederea a prevenirii progresiei bolii către insuficiența cardiacă severă.

În literatură, rolul galectinei-3 (o lectină care leagă beta-galactozidaza) este subliniat în procesul de fibroză, inflamație și remodelare cardiacă. Expresia sa este scăzută la nivel cardiac, însă este rapid indusă în timpul leziunilor cardiace. Deși nivelurile intracelulare de Gal-3 sunt corelate cu repararea țesuturilor, expresia sa necontrolată contribuie la activarea susținută a macrofagelor și miofibroblastelor prin căi dependente și independente de factorul de creștere transformator beta (TGF- β), rezultând în fibroză tisulară. Nivelurile plasmatiche de Gal-3 au fost propuse ca un bun biomarker pentru predicția disfuncției diastolice a ventriculului stâng și a insuficienței cardiace la pacienții diabetici. Galectina-3 poate prezenta interes terapeutic, deoarece inhibiția sa previne mecanismele pro-inflamatorii și pro-fibrotice în studii animale.

FGF21 este un polipeptid care joacă un rol în reglarea homeostaziei glucozei și metabolismului lipidic, prin reducerea nivelurilor de glucoză plasmatică și scăderea nivelurilor de trigliceride în ficat și ser. Există dovezi că miocitele secretă FGF21 ca factor autocrin, pentru a proteja cordul de remodelarea adversă. Cu toate acestea, nu este clar dacă nivelul seric crescut de FGF21 reprezintă baza patogenezei CMPD sau este o moleculă-cheie implicată în repararea leziunilor asociate. Acest biomarker are o corelație pozitivă semnificativă cu prezența hipertensiunii arteriale, a diabetului zaharat, insuficienței cardiace, bolii coronariene ischemice și bolii arteriale periferice.

Vasopresina secretată de glanda pituitară posterioară este implicată în osmoreglare, având un rol important în fiziopatologia IC. În IC, sistemul vasopresină- argininină contribuie la progresia disfuncției ventriculului stâng prin stimularea directă a hipertrofiei ventriculare stângi și a remodelării miocardice. Deoarece vasopresina este instabilă în plasmă și are un timp de înjumătățire scăzut, coceptina (porțiunea C-terminală a pro-argininei vasopresinei) a fost introdusă ca marker surrogat al vasopresinei și a fost investigat în spectrul bolilor cardiovasculare (inclusiv insuficiența cardiacă) ca marker prognostic.

Material și metodă

Au fost incluși în studiu 69 de pacienți cu DZ tip 2 evaluați la Institutul Inimii Nicolae Stăncioiu din Cluj-Napoca și la Spitalul Județean de Urgență Dr. Constantin Opreș, Baia Mare, care au fost împărțiți în două grupuri: pacienți cu insuficiență cardiacă cu fracție de ejeție păstrată (ICFEp) și pacienți fără insuficiență cardiacă.

Rezultate și concluzii

Vârsta medie a pacienților incluși în studiu este 64 ani, cu predominanța sexului masculin (53%). S-a observat prezența numeroaselor comorbidități cardiovasculare asociate: 86% prezintă HTA, 79% boală coronariană ischemică, 20% fibrilație atrială. Însă fără diferențe semnificative statistice între cele două grupuri. Pacienții cu ICFEp au avut valori semnificativ diferite ale HbA1c față de pacienții fără IC ($p=0.008$). Prezența bolii coronariene multivasculare a fost mai frecventă la pacienții cu ICFEp comparativ cu pacienții fără insuficiență cardiacă ($p = 0.031$). Pacienții cu ICFEp tind să asocieze mai frecvent fibrilație atrială, însă la limita semnificației statistice. Prezența bolii coronariene multivasculare a fost mai frecventă la pacienții diabetici cu ICFEp comparativ cu pacienții fără insuficiență cardiacă, un procent de 57% asociind leziuni bi sau triconariene. Valoarea NT pro BNP a fost semnificativ crescută în grupul pacienților cu ICFEp

Valoarea FGF21 a fost semnificativ mai crescută la pacienții cu ICFEp comparativ cu cei fără IC ($p = 0,001$). Modelul multivariat a demonstrat o bună distincție între pacienți cu un AUC de 0,88, IC 95%:

[0,80, 0,96], PCP = 81,16%, IC 95% PCP: [71,93, 90,39], sensibilitate (Se) = 85% [70,2, 94,3], specificitate (Sp) = 79,3% [60,3, 92,0].

Nu a existat o diferență semnificativ statistică în ceea ce privește concentrațiile de galectină-3 și copeptină între cele două grupuri studiate. Parametrii ecocardiografici precum FEVS, VTSVS, volum AS indexat, suprafața atriului stâng, raport E/e', PSAP, au fost semnificativ diferiți între pacienții cu diabet zaharat și ICFEp și cei fără ICFEp. FGF21 se corelează pozitiv cu parametrii ecocardiografici: volum AS, suprafața AS, volum telediastolic ventricul, stâng, Volum telesistolic ventricul stâng. FGF21 a fost semnificativ asociat cu șansele de a dezvolta ICFEp, însă galectina-3 și copeptina, nu au dovedit o asociere semnificativă cu șansele de a dezvolta ICFEp la pacienții cu DZ tip 2. FGF21 ar putea fi utilizat ca și biomarker nou pentru diagnosticul ICFEp, având o performanță bună în discriminarea acestor pacienți.

Studiu 2. Valoarea predictivă a NT-proBNP, FGF21, Galectina-3 și Copeptina în insuficiența cardiacă moderată/severă la pacienții cu fracție de ejeție păstrată sau ușor redusă și diabet zaharat de tip 2

Introducere

Nivelurile ridicate de BNP și NT-proBNP sunt utilizate ca și markeri ai severității IC și ai prognosticului, fiind asociate cu un risc crescut de evenimente cardiovasculare atât pe termen scurt cât și pe termen lung în IC, inclusiv mortalitate de orice cauză și mortalitate cardiovasculară. Stresul diastolic crescut al peretelui ventricular stâng este considerat principalul factor declanșator pentru eliberarea peptidelor natriuretice, fiind invers proporțional cu grosimea peretelui. Prin urmare, valoarea predictivă negativă excelentă a peptidelor natriuretice se aplică în special în insuficiența cardiacă cu fracție de ejeție scăzută, cu un ventricul stâng dilatat, dar nu neapărat în ICFEp, unde hipertrofia ventriculară stângă tinde să normalizeze stresul parietal. Ghidul American pentru managementul insuficienței cardiace sugerează că biomarkerul implicat în fibroza cardiacă (Gal-3) ar putea fi luat în considerare pentru evaluarea prognosticului și stratificarea riscului de evenimente cardiovasculare, fiind un predictor al respitalizării și al mortalității la pacienții cu IC. De asemenea, oferă o valoare adăugată atunci când sunt utilizate în combinație cu valoarea NT pro BNP pentru evaluarea prognosticului. Obiectivele studiului au fost analiza comparativă a caracteristicilor clinice și paraclinice la pacienții cu insuficiență cardiacă moderată /severă și cei cu insuficiență cardiacă ușoară (conform clasificării funcționale NYHA), analiza nivelurilor serice de NT-proBNP, FGF21, Gal-3 și Copeptină în cele două grupuri studiate, evaluarea performanței NT-proBNP, FGF21, Galectinei-3 și Copeptinei în diferențierea insuficienței cardiace moderate până la severă și cea ușoară.

Material și metodă

În perioada februarie 2019-februarie 2024, au fost înrolați într-un studiu prospectiv un număr de 117 pacienți cu DZ tip 2 și ICFEp și ICFEur, recrutați din cadrul Institutului Inimii „Niculae Stăncioiu” din Cluj-Napoca și a Spitalului Județean de Urgență „Dr. Constantin Oprea” din Baia Mare. Pacienții au fost împărțiți două grupuri în funcție de severitatea simptomelor, utilizând Clasificarea funcțională NYHA (New York Heart Association). Primul grup a cuprins 67 de pacienți cu simptomatologie ușoară, încadrați în clasa funcțională NYHA I-II, diagnosticați cu IC cronică sau ”de novo”, iar al doilea grup a fost compus din 50 de pacienți cu simptomatologie moderată/severă încadrați în clasa funcțională NYHA III-IV, cu IC cronică decompensată sau IC acută ”de novo”.

Rezultate și concluzii

În lotul studiat, vârsta medie a pacienților cu ICFEp/ICFEur și DZ tip 2 a fost de 66 ani, iar un procent de 51,2 % este reprezentat de femei. Pacienții asociază comorbidități multiple, atât cardiovasculare (hipertensiunea arterială, boala coronariană ischemică, fibrilația atrială, ACOMI, AVC) cât și noncardiovasculare (obezitate, BPOC). ICFEp/ICFEur prezintă un fenotip mixt, mai mult de jumătate dintre pacienți asociind obezitate, hipertensiune arterială, boală coronariană ischemică. Pacienții cu obezitate au reprezentat un procent important de 61%. Pacienții cu IC moderată/severă au asociat mai frecvent fibrilația atrială, obezitatea, boală cronică de rinichi, BPOC. Boala coronariană ischemică prin afectare trivasculară a fost prezentă la o treime dintre pacienții diabetici cu ICFEp/ICFEur, însă nu au existat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri cu privire la gradul de afectare coronariană. Tratamentul hipoglicemiant la pacienții cu IC moderată/severă constă predominant în administrarea de insulină, iar la cei cu IC ușoară în administrarea antidiabeticului oral metformin. Un procent important de pacienți, 76%, au un control glicemic suboptimal, cu HbA1c >7%, iar jumătate prezintă valori ale HbA1C >8%. Nu au existat diferențe semnificative pentru valorile HbA1c între cele două grupuri studiate. Pacienții cu ICFEp/ICFEur moderată/severă au rata filtrării glomerulare și hemoglobina mai scăzute și niveluri mai ridicate ale ureei și acidului uric comparativ cu pacienții cu IC ușoară. În ceea ce privește parametrii ecocardiografici, precum volumul atriului stâng indexat (VASi), dimensiunea AS, suprafața AS, Vmax IT, gradientul VD-AD și PSAP au avut valori semnificativ mai mari la pacienții cu IC moderată/severă comparativ cu cei cu IC ușoară.

Nivelurile serice de FGF21 și NT-proBNP au fost semnificativ crescute la pacienții cu DZ tip 2 cu și ICFEp/ICFEur moderat/severă comparativ cu pacienții cu IC ușoară. Studiul a demonstrat că valoare a FGF21 peste valoarea prag de 377 ng/mL indică că șansele de a dezvolta IC moderată/severă sunt de 4,4 ori mai mari după cum arată modelul univariat și de 8 ori mai mari în cazul în care se asociază și alte covariate cum ar fi vârsta, sexul, HTA, obezitatea, fumatul, fibrilația atrială, trigliceridele ≥ 150 mg/dL. În ceea ce privește NT pro BNP, o valoare peste 2379 pg/ml crește șansele de IC moderată/severă de până la 8 ori, ca predictor independent, și de până la 17 ori în cazul în care se asociază covariatele menționate anterior.

Gal-3 și copeptina nu au avut performanța de a diagnostica pacienții cu IC moderată/severă.

Atât NT pro -BNP cât și FGF21 au performanța de a distinge pacienții cu IC moderată/severă. NT pro BNP poate fi utilizat ca și biomarker de diagnostic pentru acest grup de pacienți (având o Specificitate înaltă) de la o valoare prag > 2379 pg/ml. FGF21 poate distinge pacienții cu IC moderată/severă începând cu o valoare prag >377 ng/mL, însă în contextul unei specificități mai scăzute, se recomandă abordarea într-un panel multi-marker care să includă și valoarea NT-pro BNP, pentru îmbunătățirea acurateții diagnosticului.

Studiul 3. Analiza polimorfismelor *M235T* și *T174M* din gena angiotensinogenului ca factori de risc pentru insuficiența cardiacă severă la pacienții cu diabet zaharat tip 2

Introducere

Sistemul renină-angiotensină aldosteron (SRAA) este distribuit în multiple sisteme de organe, în special în rinichi, sistemul vascular și cortexul suprarenal și joacă un rol important în patogeniza hipertensiunii arteriale, a insuficienței cardiace și a altor boli cardiovasculare sau renale. În condiții de

hiperglicemie și rezistență la insulină, activarea crescută SRAA atât la nivel sistemic cât și tisular este implicată în patogeniza cardiomiopatiei diabetice și a insuficienței cardiace. În IC, principalele mecanisme implicate sunt secreția AT II, stimularea receptorilor AT1R, creșterea eliberării de aldosteron care determină fibroză cardiacă, retenția de Na^+ și apă, excreția K^+ la nivel renal, disfuncție endotelială. Polimorfismul genetic crește nivelul circulant în sânge de AGT, amplificând efectele produse de acesta. Polimorfismul AGT se asociază cu multiple boli cardiovasculare, inclusiv cu riscul de infarct miocardic, boala coronariană, insuficiența cardiacă. Alte afecțiuni cum ar fi obezitatea, nefropatia diabetică, depresia, preeclampsia și leziunile hepatice, sunt de asemenea asociate cu anumite variante ale genei AGT. Cele mai comune și semnificative variante ale polimorfismului AGT sunt *M235T* (rs699) și *T174M* (rs4762).

Până în prezent, studiile au demonstrat că polimorfismul *M235T* este asociat cu o susceptibilitate crescută de a dezvolta hipertensiune arterială, boala coronariană ischemică și fibrilație atrială. În ceea ce privește impactul asupra insuficienței cardiace au fost puține cercetări care să evalueze această corelație, iar rezultatele au fost discordante în contextul grupurilor etnice diferite. Prima metaanaliză care a raportat aceste rezultate a fost efectuată în 2014 și a cuprins 6 studii dintre care doar două au inclus pacienți caucazieni. Polimorfismul *T174M* este asociat cel mai frecvent cu hipertensiunea arterială

Obiectivele studiului au fost determinarea frecvenței polimorfismelor *M235* și *T174M* la pacienții cu DZ tip 2 fără insuficiență cardiacă și la cei cu formă severă, determinarea riscului de insuficiență cardiacă severă în asocieră cu polimorfismele *M235T* și *T174M* în gena angiotensinogenului, analiza corelațiilor dintre cele două polimorfisme și parametrii clinici și biologici.

Material și metodă

Au fost înrolați într-un studiu prospectiv un număr de 49 de pacienți cu DZ tip 2 recrutați din cadrul Institutului Inimii „Niculae Stăncioiu” din Cluj-Napoca și a Spitalului Județean de Urgență „Dr. Constantin Opreș” din Baia Mare. Primul grup a cuprins 29 de pacienți cu ICFEp cu simptomatologie severă, încadrați în clasa funcțională NYHA III/IV, iar a doilea grup de control a cuprins 20 de pacienți fără insuficiență cardiacă.

Rezultate și concluzii

Din punct de vedere biologic, pacienții cu ICFEp au avut valori semnificativ mai mari pentru NTproBNP (1938,0 pg/mL [1148,00 ; 3856,00] vs. 114,5 pg/mL [63,75 ; 230], $p < 0.0001$), cât și pentru FGF-21 (624,70 ng/mL [377,50 ; 876,30] vs. 188,10 [109,73; 261,38], $p = 0,00012$

Rezultatele studiului au arătat o frecvență mai mare a genotipului heterozigot mutant M/T pentru polimorfismul *M235T* și respectiv T/M pentru polimorfismul *T174M* în lotul de pacienți cu insuficiență cardiacă severă comparativ cu cei fără insuficiență cardiacă. Nu a fost identificat nici un pacient purtător al genotipului homozigot T/T pentru polimorfismul *M235T* și respectiv M/M pentru polimorfismul *T174M* în lotul de pacienți fără insuficiența cardiacă. Studiul a confirmat faptul că în modelul univariat, polimorfismul *M235T* din gena angiotensinogenului în formă heterozigotă și homozigotă reprezintă un factor de risc pentru insuficiența cardiacă severă. Modelul de regresie logistică multivariabilă a evidențiat că polimorfismul *M235T* (sub modelul codominant, respectiv dominant) este un predictor independent de vârstă și sex pentru riscul de insuficiență cardiacă severă. Prezentul studiu nu a confirmat asocierea variantelor *M235T* și *T174M* din gena angiotensinogenului cu caracteristici clinice, obezitate, fibrilație atrială, HTA ca factori de risc pentru insuficiența cardiacă severă la pacienții cu DZ tip 2.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Asocierea dintre diabetul zaharat tip 2 și insuficiența cardiacă (IC) reprezintă o problemă de sănătate publică majoră, acești pacienți având un risc de morbiditate și mortalitate cardiovasculară mai ridicat decât pacienții fără insuficiență cardiacă. Astfel, se justifică eforturile de dezvoltare a unor instrumente de screening și diagnostic ușor accesibile și fiabile. În același timp, decelarea a unor molecule noi implicate în fiziopatologia cardiomiopatiei diabetice, ar putea deschide noi orizonturi de cercetare spre identificarea unor soluții de tratament cu rol în scăderea morbidității și a mortalității la această categorie de pacienți. În prezent, singura clasă de medicamente care a dovedit o scădere a riscului de respitalizare și mortalitate de orice cauză la pacienții cu ICFeP o reprezintă inhibitorii SGLT2.

Acesta reprezintă primul studiu care a evaluat rolul a trei biomarkeri noi precum FGF-21, galectina-3, coceptina în stabilirea diagnosticului insuficienței cardiace cu fracție de ejeție păstrată la pacienții cu DZ tip 2. Rezultatele acestui studiu afirmă că valorile crescute ale FGF-21 cresc șansele de a dezvolta ICFeP de 4 până la 8 ori. De asemenea, a demonstrat o performanță diagnostică bună prin specificitatea și sensibilitatea crescute. În continuare am evaluat rolul FGF-21, galectinei-3, coceptinei și al biomarkerului convențional NT pro BNP în a distinge sau a prezice formele moderate sau severe de ICFeP/ ICFeur. Am confirmat că NT pro BNP poate fi utilizat ca și biomarker de diagnostic pentru ICFeP/ICFeur forma moderată/severă de la o valoare prag > 2379 pg/m. FGF21 poate distinge pacienții cu IC moderată/severă începând cu o valoare prag >377 ng/ mL, însă în contextul unei specificități mai scăzute, se recomandă abordarea într-un panel multi-marker care să includă și valoarea NT-pro BNP, pentru îmbunătățirea acurateții diagnosticului. Valorile FGF-21 peste valoarea prag enunțată cresc semnificativ riscul de a dezvolta insuficiență cardiacă severă de până la 8 ori. Semnificația valorilor crescute ale acestui biomarker în insuficiența cardiacă este încă incertă, studiile animale relatând un rol protector, fiind implicat în suprimarea diverselor procese patologice care contribuie la dezvoltarea IC, cum ar fi stresul oxidativ, apoptoza, inflamația miocardică și acumularea de lipide. Creșterile excesive în insuficiența cardiacă reflectă o rezistență la FGF-21. Studiile experimentale au demonstrat că administrarea exogenă de FGF-21 are efecte benefice privind ameliorarea profilului glucidic și lipidic și scăderea în greutate, iar un număr tot mai mare de dovezi vin să afirme că FGF21 poate fi o opțiune terapeutică promițătoare în cardiomiopatia diabetică, în special prin reducerea stresului oxidativ, a inflamației apoptozei și acumulării de lipide la nivel miocardic.

În literatură sunt descrise puține studii care au evaluat o posibilă asociere a polimorfismelor *M235T* și *T174M* din gena angiotensinogenului cu dezvoltarea insuficienței cardiace, iar rezultatele au fost discordante în contextul diferențelor etnice. La populația caucaziană, două studii au afirmat o asociere a polimorfismului *M235T* în gena angiotensinogenului cu insuficiența cardiacă. În cercetarea de față am demonstrat că polimorfismul *M235T* din gena angiotensinogenului în formă heterozigotă și homozigotă reprezintă un factor de risc pentru insuficiența cardiacă severă.

Prin această lucrare am reușit să confirmăm datele din literatură referitoare la profilul clinic și paraclinic al pacienților cu DZ tip 2 și ICFeP și am adus o contribuție inovativă prin decelarea unui biomarker nou, și anume FGF-21 care s-a asociat cu șanse crescute de dezvoltare a IC și care are o performanță bună în diagnosticarea ICFeP. Luând în considerare și posibila implicare terapeutică, rezultatele obținute pot fi valoroase și pot reprezenta bazele unor noi direcții de cercetare, în vederea obținerii unui beneficiu real pentru acești pacienți, dată fiind paucitatea mijloacelor de tratament (cu dovezi privind scăderea evenimentelor cardiovasculare majore și a mortalității) și de diagnostic precoce.

PhD THESIS

Diagnostic and prognostic value of
biomarkers and genetic polymorphism
in patients with heart failure and type
2 diabetes mellitus

Doctorand **Raluca-Diana Ianoș**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Lucia Maria Procopciuc**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	14
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Heart failure and type 2 diabetes.Epidemiological data	19
2. Pathophysiology of heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus	23
3. Diagnosis of diabetic cardiomyopathy in subclinical and clinical stages	27
4. Biomarkers for establishing the diagnosis and prognosis of heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus	31
4.1 Natriuretic peptides	31
4.2 Fibroblast growth factor-21	32
4.3 Galectin-3	35
4.4 Copeptin	37
5. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)	39
5.1 Physiology of SRAA	39
5.2 SRAA activation in diabetic cardiomyopathy	40
5.3 SRAA activation in obesity	
6. Genetic polymorphism of angiotensinogen	43
6.1 M235T Polymorphism	43
6.2 T174M Polymorphism	44
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives	49
2. General methodology	51
3. Study 1 - Diagnostic Performance of Serum Biomarkers FGF 21, Galectin 3, and Copeptin for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in Patients With Type 2 Diabetes	59
3.1. Introduction	59
3.2. Working hypothesis/objectives	62
3.3. Materials and Methods	63
3.4. Results	65
3.5. Discussion	72
3.6. Conclusion	76
Study 2 - Predictive Value of NT-proBNP, FGF21, Galectin-3, and Copeptin in Moderate/Severe Heart Failure in Patients With Preserved or Slightly Reduced Ejection Fraction and Type 2 Diabetes Mellitus	79
4.1. Introduction	79
4.2. Working hypothesis/objectives	81
4.3. Materials and Methods	82

4.4. Results	84
4.5. Discution	95
4.6. Conclusions	
5. Study 3-Analysis of M235T and T174M Polymorphisms in the Angiotensinogen Gene as Risk Factors for Severe Heart Failure	101
5.1. Introduction	101
5.2. Working method/objectives	102
5.3. Materials and method	102
5.4. Results	104
5.5. Discussions	112
5.6. Conclusion	115
7. General Conclusions	117
8. Originality and innovative contributions	121
REFERENCES	123

INTRODUCTION

Heart failure and type 2 diabetes mellitus are two highly interconnected conditions whose association significantly increases morbidity and mortality risks. Identifying diabetic patients at risk of developing heart failure, as well as diagnosing this syndrome at its early stages, is critical for initiating treatments aimed at delaying clinical progression, reducing the risk of major cardiovascular events, and lowering mortality.

Diabetic cardiomyopathy (CMPD) is a unique pathophysiological condition characterized by structural and functional changes, including left ventricular hypertrophy, fibrosis, and altered cellular signaling. Early stages are usually asymptomatic or mildly symptomatic, presenting phenotypes attributed exclusively to diabetes. Later stages are marked by clinically manifest heart disease, often on a background of microvascular and macrovascular damage, frequently associated with other pathologies such as hypertension or ischemic coronary artery disease. Given its increasing recognition, understanding the pathophysiological mechanisms of CMPD is necessary for early diagnosis and developing therapeutic strategies to reduce the risk of heart failure development in diabetic patients. The prevalence of CMPD is rising in parallel with the alarming increase in type 2 diabetes prevalence. Recent epidemiological data show that the most common CMPD phenotypes are asymptomatic left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF).

Research suggests that cytokines, including various serum biomarkers, undergo significant changes in the early stages of CMPD development, indicating their potential for early diagnosis. Identifying biomarkers with high specificity and sensitivity is therefore essential to establish effective early diagnostic methods.

This study emphasizes the topic heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) and mildly reduced ejection fraction (HFmrEF) associated with type 2 diabetes. Addressing this topic is highly relevant in the current epidemiological context for several reasons: the mortality rate for diabetic patients with HFpEF is higher than for those with reduced ejection fraction (HFrEF), primarily due to the burden of associated comorbidities. Diagnosing HFpEF is difficult, with invasive procedures like right heart catheterization being the "gold standard" for thorough evaluation. Diagnostic algorithms often categorize patients into an intermediate probability class, leaving up to a third of HFpEF cases undiagnosed. Conventional biomarkers like B-type natriuretic peptides (BNP) are recommended for diagnosis, severity assessment, and prognosis. However, their effectiveness is influenced by various conditions, and recent studies show an overlap of BNP values across NYHA functional classes.

Recent research into new biomarkers for heart failure has mainly focused on HFrEF patients. In this study, we evaluate the diagnostic role of the biomarkers FGF-21, galectin-3, and copeptin in HFpEF associated with type 2 diabetes. The performance of these biomarkers, alongside the conventional NT-proBNP, was assessed for distinguishing or predicting moderate to severe HFpEF/HFmrEF. Additionally, clinical, biological, and echographic profiles of these patients and correlations between biomarkers and these parameters were evaluated.

In the final part of the research, we explored potential associations between M235T and T174M polymorphisms in the angiotensinogen gene and the development of severe HFpEF.

Study 1: Diagnostic Performance of Serum Biomarkers FGF 21, Galectin 3, and Copeptin for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in Patients With Type 2 Diabetes

Introduction

Mortality associated with diabetic cardiomyopathy is relatively high, with CMPD evident in up to 60% of type 2 diabetes cases. Precise disease definition is challenging, as most type 2 diabetes patients exhibit associated cardiovascular diseases. Early stages are marked by subclinical structural and functional changes, including left ventricular hypertrophy, fibrosis, and altered cellular signaling, which frequently progress to heart failure. Among patients with heart failure symptoms, approximately 50% have HFpEF. Observational studies report similar mortality risks between HFpEF and HFrEF, highlighting HFpEF's clinical significance.

In diabetic patients, metabolic disturbances often coexist with cardiac changes such as local inflammation, oxidative stress, myocardial fibrosis, and cardiomyocyte apoptosis. Identifying specific biomarkers that integrate these processes is critical for early CMPD detection and assessing their potential role in targeted therapies to prevent severe heart failure progression.

Galectin-3 is a beta-galactosidase-binding lectin involved in fibrosis, inflammation, and cardiac remodeling. Its expression is low in healthy cardiac tissue but rapidly induced during cardiac injury. Elevated plasma levels correlate with left ventricular diastolic dysfunction and heart failure. Therapeutically, inhibiting galectin-3 may prevent pro-inflammatory and pro-fibrotic mechanisms.

FGF21 is a polypeptide regulating glucose homeostasis and lipid metabolism by lowering plasma glucose and triglyceride levels. Secreted by myocytes, FGF21 acts as an autocrine factor to protect the heart from adverse remodeling. Its elevated serum levels are associated with hypertension, diabetes, heart failure, and ischemic coronary artery disease.

Copeptin is a surrogate marker for vasopressin, which contributes to left ventricular dysfunction and remodeling in heart failure and is useful for prognostic evaluation across cardiovascular diseases.

This study investigates the clinical, echographic, and biomarker profiles of HFpEF in type 2 diabetes patients, focusing on their diagnostic and prognostic potential.

Material and Methods

The study included 69 patients with type 2 diabetes (T2DM) who were evaluated at Nicolae Stăncioiu Heart Institute in Cluj-Napoca and the Dr. Constantin Opreș County Emergency Hospital in Baia Mare. Patients were divided into two groups: those with heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) and those without heart failure.

Results and Conclusions

The average age of the participants was 64 years, with a male predominance (53%). Significant cardiovascular comorbidities were observed across the cohort: Hypertension (HTN): 86%, Ischemic coronary artery disease (CAD): 79%, Atrial fibrillation (AF): 20%.

There were no statistically significant differences in comorbidities between the groups.

Patients with HFpEF had significantly higher HbA1c levels compared to those without heart failure ($p=0.008$). It was more frequently observed in HFpEF patients than in those without HF ($p=0.031$). Specifically, 57% of HFpEF patients had bi- or tri-vessel lesions. HFpEF patients had a higher association with AF, though this finding was near the statistical significance threshold. NT-proBNP levels were significantly higher in the HFpEF group. FGF21 levels were markedly elevated in HFpEF patients compared to non-HF patients ($p=0.001$).

Echocardiographic markers, including indexed left atrial volume, left atrial surface area, E/e' ratio, and pulmonary artery systolic pressure (PASP), differed significantly between the two groups.

FGF21 levels correlated positively with echocardiographic parameters, such as left atrial volume and surface area, as well as left ventricular diastolic and systolic volumes. FGF21 was significantly associated with an increased likelihood of developing HFpEF.

Regarding its diagnostic model performance, the multivariate analysis yielded an AUC of 0.88 (95% CI: 0.80–0.96), with a positive predictive value of 81.16% (95% CI: 71.93–90.39), sensitivity of 85% (70.2–94.3), and specificity of 79.3% (60.3–92.0).

Galectin-3 and copeptin showed no statistically significant differences between HFpEF and non-HF groups and were not associated with an increased risk of HFpEF in T2D patients.

In conclusion FGF21 shows promise as a novel biomarker for diagnosing HFpEF and demonstrates good discriminatory power. However, galectin-3 and copeptin are not effective predictors for HFpEF in this population.

Study 2: Predictive Value of NT-proBNP, FGF21, Galectin-3, and Copeptin for Moderate/Severe HFpEF and HFmrEF in Type 2 Diabetes

Introduction

High levels of BNP and NT-proBNP are established markers of heart failure severity and prognosis, associated with an increased risk of short- and long-term cardiovascular events, including mortality. However, in HFpEF, left ventricular hypertrophy often normalizes wall stress, limiting the predictive utility of natriuretic peptides. Emerging biomarkers like galectin-3, implicated in cardiac fibrosis, and FGF21, associated with metabolic and structural cardiac changes, may offer complementary insights.

Material and Methods

Between February 2019 and February 2024, 117 T2D patients with HFpEF or HFmrEF were enrolled from the same two hospitals. Patients were stratified by severity into two groups based on NYHA functional class: 67 patients with mild heart failure in NYHA class I-II and 50 patients with moderate/severe HF in NYHA class III-IV.

Results and Conclusions

The average age in the study was 66 years, from whom a percent of 51.2% were women.

Comorbidities: such as hypertension, obesity (61%), chronic kidney disease (CKD), and COPD were prevalent.

Regarding the biomarker findings, FGF21 and NT-proBNP were significantly higher in moderate/severe HF patients compared to mild HF. The value of FGF21 >377 ng/mL increased the likelihood of moderate/severe HF by 4.4 times (in univariate analysis) and 8 times when adjusted for covariates (e.g., age, sex, hypertension, obesity). The value of NT-proBNP >2379 pg/mL raised the likelihood of

moderate/severe HF by 8 times independently and 17 times with covariates. The other biomarkers , Galectin-3 and Copeptin did not differentiate between mild and severe HF.

The echocardiographic parameters such as indexed left atrial volume, left atrial size, and PASP were significantly higher in the moderate/severe HF group.

In conclusion, FGF21 and NT-proBNP are valuable biomarkers for distinguishing moderate/severe HF in T2D patients, with NT-proBNP demonstrating higher specificity , but a multimarker panel combining FGF21 and NT-proBNP could improve diagnostic accuracy.

Study 3: Genetic Polymorphisms *M235T* and *T174M* in the Angiotensinogen Gene as Risk Factors for Severe HF in T2D

Introduction

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is present in multiple organ systems, particularly in the kidneys, vascular system, and adrenal cortex. It plays a critical role in the pathogenesis of hypertension, heart failure, and other cardiovascular or renal diseases. Under conditions of hyperglycemia and insulin resistance, increased systemic and tissue-level RAAS activation contributes to the development of diabetic cardiomyopathy and heart failure.

In heart failure, key mechanisms include secretion of angiotensin II (AT II), stimulation of AT1R receptors, Increased aldosterone release, leading to cardiac fibrosis, sodium and water retention, potassium excretion at the renal level, and endothelial dysfunction.

Genetic polymorphisms elevate circulating levels of angiotensinogen (AGT), intensifying its effects. AGT polymorphisms are linked to multiple cardiovascular conditions, including myocardial infarction, coronary artery disease, and heart failure. Other associated conditions include obesity, diabetic nephropathy, depression, preeclampsia, and liver damage. The most common and significant AGT polymorphisms are *M235T* (*rs699*) and *T174M* (*rs4762*). Studies have demonstrated that the *M235T* polymorphism is associated with an increased risk of developing hypertension, ischemic coronary artery disease, and atrial fibrillation. However, research evaluating its impact on heart failure has been limited, and findings have been inconsistent across different ethnic groups. The first meta-analysis to address these findings, conducted in 2014, included six studies, of which only two involved Caucasian patients. The *T174M* polymorphism is most frequently associated with hypertension.

The study objectives were to determine the frequency of *M235T* and *T174M* polymorphisms in type 2 diabetes (T2DM) patients without heart failure and in those with severe heart failure, to assess the risk of severe heart failure associated with these polymorphisms in the angiotensinogen gene (AGT), to analyze the correlations between the two polymorphisms and clinical or biological parameters.

Material and Methods

A prospective study included 49 patients with type 2 diabetes (T2D) recruited from the Nicolae Stăncioiu Heart Institute in Cluj-Napoca and the Dr. Constantin Opreș County Emergency Hospital in Baia Mare. The first group consisted in 29 patients with severe HFpEF symptoms, classified as NYHA functional class III/IV. and the Control group consisted in 20 patients without heart failure.

Results and Conclusions

Regarding the biological findings, patients with HFpEF had significantly higher levels of NT-proBNP (1938.0 pg/mL [1148.00–3856.00] vs. 114.5 pg/mL [63.75–230], $p < 0.0001$) and FGF-21 (624.70 ng/mL [377.50–876.30] vs. 188.10 ng/mL [109.73–261.38], $p = 0.00012$).

A higher frequency of the heterozygous mutant genotype (M/T) for the *M235T* polymorphism and the T/M genotype for the *T174M* polymorphism was observed in patients with severe HF compared to those without HF. No patients in the non-HF group carried the homozygous mutant genotype (T/T for *M235T* or

M/M for *T174M*). The study confirmed that in a univariate model, M235T polymorphism (both heterozygous and homozygous forms) represents a risk factor for severe heart failure. Multivariable logistic regression analysis demonstrated that M235T (in codominant or dominant models) is an independent predictor of severe heart failure risk, unaffected by age or sex. The study did not find a significant association between M235T and T174M polymorphisms and clinical characteristics such as obesity, atrial fibrillation, or hypertension as risk factors for severe heart failure in T2D patients.

This study highlights the importance of genetic factors, particularly the M235T polymorphism in the angiotensinogen gene, in the development of severe HF in T2D patients, suggesting its potential as a predictive biomarker

Originality and Innovative Contributions of the Thesis

The association between type 2 diabetes mellitus (T2D) and heart failure (HF) represents a major public health issue, with these patients facing a higher risk of cardiovascular morbidity and mortality compared to those without heart failure. This highlights the need for efforts to develop accessible, reliable screening and diagnostic tools. Additionally, identifying new molecules involved in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy could open new research pathways toward treatments aimed at reducing morbidity and mortality in this patient group.

Currently, SGLT2 inhibitors are the only class of medications proven to reduce the risk of rehospitalization and all-cause mortality in HFpEF patients.

This study is the first to evaluate the role of three novel biomarkers—FGF-21, galectin-3, and copeptin—in diagnosing HFpEF in T2D patients. The findings demonstrate that elevated FGF-21 levels increase the likelihood of developing HFpEF by 4 to 8 times, with good diagnostic performance, reflected by high specificity and sensitivity.

The study further assessed the role of FGF-21, galectin-3, copeptin, and NT-proBNP in differentiating or predicting moderate or severe forms of HFpEF/HFmrEF. It confirmed that NT-proBNP can be used as a diagnostic biomarker for moderate/severe HFpEF/HFmrEF, with a threshold value of >2379 pg/mL. While FGF-21 can also distinguish these patients at a threshold >377 ng/mL, its lower specificity suggests the use of a multi-marker panel including NT-proBNP to improve diagnostic accuracy.

Elevated FGF-21 levels significantly increase the risk of severe heart failure (up to 8 times). However, the significance of elevated FGF-21 levels in heart failure remains uncertain. Animal studies suggest that FGF-21 has protective roles, suppressing various pathological processes contributing to HF, such as oxidative stress, apoptosis, myocardial inflammation, and lipid accumulation. Excessive increases in FGF-21 levels in heart failure may reflect FGF-21 resistance.

Experimental studies have demonstrated that exogenous administration of FGF-21 has beneficial effects, including improvements in glucose and lipid profiles, weight reduction, and evidence supporting its potential as a therapeutic option in diabetic cardiomyopathy. These benefits appear to result from reduced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and lipid accumulation in the myocardium.

There are few studies in the literature evaluating the potential association between the M235T and T174M polymorphisms in the angiotensinogen gene and heart failure development, and the findings have been inconsistent due to ethnic differences. Among Caucasians, two studies have reported an association between the M235T polymorphism and heart failure.

In this research, we demonstrated that the M235T polymorphism, in both heterozygous and homozygous forms, is a risk factor for severe heart failure.

Through this work, we confirmed existing data on the clinical and paraclinical profile of T2D patients with HFpEF, while contributing an innovative finding by identifying FGF-21 as a novel biomarker associated with an increased risk of HF development and good diagnostic performance for HFpEF. Considering its potential therapeutic implications, these results are valuable and could form the basis for new research directions aimed at achieving tangible benefits for these patients. This is particularly relevant given the limited treatment options (with proven benefits in reducing major cardiovascular events and mortality) and early diagnostic tools currently available.