



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Release characteristics of cardiac proteins after reversible or irreversible myocardial damage

Hessel, M.H.M.

Citation

Hessel, M. H. M. (2008, February 7). *Release characteristics of cardiac proteins after reversible or irreversible myocardial damage*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12593>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12593>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Chapter 10

Summary & Samenvatting

Summary

The development of novel assays for cardiac biomarkers has resulted in improved diagnosis of acute myocardial infarction (AMI) and congestive heart failure (CHF). Nowadays, cardiac biomarkers assist in a rapid diagnosis and in evaluating the efficiency of treatment. The major objectives of the research described in this thesis were to characterize conditions and release kinetics of cardiac proteins from reversibly injured or irreversibly injured myocardium into the circulation and to investigate their value as relevant biomarkers of AMI or CHF. Experimental findings obtained from cardiomyocyte cultures and animals with cardiac overload were compared with results of clinical studies in an attempt to translate results of basic research to the diagnosis and therapy of human heart disease.

Chapter 1 provides background information about the mechanisms responsible for reversible and/or irreversible myocardial damage after AMI and during the progression to CHF. Cardiac proteins, posttranslational modifications of cardiac proteins, and the effects of these protein modifications on myocardial function are discussed, including the release of well-known biomarkers of AMI or CHF.

In the first part of this thesis we reported the release of cardiac troponin I (cTnI) from irreversibly injured versus reversibly injured cardiomyocytes (**chapters 2-5**). **Chapter 2** describes the release kinetics of intact cTnI from necrotic cardiomyocytes *in vitro* in comparison with the release of lactate dehydrogenase (LDH), the golden standard for necrotic cell death. Cultured cardiomyocytes were exposed to severe metabolic inhibition to induce necrosis. The release of LDH from necrotic cardiomyocytes preceded the release of intact cTnI by about 60 minutes. The maximal quantity of LDH released from necrotic cardiomyocytes was 80-90%, whereas the release of intact cTnI was maximally 50%. This study demonstrated a partial and delayed release of intact cTnI from necrotic cardiomyocytes compared with the release of LDH, which may be explained by the early formation of cTnI degradation products that remained undetected by the currently used immunoassay (ELISA).

To further study troponin degradation in energy-deprived cardiomyocytes, release kinetics of intact and degraded cTnI and cardiac troponin T (cTnT) from azide-treated

cardiomyocytes were characterized before and after the transition to irreversible cell damage (**chapter 3**). During the first 12 h of mild metabolic inhibition, cell viability as assessed by LDH release was unchanged without release of intact cTnI or cTnT, nor their degradation products. Between 12 and 30 h of azide treatment, cardiomyocytes showed progressive cell death accompanied by release of intact cTnI (29 kDa), intact cTnT (39 kDa), four cTnI degradation products of 26, 20, 17 and 12 kDa, and three cTnT degradation products of 37, 27 and 14 kDa. Necrotic cardiomyocytes demonstrated release kinetics similar for cTnI and cTnT. Nevertheless, the release of LDH from necrotic cardiomyocytes was more pronounced (90% in 30 h) than the release of both troponins (50-55% in 30 h).

Unexpectedly, total quantity of intact cTnI and cTnT per culture (cells+medium) during azide-treatment declined progressively compared with the total quantity at t=0 (100%), whereas total LDH activity per culture (cells+medium) hardly changed during azide-treatment. These results indicated progressive loss of both intact cTnI and cTnT during metabolic inhibition. Post-translational modifications of intact troponins such as degradation, phosphorylation, nitrosylation and oxidation may result in a reduced detection of intact troponins by the antibodies that were used in the immunoassays. This study demonstrated that the detection of cardiac troponins is influenced negatively by the formation of troponin degradation products and by diminished immunoreactivity of the currently available antibodies for these degradation products.

Based on the results described in **chapters 2 and 3** we concluded that the release of intact and degraded troponins from energy-deprived cardiomyocytes (metabolic inhibition) does not occur before necrosis sets in, but is exclusively associated with necrotic cell death.

In **chapter 4**, we describe the release of cTnI from viable cardiomyocytes during stimulation of stretch-responsive integrins. Integrins are membrane proteins of which the extracellular side binds to extracellular matrix (ECM) proteins and of which the intracellular side binds to the cytoskeleton. Several integrins are stimulated by binding to the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence, present in fibronectin and other ECM proteins. The Asp-Gly-Arg (RGE) sequence is not recognized by integrins. RGD-induced integrin

stimulation of cardiomyocytes resulted in an increased release of intact cTnI ($9.6 \pm 3.0\%$) compared with RGE-treated cardiomyocytes ($4.5 \pm 0.8\%$; $p < 0.001$) and control cardiomyocytes ($3.0 \pm 3.5\%$; $p < 0.001$). LDH release from RGD-treated cardiomyocytes ($15.9 \pm 3.8\%$) equalled that of control cardiomyocytes ($15.2 \pm 2.3\%$; n.s.), indicating that the increased release of cTnI is not due to cardiomyocyte necrosis. This result was confirmed by nuclear staining with propidium iodide, which is another method to determine the presence of necrotic cells. Integrin stimulation of cardiomyocytes increased the intracellular and extracellular matrix metalloproteinase-2 (MMP2) activities as compared with control cardiomyocytes (both $p < 0.05$). However, despite the ability of active MMP2 to degrade purified cTnI *in vitro*, integrin stimulation of cardiomyocytes was not associated with cTnI degradation. This study demonstrated that viable cardiomyocytes release cTnI as an intact protein, by a stretch-related mechanism mediated by integrins, whereas cTnI release from necrotic cardiomyocytes is associated with the release of cTnI degradation products. The finding that cTnI can be released from viable cardiomyocytes may explain why in several pathological conditions plasma troponin levels are elevated in the absence of myocardial necrosis.

The experimental finding of integrin stimulation-induced cTnI release was also studied in patients with CHF. In **chapter 5**, we describe a study in which CHF patients with elevated serum cTnT levels (CHF $\oplus$ -group) were compared with CHF patients without elevated serum cTnT levels (CHF $\ominus$ -group). CHF $\oplus$ patients had $\approx$ 4-fold higher serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels than CHF $\ominus$ patients with cTnT levels < 0.01 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.001$). Since the serum NT-proBNP level is considered to be a general indicator of cardiac overload, we may conclude that CHF $\oplus$ patients had significantly higher cardiac overload than CHF $\ominus$ patients. However, although serum cTnT levels differed between the two groups, serum LDH activity did not differ between the CHF $\oplus$ and CHF $\ominus$ group. Serum cTnT/LDH ratios in CHF $\oplus$ and CHF $\ominus$ were 0.510 ± 0.186 ng/U and 0.035 ± 0.0029 ng/U, respectively ($p < 0.001$), indicating preferential release of cTnT from hearts of CHF $\oplus$ patients. These results support our experimental findings with integrin-stimulated cardiomyocytes *in vitro*. Apparently, cTnT release in

patients with CHF may be the result of cardiac overload and associated strain, instead of myocardial necrosis.

In human heart failure, myocardial expression patterns of many proteins undergo marked changes. In the second part of this thesis we describe the altered expression of the ECM proteins including tenascin-C (TNC), MMP2 and MMP9, and their relevance as biomarkers of *adverse* and/or *reverse* ventricular remodeling (**chapters 6-8**).

The rat model of monocrotaline(MCT)-induced pulmonary hypertension was used to study the transition from compensated right ventricular (RV) hypertrophy to RV failure. In **chapter 6** we reported the characterization of RV function in relation to structural changes during MCT-induced pulmonary hypertension in the intact rat. MCT-induced pressure overload was associated with a dose-dependent development of RV hypertrophy. In rats treated with 30 mg MCT/kg bodyweight, the RV ejection fraction was lower (from 50% to 40%) and RV volumes and filling pressures were significantly higher than in control rats (all $p < 0.05$), indicating adverse RV remodeling. However, cardiac output and stroke volume were maintained, indicating a compensatory state in these rats. In rats treated with 80 mg MCT/kg bodyweight, RV systolic pressure, volumes and peak wall stress had risen further, whereas RV ejection fraction and cardiac output had decreased (from 50% to 27%, and by 26%, respectively) compared to control rats (all $p < 0.05$). Nevertheless, RV end-systolic and end-diastolic stiffness were unchanged, consistent with the absence of interstitial fibrosis. This study demonstrated that besides RV hypertrophy, the most pronounced response to MCT-treatment was RV dilatation, i.e. increase in RV end-systolic and end-diastolic volumes, and consequently, a decrease of RV ejection fraction.

In **Chapter 7** we describe a study showing that MCT-induced RV dilatation was associated with re-expression of TNC in failing myocardium. MCT-induced RV dilatation in rats with RV failure was associated with a significant upregulation of TNC gene expression, resulting in re-expression of myocardial TNC protein levels and elevated plasma TNC levels. Both TNC gene expression and TNC protein re-expression were more abundant in the RV compared to the left ventricle (LV) and interventricular septum

of rats with heart failure. RV volumes and RV ejection fraction were correlated with plasma TNC levels, indicating that plasma TNC can be used as a marker of ventricular dilatation. Re-expression of TNC in the RV of rats with RV failure was also associated with a significant downregulation of integrin $\alpha 6$ gene expression (by 48% compared to RV of control rats, $p < 0.05$), reduced myocardial proMMP2 levels (by 45% compared to RV of control rats, $p < 0.05$), and increased myocardial proMMP9 levels (by 68% compared to RV of control rats, $p = 0.06$). The de-adhesive properties of TNC together with the downregulation of $\alpha 6$ integrin gene expression may result in weakened binding of cardiomyocytes to the ECM and possibly in cardiomyocyte slippage.

To study the value of circulating TNC, MMP2, and MMP9 concentrations as a marker of ventricular remodeling in humans, we assessed serum or plasma levels of TNC, MMP2 and MMP9 in patients with CHF before and after intervention. In heart failure patients, cardiac resynchronization therapy (CRT) leads to *reverse* ventricular remodeling. However, the molecular and cellular mechanisms underlying *reverse* ventricular remodeling following CRT are not completely understood. Therefore we evaluated whether changes in levels of circulating biomarkers correlate with the response to CRT and whether these proteins can be used as biomarkers of *reverse* ventricular remodeling (**chapter 8**). The majority of patients (72%) showed a reduction $> 10\%$ in LV end-systolic volume at 6 months follow-up, and were classified as responders to CRT. The remaining patients were classified as non-responders. In responders, we observed a significant decrease in circulating levels of TNC (from 60 ± 40 ng/mL to 47 ± 30 ng/mL, $p < 0.01$), MMP-9 (from 55 ± 30 AU to 44 ± 27 AU, $p < 0.01$), and NT-proBNP (from 2106 ± 1805 pg/mL to 1132 ± 1289 pg/mL, $p < 0.001$) at follow-up compared to baseline; plasma MMP-2 levels remained unchanged. In non-responders circulating TNC, NT-proBNP, MMP-9 and MMP-2 levels remained unchanged. From this study we concluded that at 6 months follow-up, CRT was associated with reverse LV remodeling, and significant decreases in TNC, MMP-9, and NT-proBNP levels. These findings suggest an important role of extracellular matrix modulation in the process of reverse ventricular remodeling in patients with heart failure who respond beneficially to CRT. In addition these findings indicate that circulating TNC, MMP9 and NT-proBNP levels can be used as biomarkers of reverse ventricular remodeling to evaluate the response to CRT.

The studies described in this thesis demonstrate the relevance of serum cardiac troponin I, cardiac troponin T, MMPs and TNC concentrations as cardiac markers of reversible and/or irreversible myocardial injury. Elevated serum troponin levels in patients are not only the result of troponin release from irreversibly damaged myocardium but may also occur from viable myocardium as a result of myocardial overloading and increased wall stress. Plasma MMP9 levels rather than plasma MMP2 levels are a potential marker of ventricular dilatation in heart failure, but due to the complex regulation of MMPs, we need more insight in the (patho)physiological mechanisms of MMP9 elevations in plasma of patients with CHF. Re-expression of myocardial TNC may contribute to cardiomyocyte slippage and ventricular dilation. Serial serum TNC levels can be used as a marker of adverse or reverse ventricular remodeling in patients with heart failure.

Samenvatting

De ontwikkeling van nieuwe laboratoriumtesten voor “hartmarker-eiwitten” heeft geleid tot een verbeterde diagnostiek van het acute myocard infarct (AMI) en van hartfalen (HF). Vandaag de dag dragen hartmarker-eiwitten bij tot een snelle diagnose en beoordeling van het behandelingsresultaat. Het hoofddoel van het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven wordt, is het karakteriseren van de afgiftepatronen van harteiwitten door reversibel of irreversibel beschadigd hartweefsel aan de circulatie en het bestuderen van de rol van deze harteiwitten als biomarkers voor AMI en HF. Experimenteel onderzoek uitgevoerd in hartcelkweeken en proefdieren met een overbelast hart werd vergeleken met de resultaten uit klinische studies, ter verbetering van diagnose en therapie van humane hartziekten.

Hoofdstuk 1 geeft achtergrondinformatie over de mechanismen die verantwoordelijk zijn voor reversibele of irreversibele schade aan het hartweefsel na AMI en gedurende de ontwikkeling van HF. Harteiwitten, post-translationele veranderingen van harteiwitten en de effecten van deze eiwitmodificaties op de hartfunctie worden beschreven, inclusief de afgifte van bekende hartmarker-eiwitten voor AMI of HF.

Het eerste deel van dit proefschrift richt zich op het afgiftepatroon van het hartspecifieke troponine I (cTnI) door irreversibel versus reversibel beschadigde hartcellen (**hoofdstukken 2 t/m 5**). **Hoofdstuk 2** beschrijft het afgiftepatroon van intact cTnI door necrotische hartcellen *in vitro* in vergelijking met de afgifte van lactaat dehydrogenase (LDH), dat de gouden standaard is voor necrose. Hartcellen in kweek werden blootgesteld aan ernstige metabole inhibitie om necrose te induceren. De afgifte van LDH door necrotische hartcellen liep ongeveer 60 minuten voor op de afgifte van intact cTnI. De maximale hoeveelheid LDH die door necrotische hartcellen werd afgegeven was 80-90%, terwijl de afgifte van intact cTnI maximaal 50% was. Dit onderzoek laat zien dat de afgifte van cTnI door necrotische cellen relatief gering is en bovendien vertraagd is ten opzichte van de afgifte van LDH. Dit zou mogelijk verklaard kunnen worden door de vorming van cTnI-degradatieproducten die niet gedetecteerd werden door de gebruikte immunoassay.

Troponinedegradatie in hartcellen met een tekort aan energie (metabole inhibitie) is verder onderzocht in azide-behandelde hartcellen (**Hoofdstuk 3**). De afgiftepatronen van intact en gefragmenteerd cTnI en cardiaal troponine T (cTnT) door met azide-behandelde hartcellen werd zowel voor als na de overgang naar irreversibele celschade gekarakteriseerd. Gedurende de eerste 12 uur van de azide behandeling was de vitaliteit van hartcellen, die door middel van de LDH-afgifte bepaald werd, onveranderd en was er geen afgifte van intact of gefragmenteerd cTnI of cTnT waarneembaar. Echter, tussen 12 en 30 uur na de start van de azide-behandeling vertoonden de hartcellen progressieve celdood, die gepaard ging met de afgifte van intact cTnI (29 kDa), intact cTnT (39 kDa), vier cTnI degradatieproducten van 26, 20, 17, en 12 kDa en drie cTnT degradatieproducten van 37, 27, en 14 kDa. Necrotische hartcellen vertoonden een vergelijkbare afgifte voor cTnI en cTnT. De afgifte van LDH door necrotische hartcellen was duidelijk meer uitgesproken (90% in 30 uur) dan de afgifte van beide troponines (50-55% in 30 uur).

Gedurende de azide-behandeling daalde de totale hoeveelheid intact cTnI en cTnT per kweek (dus in cellen+medium) progressief ten opzichte van de totale hoeveelheid op tijdstip t=0 (100%), terwijl de totale hoeveelheid LDH per kweek vrijwel niet veranderde tijdens die behandeling. Deze resultaten wijzen op een progressief verlies van zowel intact cTnI als intact cTnT als gevolg van metabole inhibitie. Post-translationele modificaties van intacte troponines, zoals degradatie, fosforylering, nitrosylering en oxidatie, zouden mogelijk tot een verminderde detectie kunnen leiden doordat de gebruikte antilichamen niet meer aan het intacte troponine en/of troponinedegradatieproduct kunnen binden. Dit onderzoek laat zien dat de detectie van hartspecifieke troponines afhankelijk is van de vorming van troponinedegradatieproducten en van een verminderde immunoreactiviteit van de antilichamen die op dit moment beschikbaar zijn.

De resultaten van **hoofdstuk 2 en 3** in aanmerking genomen, concluderen we dat er geen afgifte plaatsvindt van intact en gefragmenteerd troponine door hartcellen met een tekort aan energie (metabole inhibitie) voordat er daadwerkelijk necrose optreedt, maar dat de release van troponine alleen geassocieerd is met celdood.

In **hoofdstuk 4** beschrijven we de afgifte van cTnI door vitale hartcellen gedurende stimulatie van rekgevoelige integrines. Integrines zijn membraaneiwitten waarvan de extracellulaire zijde aan extracellulaire matrix (ECM) eiwitten bindt en waarvan de intracellulaire zijde aan het cytoskelet bindt. Vele integrines worden gestimuleerd door binding met de Arg-Gly-Asp(RGD)-sequentie, die onder andere aanwezig is in fibronectine maar ook in vele andere ECM eiwitten. De Asp-Gly-Arg(RGE)-sequentie wordt echter niet door integrines herkend. De door RGD-geïnduceerde integrinestimulatie resulteerde in een afgifte van intact troponine ($9.6 \pm 3.0\%$) die afwezig was in met RGE-behandelde hartcellen ($4.5 \pm 0.8\%$; $p < 0.001$) en in controlehartcellen ($3.0 \pm 3.5\%$; $p < 0.001$). De afgifte van LDH door met RGD-behandelde hartcellen ($15.9 \pm 3.8\%$) was vergelijkbaar met die van controlehartcellen ($15.2 \pm 2.3\%$; n.s.) en geeft dus aan dat de afgifte van troponine in dit experiment niet veroorzaakt wordt door hartcelnecrose. Dit resultaat werd bevestigd door een kernkleuring met propidium iodide, dat een alternatieve methode is om necrotische cellen aan te tonen. Integrinestimulatie van hartcellen resulteerde ook in een verhoogde activiteit van zowel intracellulair als extracellulair matrix metalloproteinase-2 (MMP2) ten opzichte van controle hartcellen (beide $p < 0.05$). Echter, ondanks dat actief MMP2 wel in staat is om geïsoleerd cTnI *in vitro* te degraderen, bleek integrinestimulatie niet te leiden tot cTnI degradatie. Dit onderzoek geeft aan dat vitale hartcellen in staat zijn om intact troponine af te geven via een mechanisme dat gerelateerd is aan rek, terwijl de afgifte van troponine door necrotische hartcellen geassocieerd is met de afgifte van troponinedegradatieproducten. Dat troponine ook door vitale hartcellen kan worden afgegeven zou kunnen verklaren waarom in verscheidene pathologische condities troponineconcentraties in serum verhoogd zijn in afwezigheid van necrose.

Het experimentele resultaat dat integrinestimulatie leidt tot de afgifte van troponine, werd ook bestudeerd in patiënten met hartfalen. In **hoofdstuk 5** beschrijven we een onderzoek waarin HF-patiënten met verhoogde troponineconcentraties in serum (HF $\oplus$ -groep) vergeleken zijn met HF-patiënten zonder verhoogde troponineconcentraties (HF $\ominus$ -groep). HF $\oplus$ -patiënten hadden circa 4 maal hogere serum N-terminal pro-Btype natriuretisch peptide (NT-proBNP) concentraties dan HF $\ominus$ -patiënten ($p < 0.001$). Serum

NT-proBNP geldt als een algemene indicatie voor overbelasting van het hart en daarom concluderen we dat HF $\oplus$ -patiënten een significant grotere overbelasting van het hart vertonen dan HF $\ominus$ -patiënten. Echter, hoewel de serumtroponineconcentraties in deze groepen verschillend waren, was de LDH-activiteit in serum niet verschillend tussen de HF $\oplus$ -groep en de HF $\ominus$ -groep. De cTnT/LDH ratio in serum van HF $\oplus$ - en HF $\ominus$ -patiënten was respectievelijk, 0.510 ± 0.186 ng/U en 0.035 ± 0.0029 ng/U ($p < 0.001$) en geeft een preferentiële afgifte van cTnT door hartweefsel van HF $\oplus$ -patiënten aan.

Deze resultaten steunen onze experimentele bevindingen in door integrine-gestimuleerde hartcellen *in vitro*. Blijkbaar is de afgifte van cTnT in patiënten met hartfalen ook het resultaat van overbelasting van het hart, en niet het resultaat van hartweefselnecrose.

Bij mensen wordt hartfalen onder meer gekenmerkt door veranderingen in het expressiepatroon van vele eiwitten in de hartspeer. In het tweede deel van dit proefschrift beschrijven we de veranderde expressie van ECM-eiwitten als tenascin-C, MMP2 en MMP9 en hun rol als biomarker voor progressieve kamerdilatatie en kamerdilatatie vermindering (**hoofdstuk 6-8**).

Door monocrotaline-geïnduceerde pulmonale hypertensie in de rat werd gebruikt als proefdiermodel om de overgang van gecompenseerde rechterkamer(RV)-hypertrofie naar RV-falen te bestuderen. In **hoofdstuk 6** werd de functie van de rechterkamer gekarakteriseerd in relatie tot structurele veranderingen in de intacte rat met door MCT-geïnduceerde pulmonale hypertensie. De door MCT-geïnduceerde drukoverbelasting bleek geassocieerd met een dosisafhankelijke ontwikkeling van RV-hypertrofie. In ratten die met een lage dosis MCT (30 mg MCT/kg lichaamsgewicht) behandeld waren was de RV-ejectiefractie gedaald (van 50% naar 40%), en waren de RV-volumes en RV-vullingsdrukken significant hoger dan in controleratten (allen $p < 0.05$), dat aangeeft dat er progressieve kamerdilatatie is opgetreden. Echter, het hartminuutvolume en het slagvolume waren onveranderd en geven een gecompenseerde status aan in deze ratten. In ratten die met een hoge dosis MCT (80 mg MCT/kg lichaamsgewicht) behandeld waren, waren RV-systolische drukken, RV-volumes en de RV wandspanning verder gestegen, terwijl de RV-ejectiefractie daalde van 50% naar 26% en het

hartminuutvolume 26% gedaald was ten opzichte van controleratten (allen $p < 0.05$). Echter, de eindsystolische en einddiastolische stijfheid van het RV-weefsel bleven onveranderd wat overeenkwam met de afwezigheid van interstitiële fibrose. Dit onderzoek laat zien dat naast RV-hypertrofie, RV-dilatatie de meest uitgesproken respons was op MCT-behandeling; of anders gezegd verhoging van RV-eindsystolische en RV-einddiastolische volumes en gedaalde RV-ejectiefractie.

In **hoofdstuk 7** beschrijven we een onderzoek dat laat zien dat de door MCT-geïnduceerde RV-dilatatie geassocieerd is met het opnieuw tot expressie komen van tenascin-C (TNC) in falend hartweefsel. De door MCT-geïnduceerde RV-dilatatie in ratten met hartfalen bleek geassocieerd te zijn met een significante toename van genexpressie van TNC dat resulteerde in re-expressie van het TNC-eiwit in hartweefsel en in stijgende TNC-concentraties in plasma. Zowel de genexpressie van TNC als de re-expressie van het TNC-eiwit waren duidelijk meer uitgesproken in het RV weefsel dan in het weefsel van de linkerkamer en het interventriculaire septum van ratten met RV-falen. RV-volumes en RV-ejectiefractie waren gecorreleerd aan TNC-concentraties in plasma, wat aangeeft dat plasma TNC gebruikt kan worden als biomarker voor kamerdilatatie. TNC re-expressie in het RV myocard van ratten met RV-falen was ook geassocieerd met een significante afname van de genexpressie van integrine $\alpha 6$ (met 48% ten opzichte van RV van controleratten, $p < 0.05$), met verminderde proMMP2-concentraties in het RV myocard (met 45% ten opzichte van RV van controleratten, $p < 0.05$), en met verhoogde proMMP9-concentraties in het hartweefsel (met 68% ten opzichte van RV van controle ratten, $p = 0.06$). De slechtere binding van TNC in vergelijking met normale ECM-eiwitten samen met de afname van de genexpressie van integrine $\alpha 6$ kunnen resulteren in een verminderde binding tussen hartcellen en de ECM en kan er mogelijk toe leiden dat hartcellen langs elkaar heen gaan glijden.

Om de rol van serum TNC, MMP2 en MMP9 concentraties als biomarkers voor progressieve kamerdilatatie te kunnen bestuderen in patiënten, hebben we TNC, MMP2 en MMP9 concentraties bepaald in serum of plasma van patiënten met hartfalen voor en na interventie. Cardiale resynchronisatietherapie (CRT) in patiënten met hartfalen leidt

tot vermindering van kamerdilatatatie. Maar de moleculaire en cellulaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor vermindering van kamerdilatatatie tijdens CRT zijn nog niet goed bekend. Daarom hebben wij bestudeerd of veranderingen van circulerende biomarkers correleren met de respons op CRT en of deze eiwitten gebruikt kunnen worden als biomarkers voor vermindering van kamerdilatatatie (**hoofdstuk 8**). Het merendeel van de patiënten (72%) vertoonde na 6 maanden CRT een daling van meer dan 10% van het eindsystolische volume en werd geclassificeerd als responder. De overige patiënten werden geclassificeerd als non-reponders. Na 6 maanden follow-up zagen we in responders een significante afname van TNC-concentraties (van 60 ± 40 ng/mL naar 47 ± 30 ng/mL, $p < 0.01$), van MMP9-concentraties (van 55 ± 30 AU naar 44 ± 27 AU, $p < 0.01$) en van NT-proBNP-concentraties (van 2106 ± 1805 pg/mL naar 1132 ± 1289 pg/mL, $p < 0.001$) in de circulatie ten opzichte van de uitgangswaarden; plasma MMP2-concentraties bleven onveranderd. In non-responders bleven TNC-, NT-proBNP-, MMP2-, en MMP9-concentraties in de circulatie onveranderd. Uit dit onderzoek concluderen we dat 6 maanden CRT geassocieerd is met vermindering van kamerdilatatatie en een significante daling van serum TNC-, MMP9- en NT-proBNP-concentraties. Deze resultaten suggereren dat de eiwitsamenstelling van de ECM een belangrijke rol speelt in het proces van kamerdilatatatie vermindering in patiënten met hartfalen die gunstig reageren op CRT. Tevens suggereren deze resultaten dat serum TNC, MMP9 en NT-proBNP concentraties bruikbaar zijn als biomarkers voor vermindering van kamerdilatatatie en voor evaluatie van de response op CRT.

De onderzoeken die in dit proefschrift beschreven zijn, geven het belang aan van troponine I, troponine T, MMP9 en TNC concentraties in de circulatie als biomarkers voor reversibele of irreversibele hartweefselschade. Verhoogde troponineconcentraties in serum van patiënten zijn niet alleen het resultaat van irreversibele schade aan het hartweefsel, maar het circulerende troponine kan ook afkomstig zijn van vitaal hartweefsel dat is blootgesteld aan overbelasting en verhoogde wandspanning.

In tegenstelling tot plasma MMP2-concentraties, zijn plasma MMP9-concentraties een potentiële marker voor kamerdilatatatie gedurende hartfalen, maar door de complexe

regulatie van MMPs is er meer kennis nodig van de (patho)fysiologische mechanismen die leiden tot een stijging van MMP9 in plasma van patiënten met hartfalen.

Re-expressie van TNC in falend hartweefsel zou ervoor kunnen zorgen dat hartcellen langs elkaar heen gaan schuiven als gevolg van een verminderde binding tussen hartcellen en ECM. Toename en afname van serum TNC-concentraties zijn bruikbaar als marker voor respectievelijk, progressieve kamerdilatatie en vermindering van kamerdilatatie in patiënten met hartfalen.