

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Dainius Daunoravičius

**MOLEKULINIAI MECHANIZMAI, ĮTAKOJANTYS VIRUSINĖS IR
UŽDEGIMINĖS KILMĖS LĖTINIŲ DILATACINIŲ KARDIOMIOPATIJŲ
VYSTYMĄSI**

Daktaro disertacijos santrauka

biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2014

Disertacija buvo parengta 2010–2014 m. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Patologijos, teismo medicinos ir farmakologijos katedroje.

Mokslinė vadovė – prof. dr. **Virginija Grabauskienė** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Mokslinis konsultantas – prof. dr. **Laimonas Griškevičius** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje.

Pirmininkė:

Prof. dr. **Janina Tutkuvienė** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Nariai:

Prof. dr. **Dainius Characiejus** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Prof. dr. **Žaneta Petrulionienė** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Doc. dr. **Aušrinė Barakauskienė** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Doc. dr. **Arsen D. Ristic** (Belgrado universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Disertacija bus ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2014 m. gruodžio 04 d. 14 val., Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Didžiojoje auditorijoje.
Adresas: Čiurlionio 21, Vilnius LT-03101, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. lapkričio 4 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

VILNIUS UNIVERSITY

Dainius Daunoravičius

**MOLECULAR MECHANISMS WITHIN CHRONIC VIRUS-POSITIVE AND
INFLAMMATORY DILATED CARDIOMYOPATHY**

Summary of Doctoral Dissertation
Biomedical sciences, medicine (06 B)

Vilnius, 2014

The dissertation was prepared in 2010-2014 at the Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Vilnius University Faculty of Medicine.

Scientific supervisor – prof. dr. **Virginija Grabauskienė** (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B).

Consultant – prof. dr. **Laimonas Griškevičius** (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B).

The dissertation will be defended at the Medical Research Council of Vilnius University.

Chairman:

Prof. dr. **Janina Tutkuvienė** (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B).

Members:

Prof. dr. **Dainius Characiejus** (Lithuanian University of Health Sciences, biomedical sciences, medicine – 06 B).

Prof. dr. **Žaneta Petrulionienė** (Lithuanian University of Health Sciences, biomedical sciences, medicine – 06 B).

Assoc. prof. dr. **Aušrinė Barakauskienė** (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B).

Assoc. prof. dr. **Arsen D. Ristic** (Belgrade University, biomedical sciences, medicine – 06 B).

The dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council on December 4, 2014, at 14:00 in the Didžioji auditorium of Vilnius University Faculty of Medicine.

Address: Čiurlionio 21, Vilnius LT-03101, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was sent on November 4, 2014.

The dissertation in full text is available at the Vilnius University Library.

TURINYS

1. SANTRUMPŲ SAŖAŠAS	8
2. ĮVADAS	12
2.1. Literatūros apžvalga	12
2.2. Hipotezės	16
2.3. Tikslai	16
2.4. Uždaviniai	16
2.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė	16
2.6. Bendradarbiavimas	17
3. MEDŽIAGOS IR METODAI	19
3.1. Išskiriami ir intramiokardiniai biožymenys sergant dKMP	19
3.1.1. Tiriamųjų atrankos kriterijai	19
3.1.2. Pagrindiniai medicininiai tyrimai	20
3.1.3. Širdies kateterizacija ir endomiokardinė biopsija	20
3.1.4. Kraujo mėginių ėmimas ir ruošimas	21
3.1.5. Virusų genomo aptikimas endomiokardo bioptate	21
3.1.6. ELISA tyrimai	23
3.1.7. Papildomi biocheminiai matavimai	24
3.1.8. Endomiokardo bioptatų histologija ir imunohistochemija	24
3.1.9. Endomiokardo bioptatų histocheminio ir imunohistocheminio dažymo vertinimas	25
3.2. Kiekybinis miokardo fibrozės vertinimas pasitelkiant skaitmeninę vaizdo analizę ir interaktyviąją stereologiją	28
3.2.1. Eksperimento modelis	28
3.2.2. Kolokalizacijos algoritmas	28
3.2.3. Genie algoritmas	29
3.2.4. Stereologija	30
3.2.5. Vizualus patologo vertinimas	32
3.3. Statistinė analizė	33

3.3.1. dKMP duomenų analizė	33
3.3.2. Fibrozės vertinimo duomenų analizė	33
3.4. Etikos principų laikymosi patvirtinimas	33
4. REZULTATAI	34
4.1. Virusui teigiama dKMP pacientų tiriamoji grupė	34
4.1.1. Virusų genomo nustatymas endomiokardo biopsijuose	34
4.1.2. Pagrindiniai klinikiniai parametrai	34
4.1.3. Uždegimo ir kardiomiocitų žūties įvertinimas virusui teigiamos ir virusui neigiamos dKMP mėginiuose	37
4.1.4. Virusų poveikis susitraukimą reguliuojantiems miokardo audinio baltymams	39
4.1.5. Išskiriamų susitraukimą reguliuojančių baltymų pokyčiai virusui teigiamos tyrimo grupės pacientų serume	43
4.1.6. Kiti dKMP vystymąsi reguliuojantys mechanizmai	45
4.2. Uždegimui teigiama dKMP pacientų tyrimo grupė	48
4.2.1. Uždegiminių infiltratų aptikimas endomiokardo biopsijuose	48
4.2.2. Pagrindiniai klinikiniai parametrai	48
4.2.3. Uždegiminiai dKMP žymenys	50
4.2.4. Apoptozinių biožymenų pokyčiai uždegiminės dKMP mėginiuose	52
4.2.5. Nekrozės indukcija uždegiminės dKMP mėginiuose	56
4.2.6. Apoptozinių kelių sąveika, prisidedanti prie uždegiminės dKMP vystymosi	57
4.2.7. Apoptozinių biožymenų raiška miokardo audinyje	60
4.3. Kiekybinis miokardo fibrozės įvertinimas pasitelkiant skaitmeninę vaizdo analizę ir interaktyviąją stereologiją	62
5. REZULTATŲ APTARIMAS	68
5.1. Virusų sukeltos dKMP molekuliniai mechanizmai	68
5.2. Molekuliniai mechanizmai, dominuojantys esant uždegiminei dKMP	70
5.3. Kiekybinis miokardo fibrozės vertinimas pasitelkiant skaitmeninę vaizdo analizę ir interaktyviąją stereologiją	73
5.4. Santrauka	75

6.	IŠVADOS	77
7.	PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	78
7.1.	Publikacijos	78
7.2.	Pranešimai	79
8.	APIE AUTORIŲ	81
9.	TYRIMO FINANSAVIMAS	82
10.	KONFIDENCIALIOS INFORMACIJOS ATSKLEIDIMAS	82
11.	PADEKA	82

1. SANTRUMPŲ SAŖAŠAS

6 tipo žmogaus herpes virusas (HHV-6)

Adenovirusas (ADV)

Adenozino trifosfatas (ATF)

Adiponektinas (APN)

Akyvieji atminties T limfocitai (CD45Ro⁺)

Amerikos širdies asociacija (AŠA)

Apoptozės proteazę aktyvinantis veiksnys (APAF; apoptosis protease-activating factor)

Apoptozinių baltymų inhibitoriai (ABI)

Aspartato aminotransferazė (AST)

Baltieji kraujo kūneliai (BKK)

Citomegalo virusas (CMV)

Dalinis aktyvinto tromboplastino laikas (DATL)

Dešiniojo prieširdžio spaudimas (DPS)

Dešiniojo skilvelio kardiomiopatija (DSK)

Didelio jautrumo C reaktyvusis baltymas (DjCRB)

Didelio jautrumo troponinas-T (DjTnT)

Didelio tankio lipoproteinai (DTL)

Dilatacinė kardiomiopatija (dKMP)

Dominanti sritis (ROI; region of interest)

Endomiokardo biopsija (EMB)

Enterovirusas (EV)

Epšteino–Bar virusas (EBV)

Europos kardiologų draugija (EKD)

Fas ligandas (FasL)

Galvijų serumo albuminas (BSA; bovine serum albumin)

Hematoksilinas ir eozinas (H&E)

Hemoglobinas A1c (HbA1c)

Hepatito C virusas (HCV)

Hipertrofinė kardiomiopatija (HK)

Implantuojamas širdies defibriliatorius (IŠD)

Imunofermentinės analizės metodas (ELISA; enzyme linked immunosorbent assay)
Indukuotos azoto oksido sintazės (iNOS; inducible nitric oxide synthase)
Interleukinas-1 (IL-1)
Interleukinas-1 beta (IL-1 β)
Interleukinas-6 (IL-6)
Kairiojo skilvelio galinis diastolinis diametras (KSGDD)
Kairiojo skilvelio išstūmimo frakcija (KSIF)
Kairysis skilvelis (KS)
Karščio-šoko baltymas-60 (Hsp60; heat shock protein-60)
Koronarinė širdies liga (KŠL)
Kreatino kinazės MB (CK-MB; creatine kinase MB)
Makrofagai (CD68⁺)
Matricinė ribonukleorūgštis (mRNR)
Matrikso metaloproteinazė (MMP)
Matrikso metaloproteinazė-1 (MMP-1)
Matrikso metaloproteinazė-13 (MMP-13)
Matrikso metaloproteinazė-2 (MMP-2)
Matrikso metaloproteinazė-9 (MMP-9)
Mažo tankio lipoproteinai (MTL)
Metaloproteinazės audinių inhibitorius (TIMP; tissue inhibitor of metalloproteinase-1)
Mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas (MIMP)
Natūraliosios ląstelės-žudikės (NLŽ)
Naviko nekrozės faktorius (TNF; tumor necrosis factor)
Naviko nekrozės faktorius alfa (TNF- α ; tumor necrosis factor alpha)
Nesuklasifikuotos kardiomiopatijos rūšys (NKR)
Niujorko širdies asociacijos (NŠA)
Parvovirusas B19 (PVB19)
Pirmo tipo kolagenas (Col I; Collagen type I)
Pirmo tipo kolageno 1- α grandinė (COL1A1)
Pirmo tipo kolageno C-galinis telobaltymas (ICTP; collagen I C-terminal telopeptide)
Pirmo tipo prokolageno C-galinis probaltymas (PICP; procollagen I C-terminal propeptide)

Pirmo tipo prokolageno N-galinis probaltymas (PINP; procollagen I N-terminal propeptide)

Plaučių hipertenzija (PH)

Plaučių kapiliarų pleištinis spaudimas (PKPS)

Plaučių kraujagyslių pasipriešinimas (PKP)

Plautinė arterija (PA)

Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Prieširdžių virpėjimas (PV)

Protrombino laikas (PL)

Raudonieji kraujo kūneliai (RKK)

Reaktyviosios deguonies formos (RDF)

Reliatyvūs šviesos vienetai (RLU; relative light units)

Restrikcinė kardiomiopatija (RKMP)

Riebalų rūgščių sintetazė (RRS)

Smegenų natriurezinis baltymas (BNP; brain natriuretic protein)

Spaudimas plautinėje arterijoje (SPA)

Su Fas receptoriumi susijęs mirties domenas (FADD; Fas-associated death domain)

Su naviko nekrozės faktoriaus receptoriais susijęs mirties domenas (TRADD; TNF receptor-associated death domain)

Širdies indeksas (ŠI)

Širdies nepakankamumas (ŠN)

Širdies resinchronizacinė terapija (ŠRT)

T-limfocitai (CD3⁺)

Transformuojantis augimo faktorius beta 1 (TGF-β1)

Trečio prokolageno tipo C-galinis probaltymas (PIIICP; procollagen III C-terminal propeptide)

Trečio tipo kolagenas (Col III; collagen type III)

Trečio tipo prokolageno N-galinis probaltymas (PIIINP; procollagen III N-terminal propeptide)

Trombocitų ląstelės (TL)

Užląstelinis užpildas (ULU)

Varicella zoster virusas (VZV)

Viso stiklo vaizdas (VSV)

Žmogaus imunodeficito virusas (ŽIV)

Žmogaus leukocitų antigenas (ŽLA)

Žūtį sukeliantis signalinis kompleksas (DISC; death-inducing signaling complex)

2. ĮVADAS

2.1. Literatūros apžvalga

Kardiomiopatijos – tai miokardo sutrikimai, kuriuose dominuoja struktūriniai ir funkciniai širdies raumens pakitimai, galintys pasireikšti net jei nesergama išemine širdies liga, hipertenzija arba net jei nėra širdies vožtuvų patologijos ar įgimtų širdies ligų. Pagal hemodinamines savybes kardiomiopatijos yra skirstomos į penkis morfologinius ir funkcinis fenotipus, kuriems būdingi genetiniai ir negenetiniai mechanizmai: dilatacinė (dKMP), hipertrofinė, restrikinė (rKMP), aritmogeninė dešinio skilvelio (ARVC) ir neklasifikuotos kardiomiopatijos (nKMP) (Elliott, Andersson et al. 2008). Dilatacinės kardiomiopatijos pagrindiniai bruožai: kairiojo skilvelio kameros išsiplėtimas ir sutrikęs miokardo susitraukinėjimas. Šia kardiomiopatijos forma serga tiek vaikai, tiek suaugusieji ir tokiems ligoniams dažniausiai reikalinga širdies transplantacija (Magnani and Dec 2006; Maron, Towbin et al. 2006; Pankuweit, Ruppert et al. 2013). Ligonių, sergančių neišemine dKMP, gydymas gali būti ypač sudėtingas, o ligos eiga – sunkiai nuspėjama. dKMP dažniau pasireiškia vyrams nei moterims ir dažniausiai ja serga žmonės nuo 20-ies iki 60-ies metų amžiaus (Robbins, Kumar et al. 2010). Ligos istorija ir klinikiniai požymiai dažnai būna nespecifiniai. Uždegiminės dKMP klinikinė raiška yra labai skirtinga: gali būti, kad pacientai neturės jokių simptomų ar ligos požymių, kitiems pacientams pasireiškia simptomai nuo miokardo infarkto požymių iki sunkios būklės ar kardiogeninio šoko. Simptomai įprastai išsivysto palaipsniui; kai kurie iš jų pacientams nepasireiškia mėnesius ir netgi metus, nors jau būna išsivystęs kairiojo skilvelio išsiplėtimas. Ryškiausias dKMP simptomas – tai kairiojo skilvelio sistolinis nepakankamumas, tačiau taip pat gali pasireikšti ir dešinėsios širdies pusės nepakankamumas, kuris būtų ypač prastos ligos eigos prognozės ženklas (Towbin and Bowles 2002; Yoshikawa, Baba et al. 2009). Uždegiminė dKMP dažniausiai diagnozuojama naudojant endomiokardo biopsijas, tuo tarpu nustatyti ūminę šios ligos fazę iš specifinių serologinių žymenų kol kas yra sudėtinga.

Nauji dKMP etiologijos tyrimų rezultatai parodė, kad virusinė infekcija, genetiniai sutrikimai ir autoimuniniai mechanizmai yra pagrindinės šios ligos priežastys (Fildes,

Shaw et al. 2009; Yajima and Knowlton 2009; Watkins, Ashrafian et al. 2011). Nuo 1950 metų pradžios buvo atrasti bent trys skirtingi mechanizmai, kurie padėjo aiškinti dKMP vystymąsi. Šiuo metu labiausiai pripažintas potencialus mechanizmas, atrastas 1990-aisiais – tai laipsniška lėtinė širdies miocitų destruktija arba jų funkcijos sutrikimas. Jis yra laikomas tiesiogine, tačiau vėlyva pradinės virusinės infekcijos ir (arba) viruso sukulto imunologinio proceso pasekme. Nors virusinė infekcija yra pripažinta pagrindine dKMP priežastimi, širdis taip pat gali tapti pagrindiniu taikiniu bakterijų, pirmuonių ar parazitų sukeltoms infekcijoms. Be to, širdis gali patirti ir „atsitiktinius pažeidimus“, sukeltus įvairiais toksinais, chemokinais, citokinais ar kryžmiškai reaguojančiais antikūnais. Tai, kad miokardo uždegimas ir virusiniai agentai prisideda prie dKMP patogenezės, įrodo sergančių dKMP pacientų rezultatai, susiję su miokardo viruso genomų pakitimais (Kuhl, Pauschinger et al. 2005; Kuhl, Pauschinger et al. 2005; Mahrholdt, Wagner et al. 2006; Elliott, Andersson et al. 2008). Infekcijos sukėlėjų, kurie galėtų prisidėti prie uždegiminės KMP vystymosi, įvairovė priklauso nuo geografinio regiono, paciento amžiaus, taikomo skirtingo gydymo ir kitų ligų. Infekcijos sukėlėjai pasižymi stebėtinu specifiškumu: virusinės infekcijos, toksiniai ir autoreaktyvūs procesai pirmiausia paveikia miokardą ir perikardą (Maisch, Richter et al., 2006).

Širdis veikia sudėtingo tinklo, sudaryto iš įvairių ląstelių ir užląstelinio užildo (ULU), principu. Širdies raumens ląstelės (kardiomiocitai) egzistuoja trijų matmenų tinkle, kuris susideda iš endotelio ląstelių, kraujagyslių lygiųjų raumenų ir gausybės fibroblastų bei laikinai gyvuojančių imuninių ląstelių populiacijų. Kardiomiocitų ir ULU ryšiais koordinuojamas širdies susitraukimas. Intersticinės fibrozės ir kraujagyslių fibrozės išsivystymas – ryškus širdies patologijos bruožas. Židininė fibrozė, kurią sudaro pirmo ir trečio tipo kolagenas, pasireiškia ankstyvose KMP stadijose. Po kurio laiko fibrozė padidėja ir pradeda tiesiogiai kenkti kardiomiocitų funkcijai. Miokarde egzistuojantys daug kolageno turintys regionai gali sutrikdyti kardiomiocitų susitraukimo ir atsipalaidavimo jungtį, padidinti miokardo standumą ir, savo ruožtu, nuslopinti širdies susitraukinėjimą (Menon, Eidem et al. 2009). Skirtingos ląstelių žūties rūšys, tokios kaip apoptozė, nekrozė/onkozė, autofagija ir proteosominė degradacija, turi įtakos širdies miocitų netekimui, priklausančiam nuo širdies pažeidimo intensyvumo (Guerra, Leri et al. 1999; Predmore, Wang et al. 2010; Vigliano, Cabeza Meckert et al. 2011). Daugelio

multimeriniuose kompleksuose egzistuojančių baltymų koordinuotos pastangos ir tarpląstelinės signalizacijos sudėtingumas lemia, kad jei šios sąveikos sutrinka – pasireiškia širdies veiklos sutrikimas (Harvey and Leinwand 2011). Nors funkcinio požiūriu širdis gali toleruoti kai kuriuos patologinius pažeidimus, tačiau adaptacinis atsakas, palaikantis širdies veiklą, galiausiai sutrinka ir iš to kyla įvairūs funkciniai kardiomiopatiniai sutrikimai.

Miokardo uždegimas – pripažintas svarbiu priežastiniu veiksniumi, atsakingu už dKMP progresavimą (Kawai 1999; Feldman and McNamara 2000; D'Ambrosio, Patti et al. 2001; Mason 2003; Pauschinger, Noutsias et al. 2006; Cooper, Baughman et al. 2007). Į jį įeina autoimuninis, virusinis arba povirusinis uždegimai – čia kaip mediatorius veikia įgytas ir įgimtas imuninis atsakas (citotoksiniai T limfocitai, natūralios ląstelės-žudikės (NLŽ) ir makrofagai) (Maisch, Bauer et al. 1993; Caforio, Goldman et al. 1996; Pankuweit, Portig et al. 1997). Miokardui kenkia vietinis uždegimo mediatorių poveikis: indukuojama azoto oksido sintazė (iNOS) ir citokinai, kuriuos išskiria infiltruoti limfocitai, makrofagai ir (ar) endotelio ląstelės. Dar daugiau širdies sutrikimų kyla dėl tiesioginės antikūnų sąveikos su β - ir kitos rūšies plazminės membranos receptoriais, sarkoplazminio tinklo, mitochondrine ir mikrosomine membranomis arba organelėse esančiais baltymais (Schultheiss, Kuhl et al. 1988; Limas, Limas et al. 1990; Wallukat, Wollenberger et al. 1995; Pohlner, Portig et al. 1997). Galiausiai tam tikri toksinai (alkoholis, antraciklinai, kokainas ir t.t.) gali pakenkti medžiagų judėjimui per membraną, biocheminiams procesams ar sukelti tokių matrikso baltymų kaip distrofinas, lamininas ir kt. sutrikimą arba jų netekimą. Iš pradžių sunku nustatyti miokardo pažeidimus, tačiau jie dažniausiai išsivysto į autoimuninį atsaką ir uždegiminę dKMP (Mason 2003). To priežastis yra tai, kad širdis nuolat patiria požūdegiminius, virusinius, oksidacinius, neurohormoninius stresinius signalus bei kitus mikro- ir makroaplinkos veiksnius, kurie vėliau pastūmėja širdį į lėtinį nepakankamumą (ŠN) (Maisch, Noutsias et al. 2012). Lėtinio ŠN samprata pakito. Anksčiau lėtinis ŠN buvo laikomas paprasta liga, o dabar – daugiasistemių sutrikimu, kuris turi įtakos imuninei, raumenų ir kaulų, inkstų ir kitoms organizmo sistemoms.

Pasitelkus histologinį, imunohistocheminį ir kitus molekulinės biologijos ligų tyrimo metodus, pagal pagrindinius patologinius mechanizmus buvo nustatyta, kurie konkrečių ligų pogrupiai geriau reaguoja į tam tikrus gydymo būdus: imunomoduliacinį, imuniteto

slopinimo ar antivirusinį (Frustaci, Chimenti et al. 2003; Kuhl, Pauschinger et al. 2003; Maisch, Hufnagel et al. 2004; Maisch, Richter et al. 2006; Frustaci, Russo et al. 2009). Šios įžvalgos yra būtinos siekiant išplėtoti naujus gydymo būdus, nukreiptus į etiologinį gydymą. Nors gydant širdies nepakankamumą pasiekta didžiulė pažanga, vis dar yra daug dKMP sergančių pacientų, kuriems būdingas gydymui atsparus širdies nepakankamumas. Jiems nepadeda jokie esami gydymo būdai. Be abejonės, geriausia uždegiminę dKMP gydyti tiksliai nustatant ir pašalinant pradines širdies pažeidimo priežastis, o tai dažniausiai yra labai sudėtinga. Dėl šios priežasties ypač svarbu suprasti, kokie molekuliniai mechanizmai veikia miokarditui progresuojant į uždegiminę dKMP. Perpratus šiuos mechanizmus, palengvėtų veiksmingesnio pažeisto miokardo gydymo paieškos. Naujausių tyrimų duomenimis, imuniteto slopinimu grindžiamas gydymas turėjo teigiamą klinikinį poveikį 90 proc. pacientų, kuriems kardiotropinių virusų nustatymui naudojamo PGR tyrimo rezultatas buvo neigiamas (Wojnicz, Nowalany-Kozielska et al. 2001; Maisch, Richter et al. 2006; Frustaci, Russo et al. 2009). Deja, iki šiol nėra bendro sutarimo dėl specifinių gydymo būdų, kurie papildytų įprastinį širdies nepakankamumo gydymo metodą, naudos.

2.2. Hipotezės

Lėtinės dKMP atveju molekuliniai mechanizmai gali įvairuoti, priklausomai nuo toksinų poveikio intensyvumo ir kilmės. Skaitmeninis širdies fibrozės vertinimas yra tikslesnis ir galėtų pakeisti gydytojo patologo vertinimą.

2.3. Tikslai

Nustatyti molekulinis mechanizmus, kurie dominuoja esant virusinei ir neaiškios kilmės uždegiminei dKMP ir sukurti bei pritaikyti būdą, kuris padėtų atlikti kiekybinį širdies fibrozės vertinimą.

2.4. Uždaviniai

1. Atlikti virusams teigiamų ir virusams neigiamų dKMP biopstatų ir serumų analizę ir iširti:
 - 1.1. uždegimo proceso sukėlimą ir miokardo ląstelių žūties molekulinis mechanizmus;
 - 1.2. širdies fibrozę ir užląstelinį užpildą reguliuojančius molekulinis mechanizmus.
2. Atlikti uždegimui teigiamų ir uždegimui neigiamų pogrupių biopsinės medžiagos ir serumų analizę ir iširti:
 - 2.1. išskiriamų uždegiminių citokinų kiekį ir jų infiltraciją į miokardą;
 - 2.2. vidinio apoptozinio kelio įtaką kardiomiocitų mirčiai;
 - 2.3. išorinio apoptozinio kelio įtaką kardiomiocitų mirčiai;
 - 2.4. molekulinis mechanizmus, kurie reguliuoja širdies fibrozės vystymąsi ir užląstelinio užpildo pokyčius.
3. Įvertinti skaitmeninės vaizdo analizės (*Genie* ir kolokalizacijos) ir vizualaus patologo vertinimo tikslumą, matuojant žmogaus miokardo biopstatų fibrozę.

2.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė

Nepaisant dKMP terapijoje naudojamų intervencinių metodų įtemptų paieškų, ši liga išlieka pagrindinė jaunų pacientų širdies nepakankamumo (ŠN) priežastis. Tokiais atvejais galiausiai reikalinga širdies transplantacija. Dėl mažo širdies donorų skaičiaus laukti transplantacijos tenka labai ilgai, todėl daugelis pacientų miršta esant paskutinei ŠN stadijai taip ir nesulaukę donoro širdies.

PGR tyrimas padeda išsiaiškinti, ar miokardas dKMP ligos metu yra užsikrėtęs virusu, o uždegimo infiltratai, aptikti EMB metu, parodo, kad ligos kilmė yra uždegiminė. Vis dėlto duomenų, kurie įrodytų, kokie molekuliniai mechanizmai atlieka pagrindinį vaidmenį skirtingų rūšių dKMP patogenezėje, dar nepakanka. Todėl pagrindinis šio darbo tikslas – tiksliau ištirti kokie molekuliniai mechanizmai dominuoja tokiais atvejais, kai miokardo ir serumo mėginiai yra virusams arba uždegimui teigiami. Daugelis gydytojų siekia nustatyti, kokie procesai ir molekuliniai mechanizmai dominuoja dKMP raidoje ir kas padėtų juos reguliuoti bei kontroliuoti. Taip pat labai svarbi miokardo nepakankamumo biožymenų paieška. Tik laiku aptikę išskiriamus biologinius žymenis, kurie sutaptų su miokarde vykstančiais procesais, galėsime pagerinti ligos diagnostikos kokybę ir rasti tinkamą gydymą, kuris padėtų išvengti tolesnių destruktivių dKMP procesų.

Dar vienas svarbus šio tyrimo uždavinys – sukurti įrankį, kuris padėtų atlikti kiekybinę širdies fibrozės analizę ir metodiką, leidžiančią įvertinti EMB audinių imunohistocheminį dažymą. Iš tiesų, dažniausiai klinikinės analizės metu pasitaikanti histomorfometrinių parametrų interpretacija vis dar remiasi vien vizualiu gydytojo-patologo vertinimu, kuris yra ne tik labai subjektyvus, bet ir varginantis. Be to, toks vertinimas turi tradicinei patologijos metodikai būdingų apribojimų (tokių kaip: žymi variacija tarp skirtingų vertintojų, bei to paties vertintojo vertinimų, o taip pat ir žemas našumas). Kadangi fibrozės laipsnio nustatymas yra labai svarbus dKMP diagnostikos faktorius, tikslaus fibrozės vertinimui numatėme panaudoti skaitmeninius algoritmus, kurie buvo validuoti pagal kriterijų standartus, gautus skaičiuojant interaktyviosios stereologijos taškus.

2.6. Bendradarbiavimas

Mokslinis darbas buvo įgyvendintas bendradarbiaujant su šiomis mokslo institucijomis:

1. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Patologijos, teismo medicinos ir farmakologijos katedra, Vilnius, Lietuva.
2. Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centro Kamieninių ląstelių biologijos skyriumi, Vilnius, Lietuva.

3. Viešosios įstaigos Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialu Valstybiniu patologijos centru, Vilnius, Lietuva.
4. Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centru, Vilnius, Lietuva.
5. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra, Vilnius, Lietuva.
6. Manheimo universitetinės ligoninės Integratyvios patofiziologijos katedra, Manheimas, Vokietija.
7. Heidelbergo universiteto Manheimo medicinos fakultetu, Manheimas, Vokietija.
8. Gyseno ir Marburgo universitetinės ligoninės Kardiologijos katedra, Marburgas, Vokietija.
9. Normandijos universiteto Path-Image/BioTiCla, Kanai, Prancūzija.
10. *Hull York* medicinos mokyklos Kardiologijos katedros *Castle Hill* ligonine, Cottingham, Jungtinė Karalystė.

3. MEDŽIAGOS IR METODAI

3.1. Išskiriami ir intramiokardiniai biožymenys sergant dKMP

3.1.1. Tiriamųjų atrankos kriterijai

Tyrime dalyvavo 32 pacientai (25 vyrai ir 7 moterys, kurių amžiaus vidurkis $43,14 \pm 11,86$ metai), gydomi tretinio lygio sveikatos priežiūros centre. Visi mėginiai buvo surinkti nuo 2010 m. liepos iki 2013 m. vasario mėn. Visiems pacientams buvo įtariama dKMP ir po miokardito išsivysčiusi KMP.

Pacientų atrankos kriterijai: 1) naujai prasidėjęs dvi savaites trunkantis širdies nepakankamumas (ŠN), kurio metu aptinkama: normalaus dydžio ir išsiplėtęs kairysis skilvelis (KS) ir hemodinamikos sutrikimas; 2) naujai prasidėjęs nuo dviejų savaičių iki trijų mėnesių trunkantis ŠN, kurio metu matomas išsiplėtęs KS ir naujos skilvelinės aritmijos, taip pat antro ar trečio laipsnio širdies blokados sutrikimai arba jei organizmas vieną ar dvi savaites nereaguoja į įprastus gydymo metodus; 3) echokardiografiniai arba angiografiniai bendros arba regioninės KS disfunkcijos įrodymai ir (arba) KS išsiplėtimas, ir (arba) sumažėjusi sistolinė KS išstūmimo frakcija iki mažiau nei 45 %; 4) Angiografinis vainikinių širdies arterijų ligos atmetimas, kuris apibrėžiamas kaip vienos ar daugiau pagrindinių širdies arterijų (50 % ar daugiau) proksimalinės stenozės įrodymas.

Į tyrimą neįtraukti pacientai: 1) jeigu jų ŠN priežastys buvo aiškios, tokios kaip hipertenzija, didelės reikšmės vainikinių širdies arterijų liga, širdies vožtuvų ligos (nors ir nepasireiškę mitralinio vožtuvo nesandarumas), endokrininė liga, sunki inkstų ligos forma ar narkotikų bei alkoholio vartojimas; 2) jeigu jie sirgo ūmiu miokarditu ir juos buvo ištikęs miokardo infarktas; 3) jeigu raštiškai nesutiko, kad jiems būtų atlikta EMB.

Visi vyresni nei 16 metų pacientai (vyriausiam pacientui buvo 67 metai), kurie atitiko prieš tai minėtus kriterijus buvo įtraukti į tyrimą. Viršutinė amžiaus riba nebuvo nustatyta.

Visiems tirtiems pacientams buvo atlikta vainikinių arterijų angiografija, dešinėsios širdies hemodinamikos įvertinimas ir endomiokardo biopsija. Visi pacientai buvo gydomi įprastais gydymo metodais.

3.1.2. Pagrindiniai medicininiai tyrimai

Buvo surinktos visų pacientų ligos istorijos. Taip pat atlikta nuosekli medicininė apžiūra bei tam tikri laboratoriniai tyrimai: skydliaukės funkcijos, serumo elektrolitų (natrio, kalio), didelio jautrumo C reaktyviojo baltymo (DjCRB), gliukozės, hemoglobino A1c (HbA1c), cholesterolio, trigliceridų, didelio tankio lipoproteinų (DTL), mažo tankio lipoproteinų (MTL), širdies fermentų: kreatino kinazės (CK), kreatino kinazės MB (CK-MB), aspartato aminotransferazės (AST), didelio jautrumo troponino-T (DjTnT), karbamido, kreatinino, šlapimo rūgšties tyrimai, bei tokie koaguliacijos tyrimai kaip protrombino laiko (PL), aktyvinto dalinio tromboplastino laiko (ADATL), bendrasis kraujo tyrimas (hemoglobino, hematokrito kiekio, raudonųjų kraujo kūnelių (RKK), baltųjų kraujo kūnelių (BKK) ir trombocitų kiekio).

Konsultacijų metu visiems pacientams buvo atlikti antropometriniai ir kraujospūdžio matavimai, taip pat elektrokardiograma, echokardiografija, MRT, Holterio monitoringas, spiroergometrija. Visi laboratoriniai tyrimai ir matavimai buvo atlikti laikantis įprastinio klinikinio protokolo.

3.1.3. Širdies kateterizacija ir endomiokardinė biopsija

Prieš EMB tyrimą kiekvienam pacientui buvo atlikta vainikinių arterijų angiografija vainikinių arterijų ligai nustatyti bei dešinėsios širdies kateterizacija šiems hemodinamikos parametrams nustatyti: vidutiniam spaudimui plaučių arterijoje (PA), plaučių kapiliarų pleištiniam spaudimui (PKPS), plaučių kraujagyslių pasipriešinimui (PKP) ir širdies indeksui (ŠI).

Dešiniojo skilvelio EMB tyrimui buvo naudotas lankstus bioptomas, kuris buvo įkištas į dešinę šlaunies veną (Cooper, Baughman et al. 2007). Biopsija buvo atlikta pacientams, kurie nesirgo išemija bei širdies ir kraujagyslių sistemos ligomis (stenoze ir okliuzija). Tyrimo mėginiai buvo imami iš dešinės tarpkilvelinės pertvaros pusės ir skirstomi į tris skirtingus pertvaros lygmenis (viršutinį, vidurinį ir apatinį). Surinkti širdies audinio mėginiai buvo nedelsiant sudėti į švarius mėgintuvėlius, atidžiai sužymėti ir suregistruoti. Bent trys EMB mėginiai iš skirtingų pertvaros lygmenų buvo išsiųsti histologiniam ir imunohistocheminiam įvertinimui. Kiti trys EMB mėginiai buvo naudojami DNR ir RNR ekstrakcijai, kad būtų atlikta viruso genomų amplifikacija. Du EMB mėginiai buvo įkelti į biobanką ir laikomi -70 °C temperatūroje tolesniems tyrimams. Biopsinio audinio mėginiai buvo ištirti per 24 valandas.

Prieš atliekant matavimus, audinio mėginiai buvo lizuojami 100- μ l mikrolitru RIPA lizės buferio (*Thermo Scientific Inc.*, JAV). Atsižvelgiant į gamintojo patarimą, tirpalas buvo papildytas proteazių ir fosfatazių inhibitorių tabletėmis: 1 mM PMSF, 1 mM Na₂VO₄, 25 mM NaF (*Thermo Scientific Inc.*, JAV). Biopsijos mėginiai buvo sonikuoti *Bandelin Sonopuls* sonikatoriumi. 10 mV buvo sonikuota 2 kartus po 5 s ant ledo. Mėginiai buvo 30 minučių palaikyti ant susmulkinto ledo, centrifuguojami 12,000g \times 15 min, išpilstyti ir vėliau laikomi -70 °C temperatūroje.

3.1.4. Kraujo mėginių ėmimas ir ruošimas

Tuo pat metu, kai buvo atliekamas EMB tyrimas, iš kiekvieno paciento buvo paimti trys serumo mėginiai ir jais pripildyti trys 8,5 ml talpos mėgintuvėliai su serumo atskyrikliu (SST II) (*BD Vacutainer*®). Kad kraujas sukreštų, mėgintuvėliai buvo 30–45 minutes (bet ne ilgiau nei 60 min) laikomi kambario temperatūroje. Mėginiai buvo 15 minučių centrifuguojami gamintojo rekomenduotu greičiu (1,000–2,000 RCF). Viršutinis sluoksnis buvo atsargiai nusiurbtas, įvertintas mėginių drumstumas ir mėginiai buvo perkelti į tinkamus užšaldyti mėgintuvėlius, sužymėti ir palikti -70 °C temperatūroje.

Prieš atliekant matavimus, visi serumo mėginiai buvo iš lėto atitirpdyti leduose, centrifuguojami 12,000 RCF \times 5 min ir prireikus atitinkamai atskiedžiami.

3.1.5. Virusų genomų aptikimas endomiokardo bioplate

Genominės DNR ir visos RNR išskyrimui iš endomiokardo bioplate buvo naudojamas *ZR-Duet*TM *DNA/RNA Miniprep* rinkinys (*Zymo Research, Irvine, Kanada, JAV*). Pasitelkus atsitiktinai pasirinktus heksamerus ir *First Strand cDNA Synthesis* rinkinį (*Thermo Fisher, Vilnius, Lietuva*), RNR (1 μ g) buvo transkribuota į 20 μ l reakcijų tūrius ir po reakcijos praskiesta dejonizuotu vandeniu (iki 100 μ l). Lizdinės PGR pradmenys, padėję nustatyti adenovirusą (Allard, Albinsson et al. 2001), *Herpes simplex* 1 ir 2 tipo virusus, *Varicella zoster* virusą, Epšteino–Bar virusą, citomegalo virusą, parvovirusą B19, hepatito C virusą, enterovirusą, raudonukės virusą (McIver, Jacques et al. 2005), žmogaus herpes virusą 6 (HHV-6 ir HHV-6B, GenBank prieigos nr. **NC001664.2** ir **NC000898.1**), Kirsten žiurkių sarkomos 2 viruso onkogeno homologą (*KRAS GenBank* prieigos nr. **NM033360**) ir ubikvitino C genus (*UBS*, (1 lentelė), *GenBank* prieigos nr. **NM021009**), buvo susintetinti „Metabion“ (Martinsried,

Vokietija). Tiesioginiai pradmenys antrojo PGR etapo metu buvo pažymėti 6-karboksifluoresceinu FAM nuo 5' galo.

1 lentelė. Oligonukleotidai, panaudoti lizdinei PGR

<i>Tikslas</i>	<i>Pradmuo</i>	<i>Seka</i>	<i>Dydis (bp)</i>
HHV-6	HHV6-N1Fw	ACCCGAGAGATGATTTTGC GTG	128
	HHV6-N1Rev	GCAGAAGACAGCAGCGAGATAG	
	HHV6-N2Fw	CATAGCAACCTTTTCTAGCTTTGAC	
	HHV6-N2Rev	TCTATAACATAAATGACCCCTGGGA	
UBC	UBC-N1Fw	TTCTTTCCAGAGAGCCGAAC	150
	UBC-N1Rev	CCCATCTTCCAGCTGTTTTC	
	UBC-N2Fw	TGGGTTCGCAGTTCTTGTTTG	
	UBC-N1Rev	CCTTCCTTATCTTGGATCTTTGCC	
KRAS	KRAS-N1Fw	CTTTGGAGCAGGAACAATGTCT	160
	KRAS-N2Fw	AATCCAGACTGTGTTTCTCCCT	
	KRAS-N1Rev / N2Rev	TACACAAAGAAAGCCCTCCCC	

Kaip aprašo literatūros šaltiniai (McIver, Jacques et al. 2005) visoms PGR atlikti buvo naudojamas *TProfessional Standard* termocikleris (*Biometra*, Gotingenas, Vokietija). KRAS ir UBC nustatymas buvo panaudotas nukleorūgščių ekstrakcijai validuoti ir buvo atliekamas lygiagrečiai atitinkama tvarka DNR ir RNR virusams. Pirmas PGR etapas, skirtas DNR ir RNR virusams, buvo atliktas 50 µl reakcijos tūryje, į kurį įėjo *Maxima Probe qPCR Master Mix (Fermentas)*, 0,2 µM kiekvieno pirmo etapo galutinės koncentracijos mėginys ir 10 µl/mikrolitrų išskirtos DNR ir kDNR tirpalo. Kiekvienas reakcijos mišinys buvo papildytas Uracil-DNR glikozilaze (*Fermentas*), kad būtų išvengta PGR kryžminės taršos. DNR virusų padauginimo sąlygas sudaro: uracil-DNR glikozilazės apdorojimas 50 °C temperatūroje × 2 min; pradinis denatūracijos etapas 95 °C temperatūroje × 10 min; 35 denatūracijos ciklai 95 °C temperatūroje × 30s, pakaitinimas 55 °C × 30 s, pailginimas 72 °C temperatūroje × 60 s; galutinis pailginimo etapas buvo 72 °C × 7 min. RNR virusų padauginimui reikalinga: uracil-DNR glikozilazės apdorojimas 50 °C × 2 min; pradinis denatūracijos etapas 95 °C temperatūroje × 10 min; 35 denatūracijos ciklai 95 °C temperatūroje × 45 s, pakaitinimas 57 °C × 45 s, pailginimas 72 °C temperatūroje × 60 s, galutinis pailginimo etapas buvo 72 °C × 7 min. Buvo testuojama kiekvienos pradmenų poros reakcija be DNR mėginio (neigiama kontrolė). Antrą kartą PGR buvo atlikta su 50 µl reakcijos tūrio, į kurį įėjo *Maxima Hot Start PCR Master Mix (Fermentas)*, visų antro etapo pradmenų ir 2 µl pirmo etapo produkto 0,2 µM galutinės koncentracijos. Virusų DNR padauginimo

sąlygos buvo tokios pat kaip ir pirmame etape, išskyrus tai, kad antrą kartą nebuvo uracil-DNR glikozilazės apdoravimo etapo. Virusų RNR padauginimo sąlygos: pradinis denatūracijos etapas 95 °C temperatūroje × 10 min, 35 denatūracijos ciklai 95 °C temperatūroje × 20 s, pakaitinimas 57 °C temperatūroje × 20 s, pailginimas 72 °C temperatūroje × 20 s; galutinis pailginimo etapas 72 °C temperatūroje × 7 min. Ubikvitino C PGR nustatymas buvo naudojamas kontrolei ir buvo atliktas lygiagrečiai pagal virusų DNR tyrimo sąlygas.

Galutiniai PGR produktai buvo 10 kartų atskiesti ir analizuojami kapiliarinės elektroforezės būdu su *Genetic Analyzer 3130xl*, PGR dydžiams nustatyti naudojant *GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard* ir *Gene Mapper Software v4.1* (*Applied Biosystems*, Fostersitis, Kanada, JAV). Jei rezultatas buvo teigiamas, iš visų kraujo mėginių išskirtos genominės DNR arba RNR buvo testuojamos papildomai siekiant atmesti kraujyje cirkuliuojančių virusų sukeltą bioptato užteršimą.

3.1.6. ELISA tyrimai

Apoptozinės ir kolagenų sintezės/degradacijos baltymų kiekiai endomiokardo bioptatų serumų mėginiuose buvo matuojami specifiniais ELISA tyrimais. Buvo vertinamos šios molekulės: Bcl-2, kaspazė-9, kaspazė-8 (*Novus Biologicals Europe*, Kembridžas, UK); Bax (*Elabscience Biotechnology Co., Ltd*, Kinija); kaspazė-3, TGF β1, matrikso metaloproteinazė-9 (MMP9), matrikso metaloproteinazės audinių inhibitorius-1 (TIMP-1), APO1/Fas/CD95, Fas ligandas (FasL) (*Invitrogen*, Peislis, UK); I tipo prokolageno terminalinis propeptidas, PICP (*Bio-Medical Assay Co., Ltd.*, Kinija); karščio šoko baltymas-60 (Hsp60) (*AssayPro*, Sent Čarlzas, Misūris, USA).

Bendra baltymų koncentracija serumo ir bioptato mėginiuose buvo matuota naudojant *Lowry Protein Assay* įrangą, kuri buvo pritaikyta pagal gamintojo rekomendacijas (*Thermo Scientific Inc.*, JAV). Absorbcija buvo išmatuota naudojant spektrofotometrą (*Asys UVM 340 Microplate Reader* Didžioji Britanija – *Biochrom Ltd.*), esant 750 nm bangos ilgiui. Siekiant ištirti tikslų bendrą baltymų koncentracijos lygį, buvo naudota standartinė galvijų serumo albumino (BSA) kreivė. Bendra baltymų koncentracija buvo išreikšta µg/ml. Galutinė ieškomų baltymų koncentracija buvo išreikšta ng/mg bendro baltymo kiekiui.

3.1.7. Papildomi biocheminiai matavimai

Prouždegiminiai citokinai TNF α , IL-6 ir IL-1 β serumo mėginiuose buvo nustatyti kietosios fazės ir chemiluminescenciniais imunometriniais tyrimais, kuriems buvo panaudotos *IMMULITE/Immulite 1000* sistemos (*Immulite, Siemens*), pagal gamintojo instrukcijas: katalogas Nr.: LKNFZ (50 testų), LKNF1 (100 testų); IL-6 (Katalogo Nr.: LK6PZ (50 testų), LK6P1 (100 testų); IL-1 β (Katalogo Nr.: LKL1Z (50 testų), LKL11 (100 testų).

Adiponektinui aptikti buvo atliktas *Millipore Adiponektin* tyrimas, atsižvelgiant į gamintojo rekomendacijas (*Millipore, JAV*).

Miokardo nekrozės žymuo (didelio jautrumo troponinas-T (DjTnT)) serume buvo išmatuotas naudojant *Elecsys 2010* analizatorių (*Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana*) ir išreikštas $\mu\text{g/ml}$.

Smegenų natriurezinio peptido (BNP) žmogaus plazmoje matavimas atliktas dviejų etapų imunofermentinės analizės būdu, naudojant *CMIA* technologiją ir *Chemiflex* protokolus. Mėginiai buvo sumaišyti su paramagnetinėmis dalelėmis, padengtomis pirminiu antikūnu prieš BNP. Po tam tikro laiko mėginiai buvo nuplauti ir sumaišyti su akridinu pažymėtu antriniu antikūnu. Mėginiai buvo inkubuojami, vėl nuplauti ir užpilti chemoluminescenciją inicijuojančiu mišiniu. Chemoluminescencija buvo pamatuota chemoluminometru ir išreikšta santykiniais šviesos intensyvumo vienetais (RLU).

Galektino-3 kiekis serumų mėginiuose buvo apskaičiuotas imunofermentinės analizės metodu (ELISA), naudojant *in vitro* diagnostikos prietaisą su mikroplokštele pagal gamintojo instrukcijas (*BG Medicine, Inc.*).

3.1.8. Endomiokardo biopatų histologija ir imunohistochemija

EMB histologinės analizės mėginiai buvo fiksuoti 10 % buferinio formalino tirpale, tada įlieti į parafiną. Mėginiai supjaustyti 3 μm storio segmentais ir naudojami tyrimams. EBM dalis buvo dažoma hematoksilinu ir eozinu (H&E) pagal įprasto histologinio vertinimo protokolą. Patyręs patologas vertino: endokardą (tankį, subendokardinius riebalus, fibrozę ir uždegimą); intersticiumą (fibrozę, riebalus, edemos ir uždegimo būklę) ir kraujo indus (dydį, uždegimo, pažeidimo ir kraujagyslės spindžio stenozės požymius). Pagal standartinį protokolą EMB mėginių jungiamasis audinys buvo nudažytas Masono trichromu (*Masson trichrome*), kad būtų galima nustatyti fibrozės dydį. Keratinas ir raumenų skaidulos nusidažė raudonai, o kolagenas – mėlynai.

Imunohistocheminis dažymas buvo atliktas su tais pačiais fiksuotais ir parafine impregnuotais mėginiais naudojant antikūnus: prieš CD3 (*DAKO* Hamburgas, Vokietija), prieš CD45Ro (*DAKO* Hamburgas, Vokietija) ir prieš CD68 (*DAKO* Hamburgas, Vokietija), prieš α lygiųjų raumenų aktiną (α -SMA) (*Biocompare*, JAV); prieš MMP1 (*Spring Bioscience Corp.*, JAV); prieš-MMP2 (*Leica Biosystems Newcastle Ltd*, Jungtinė Karalystė); prieš MMP9 (*Leica Biosystems Newcastle Ltd*, Jungtinė Karalystė), prieš MMP13 (*Novus Biologicals Europe, Cambridge*, Jungtinė Karalystė), prieš HLA-DR (*DAKO* Hamburgas, Vokietija), prieš PICP (*EMD Millipore*, Temecula, JAV).

3.1.9. Endomiokardo biopatų histocheminio ir imunohistocheminio dažymo vertinimas

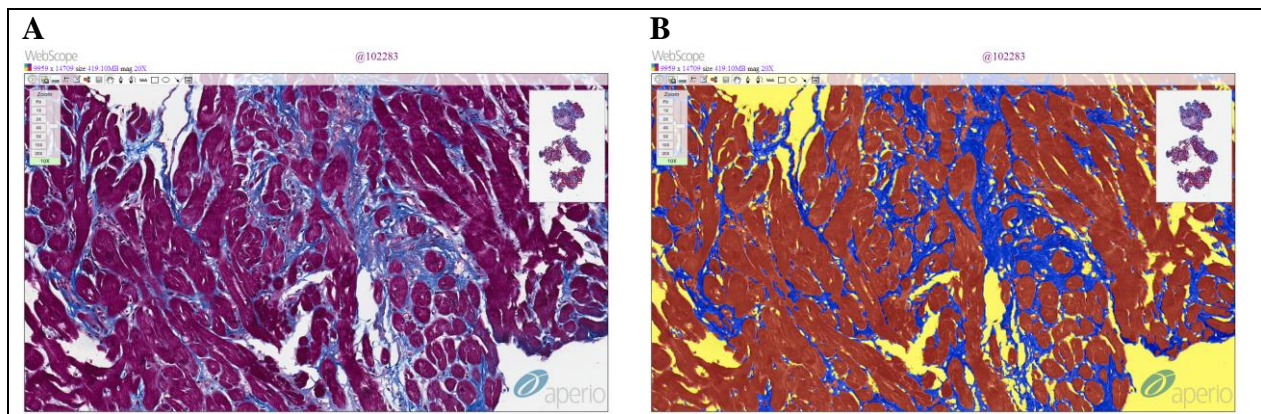
Uždegiminiai infiltratai biopatuose buvo imunohistochemiškai suskirstyti pagal audinių pjūviuose esančią CD3⁺ (T limfocitų), CD45Ro⁺ (aktyviųjų atminties T limfocitų) ir CD68⁺ (makrofagų) raišką. Specifiškai nusidažiusių ląstelių skaičius kiekviename biopsijos mėginyje buvo įvertintas patyrusio patologo ir išreikštas ląstelių skaičiumi/mm². Pagal Pasaulio sveikatos organizacijos ir Tarptautinės kardiologų darbo grupės bendruomenės ir federacijos išleistą kardiomiopatijų klasifikacijos dokumentą, EMB yra laikomas uždegiminiu, jeigu miokarde aptinkami židininiai arba pasklidieji vienbranduoliai infiltratai (leukocitai, CD3⁺ T limfocitai ar CD68⁺ makrofagai), kurių 1 mm² yra >14 (Richardson, McKenna et al. 1996; Mahrholdt, Wagner et al. 2006; Kindermann, Kindermann et al. 2008).

Miokardo nekrozei nustatyti biopsijos mėginiai buvo histochemiškai nudažyti hematoksilinu ir eozinu (H&E). Normalios raumeninės skaidulos turėjo periferinius branduolius, nepažeistą sarkolemą ir nefragmentuotus branduolius. Raumeninių skaidulų branduolių piknozė, edema ir kapiliaruose prasidėjusi leukodiapedezė leido teigti, kad šios miokardo ląstelės pasiekė nekrozės stadiją. Patologas apskaičiavo nekrozių raumeninių skaidulų kiekį ne mažiau kaip trijuose vienas nuo kito nepriklausomuose audinių pjūviuose.

Skaitmeninės eksperimentinių stiklų nuotraukos buvo gautos naudojant *ScanScope Digital Slide Scanner (Aperio, Vista, Kanada)*. Jos buvo padidintos 20 kartų ir archyvuotos tam skirtame *Spectrum Server 11.1.0.751 (Aperio)*. Skenuotų nuotraukų kokybės kontrolė ir kiti tyrimai buvo atlikti naudojant *ImageScope V11.1.2.760 (Aperio)* ir *WebScope V11.1.0.756 (Aperio)*.

Genie algoritmas buvo naudojamas fibrozės masto matavimui, imuniniu būdu nudažytų ląstelių suskaičiavimui ir imunohistochemiškai nudažytų miokardo elementų įvertinimui. *Genie* (*GENetic Imagery Exploration*; liet. Genetinis vaizdų tyrinėjimas (Holland 1992)) yra struktūrų atpažinimo algoritmas, kuris atskiria erdvines ir morfologines ypatybes pagal vartotojo nustatytas struktūras (klases). Algoritmas buvo naudojamas visam stiklui, nekreipiant dėmesio į susiklojančių audinių sekcijas. Dėl to procesas tapo visiškai automatinis. Šiam tyrimui buvo sukurti specifiniai *Genie* klasifikatoriai:

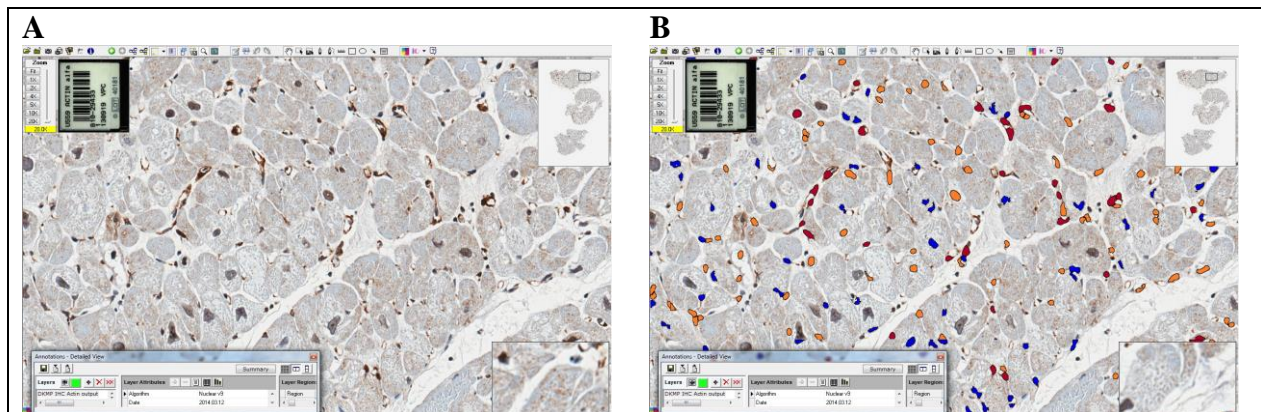
1. Miokardo fibrozės identifikavimui buvo naudojamas bazinis audinių atpažinimo *Genie* klasifikatoriaus v1 algoritmas. Buvo vertinamos visos fibrozės formos (įskaitant intersticinę ir perivaskulinę). Kad fibrozę pavyktų geriau aptažinti, mes naudojome tik erdvinį atpažinimo būdą ir atsisakėme vertinti morfologines savybes. Šiam tikslui *Genie* sistema buvo „išmokyta“ atskirti miokardą, fibrozinį audinį ir stiklą (1 pav.). Bendras širdies fibrozės išreikštumas procentais buvo perskaičiuotas atsižvelgiant į bendrą audinio plotą analizuotuose vaizduose. Stiklo buvo nepaisoma.



1 pav. Fibrozės paryškinimas skaitmeninėje stiklo nuotraukoje, nuotrauka padidinta x10. (A) originalus dažymas Masono trichromu, (B) *Genie* algoritmas

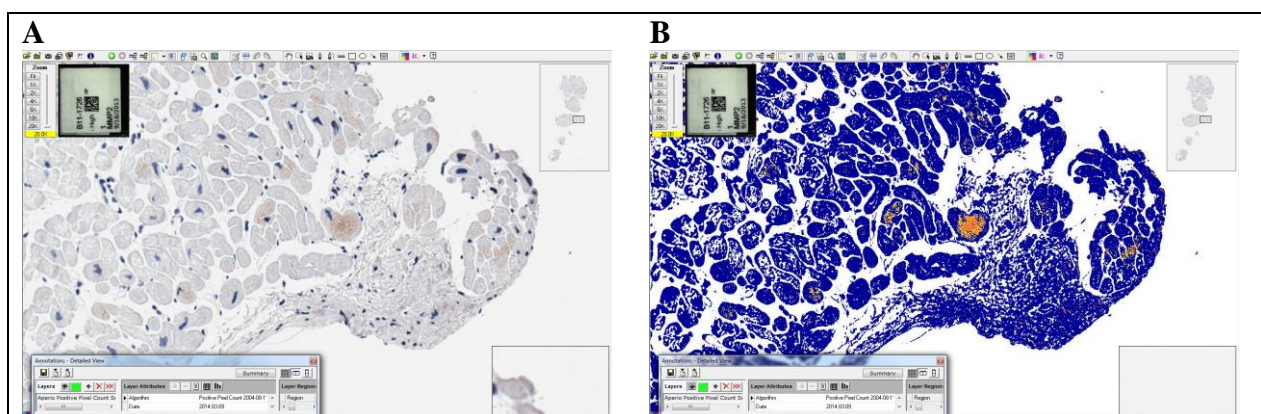
2. *Genie Nuclear v9.0* algoritmas buvo naudojamas aktyvintų imuninių ląstelių (HLA-DR) ir širdies fibroblastų (α -SMA) miokardo audinyje suskaičiavimui. Šis algoritmas atskiria ir suskaičiuoja imuniniu būdu nudažytas teigiamas ir neigiamas ląsteles (2 pav.). Priklausomai nuo parametrų, jis gali sužymėti skirtingų dydžių ir formų ląsteles. Taigi, siekiant tikslių analizės rezultatų, skirtingiems imuninių ląstelių tipams buvo nustatyti skirtingi *Nuclear v9.0*

parametrai. Atlikus analizę, buvo pateiktas bendras imunoteigiamų ląstelių skaičius audinio plote, kuris buvo pamatuotas ir išreikštas ląstelių sk./mm².



2 pav. Imunoteigiamų ląstelių pažymėjimas skaitmeninėje stiklo nuotraukoje, nuotrauka padidinta x20. (A) α -SMA dažymas, (B) *Genie* algoritmas

3. Imuniniu būdu nudažytų baltymų (MMP1, MMP2, MMP9, MMP13 ir PICP) miokardo biopstatuose matavimui panaudotas *Genie* pikselių skaičiavimo algoritmas. Pirmiausia skaitmeninėje stiklo nuotraukoje buvo pažymėta dominanti sritis (ROI) (miokardo biopsija), tada šioje srityje buvo pritaikytas algoritmas. Rezultatai buvo pateikti kaip bendras silpnų, vidutinių, stiprių teigiamų ir neigiamų pikselių kiekis (3 pav.). Kiekvienam baltymui silpnų, vidutinių ir stiprių teigiamų pikselių suma buvo skaičiuojama kaip „teigiama“. Toliau rankiniu būdu buvo apskaičiuotas teigiamų pikselių kiekis procentas ir perskaičiuotas bendram audinio plotui.



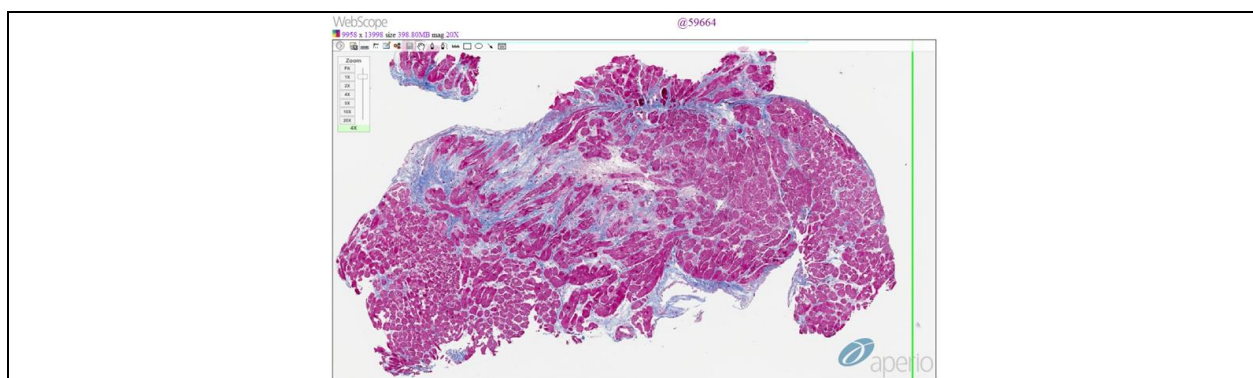
3 pav. Imuniniu būdu nudažyto baltymo pažymėjimas skaitmeninėje stiklo nuotraukoje, nuotrauka padidinta x20. (A) MMP2 dažymas, (B) *Genie* algoritmas

3.2. Kiekybinis miokardo fibrozės vertinimas pasitelkiant skaitmeninę vaizdo analizę ir interaktyviąją stereologiją

3.2.1. Eksperimento modelis

Tyrimui buvo naudota 38-ių pacientų (29 vyrų, 9 moterų, amžiaus vidurkis: 42.3 ± 12.2 metai) endomiokardo biopsijų (EMB) medžiaga, kuriems diagnozuota uždegiminė dKMP. Visi EMB mėginiai buvo surinkti nuo 2010 m. liepos iki 2013 m. vasario. Prieš EMB kiekvienam pacientui buvo atlikta vainikinių arterijų angiografija, kad iš tyrimo būtų pašalinti pacientai, sergantys vainikinių arterijų liga. Dešiniojo skilvelio EMB paėmimui buvo panaudotas lankstus bioptomas, kuris buvo įstumtas į dešinę šlaunies veną (Cooper, Baughman et al. 2007). Ne mažiau nei trys EMB mėginiai buvo įvertinti histologiškai. Į tyrimą buvo įtraukti visi mėginiai siekiant užtikrinti maksimalų fibrozės diapazoną.

Histologinės analizės mėginiai buvo fiksuoti 10 % buferiniame formalino tirpale ir įlieti į parafiną. 3 μm storio pjūviai buvo naudojami viso tyrimo metu. Pjūviai buvo nudažyti Masono trichromu pagal įprastą protokolą. Viso stiklo vaizdai (VSV) buvo išgauti su 0,5 μm raiška iš eksperimentinių stiklų naudojant skenerį (*ScanScope XT*, *Aperio Technologies*, *Vista*, Kanada, JAV), kurio objektyvas didino 20 kartų. VSV buvo išsaugoti Tiff formatu WSI serveryje (*Spectrum 11.1.0.751*, *Aperio*) (4 pav.). Visoms tolesnėms analizėms atsitiktine tvarka buvo pasirinktas vienas stiklų segmentas. Vaizdo analizei buvo naudojami *Aperio* kolokalizacijos ir *Genie* algoritmai.

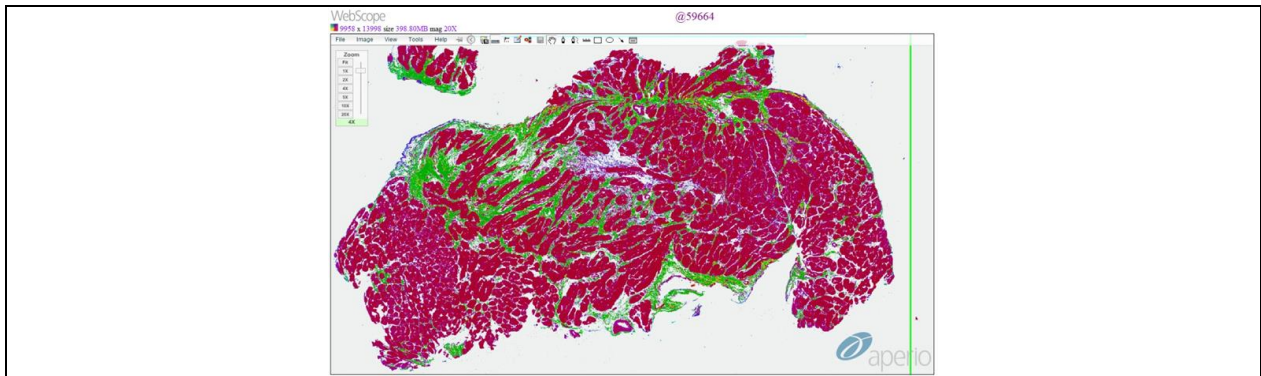


4 pav. Fibrozė skaitmeninėje skaidrėje (originalus dažymas Masono trichromu)

3.2.2. Kolokalizacijos algoritmas

Kolokalizacijos procese naudojama spalvų dekonvoliucija (Ruifrok and Johnston 2001) padeda atskirti nudažytas audinio dalis, suklasifikuoti kiekvieną pikselį pagal esamą nudažytų dalių kiekį. Kolokalizacijos procese kiekvienos nudažytos audinio dalies riba yra nurodyta konkrečiai kiekvienai reikiamai nudažytai audinio daliai (pvz.,

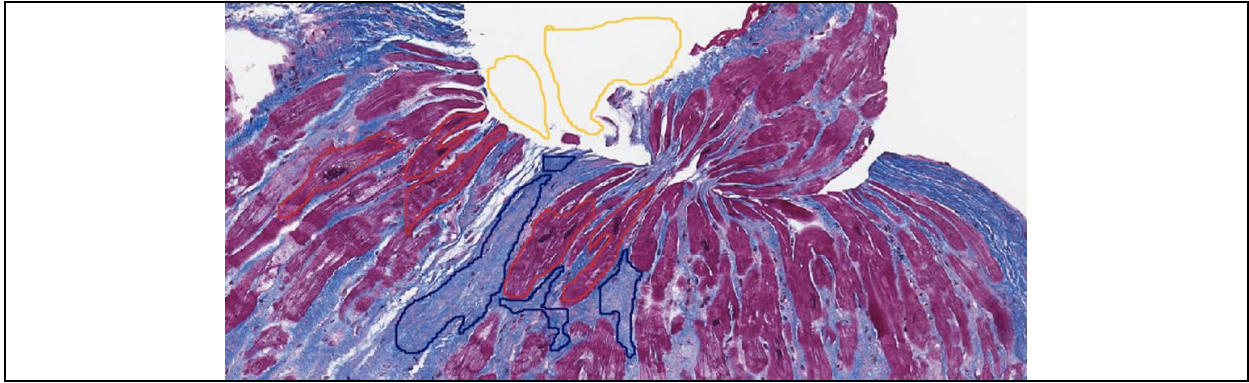
dažymas Masono trichromu). Algoritmu apskaičiuojamas viso audinio plotas, kuriame aptinkami šie dažyto audinio deriniai: 1, 2, 3, 1+2, 1+3, 2+3, 1+2+3, arba nė vieno (buvo įtrauktos ne daugiau nei trys nudažyto audinio dalys). Aštuoniomis spalvomis pažymėta nuotrauka, skirta kolokalizuotų nudažytų audinio dalių vizualizacijai, buvo gauta iš algoritmo. Bendras širdies fibrozės ir biopsijos mėginių procentas buvo apskaičiuotas pagal šių dažymų derinių sumas: 3, 2+3 ir 1+3 (5 pav.).



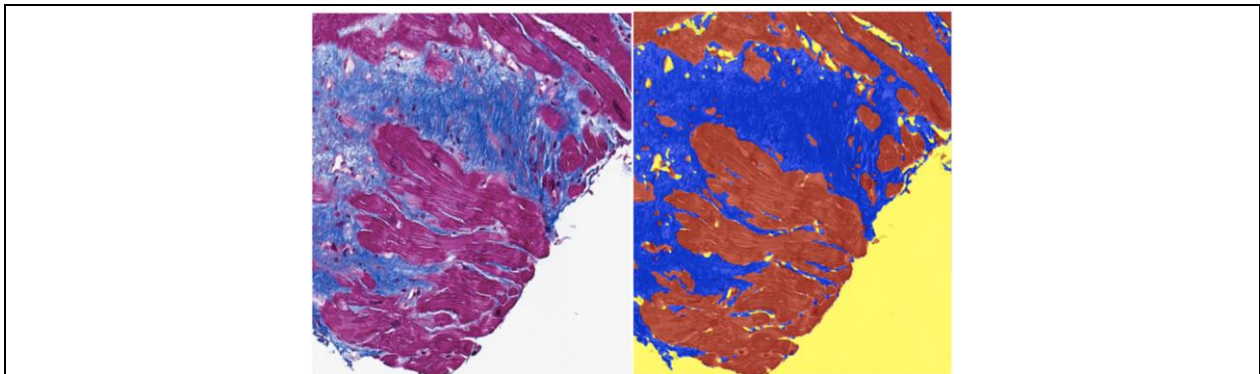
5 pav. Fibrozė skaitmeninėje skaidrėje (kolokalizacijos algoritmas)

3.2.3. Genie algoritmas

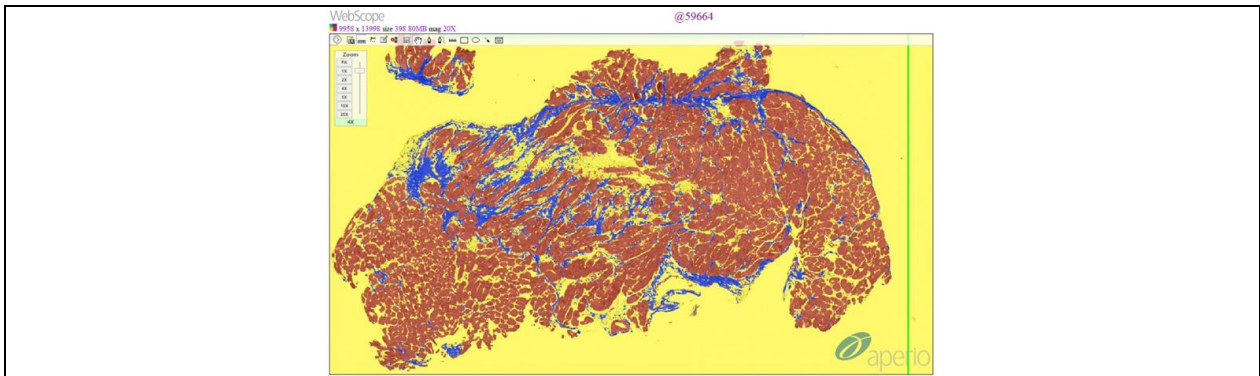
Genie (*GENetic Imagery Exploration*; liet. Genetinis vaizdų tyrinėjimas (Holland 1992) yra struktūrų atpažinimo algoritmas, kuris atskiria erdvines ir morfologines ypatybes pagal vartotojo nustatytas struktūras (klases). Štai taip buvo išplėtotas specialus *Genie* klasifikatorius: 1. Sukurtas naujas *Genie* projektas ir „mokymo“ rinkinys. 2. Prie „mokymo“ rinkinio prijungtos skaitmeninės skaidrės. 3. „Mokymo“ rinkinio skaitmeninėse stiklo plokštelėse buvo nustatytos ir pažymėtos dominančios grupės (6 pav.). 4. Mokymo montažas, sukurtas paleidžiant *Genie Training v1* algoritmą (1000 mokymo iteracijų rinkinį) ant vartotojo pasirinktų subregionų (algoritmas apskaičiavo, kad mokymo tikslumas buvo 99,4 %). 5. Remiantis mokymo „makroprograma“, *Genie Classifier v1* algoritmas buvo panaudotas sukurti specifinį klasifikatorių, kuris būtų testuojamas ir naudojamas (7 pav.). Išbandžius klasifikatorių, pasirinktos struktūrų analizės klasės, skirtos specifinėms užduotims atlikti. Kad geriau pavyktų aptikti širdies fibrozę, naudojome tik erdvinio atpažinimo būdą ir išjungėme morfologinių ypatybių aptikimo funkciją. Šiam tyrimui *Genie* sistema buvo „išmokyta“ atskirti miokardą, fibrozę ir stiklą (7 pav.). Ištirtose nuotraukose bendras širdies fibrozės skaičius procentais buvo perskaičiuotas bendram audinio plotui. Stiklo buvo nepaisoma (8 pav.).



6 pav. *Genie* mokymas ir naudojimas. Dominančių grupių ribų apibrėžimas ir pažymėjimas



7 pav. *Genie* mokymas ir naudojimas. Naujojo specifinio klasifikatoriaus testavimas ir naudojimas

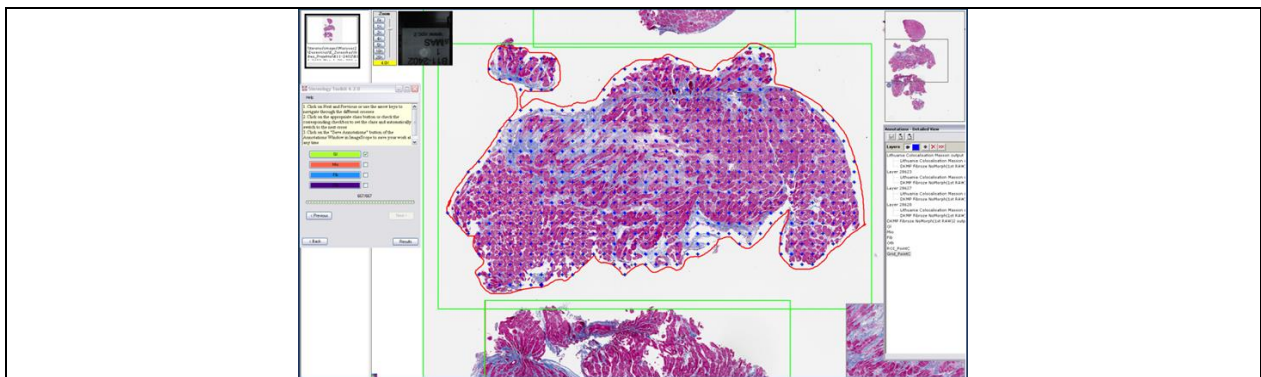


8 pav. Fibrozė, pažymėta skaitmeninėje skaidrėje (*Genie* algoritmas)

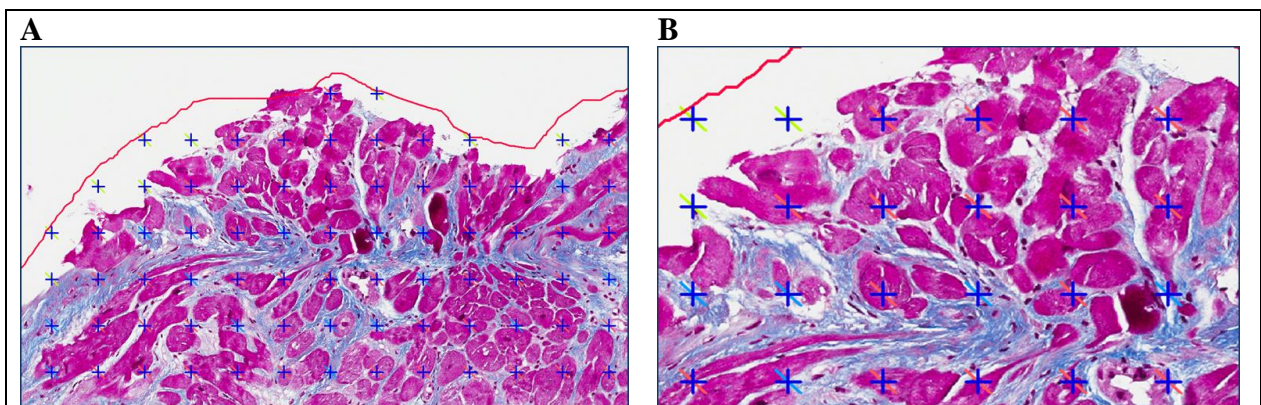
3.2.4. Stereologija

Stereologija yra tarpdisciplininė tyrimų sritis, skirta trijų matmenų struktūrų tūrio apskaičiavimui naudojant horizontalius struktūrų pjūvius. Mes atlikome 3 μm audinio pjūvių tyrimą, taigi stereologija buvo atlikta ne ant 2D plokštumos, bet ant jų projekcijos. Taškų skaičiavimo tinklelis buvo naudojamas frakcijos ploto daliai apskaičiuoti (Baddeley 2005). Šiame tyrime buvo naudojama *Stereology toolkit 4.2.0* iš *ADCIS (Saint Contest, Prancūzija)*. Šis stereologijos modulis leido apibrėžti dominančią sritį (ROI) ir tinklelį, kurie yra projektuojami ant virtualios skaidrės. Tuomet buvo

pritaikytas lentelės tipas, tarpai tarp langelių, šablono dydis (9 pav.). Kad analizė būtų tiksli, rekomenduojama įtraukti 150-200 testo taškų (Weibel 1979; Gundersen ir Jensen 1987). Miokardo audinio ir širdies ploto daliai apskaičiuoti buvo pasirinkta taškų skaičiavimo lentelė su 200 pikselių intervalais ir 20 pikselių dydžio šablonu. Šis stereologijos tinklelio pritaikymas užtikrino minimalų 500 testo taškų kiekį mažiausiuose miokardo bioptatuose ir didesnę skaičiavimų tikslumą. Dominančios struktūros: stiklas, fibrozė, miokardas ir kitos (uždegimas, nekrozė, stiklo plotas miokarde) buvo stebėtojo pasirinktos rankiniu būdu (10 pav.). Širdies fibrozės lygis procentais buvo apskaičiuotas naudojant taškų kiekį, nepaisant „stiklo“ ir „kitų“ kategorijų. Širdies fibrozės ploto dalis, lygi tūrio daliai, buvo apskaičiuota kaip santykis tarp testo dalies, pažymėtos kaip fibrozė, ir visų testo taškų, įeinančių į dominančią sritį (ROI), nepaisant „stiklo“ ir „kitų“ faktorių. Rezultatai buvo išreikšti procentais kartu su atitinkamu neapibrėžtumu, apskaičiuotu Weibelio metodu (Weibel 1979).



9 pav. Fibrozė pažymėta skaitmeninėje skaidrėje, naudojant stereologijos protokolą. ImageScope V11 vaizdas įtraukiant tinklelį (taškų skaičiavimo lentelė su 200 pikselių intervalais ir 20 pikselių dydžio šablonu).



10 pav. Fibrozė pažymėta skaitmeninėje skaidrėje, naudojant stereologijos protokolą. Dominančios struktūros (stiklas, fibrozė, miokardas, kitos) stebėtojo pažymėtos rankiniu būdu. (A) Nuotrauka padidinta x10, (B) Nuotrauka padidinta x20

3.2.5. Vizualus patologo vertinimas

Patyręs patologas, naudodamasis optiniu mikroskopu, procentais įvertino visos širdies fibrozės lygį mėginiuose. Per dvi savaites buvo atlikti du kiekvieno pjūvio vertinimai.

3.3. Statistinė analizė

Darbe pateikiami duomenų vidurkiai ir standartinės vidurkio paklaidos (vidurkis \pm SEM). Visa statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant *SPSS* programinį paketą (versija 19.0 skirta *Windows* operacinei sistemai; *SPSS Inc.*, Čikaga, IL, JAV) su nustatytu 5 % reikšmingumo lygmeniu.

3.3.1. dKMP duomenų analizė

Normalus duomenų pasiskirstymas buvo patikrintas Šapiro–Vilko testu. Virusui neigiamos, virusui teigiamos taip pat uždegimui neigiamos ir uždegimui teigiamos pacientų grupių parametrų skirtumai buvo patikrinti Stjudento *t* testu arba Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumos testu (tikslėni paaiškinimai pateikti legendose ir lentelių pavadinimuose). Palyginimui buvo panaudotas Pirsono koreliacijos koeficientas. Kategorinių kintamųjų palyginimui, kur tiko, buvo taikomas Pirsono chi kvadrato testas.

3.3.2. Fibrozės vertinimo duomenų analizė

Statistiniam duomenų palyginimui buvo panaudotas Pirsono koreliacijos koeficientas, *post hoc* analizė (Vilkoksono žymėtų rangų metodika su Bonferonio pataisomis) ir taškinės diagramos (su susikirtimu ir nuolydžiu). Prieš brėžiant taškinės diagramas, buvo atlikta natūrali visų matavimų logaritminė transformacija, kad duomenis būtų galima tvarkyti pagal standartus. Buvo pasitelkta Bland–Altman statistinė analizė siekiant patikrinti matavimo metodų ir fibrozės atitikimą (Bland and Altman 1999), naudojant stereologijos vertinimą kaip X ašies pamatinį metodą (Krouwer 2008).

3.4. Etikos principų laikymosi patvirtinimas

Tyrimą patvirtino Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komitetas (licencijos Nr. 158200-09-382-103). Visi pacientai pateikė rašytinius sutikimus, kad duomenys apie kiekvieną jiems atliktą tyrimą būtų įtraukti į šį darbą.

Tyrimas atitinka principus, išdėstytus *Helsinki* deklamacijoje.

4. REZULTATAI

4.1. Virusui teigiama dKMP pacientų tiriamoji grupė

4.1.1. Viruso genomo nustatymas endomiokardo biopsiatuose

Iš 32-iejų tyrime dalyvavusių pacientų 14-ai (43,8 %) buvo nustatytas viruso genomas. Buvo rastos šios virusų rūšys: parvovirusas B19 (PVB19) (n = 11; 34,4 %), žmogaus herpes virusas 6 (HHV-6) (n = 4; 12,5 %), enterovirusas (EV) (n = 1; 3,1 %), hepatito C virusas (HCV) (n = 1; 3,1 %), Epšteino–Bar virusas (EBV) (n = 1; 3,1 %), *Varicella zoster* virusas (VZV) (n = 1; 3,1 %). 3-ims pacientams (9,38 %) buvo nustatyta virusų koinfekcija: du EMB tyrimo mėginiai rodė PVB19 ir HHV6, o vienas EMB mėginys rodė PVB19 ir HCV virusus. Vieno paciento tyrimų rezultatai rodė trigubą infekciją: PVB19, HHV6 ir EV.

Visi pacientai buvo suskirstyti į dvi grupes: virusui neigiamą (n = 18) ir virusui teigiamą (n = 14) pagal tai, ar EMB analizės metu buvo aptiktas viruso genomas.

4.1.2. Pagrindiniai klinikiniai parametrai

Antroje (2) lentelėje pateikti pagrindiniai tyrimo grupių pacientų duomenys. Nebuvo pastebėta jokių ypatingų skirtumų tarp grupių pacientų lyties, amžiaus ir ŠN simptomų pasiskirstymo.

Niujorko širdies asociacijos (NŠA) 1994 metais išleista funkcinė klasifikacija apibūdina ŠN kaip simptominių sindromą (Dolgin 1994). Dauguma mūsų tyrime dalyvavusių priklausė NYHA III klasei. 11 (61 %) pacientų buvo iš virusui neigiamos grupės ir 12 (85 %) – iš virusui teigiamos grupės. Sunkiais ŠN simptomais (NYHA IV klasė) virusui neigiamoje grupėje skundėsi keli pacientai (iš viso 6,33 %), o virusui teigiamoje grupėje dar mažiau (iš viso 1,7 %). Šis skirtumas buvo nereikšmingas (p = 0,075).

Dviejų grupių prieširdžių virpėjimo (PV) ir kairiosios širdies pluošto kojų blokados (KHPKB) elektrokardiografinių rezultatų dažniai skyrėsi mažai (PV – 3 (17 %) ir 1 (7 %), p = 0,360; KHPKB – 5 (28 %) ir 2 (14 %), p = 0,360) ir netgi buvo mažesni virusui teigiamoje pacientų grupėje.

Apskritai, pagrindiniai echokardiografijos parametrai rodė požymius, būdingus dKMP: sumažėjusią kairiojo skilvelio išstūmimo frakciją (KSIF) ir kairiojo skilvelio

išsiplėtimą. Palyginus abiejų grupių rezultatus ryškių skirtumų nepastebėta: KSIF $23,11 \pm 1,6 \%$ ir $24,93 \pm 1,39 \%$ ($p = 0,413$), kairiojo skilvelio galinis diastolinis diametras (KSGDD) $6,87 \pm 0,24$ cm ir $6,64 \pm 0,18$ cm, kairiojo skilvelio galinio diastolinio diametro indeksas (KSGDDI) $3,66 \pm 0,12$ cm/m² ir $3,54 \pm 0,12$ cm/m².

2 lentelė. Pagrindiniai tyrimo grupių pacientų duomenys

<i>Klinikiniai duomenys</i>	<i>Virusui neigiama tyrimo grupė</i>		<i>Virusui teigiama tyrimo grupė</i>		p vertė
	Pacientų sk.	Vertė	Pacientų sk.	Vertė	
Lytis (vyras/moteris)	18	16 (89 %) / 2 (11 %)	14	9 (64 %) / 5 (36 %)	0,095
Amžius (metai)	18	$45,11 \pm 3,18$	14	$40,79 \pm 2,29$	0,279
ŠNA					
II	18	1 (6 %)	14	1 (7 %)	0,854†
III	18	11 (61 %)	14	12 (85 %)	0,125†
IV	18	6 (33 %)	14	1 (7 %)	0,075†
Širdies parametrai					
KHPKB (%)	18	5 (28 %)	14	2 (14 %)	0,360†
Nuolatinis PV (%)	18	3 (17 %)	14	1 (7 %)	0,419†
KSIF (%)	18	$23,11 \pm 1,6$	14	$24,93 \pm 1,39$	0,413
KSGDD (cm)	18	$6,87 \pm 0,24$	14	$6,64 \pm 0,18$	0,460
KSGDD I (cm/m ²)	13	$3,66 \pm 0,14$	14	$3,54 \pm 0,12$	0,522
Vid. Ao (mmHg)	11	$91,73 \pm 3,26$	10	$84,6000 \pm 3,44$	0,149
Vid. DPF (mmHg)	15	$17,00 \pm 2,22$	11	$9,00 \pm 1,54$	0,011*
Vid. PKPS (mmHg)	16	$29,00 \pm 2,62$	12	$17,75 \pm 2,18$	0,004*
Vid. SPA (mmHg)	16	$40,19 \pm 3,45$	12	$25,42 \pm 2,6$	0,003*
ŠI (L/min/m ²)	13	$2,08 \pm 0,2$	8	$2,41 \pm 0,17$	0,309

* Reikšmingumo lygis $p < 0,05$. † Chi kvadrato testas. Duomenys pateikti kaip vid. \pm SEM. Santrumpos: NYHA – Niujorko širdies asociacijos funkcinio pajėgumo klasė; KHPKB – kairiosios Hiso pluošto kojų blokada, PV – prieširdžių virpėjimas, KSIF – kairiojo skilvelio išstūmimo frakcija, KSGDD – kairiojo skilvelio galinis diastolinis diametras, KSGDDI – kairiojo skilvelio galinio diastolinio diametro indeksas; Ao – aortos, DPS – dešiniojo prieširdžio spaudimas, PKPS – plaučių kapiliarų pleištinis spaudimas, SPA – spaudimas plautinėje arterijoje, ŠI – širdies indeksas.

Pacientams buvo atlikta širdies kateterizacija, siekiant įvertinti hemodinamikos sutrikimą, patvirtinti plautinės hipertenzijos (PH) diagnozę bei nustatyti PH sunkumą (PH nustatoma tuomet, kai vidutinis spaudimas plautinėje arterijoje (SPA) būna 25 mmHg ramybės būsenoje) (Badesch, Champion et al. 2009). Taip pat buvo pamatuotas vidutinis plaučių kapiliarų pleištinis spaudimas (VPKPS), šis tyrimas reikalingas diferencinei PH diagnostikai atlikti dėl kairiosios širdies pusės nepakankamumo (Simonneau, Robbins et al. 2009). Abiejose grupėse šie hemodinamikos parametrai buvo padidėję ir tai įrodo, jog kairiosios širdies pusės nepakankamumas sukėlė PH. Visgi

hemodinamikos rodikliai (SPA PKPS, DPS) buvo daug aukštesni virusui neigiamoje tyrimo grupėje (vidutinis SPA $40,19 \pm 3,45$ ir $25,42 \pm 2,6$, $p = 0,003$; vidutinis PKPS $29,00 \pm 2,62$ ir $17,75 \pm 2,18$, $p = 0,004$; vidutinis DPS $17,00 \pm 2,22$ ir $9,00 \pm 1,54$, $p = 0,011$). Šis skirtumas parodo, kad virusui neigiamos grupės pacientai sirgo labiau pažengusia PH forma, o šiais atvejais ligos prognozė būna prastesnė (D'Alonzo, Barst et al. 1991). Širdies indeksas (ŠI) buvo sumažėjęs abiejose grupėse ir tarp jų nebuvo didelio skirtumo ($2,08 \pm 0,2$ vs $2,41 \pm 0,17$, $p = 0,309$). Virusui teigiamos pacientų grupės hemodinaminė situacija buvo geresnė nei virusui neigiamos galbūt dėl mažesnės miokardo fibrozės ir žemesnio širdies susitraukimus reguliuojančių baltymų kiekio. Dėl nuolatinio viruso buvimo miokarde hemodinamikos rodikliai greičiausiai pradėtų didėti ir tai reikštų blogesnę ligos prognozę.

Be to, atvirkštinis ryšys tarp KSIF su DjCRB ir BNP (atitinkamai $R = -0,803$, $p = 0,005$; $R = -0,630$, $p = 0,016$) taip pat parodė, kad, jeigu miokardas yra užkrėstas virusu ilgesnį laiką, tai gali padidinti uždegimo ir fibrozės tikimybę bei vėlesnį skilvelio natriurezinio peptido išsiskyrimą, kuris galėtų išderinti įprastinę miokardo veiklą ir sukelti širdies nepakankamumą (2 ir 4 lentelė).

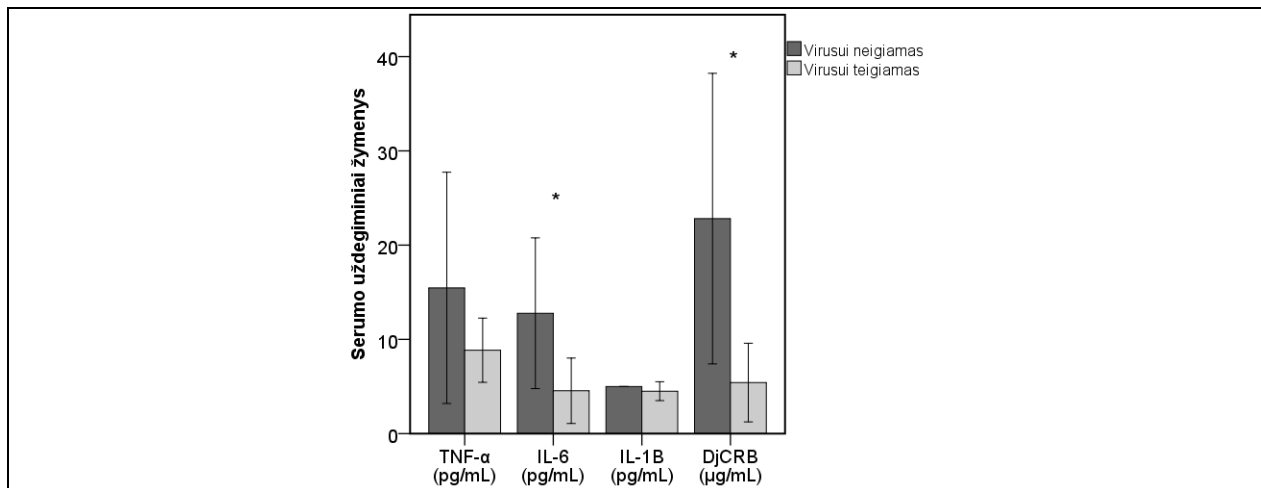
Abiejų grupių pacientai buvo gydomi vienodai pagal rekomendacijas (3 lentelė) (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008; Dickstein, Vardas et al. 2010; McMurray, Adamopoulos et al. 2012). Palyginus abiem grupėms paskirtus vaistus, nebuvo pastebėta jokių ryškių skirtumų.

3 lentelė. Įprastinis tyrimo grupių gydymas (pagal Europos kardiologų draugijos (EKD) rekomendacijas)

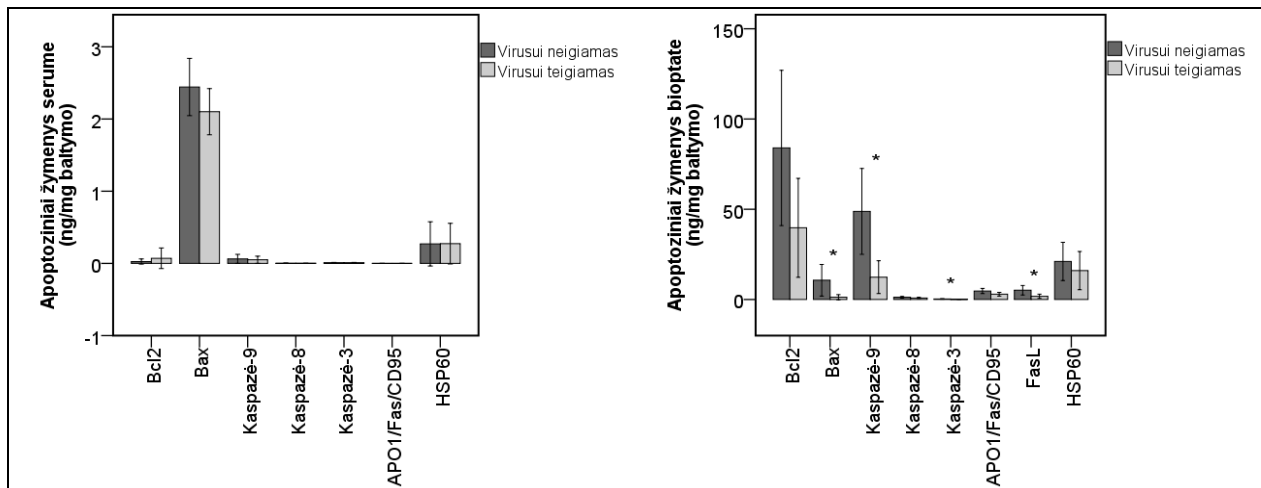
<i>Standartinis ŠN gydymas</i>	<i>Virusui neigiama grupė</i>	<i>Virusui teigiama grupė</i>
AKF inhibitoriai	9 (50 %)	7 (50 %)
β adrenoblokatoriai	16 (89 %)	13 (93 %)
Rusmenė (prieširdžių virpėjimo atveju)	3 (17 %)	6 (43 %)
Diuretikai	18 (100 %)	14 (100 %)
Kraujo krešėjimą slopinantys vaistai (prieširdžių virpėjimas, išstūmimo frakcija < 40 %)	14 (78 %)	7 (50 %)
Antiaritminiai vaistai (III klasės: amiodaronas)	5 (28 %)	2 (14 %)
Intervencijos		
Implantuojamas širdies defibriliatorius (IŠD)	0 (0 %)	0 (0 %)
Širdies resinchronizacinis gydymas (ŠRG)	3 (17 %)	1 (7 %)

4.1.3. Uždegimo ir kardiomiocitų žūtis įvertinimas virusui teigiamos ir virusui neigiamos dKMP mėginiuose

Manoma, kad intramiokardinė virusinė infekcija iš esmės yra su uždegimu susijęs procesas, kurio rezultatas – miokardo ląstelių žūtis. Visgi tyrimo duomenys rodo, jog uždegimo ir apoptozės lygis sumažėjo tiek serume, tiek biopsijos mėginiuose. Uždegiminių citokinų IL-6 ir DjCRB kiekio sumažėjimas serume buvo statistiškai reikšmingas (11 pav.), o apoptozinių žymenų pokyčiai buvo reikšmingi tik biopsijos mėginių rezultatuose (12 ir 13 pav., $p < 0,05$).



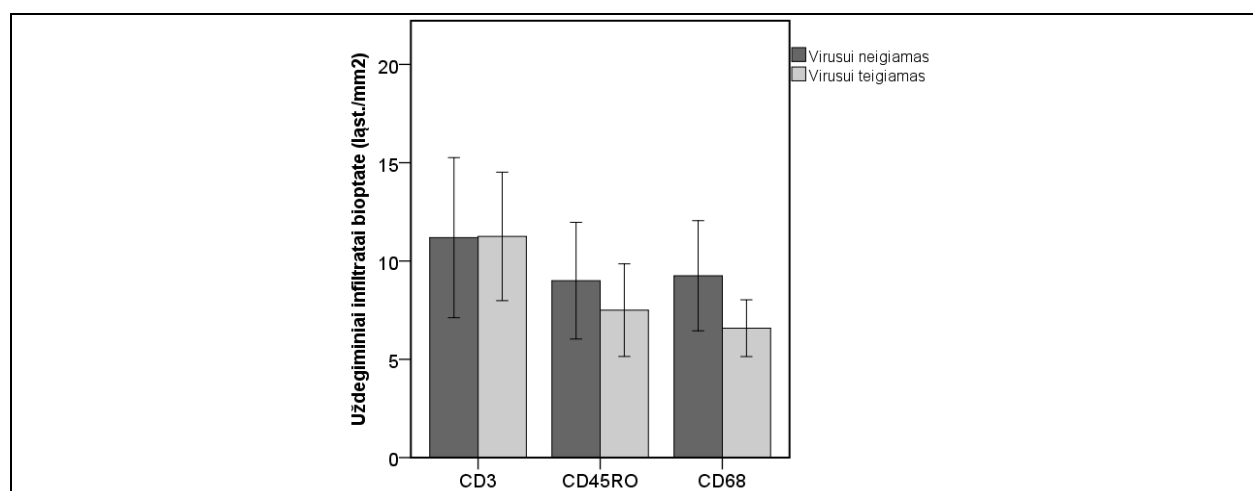
11 pav. Uždegiminių žymenų lygiai serume. ELISA tyrimo duomenys pateikiami kaip vid. ± SEM. Duomenys buvo laikomi reikšmingais, kai * $p < 0,05$



12 pav. Apoptozinių žymenų lygiai serume. ELISA tyrimo duomenys pateikiami kaip vid. ± SEM

13 pav. Apoptozinių žymenų lygiai biopatuose. ELISA tyrimo duomenys pateikiami kaip vid. ± SEM. Duomenys buvo laikomi reikšmingais, kai * $p < 0,05$

Uždegiminių infiltratų lygis CD3⁺, CD45Ro⁺ ir CD68⁺ virusui teigiamos pacientų grupės biopstatuose taip pat sumažėjo ir tai patvirtino, kad intramiokardinio uždegimo nėra arba jis sumažėjo (14 pav.).



14 pav. Uždegiminių infiltratų kiekis biopstatuose. IHC teigiamų ląstelių duomenys pateikiami kaip vid. ± SEM iš ne mažiau kaip trijų viena nuo kitos nepriklausomų lokalizacijų, įvertinti patyrusio patologo

Be to, virusui teigiamuose serumo mėginiuose taip pat buvo aptikta, kad miokardo nekrozės žymens (didelio jautrumo Troponino-T (DjTnT)) kiekis sumažėjo 2,6 karto – iš to galima daryti išvadą, kad nekrozės nepastebėta (4 lentelė). Tą patį patvirtino histologinė biopstatų analizė, kurios metu audinių mėginiai buvo ištirti IHC būdu naudojant hematoksiliną ir eoziną.

4 lentelė. Įvertintų baltymų duomenų santrauka virusui neigiamų ir virusui teigiamų dKMP serumuose ir biopstatuose

<i>Kintamieji</i>	<i>Virusui neigiama grupė</i>		<i>Virusui teigiama grupė</i>		p vertė
	Pacientų ertė sk.		Pacientų Vertė sk.		
ELISA baltymų tyrimai serumuose					
MMP9 (ng/mg baltymas)	18	1,4886 ± 0,0648	14	1,4320 ± 0,0630	0,536
TIMP-1 (ng/mg baltymas)	18	6,1611 ± 0,2028	14	5,7538 ± 0,2945	0,266
MMP-9/TIMP-1	18	0,2428 ± 0,0084	14	0,2529 ± 0,0108	0,465
PICP (ng/mg baltymas)	18	0,1589 ± 0,0321	14	0,0792 ± 0,0180	0,039*
ICTP (ng/mg baltymas)	18	0,0177 ± 0,0023	14	0,0148 ± 0,0033	0,495
PICP/ICTP	18	11,2537 ± 2,1036	14	8,6832 ± 3,9652	0,573
TGFβ1 (pg/mg baltymas)	18	13,9515 ± 1,9427	14	13,7339 ± 2,1101	0,940

ELISA baltymų tyrimai**bioptatuose**

MMP-9 (ng/mg baltymai)	18	2,9149 ± 1,0740	13	1,3321 ± 0,3952	0,089 _j
TIMP-1 (ng/mg baltymai)	18	9,6116 ± 1,4578	13	5,8772 ± 1,6243	0,266
MMP-9/TIMP-1	18	0,3434 ± 0,0838	13	0,4107 ± 0,1461	0,694
PICP (ng/mg baltymai)	18	4,2779 ± 2,3323	13	1,0708 ± 0,5718	0,312 _j
ICTP (ng/mg baltymai)	18	0,0733 ± 0,0337	13	0,2636 ± 0,1184	0,196 _j
PICP/ICTP	18	14,6047 ± 6,3008	13	3,4117 ± 2,1170	0,154
TGF-β1 (pg/mg baltymai)	18	122,0955 ± 82,6902	13	34,3392 ± 29,0622	0,622 _j

Imuno- ir histocheminiai**baltymų tyrimai bioptatuose**

MMP-1 (%)	15	6,6747 ± 1,5248	14	14,6564 ± 22,9998	0,022*
MMP-2 (%)	15	2,8940 ± 0,3412	14	7,0350 ± 3,9725	0,292
MMP-9 (%)	15	10,9707 ± 4,2136	14	9,6871 ± 1,5709	0,783
MMP-13 (%)	15	12,2860 ± 2,5354	14	12,6650 ± 2,6789	0,919
α-SMA (%)	15	24,1400 ± 4,6102	14	21,4821 ± 2,5839	0,620
HLA-DR (%)	15	0,8253 ± 0,21629	14	0,8886 ± 0,21432	0,837

Kiti tyrimai serumuose

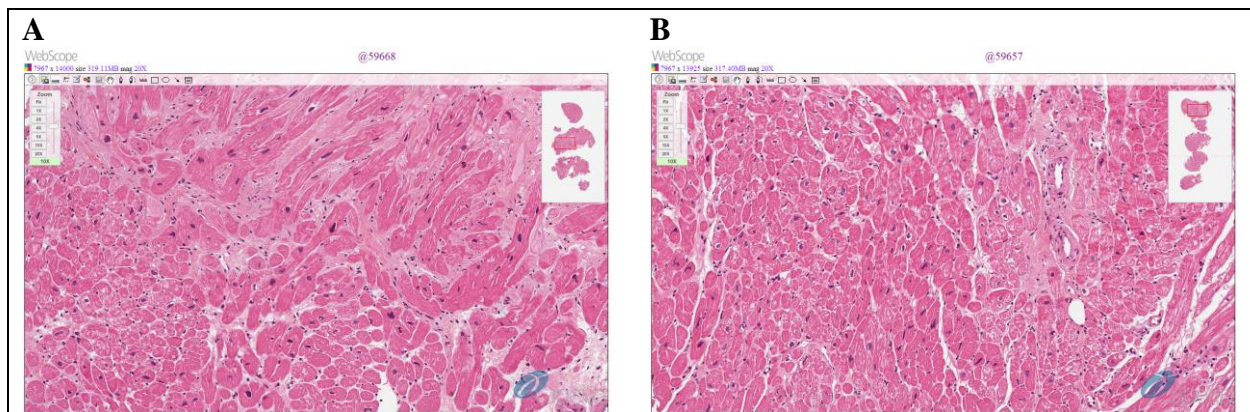
Adiponektinas (μg/ml)	18	28,3389 ± 3,4627	14	15,0143 ± 2,7360	0,005*
BNP (pg/ml)	18	1841,7944 ± 341,4525	14	936,4786 ± 260,1920	0,044*
DjCRB (μg/ml)	17	22,8118 ± 7,7080	10	5,4170 ± 2,0884	0,043*
DjTnT (pg/ml)	18	74,0878 ± 29,8031	13	28,8277 ± 4,9154	0,151
Galektinas-3 (ng/ml)	18	12,8344 ± 0,8536	14	11,0579 ± 1,0107	0,190
Širdies fibrozė (%)	18	17,9724 ± 2,2076	14	10,4818 ± 1,6854	0,012*

Duomenys pateikti kaip vid. ± SEM. * Duomenys laikomi reikšmingais kai $p < 0,05$; _j Mano-Vitnio-Vilkoksono rangų sumos testas. Santrumpos: Bcl-2 – B ląstelių limfoma 2 baltymas; Bax – su Bcl-2 susietas X baltymas; MMP – matrikso metaloproteinazės; TIMP – matrikso metaloproteinazės audinių inhibitoriai; PICP – I tipo prokolageno C-terminalinis propeptidas; ICTP – I tipo prokolageno C-terminalinis telopeptidas; TNF-α – naviko nekrozės faktorius alfa; IL-1β – interleukinas 1 beta; IL-6 – interleukinas 6; DjCRB – didelio jautrumo C reaktyvusis baltymas; djTnT – didelio jautrumo troponinas T; TGF-β1 – transformuojantis augimo faktorius β1; BNP – smegenų natriurezinis peptidas.

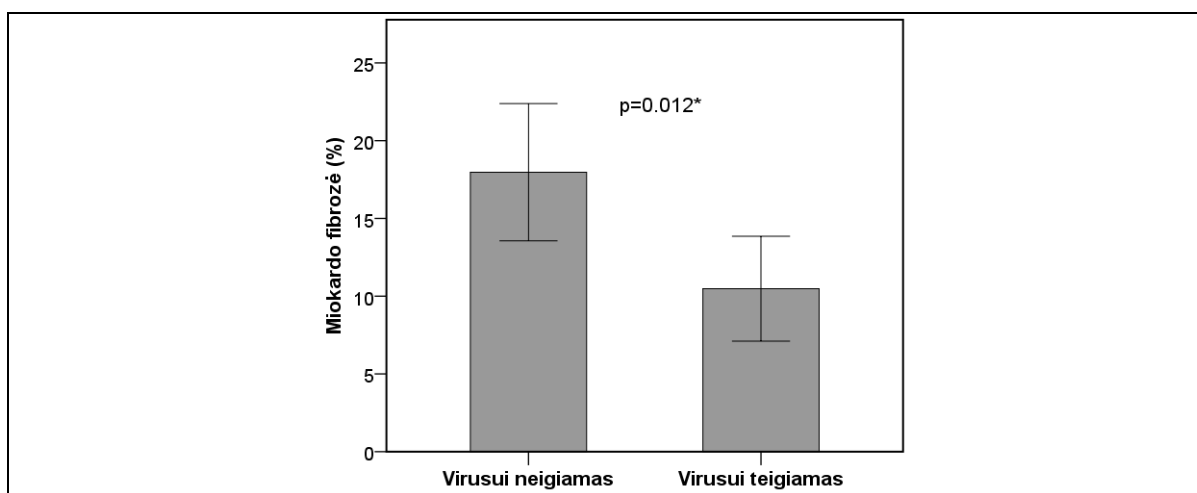
4.1.4. Virusų poveikis susitraukimą reguliuojantiems miokardo audinio baltymams

Uždegimo, apoptozės ir nekrozės nebuvimas virusui teigiamos pacientų grupės miokarde paskatino iširti fibrozę ir susitraukimo ypatybes bei šiuos procesus reguliuojančius molekulinis mechanizmus (15 pav.).

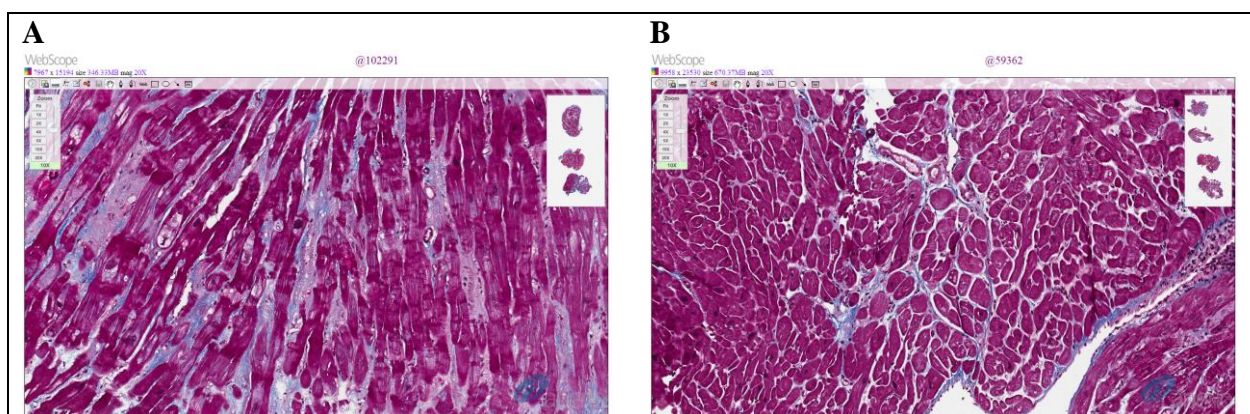
Duomenys 4 lentelėje, 16 pav. ir 17 pav. rodo mažesnę fibrozės intensyvumą virusui teigiamos grupės pacientų miokarde.



15 pav. Kairiojo skilvelio uždegimo vaizdas EMB tyrime. Mikroskopinėse nuotraukose matome po vieną kiekvieną grupę reprezentuojančio paciento nuotrauką. (A) virusui neigiama; (B) virusui teigiama. Mėginių dažymui buvo naudojamas hematoksilinas ir eozinas. Nuotrauka padidinta: x10

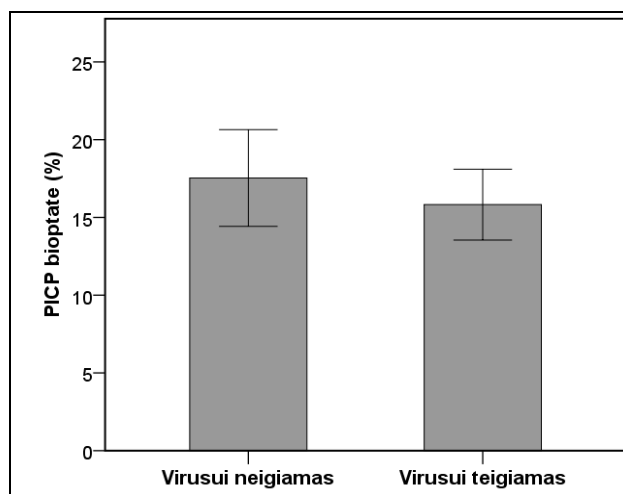


16 pav. Fibrozės lygiai biopsiatuose. Duomenys pateikiami kaip vid. \pm SEM iš ne mažiau nei trijų vienas nuo kito nepriklausomų matavimų. Duomenys buvo laikomi reikšmingais, kai $*p < 0,05$

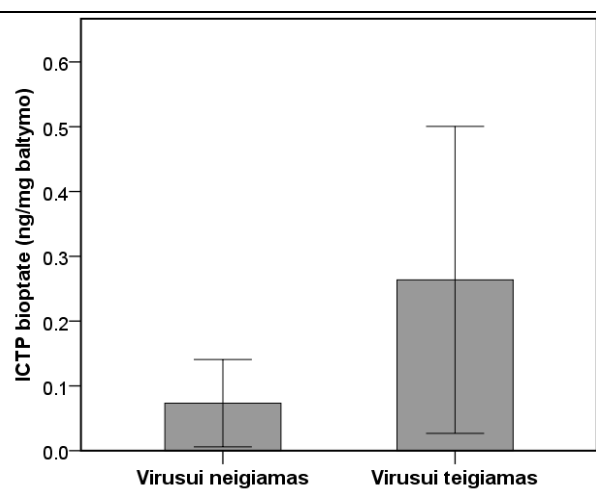


17 pav. Fibrozė dešiniojo skilvelio EMB. Mikroskopinėse nuotraukose matome po vieną kiekvieną grupę reprezentuojančio paciento nuotrauką. (A) virusui neigiama (skaitmeniniu būdu apskaičiuotas fibrozės lygis – 21,20 %); (B) virusui teigiama (skaitmeniniu būdu apskaičiuotas fibrozės lygis – 9,79 %). Širdies mėginiai nudažyti Masono trichromu (fibrozė pažymėta mėlyna spalva). Dideli kolageno kiekiai parodo aukštą fibrozės lygį. Nuotrauka padidinta: x10

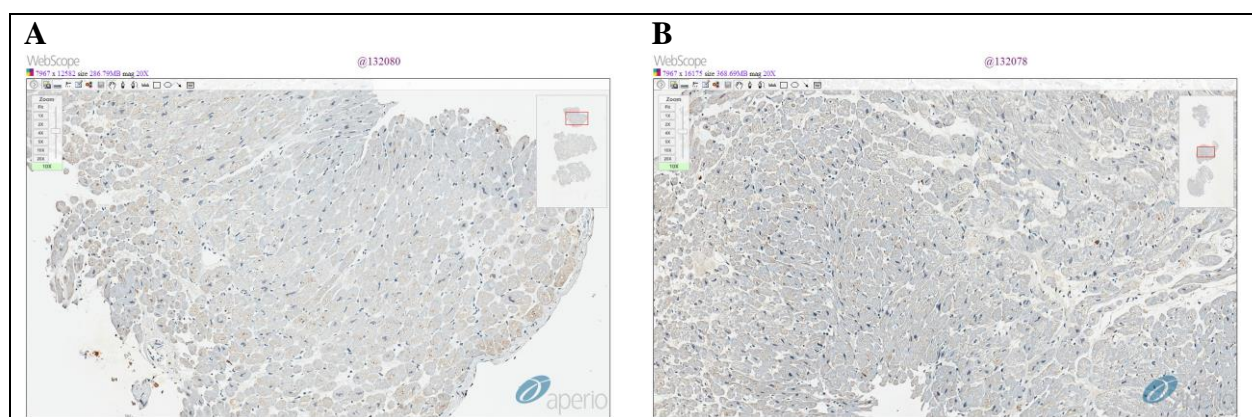
Be to, I tipo kolageno biosintezės žymuo biopstatuose – I tipo prokolageno C-terminalinis propeptidas (PICP) sumažėjo 4 kartus, o I tipo kolageno degradacijos žymuo – I tipo kolageno C-terminalinis telopeptidas (ICTP) padidėjo 3,6 karto (18 pav., 19 pav. ir 20 pav.). ICTP pokyčiai miokardo audinyje nebuvo imunohistochemiškai patvirtinti dėl atitinkamų antikūnų trūkumo. Taip pat buvo nustatyta, kad virusui teigiamuose biopstatuose miokardo fibrozė stipriai koreliavo su PICP/ICTP santykiu ir bendru serumo uždegimo žymeniu DjCRB. Iš to galima daryti išvadą, kad uždegimas ir fibrozė atsiranda dėl intramiokardinio viruso buvimo (21 pav.).



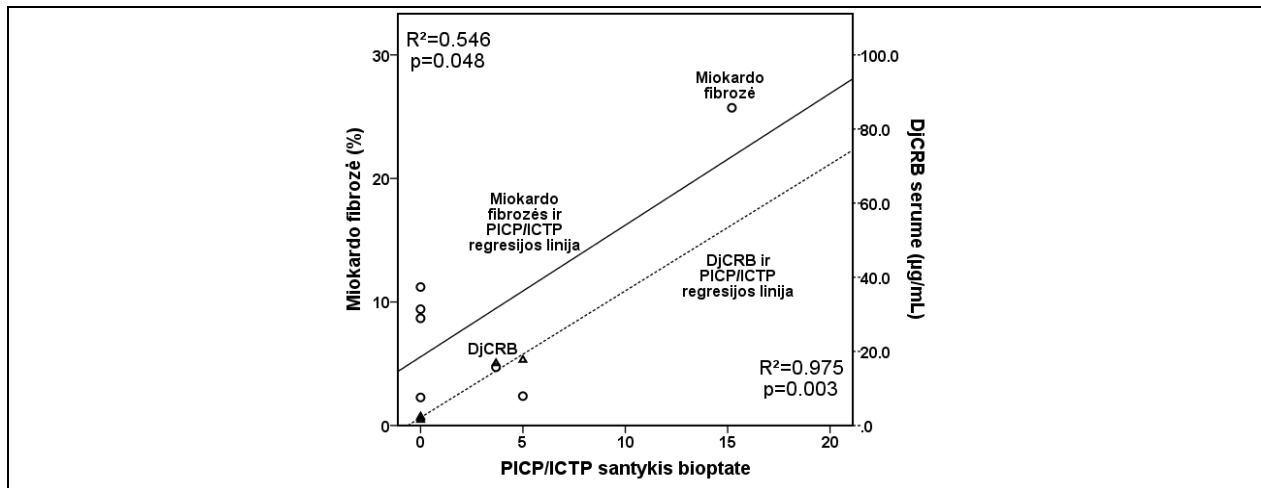
18 pav. I tipo kolageno sintezės (I tipo prokolageno C-terminalinio propeptido; PICP) biožymens lygiai biopstatuose. Duomenys pateikti kaip \pm SEM iš ne mažiau kaip trijų vienas nuo kito nepriklausomų matavimų



19 pav. Virusui neigiamų ir virusui teigiamų serumų mėginių I tipo kolageno degradacijos (I tipo prokolageno C-terminalinio telopeptido; ICTP) biožymens lygiai biopstatuose. Duomenys pateikti kaip \pm SEM



20 pav. I tipo kolageno sintezės (I tipo prokolageno C-terminalinio propeptido (PICP)) biožymuo dešiniojo skilvelio EMB tyrime. Mikroskopinėse nuotraukose matome po vieną kiekvieną grupę reprezentuojančią paciento nuotrauką. (A) virusui neigiamos grupės paciento rezultatai (skaitmeniniu būdu apskaičiuotas PICP – 13,70 %); (B) virusui teigiamos grupės paciento rezultatai (skaitmeniniu būdu apskaičiuotas PICP – 16,43 %). Imunohistocheminis dažymas buvo atliktas naudojant anti-PICP antikūnus (ruda spalva žymi teigiamą PICP dažymo rezultatą). Nuotrauka padidinta: $\times 10$



21 pav. Papildomų žymenų koreliacijos analizė virusui teigiamos grupės pacientų serumo mėginiuose. Kolageno sintezės/degradacijos biožymenų (PICP/ICTP) bioplatuose santykio (ELISA tyrimas) koreliacija su širdies fibroze ir bendru uždegiminiu biožymeniu – didelio jautrumo C reaktyviuoju baltymu (DjCRB) serume. Duomenys buvo laikomi reikšmingais, kai $*p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose

Išsamesnė koreliacijos analizė, pateikiama 5 lentelėje rodo, kad I tipo kolageno sintezės žymuo (PICP), taip pat kaip ir virusui teigiamų bioplatų MMP-9 lygis, daugiausia buvo susiję su išskiriamu uždegiminiu citokinu IL-6. Be to, I tipo kolageno apykaita ir MMP-9 aktyvacija labai priklausė nuo mitochondrijų išorinės membranos funkcionavimo: mitochondrijų išorinės membranos pralaidumą stabilizuojantis baltymas Hsp60 stipriai koreliavo su I tipo kolageno sintezės (PICP) ir degradacijos (ICTP) serumo žymenimis, matrikso metaloproteinaze-9 (MMP-9) ir uždegimo žymeniu (IL-6) (5 lentelė). Koreliacijos duomenys leidžia daryti išvadą, kad negydomas miokardo virusas gali ateityje sukelti uždegimą, dėl kurio padidės Hsp60 išskyrimas ir MMP9 aktyvacija. Tyrimo duomenys parodė, kad lėtinė intramiokardo virusinė infekcija gali inicijuoti procesus, sukeliančius širdies nepakankamumą.

5 lentelė. I tipo kolageno apykaitos žymenų koreliacija biopsijos ir serumo mėginiuose

	PICP bioptate	ICTP bioptate	MMP9 bioptate	IL-6 serume	djCRB serume
ICTP bioptate	0,806**				
MMP-9 bioptate	0,283	0,385			
IL-6 serume	0,572*	0,489	0,584*		
DjCRB serume	0,913**	0,933**	0,527	0,576	
Hsp60 serume	0,641*	0,641*	0,646*	0,756**	0,591

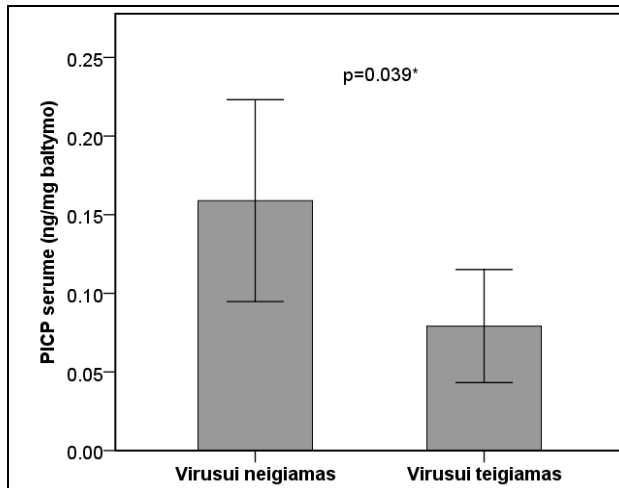
2-tailed testo svarba: *p < 0,05; **p < 0,01. Reikšmingos koreliacijos paryškintos. Santrumpos: PICP – I tipo prokolageno C-terminalinis propeptidas; ICTP – I tipo prokolageno C-terminalinis telopeptidas; MMP-9 – matrikso metaloproteinazė-9; IL-6 – interleukinas-6; DjCRB – didelio jautrumo C reaktyvusis baltymas; Hsp60 – karščio šoko baltymas-60.

4.1.5. Išskiriamų susitraukimą reguliuojančių baltymų pokyčiai virusui teigiamos tyrimo grupės pacientų serume

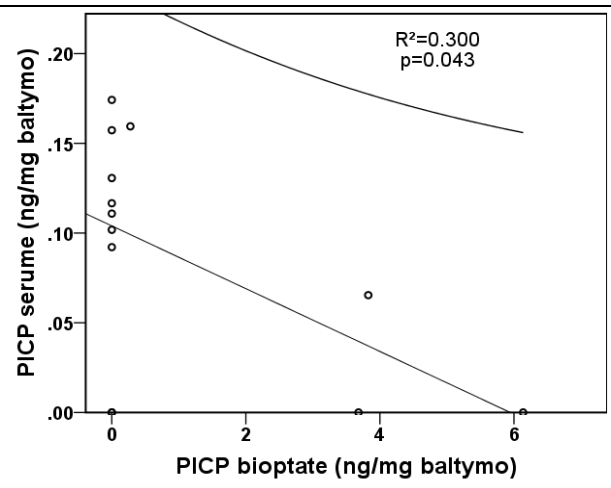
Duomenys rodo, kad daugumos tirtų intramiokardinių apoptozinių, uždegiminių ir susitraukimą reguliuojančių baltymų (TGF-β1, MMP-9, TIMP-1, djTnT, galektinas-3 ir PICP/ICTP) kiekis serume virusui teigiamos tyrimo grupės pacientų sumažėjo (4 lentelė).

I tipo kolageno sintezės biožymens (PICP) kiekis serume sumažėjo reikšmingai (22 pav.; p < 0,05). Visgi I tipo kolageno sintezės (PICP) kiekis biopsijos mėginiuose atvirkščiai proporcingai koreliavo su tuo pačiu lygiu serume ir tai parodo, kad besivystanti virusinė infekcija gali pažeisti miokardo laidumą (23 pav.).

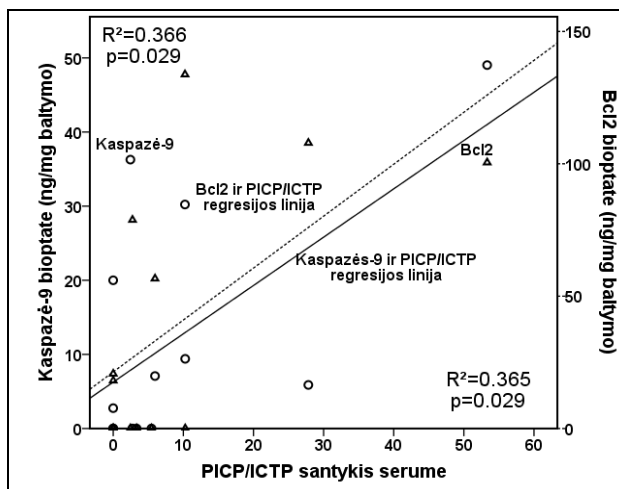
Papildoma koreliacijos analizė parodė, kad apoptozės žymenys: vidinio kelio (Bcl-2 ir kaspazė-9) ir išorinio kelio (FasL ir kaspazė-8) taip pat yra labai glaudžiai susiję su I tipo kolageno apytakos biožymenų išsiskyrimu (24 pav. ir 25 pav.).



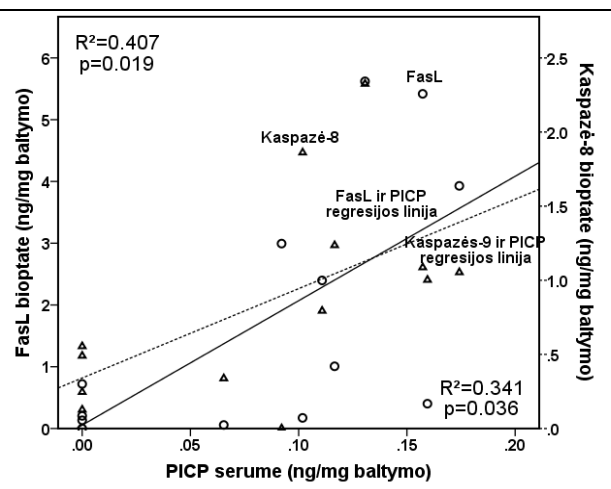
22 pav. I kolageno tipo sintezės biožymens (I tipo prokolageno C-terminalinio propeptido; PICP) lygiai virusui neigiamos ir virusui teigiamos pacientų grupių serumų mėginiuose. Duomenys pateikiami kaip vid. \pm SEM ir buvo laikomi reikšmingais, kai $*p < 0,05$



23 pav. Diagramoje pateikiama atvirkščiai proporcinga koreliacija tarp kolageno sintezės biožymens PICP (I tipo prokolageno C-terminalinio propeptido) pasiskirstymo virusui teigiamos pacientų grupės serumo ir biopsijos mėginiuose. Koreliacija buvo laikoma reikšminga, jei $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose

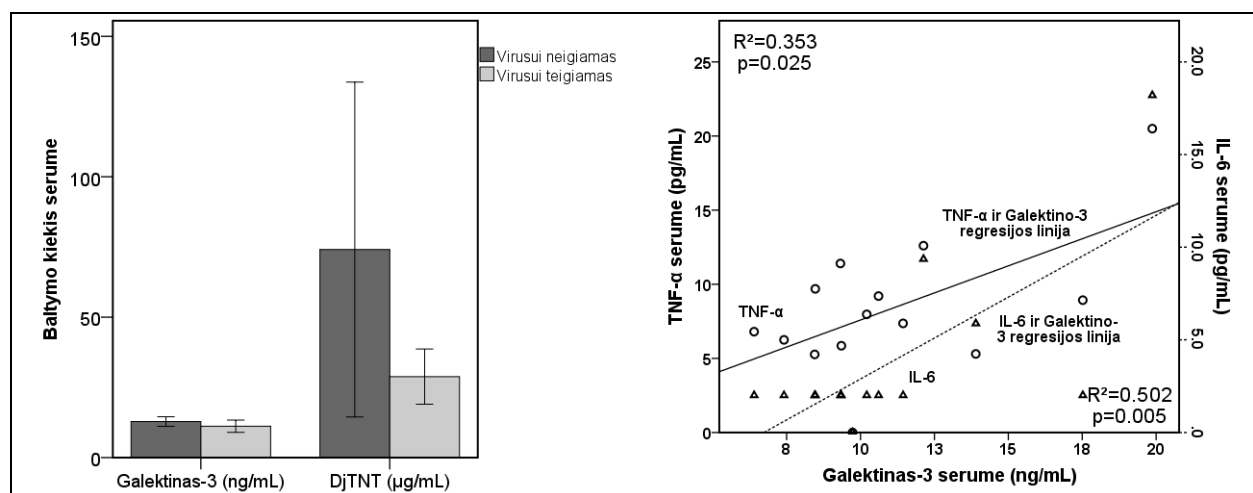


24 pav. Virusui teigiamos pacientų grupės kontraktilinių baltymų rezultatų koreliacijos analizė. Koreliacijos tarp kolageno sintezės/degradacijos biožymenų (PICP/ICTP) serumuose santykis su vidinio apoptozės kelio žymenimis (Bcl-2 ir kaspazė-9) bioplateuose. Koreliacija buvo laikoma reikšminga, jei $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose



25 pav. Virusui teigiamos pacientų grupės kontraktilinių baltymų rezultatų koreliacijos analizė. I tipo kolageno sintezės biožymens (PICP) koreliacija su išorinio apoptozės susidarymo kelio žymenimis (Fas ligandu ir kaspazė-8). Koreliacija buvo laikoma reikšminga, jei $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose

Duomenys, pateikti 26 pav., rodo, kad serume taip pat sumažėjo tarpląstelinių, su fibroze susijusių, baltymų – širdies didelio jautrumo troponino-T (širdies DjTnT) ir galektino-3 išsiskyrimas. Be to, galektinas-3 stipriai koreliavo su makrofagų išskiriamais citokinais TNF- α ir IL-6 o tai rodo, kad dalis galektino-3 gali būti makrofaguose (27 pav.).



26 pav. Diagramoje pateikiami kontraktilinių baltymų (didelio jautrumo troponino-T (DjTnT) ir galektino-3) lygmenys serumo mėginiuose. Duomenys pateikiami kaip vid. \pm SEM

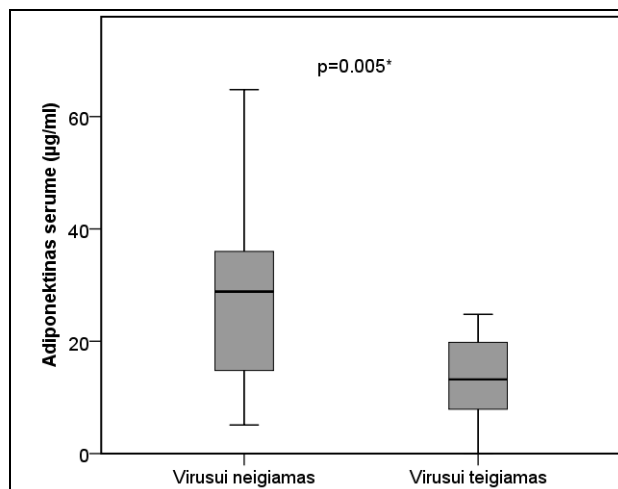
27 pav. Diagramoje pateikiama koreliacija serume tarp galektino-3 ir prouždegiminių citokinių: naviko nekrozės faktoriaus α (TNF- α) ir interleukino-6 (IL-6). Koreliacija buvo laikoma reikšminga, kai $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose

Mažesnio galektino-3 kiekio serume priežastis gali būti mažesnis infiltruotų makrofagų kiekis tirtuose mėginiuose (14 pav.). Viduląstelinių baltymų atsiradimas plazmoje, paprastai, žymi, kad ląstelių ir kraujagyslių membranų vientisumas yra pažeistas dėl ūmaus miokardito. Mūsų duomenys rodo, kad virusinė infekcija tirtuose mėginiuose yra lėtinė, o ne ūminė ir ji nepažeidžia ląstelių membranos laidumo. Visgi koreliacijos analizė parodė, kad ilgiau trunkanti intramiokardo virusinė infekcija gali sukelti uždegimą, apoptozinę kardiomiocitų žūtį ir fibrozę, kurie veda prie širdies nepakankamumo.

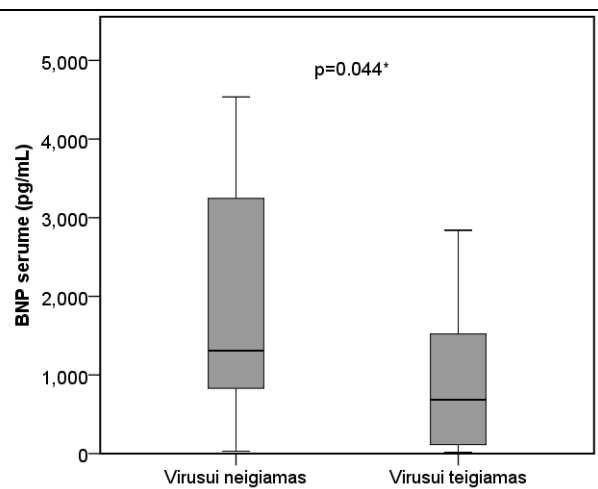
4.1.6. Kiti dKMP vystymąsi reguliuojantys mechanizmai

Paskutinių eksperimentų rezultatai parodė, kad virusui teigiamos tyrimo grupės pacientų serume adipocitokino adiponektino ir BNP kiekis buvo daug (beveik 2 kartus)

mažesnis, palyginus su virusui neigiamos grupės pacientų duomenimis (28 pav. ir 29 pav.; 3 lentelė).

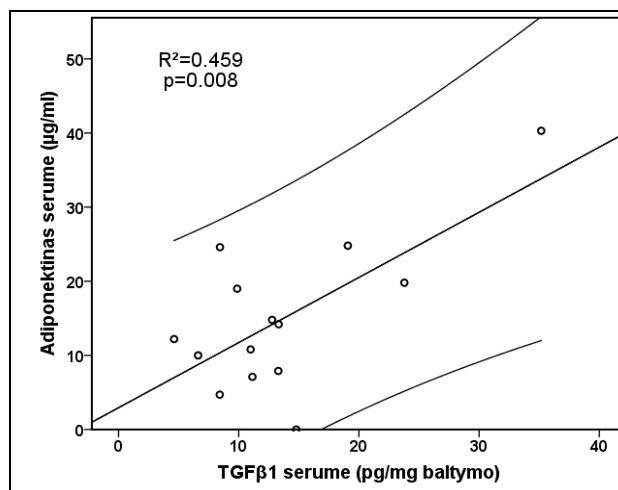


28 pav. Adiponektino kiekiai virusui neigiamos ir virusui teigiamos grupių serumo mėginiuose. Duomenys pateikiami kaip vid. \pm SEM ir buvo laikomi reikšmingais, kai $*p < 0,05$

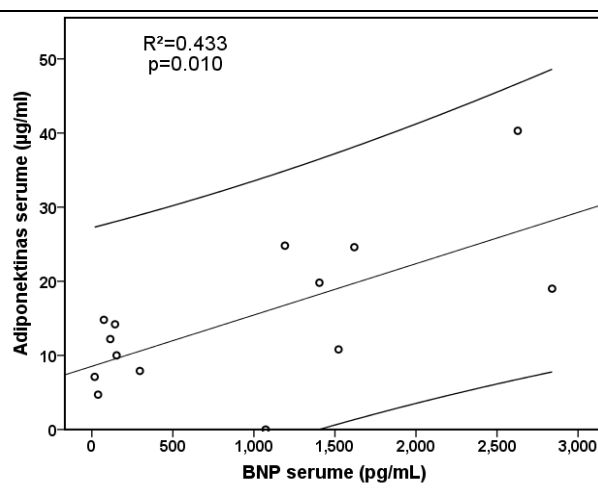


29 pav. Smegenų natriurezino peptido B (BNP) kiekiai virusui neigiamos ir virusui teigiamos grupių serumo mėginiuose. Duomenys pateikiami kaip vid. \pm SEM ir buvo laikomi reikšmingais, kai $*p < 0,05$

Koreliacijos analizė parodė, kad adiponektinas serume stipriai koreliavo su pagrindiniu I tipo kolageno reguliatoriumi – transformuojančiu augimo faktoriumi – $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (30 pav.), ir smegenų natriurezinio baltymu (BNP) (31 pav.).

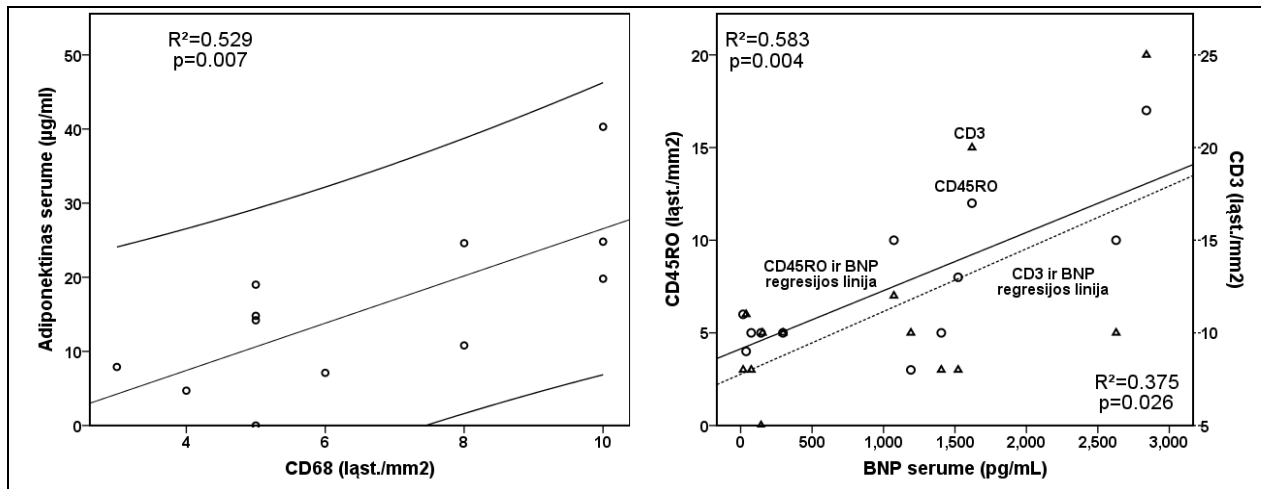


30 pav. Virusui teigiamos pacientų grupės papildomų žymenų koreliacijos analizė. Adiponektino serume koreliacija su transformuojančiu augimo faktoriumi $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Koreliacija buvo laikoma reikšminga, kai $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose



31 pav. Virusui teigiamos pacientų grupės papildomų žymenų koreliacijos analizė. Adiponektino serume koreliacija su BNP serume. Koreliacija buvo laikoma reikšminga, kai $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose

Be to, serumo adiponektinas stipriai koreliavo su infiltruotais makrofagais (CD68⁺) (32 pav.), o BNP koreliavo su vidumiokardo T atminties ląstelėmis (CD45Ro⁺) ir T limfocitais (CD3⁺) (33 pav.). TGF-β1 serume taip pat pasižymėjo stipria koreliacija su intramiokardo makrofagais (CD68⁺, R = 0,649; p = 0,022) ir MMP9 (R = 0,689; p = 0,009).



32 pav. Virusui teigiamos pacientų grupės papildomų žymenų koreliacijos analizė. Adiponektino serume koreliacija su širdies biopstatų infiltruotais makrofagais (CD68⁺). Koreliacija buvo laikoma reikšminga, kai $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose

33 pav. Virusui teigiamos pacientų grupės papildomų žymenų koreliacijos analizė. BNP serume koreliacija su širdies biopstatų T ląstelėmis (CD3⁺) ir T atminties ląstelėmis (CD45Ro⁺). Koreliacija buvo laikoma reikšminga, kai $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose

Šiame skyriuje pateikti duomenys parodo, kad dėl įsisenėjusio virusų buvimo padidėjęs vidumiokardinis uždegimo lygis padidina adiponektino kiekį ir BNP kiekį serume. Dėl šios priežasties aktyvinama TGF-β1, kolageno sintezė ir fibrozė. Pagrindinis I tipo kolageno sintezės reguliatorius TGF-β1 taip pat gali būti tiesiogiai aktyvinamas uždegiminiais infiltratais, ypač makrofagais. Tai rodo, kad dėl širdyje įsisenėjusio viruso buvimo gali padidėti uždegimas ir išsivystyti fibrozė bei širdies nepakankamumas.

4.2. Uždegimui teigiama dKMP pacientų tyrimo grupė

4.2.1. Uždegiminių infiltratų aptikimas endomiokardo biopstatuose

Ne tik ilgalaikis virusų buvimas miokarde gali sukelti uždegiminius procesus. Daugeliu atveju dKMP išsivysto dėl neaiškios kilmės uždegiminių procesų. Kadangi tikslai nustatyti uždegimo kilmę yra siekiama, tačiau ne visada įgyvendinama, šioje darbo dalyje tyrėme molekulinis mechanizmus dominuojančius neaiškios kilmės uždegiminėje KMB. Uždegiminis vidumiokardinis procesas buvo nustatytas matuojant uždegiminius infiltratus. Iš visų EMB tyrimo metu imunohistochemiškai įvertintų uždegiminių ląstelių, dažniausiai buvo aptikti ($11,28 \pm 1,21$) T limfocitai ($CD3^+$), toliau – aktyvieji atminties T limfocitai ($CD45Ro^+$) ($8,29 \pm 0,91$) ir makrofagai ($7,75 \pm 0,85$).

Visi pacientai buvo paskirstyti į dvi grupes: uždegimui neigiama ($n = 10$) ir uždegimui teigiama ($n = 22$) pagal Pasaulio sveikatos organizacijos, Tarptautinės kardiologų darbo grupės bendruomenės ir federacijos išleistą dokumentą, kuris apibrėžia ir suklasifikuoja rekomendacijas, kaip gydyti kardiomiopatijas (Richardson, McKenna et al. 1996; Mahrholdt, Wagner et al. 2006; Kindermann, Kindermann et al. 2008).

4.2.2. Pagrindiniai klinikiniai parametrai

Lentelėje 6 galime matyti tyrimo grupių pacientų pagrindinius duomenis. Nebuvo pastebėta jokių ypatingų skirtumų tarp tiriamųjų lyties, amžiaus ir ŠN simptomų pasiskirstymo grupėse.

Niujorko širdies asociacijos (NŠA) 1994 metais išleista funkcinė klasifikacija apibūdina ŠN kaip simptominių sindromą (Dolgin 1994). Dauguma tyrime dalyvavusių pacientų priklausė III klasei pagal NYHA: uždegimui neigiamoje grupėje buvo 7 (70 %) pacientai, uždegimui teigiamoje grupėje 15 (68 %) pacientų. Taip pat buvo tokių, kuriems pasireiškė rimti ŠN simptomai (NYHA IV klasė: atitinkamai 2 (20 %) ir 7 (32 %) pacientai).

Prieširdžių virpėjimas (PV) buvo daug labiau paplitęs uždegimui neigiamoje grupėje nei uždegimui teigiamoje grupėje: atitinkamai 2 (20 %) ir 0 (0 %), $p < 0,001$. Tai greičiausiai yra dėl to, kad uždegimui teigiamoje grupėje fibrozės laipsnis yra mažesnis (44 pav.). Išanalizavus EKG pagal kairiosios Hiso pluošto kojų blokados (KHPKB) paplitimą, abi grupės mažai skyrėsi: 3 (30 %) ir 5 (22 %), $p = 0,659$.

6 lentelė. Pagrindiniai tyrimo grupių pacientų duomenys

<i>Kintamieji</i>	<i>Uždegimui neigiama grupė</i>		<i>Uždegimui teigiama grupė</i>		p vertė
	Pacientų sk.	Vertė	Pacientų sk.	Vertė	
Lytis (vyras/moteris)	10	8 (80 %) / 2 (20 %)	22	17 (77 %) / 5 (33 %)	0,863 _č
Amžius (metai)	10	46,7 ± 5,87	22	42,36 ± 2,07	0,389
NYHA					
II	10	1 (10 %)	22	0 (0 %)	0,132 _č
III	10	7 (70 %)	22	15 (68 %)	0,918 _č
IV	10	2 (20 %)	22	7 (32 %)	0,491 _č
Širdies parametrai					
KHPKB (%)	10	3 (30 %)	22	5 (22,7 %)	0,659 _č
Nuolatinis PV (%)	10	2 (20 %)	22	0 (0 %)	0,000 _č *
KSIF (%)	10	24,10 ± 2,28	22	23,05 ± 1,35	0,678
KSGDD (cm)	10	6,89 ± 0,17	22	6,89 ± 0,19	0,998
KSGDDI (cm/m ²)	10	3,68 ± 0,21	22	3,71 ± 0,09	0,847
Vid. Ao (mmHg)	10	92,00 ± 3,95	22	86,06 ± 2,71	0,291
Vid. DPS (mmHg)	10	16,22 ± 3,19	22	11,44 ± 1,74	0,164
Vid. PKPS (mmHg)	10	25,00 ± 2,79	22	23,45 ± 2,70	0,731
Vid. SPA (mmHg)	10	34,89 ± 4,33	22	32,95 ± 3,24	0,734
ŠI (L/min/m ²)	10	2,38 ± 0,33	22	2,2 ± 0,14	0,573

Duomenys pateikti kaip vid. ± SEM. * Duomenys laikomi reikšmingais, kai $p < 0,05$. _č Chi kvadrato testas. Santrumpos: NYHA – Niujorko širdies asociacijos funkcinio pajėgumo klasė; KHPKB – kairiosios Hiso pluošto kojų blokada; PV – prieširdžių virpėjimas; KSIF – kairiojo skilvelio išstūmimo frakcija; KSGDD – kairiojo skilvelio galinis diastolinis diametras; KSGDDI – kairiojo skilvelio galinio diastolinio diametro indeksas; Ao – aortos; DPS – dešiniojo prieširdžio spaudimas; PKPS – plaučių kapiliarų pleištinis spaudimas; SPA – spaudimas plautinėje arterijoje, ŠI – širdies indeksas.

Apskritai, pagrindiniai echokardiografijos parametrai parodė būdingus dKMP požymius: sumažėjusią kairiojo skilvelio išstūmimo frakciją (KSIF) ir kairiojo skilvelio išsiplėtimą. Palyginus abiejų grupių rezultatus nepastebėta ryškių skirtumų: KSIF 24,10 ± 2,2 % ir 23,05 ± 1,3 %, kairiojo skilvelio galinis diastolinis diametras (KSGDD) 6,89 ± 0,17 cm ir 6,89 ± 0,19 cm, kairiojo skilvelio galinio diastolinio diametro indeksas (KSGDDI) 3,68 ± 0,21 cm/m² ir 3,71 ± 0,09 cm/m².

Pacientams buvo atlikta širdies kateterizacija, siekiant įvertinti hemodinamikos sutrikimo lygį. Abiejų grupių hemodinaminiai parametrai buvo panašūs. Abiejose grupėse spaudimas plautinėje arterijoje (SPA) buvo išaugęs: 34,89 ± 4,33 mmHg ir 32,95 ± 3,24 mmHg, $p = 0,734$. Šie duomenys patvirtina plautinės hipertenzijos (PH) diagnozę – PH diagnozė patvirtinama, kai ramybės metu vid. SPA yra ≥ 25 mmHg (Badesch, Champion et al. 2009). Abiejose grupėse padidėjęs vidutinis plaučių kapiliarų pleištinis spaudimas (VPKPS) (>15 mmHg): 25,00 ± 2,79 mmHg ir 23,45 ± 2,70 mmHg, $p = 0,731$ rodo, kad sergama postkapiliarine hipertenzija, kurią sukėlė kairiosios širdies

pusės nepakankamumas (Simonneau, Robbins et al. 2009). Abiejose grupėse padidėjęs vidutinis dešiniojo prieširdžio spaudimas (DPP), padidėjęs vidutinis SPA ir sumažėjęs širdies indeksas (ŠI) rodo blogą ligos prognozę (D'Alonzo, Barst et al. 1991).

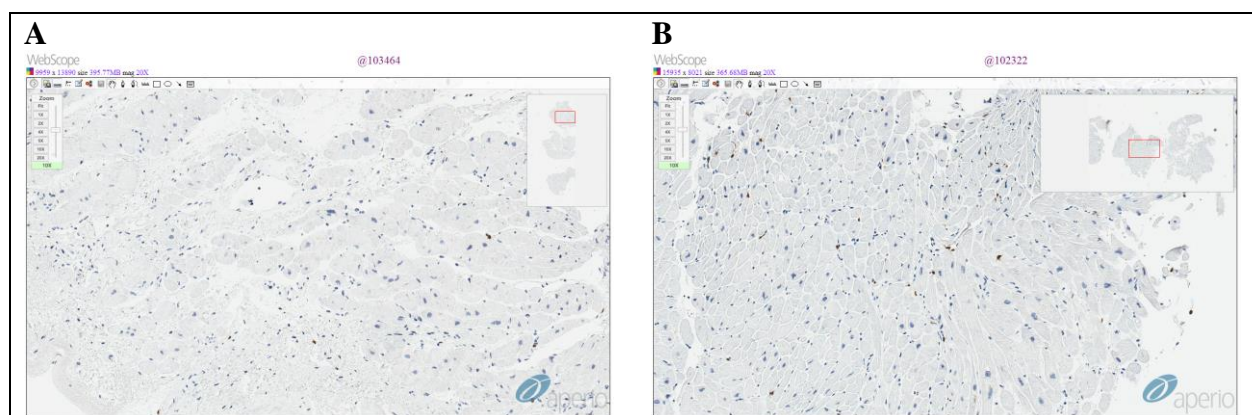
Abiejų grupių pacientai buvo gydomi vienodai pagal rekomendacijas (7 lentelė) (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008; Dickstein, Vardas et al. 2010; McMurray, Adamopoulos et al. 2012). Palyginus abiem grupėms paskirtus vaistus, jokių reikšmingų skirtumų nepastebėta.

7 lentelė. Įprastinis tyrimo grupių gydymas (pagal Europos kardiologų draugijos (EKD) rekomendacijas)

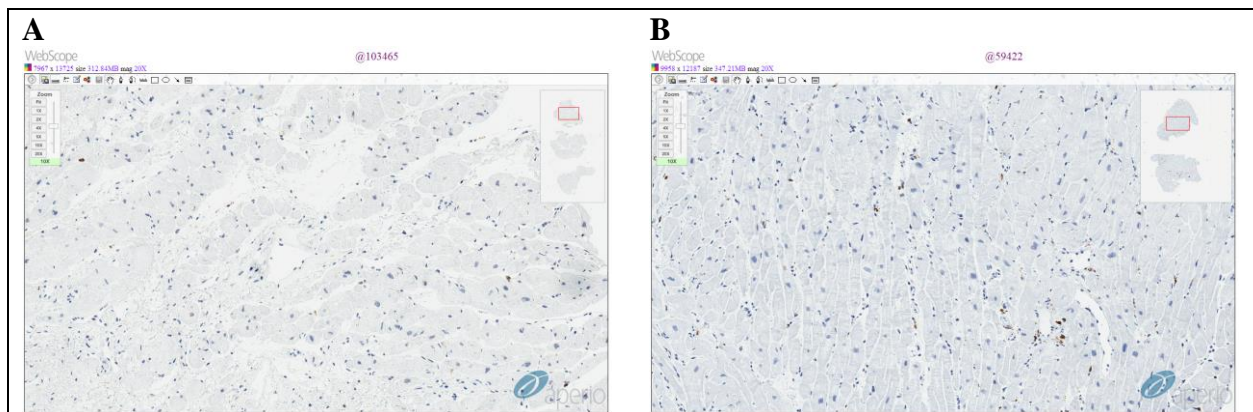
<i>Standartinis ŠN gydymas</i>	<i>Uždegimui neigiama grupė</i>	<i>Uždegimui teigiama grupė</i>
AKF inhibitoriai	5 (50 %)	10 (46 %)
β-blokatoriai	10 (100 %)	19 (87 %)
Rusmenė (prieširdžių virpėjimui gydyti)	2 (20 %)	7 (32 %)
Diuretikai	10 (100 %)	22 (100 %)
Kraujo krešėjimą slopinantys vaistai (prieširdžių virpėjimas, išstūmimo frakcija < 40 %)	7 (70 %)	15 (68 %)
Antiaritminiai vaistai (III klasės: amiodaronas)	1 (10 %)	5 (23 %)
Intervencijos		
Implantuojamas širdies defibriliatorius (IŠD)	1 (10 %)	0 (0 %)
Širdies resinchronizacinis gydymas (ŠRG)	1 (10 %)	3 (14 %)

4.2.3. Uždegiminiai dKMP žymenys

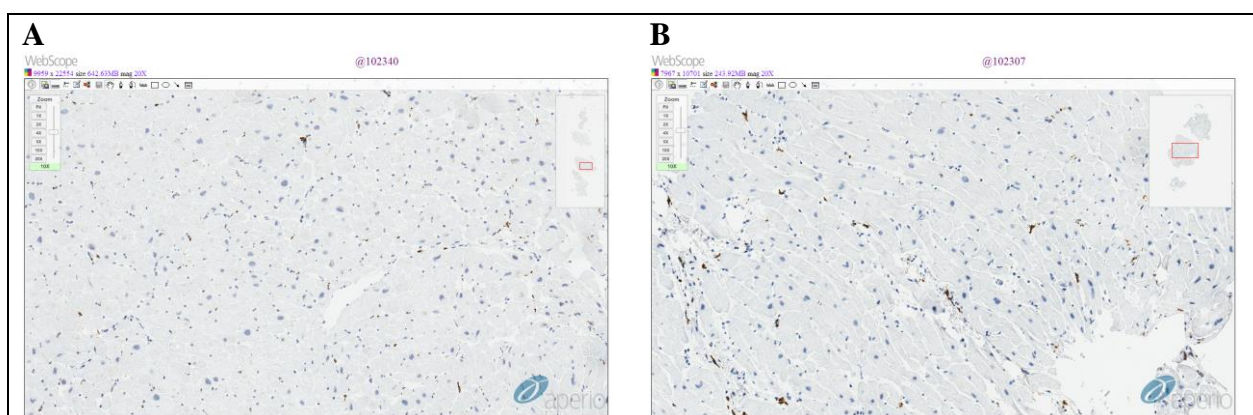
Uždegimo procesas buvo stebimas imunohistochemiškai nustatant CD3⁺, CD45Ro⁺ ir CD68⁺ ekspresiją uždegiminiuose infiltratuose. Taip pat buvo nustatyti uždegiminiai citokinai TNF-α, IL-6 ir IL-1β. Imunohistocheminių mikroskopinių nuotraukų pavyzdžiai rodo po vieną CD3⁺, CD45Ro⁺ ir CD68⁺ ekspresijos atvejį iš abiejų grupių dKMP sergančių pacientų (34 pav., 35 pav. ir 36 pav.).



34 pav. EMB tyrimo uždegiminio infiltrato dešiniojo skilvelio vaizdas, kurį parodo CD3⁺ ląstelės (T limfocitai). (A) uždegimui neigiama grupė (CD3⁺ = 3 ląst./mm²); (B) uždegimui teigiama grupė (CD3⁺ = 20 ląst./mm²). Imunohistocheminiam dažymui buvo naudojami anti-CD3⁺ antikūnai. Nuotrauka padidinta: x10

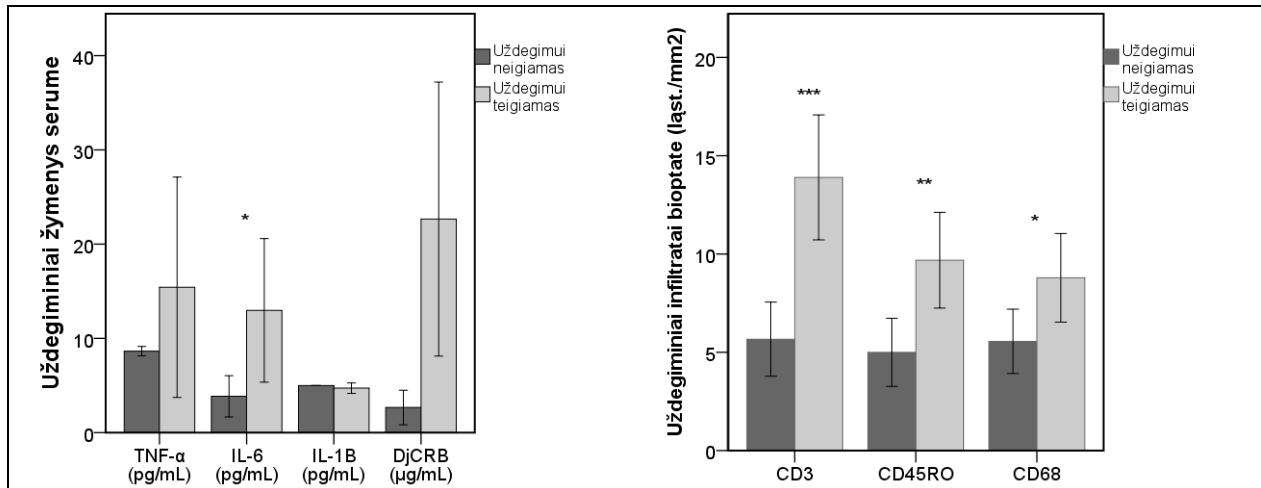


35 pav. EMB tyrimo uždegiminio infiltrato dešiniojo skilvelio vaizdas, kurį parodo CD45Ro+ ląstelės (T atminties limfocitai). (A) uždegimui neigiama grupė (CD45Ro+ = 3 ląst./mm²); (B) uždegimui teigiama grupė (CD45Ro+ = 17 ląst./mm²). Imunohistocheminiam dažymui buvo naudojami anti-CD45Ro+ antikūnai. Nuotrauka padidinta: x10



36 pav. EMB tyrimo uždegiminio infiltrato dešiniojo skilvelio vaizdas, išreikštas per CD68⁺ ląsteles (makrofagus). (A) uždegimui neigiama grupė (CD68⁺ = 5 ląst./mm²); (B) uždegimui teigiama grupė (CD68⁺ = 20 ląst./mm²). Imunohistocheminiam dažymui buvo naudojami anti-CD68 antikūnai. Nuotrauka padidinta: x10

Kiekybinę citokinų ir infiltratų išraišką abiejose uždegimui neigiamoje ir uždegimui teigiamoje pacientų grupėse matome 37 pav. Daugiausia buvo aktyvinti uždegiminiai infiltratai: T-limfocitai (CD3⁺) ir T atminties limfocitai (CD45Ro+) (atitinkamai 2,38 karto ir 2,1 karto; $p < 0,001$ ir $p < 0,01$), o makrofagų veikla sustiprėjo tik 1,63 karto (38 pav.). Ryškus CD3⁺ ir CD45Ro⁺ padidėjimas uždegiminės dKMP miokarde taip pat leidžia daryti išvadą, kad padidėjo miokardo ir mikrokraujagyslių pralaidumas.



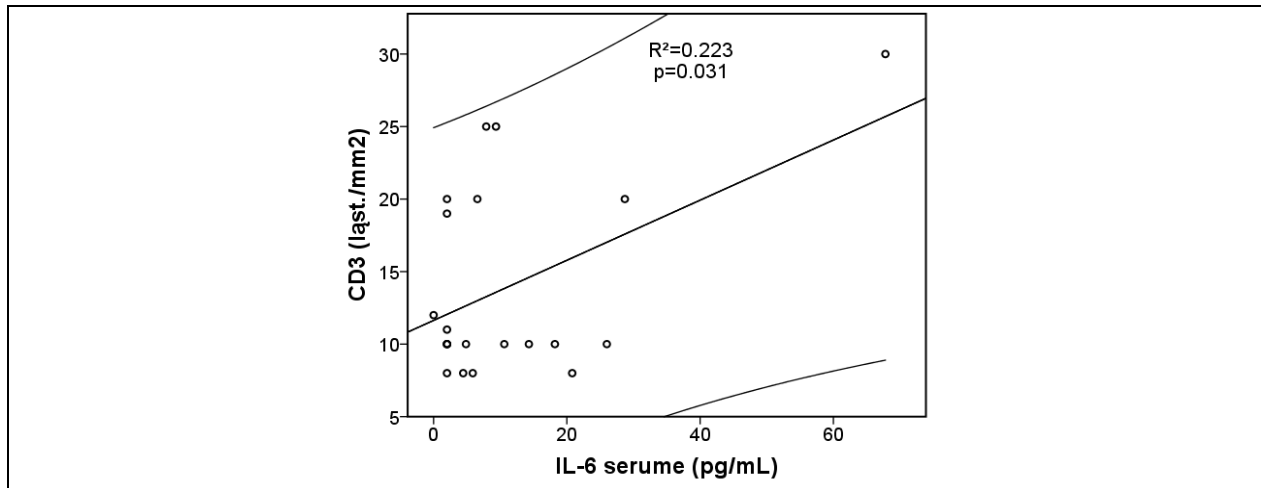
37 pav. Uždegimo žymenų lygiai serume. ELISA tyrimo duomenys pateikti kaip vid. ± SEM, surinkti iš bent trijų vienas kitam įtakos neturėjusių matavimų. Duomenys buvo laikomi reikšmingais, kai * $p < 0.05$

38 pav. Uždegimo žymenų lygiai biopsijos mėginiuose. Imunohistochemiškai teigiamai nudažytų ląstelių tyrimo duomenys pateikti kaip ± SEM; įvertintos labai patyrusio patologo iš bent trijų viena nuo kitos nepriklausomų lokalizacijų. Duomenys buvo laikomi reikšmingais, kai * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ir *** $p < 0,001$

Aštuntoje (8) lentelėje pateikti duomenys rodo, kad specifinių (interleukino-6 (IL-6)) ir bendrųjų (C reaktyviojo baltymo (DjCRB)) uždegimo žymenų aktyvumas buvo didesnis uždegiminės dKMP serumų mėginiuose (atitinkamai 3,45, ir 2,76 karto). Vidutinis citokino IL-6 lygis uždegiminės dKMP serume mėginiuose padidėjo tris kartus ($p < 0,05$). Lyginant abiejų grupių naviko nekrozės faktoriaus alfa (TNF- α) raiškos rezultatus paaiškėjo, kad TNF- α lygis buvo du kartus padidėjęs uždegimui teigiamos dKMP serume mėginiuose lyginant su neuždegiminės kilmės dKMP. Kadangi TNF- α yra Fas receptoriaus ligandas, tai paaiškina, kodėl uždegimui teigiamos dKMP mėginiuose buvo šiek tiek aktyvinta kaspazė-8 (8 lentelė). Nebuvo pastebėta ryškių interleukino-1 beta (IL-1 β) (dar vadinamo katabolinu) pakitimų serume mėginiuose.

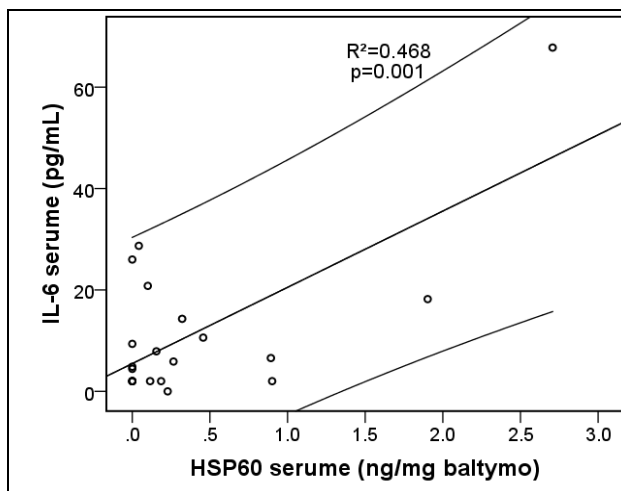
4.2.4. Apoptozinių biožymenų pokyčiai uždegiminės dKMP mėginiuose

Koreliacinė uždegiminių citokinų ir kitų išskiriamų biožymenų analizė padėjo atkreipti dėmesį į apoptozinių mechanizmų svarbą uždegiminės dKMP kontekste. 39 pav. vaizduojami duomenys iliustruoja reikšmingą CD3⁺ ir IL-6 koreliaciją.

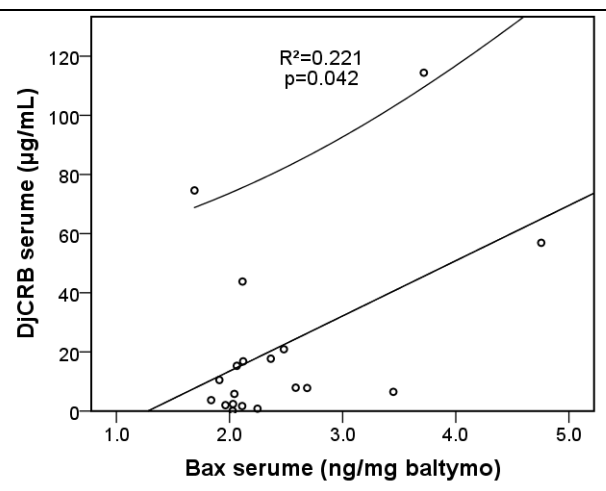


39 pav. Koreliacija tarp uždegiminių ir mitochondrijų membranos destabilizacijos žymenų uždegimui teigiamoje pacientų grupėje. Skaičiuojant EMB ląsteles nustatyta serume esančių uždegiminių citokinų IL-6 ir CD3⁺ koreliacija. Koreliacija buvo laikoma reikšminga, kai $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikiami diagramose

Be to, ryški koreliacija serumuose tarp IL-6 ir DjCRB, kurie atitinkamai reagavo su mitochondrinio šaperoniniu baltymu Hsp60 ir proapoptoziniu Bax, leidžia manyti, kad miokardo uždegimas daugiausia paveikia mitochondrijų membranų vientisumą ir aktyvina nuo Bax priklausomą apoptozinių signalų kaskadą (40 pav. ir 41 pav.).



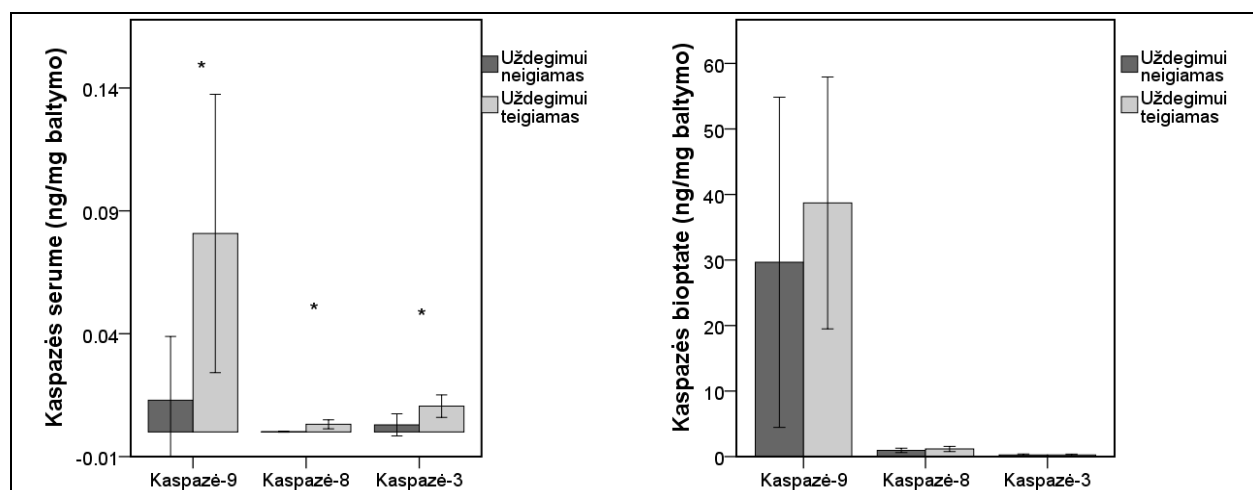
40 pav. Koreliacija tarp uždegiminių ir mitochondrijų membranos destabilizacijos žymenų uždegimui teigiamoje pacientų grupėje. Čia vaizduojama koreliacija serumuose tarp IL-6 ir mitochondrijų membranos, kuris stabilizuoja šaperoną Hsp60. Koreliacija buvo laikoma reikšminga, kai $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikti diagramose



41 pav. Koreliacija tarp uždegiminių ir mitochondrijų membranos destabilizacijos žymenų uždegimui teigiamoje pacientų grupėje. Čia vaizduojama koreliacija serumuose tarp didelio jautrumo C reaktyviojo baltymo (DjCRB) ir Bax. Koreliacija buvo laikoma reikšminga, kai $p < 0,05$. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) pateikti diagramose

Mitochondrijos membraną stabilizuojančių baltymų Bcl-2 ir Hsp60 kiekis uždegimui teigiamuose serumuose atitinkamai padidėjo 1,86 ir 8,97 ($p < 0,05$) karto. Šie rezultatai paremia teoriją, kad esant uždegiminei dKMP padidėja mitochondrijų ir miokardo ląstelių plazminės membranų pralaidumas (8 lentelė). Kartu uždegiminių dKMP biopsijų rezultatai parodė, kad Bcl-2 sumažėjo 1,34 karto, o Bax padidėjo 1,22 karto. Šie duomenys rodo, kad aktyvinosi nuo Bcl-2/Bax priklausanti apoptozės reakcijų seka (8 lentelė). Tuo tarpu uždegimine dKMP sergančių pacientų serumo ir bioptato mėginiuose APO1/Fas/CD95 (pagrindinio išorinės apoptozės reakcijų sekos receptoriaus) lygis padidėjo tik šiek tiek, Fas ligando (FasL) lygis bioptatuose net sumažėjo (8 lentelė).

Duomenys, pateikti 42 pav., demonstruoja statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) kaspazės-9, -8 ir -3 padidėjimą serumuose. Kaspazės-9 lygio padidėjimas serume buvo didžiausias. Kaspazių-9, -8, -3 raiškos padidėjimas endomiokardinių biopsijų mėginiuose (43 pav.) nebuvo statistiškai reikšmingas dėl duomenų įvairavimo. Vis dėlto uždegimine dKMP sergančių pacientų tyrimuose kaspazės-9 vertės vidurkis buvo 31 ir 118 kartų didesnis nei kaspazės-8 ar kaspazės-3. Tai rodo, kad vidinis apoptozinis kelias atlieka didesnę vaidmenį uždegiminės dKMP ligos vystymesi (43 pav.).



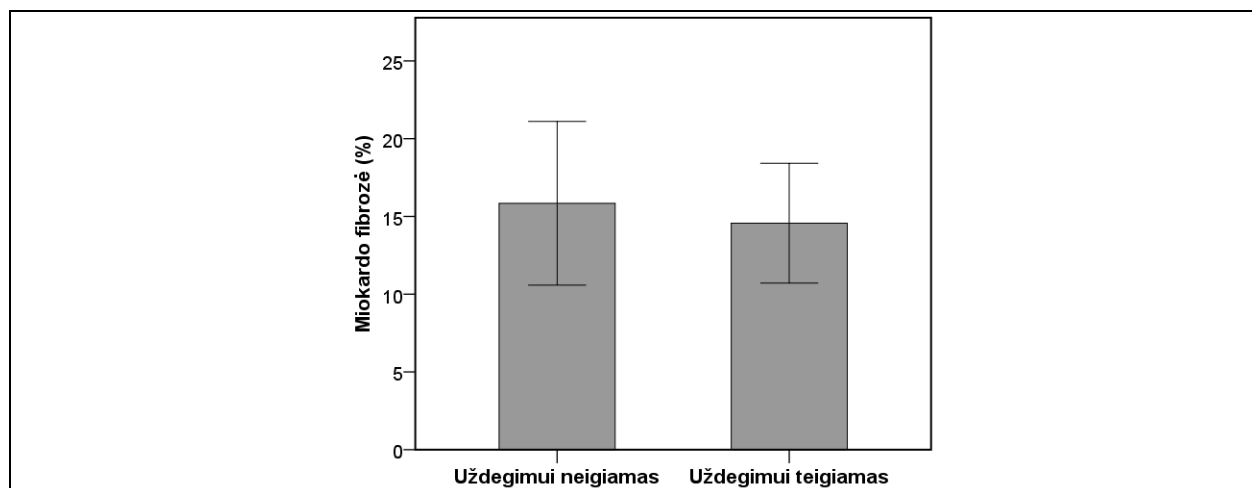
8 lentelė. Duomenų apie išmatuotus biožymenis santrauka

<i>Kintamieji</i>	<i>Uždegimui neigiama grupė</i>		<i>Uždegimui teigiama grupė</i>		<i>p Vertė</i>
	Pacientų sk.	Vertė	Pacientų sk.	Vertė	
Uždegimo žymenys serume					
TNF- α (pg/ml)	8	7,9313 \pm 0,5106	21	14,2819 \pm 5,0280	0,223
IL-6 (pg/ml)	8	3,3938 \pm 0,8554	21	11,4038 \pm 3,3614	0,031*
IL-1 β (pg/ml)	8	5,0000 \pm 0,0000	21	4,7619 \pm 0,2381	0,329
DjCRB (μ g/ml)	8	7,6875 \pm 5,0460	19	21,5563 \pm 6,9633	0,066;
Apoptozės žymenys serume					
Bcl2 (ng/mg baltymas)	10	0,0288 \pm 0,0288	22	0,0536 \pm 0,0455	0,889;
Bax (ng/mg baltymas)	10	2,1527 \pm 0,2400	22	2,3354 \pm 0,1606	0,535
Kaspazė-9 (ng/mg baltymas)	10	0,0130 \pm 0,0013	22	0,0808 \pm 0,0283	0,038*
Kaspazė-8 (ng/mg baltymas)	10	0,0010 \pm 0,0001	22	0,0031 \pm 0,0009	0,043*;
Kaspazė-3 (ng/mg baltymas)	10	0,0029 \pm 0,0022	22	0,0105 \pm 0,0023	0,025*
APO1/Fas/CD95 (ng/mg baltymas)	10	0,0000 \pm 0,0000	22	0,0000 \pm 0,0000	0,857;
FasL (ng/mg baltymas)	10	0,0000 \pm 0,0000	22	0,0000 \pm 0,0000	N.A.
Hsp60 (ng/mg baltymas)	10	0,0419 \pm 0,0253	22	0,3760 \pm 0,1468	0,035*
Apoptozės žymenys bioplate					
Bcl2 (ng/mg baltymas)	10	83,5523 \pm 26,2936	21	63,8790 \pm 17,2137	0,540
Bax (ng/mg baltymas)	10	5,6452 \pm 2,6905	21	6,8873 \pm 3,7924	0,724;
Kaspazė-9 (ng/mg baltymas)	10	29,6575 \pm 12,5969	21	38,7122 \pm 9,6108	0,950;
Kaspazė-8 (ng/mg baltymas)	10	0,9483 \pm 0,1640	21	1,1611 \pm 0,1962	0,413
Kaspazė-3 (ng/mg baltymas)	10	0,2503 \pm 0,0773	21	0,2586 \pm 0,0649	0,935
APO1/Fas/CD95 (ng/mg baltymas)	10	3,4651 \pm 0,6568	21	4,1921 \pm 0,6607	0,443
FasL (ng/mg baltymas)	10	4,5550 \pm 1,3594	21	4,0588 \pm 1,1083	0,780
Hsp60 (ng/mg baltymas)	10	24,1262 \pm 6,9102	21	19,2656 \pm 4,5617	0,565
Širdies kontraktilumo žymuo serume					
DjTnT (pg/mL)	8	35,4988 \pm 9,0908	20	66,4145 \pm 26,9755	0,289
Užląstelinio užpildo degradacijos žymenys serume					
MMP9 (ng/mg baltymas)	10	1,3867 \pm 0,0674	22	1,5261 \pm 0,0508	0,115
TIMP-1 (ng/mg baltymas)	10	5,9610 \pm 0,3597	22	6,1223 \pm 0,1497	0,686
MMP-9/TIMP-1	10	0,2355 \pm 0,0090	22	0,2511 \pm 0,0086	0,223
Užląstelinio užpildo degradacijos žymenys bioplate					
MMP-9 (ng/mg baltymas)	10	2,3698 \pm 1,1931	21	2,7630 \pm 0,9394	0,798
TIMP-1 (ng/mg baltymas)	10	9,4917 \pm 1,7605	21	7,8056 \pm 1,4029	0,462
MMP-9/TIMP-1	10	0,1931 \pm 0,0729	21	0,4760 \pm 0,1048	0,035*
Kiti matavimai					
BNP (pg/ml)	10	1277,8500 \pm 428,5054	22	1603,2591 \pm 276,3777	0,532
Adiponektinas (μ g/ml)	8	24,1000 \pm 3,5914	21	22,9048 \pm 3,5287	0,815
Galektinas-3 (ng/ml)	10	12,4670 \pm 1,9009	22	12,3895 \pm 0,8635	0,971
Širdies fibrozė (%)	10	15,8447 \pm 2,6319	22	14,5632 \pm 1,9258	0,699

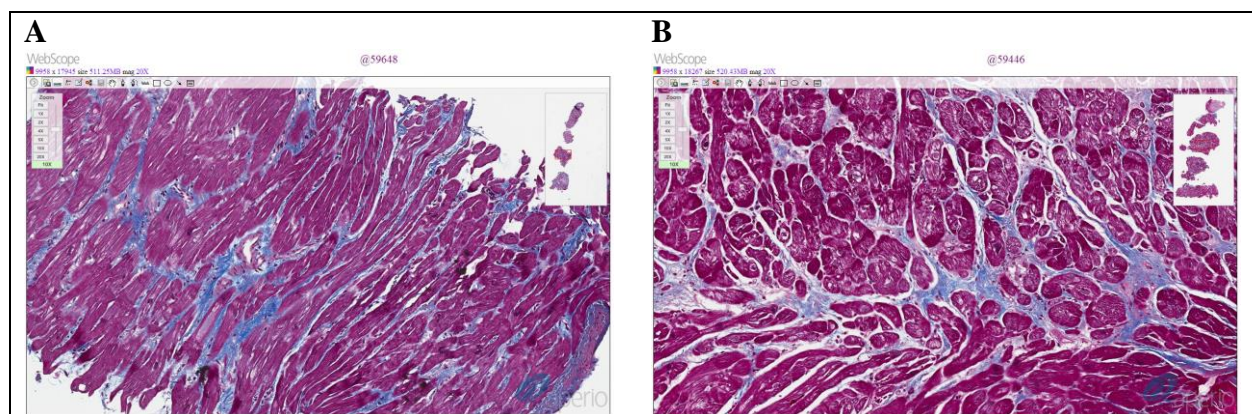
Duomenys pateikti kaip \pm SEM. * Duomenys buvo laikomi reikšmingais, kai jų lygis $p < 0,05$; ; Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumos testas. Santrumpos: TNF- α – naviko nekrozės faktorius α ; IL-6 – interleukinas-6; IL-1 β – interleukinas 1 β ; Bcl-2 – B ląstelių limfomos 2 baltymas; Bax – su Bcl-2 susijęs X baltymas; Hsp60 – karščio šoko baltymas-60; MMP-9 – matrikso metaloproteinazė-9; TIMP-1 – matrikso metaloproteinazės audinių inhibitorius-1; IL-1 β – interleukinas-1 beta; IL-6 – interleukinas 6; DjTnT – didelio jautrumo troponinas-T; DjCRB – didelio jautrumo C reaktyvusis baltymas, N.A. – negalimas.

4.2.5. Nekrozės indukcija uždegiminės dKMP mėginiuose

Uždegimui teigiamos pacientų grupės serumuose didelio jautrumo troponino-T (DjTnT, pagrindinio struktūrinio sarkomero baltymo, esančio širdyje) lygis buvo dvigubai didesnis (8 lentelė). DjTnT išsiskyrimas iš miokardo rodo, kad vyksta lėtinė struktūrinė ir funkcinė miokardo degradacija, kuri sutapo su žemesniu fibrozės lygiu uždegiminės dKMP biopsiatuose (44 pav. ir 45 pav.).

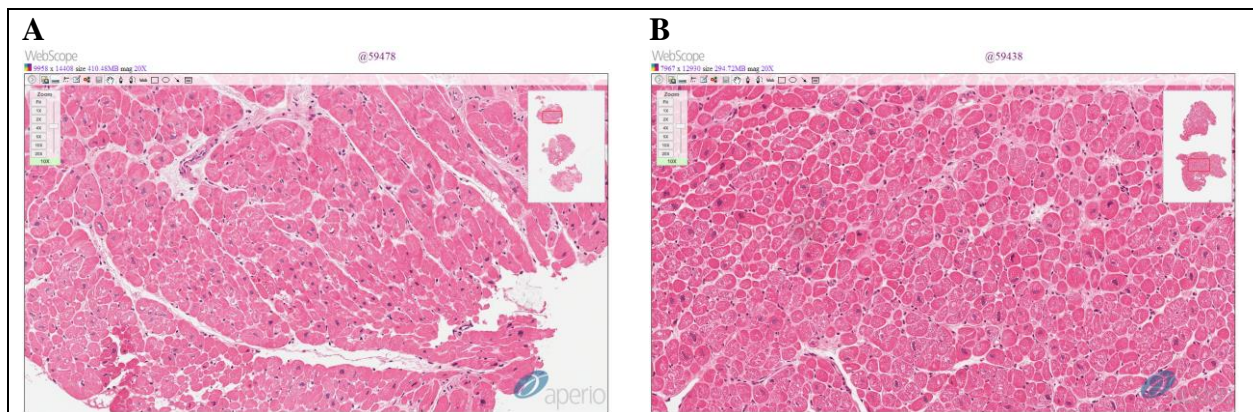


44 pav. Širdies fibrozė dešiniajame skilvelyje, EMB tyrimo rezultatai. Duomenys pateikti kaip vid. \pm SEM iš ne mažiau kaip trijų vienas nuo kito nepriklausomų matavimų



45 pav. Mikroskopinėse nuotraukose matome po vieną kiekvieną grupę reprezentuojančią paciento nuotrauką. (A) uždegimui neigiama (kiekybiškai įvertinta fibrozė – 20,34 %); (B) uždegimui teigiama (kiekybiškai įvertinta fibrozė – 18,65 %). Širdies fibrozė nudažyta Masono trichromo dažu (kolagenas pažymėtas mėlyna spalva). Dideli kolageno kiekiai parodo aukšą fibrozės lygį. Nuotrauka padidinta: x10

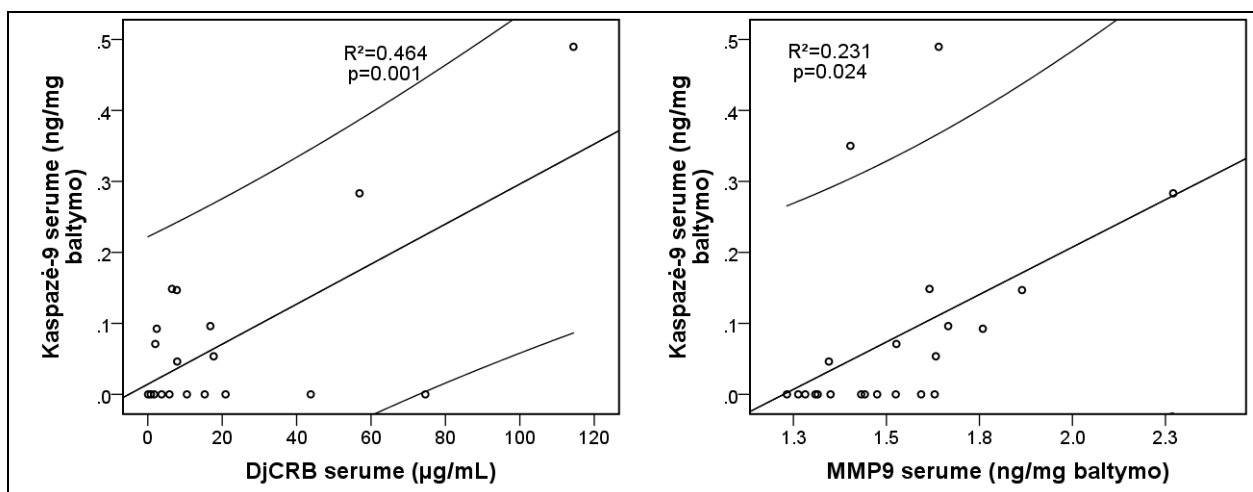
Taip pat atlikus histologinę analizę, miokardo biopsijos mėginiuose nekrozės neaptikta (46 pav.). Tai leidžia daryti išvadą, kad į serumą išsiskiriantis DjTnT yra susijęs su lėtai besivystančiu skersaruožių raumenų sutrikimu nei su nekrozės procesu.



46 pav. Uždegimas kairiojo skilvelio EMB. Mikroskopinėse nuotraukose matome po vieną kiekvieną grupę reprezentuojančią paciento nuotrauką. (A) uždegimui neigiama; (B) uždegimui teigiama. Dažymas hematoksilinu ir eozinu. Nuotrauka padidinta: x10

4.2.6. Apoptozinių kelių sąveika, prisidedanti prie uždegiminės dKMP vystymosi

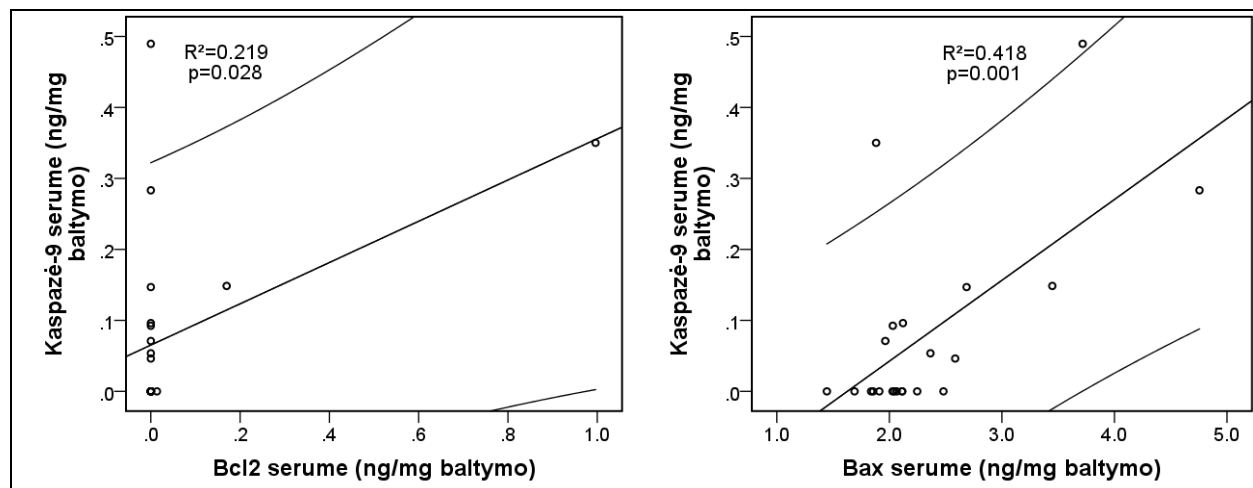
47 pav. pateikti duomenys rodo, kad kaspazė-9, specifinė serumo cisteino-asparto rūgšties proteazė, dar žinoma kaip apoptozę sukelianti kaspazė, stipriai koreliuoja su bendruoju uždegimo žymeniu DjCRB, taip patvirtindama, kad apoptozės vidinis kelias jautriai reaguoja į uždegimą.



47 pav. Kaspazės-9 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės mėginiuose. Koreliacija tarp kaspazės-9 ir didelio jautrumo C reaktyviojo baltymo (DjCRB) serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikiami diagramose

48 pav. Kaspazės-9 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės mėginiuose. Koreliacija tarp kaspazės-9 ir matrikso metaloproteinazės-9 (MMP-9) serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikiami diagramose

Koreliacija tarp kaspazės-9 ir MMP9 (48 pav.) rodo, kad kaspazė-9 gali būti tiesiogiai aktyvinama MMP9 arba kitų vidinio apoptozinio kelio tarpininkų: Bcl-2 ir Bax (49 pav. ir 50 pav. $p < 0,05$).

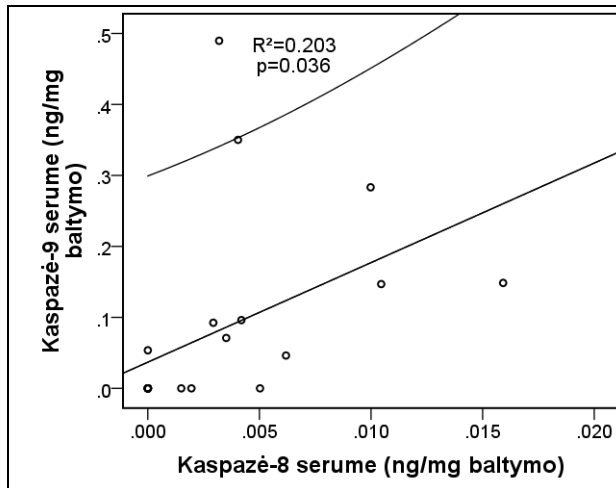


49 pav. Kaspazės-9 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės serumo mėginiuose. Čia pateikiama koreliacija tarp kaspazės-9 ir B ląstelių limfos 2 baltymo (Bcl-2) serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikiami diagramose

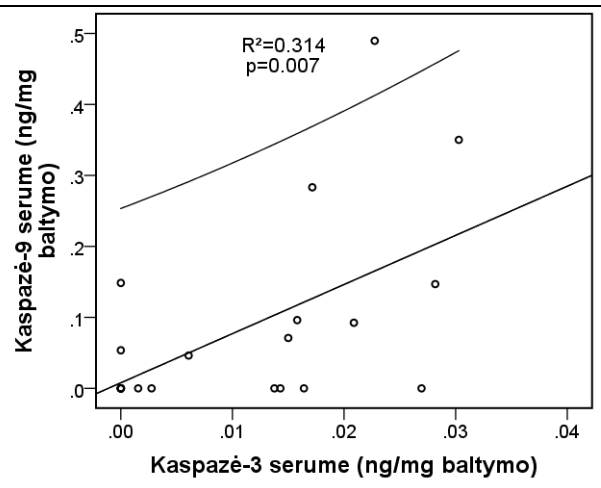
50 pav. Kaspazės-9 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės serumo mėginiuose. Čia pateikiama koreliacija tarp kaspazės-9 ir su Bcl-2 susijusio X baltymo (Bax) serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikiami diagramose

51 pav. ir 52 pav. pateikiami duomenys taip pat rodo, kad ne tik apoptozę inicijuojanti kaspazė-9 prisideda prie miokardo destrukcijos reguliavimo. Stipri koreliacija ($p < 0,05$) tarp kaspazės-9 ir egzekucinės kaspazės-3 bei išorinį apoptozės kelią inicijuojančios kaspazės-8 leidžia manyti, kad vidinis ir išorinis apoptoziniai keliai tarpusavyje sąveikauja.

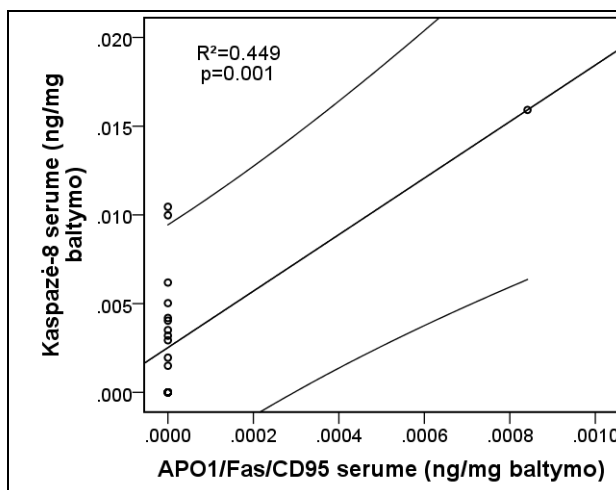
Nors kaspazės-8 aktyvinimas uždegiminiuose KMP mėginiuose nebuvo ypatingai ženklus, koreliacinė analizė su APO1/Fas/CD95 rodo, kad šis kelias ir su juo susijęs receptorius, esant stipresniam uždegimui, gali dalyvauti uždegiminės dKMP vystymesi (53 pav.). Svarbi koreliacija tarp kaspazės-8 ir Bax patvirtina, kad išorinis ir vidinis apoptoziniai keliai susikerta mitochondriniame lygmenyje ir šiame procese Bax atlieka ypatingą vaidmenį (54 pav.).



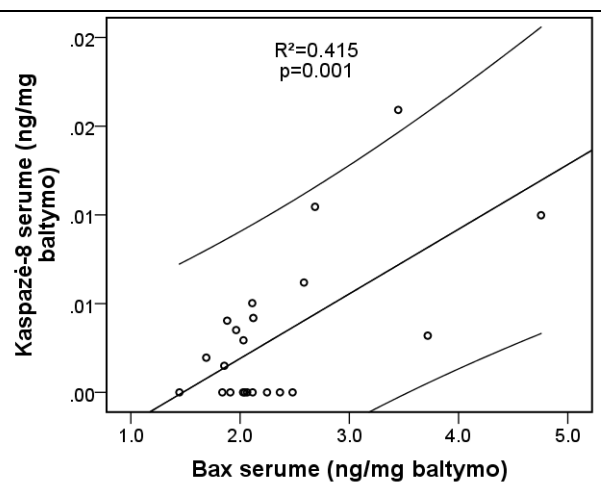
51 pav. Kaspazės-9 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės serumo mėginiuose. Čia pateikiama koreliacija tarp kaspazės-9 ir kaspazės-8 serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikiami diagramose



52 pav. Kaspazės-9 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės serumo mėginiuose. Čia pateikiama koreliacija tarp kaspazės-9 ir kaspazės-3 serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikiami diagramose



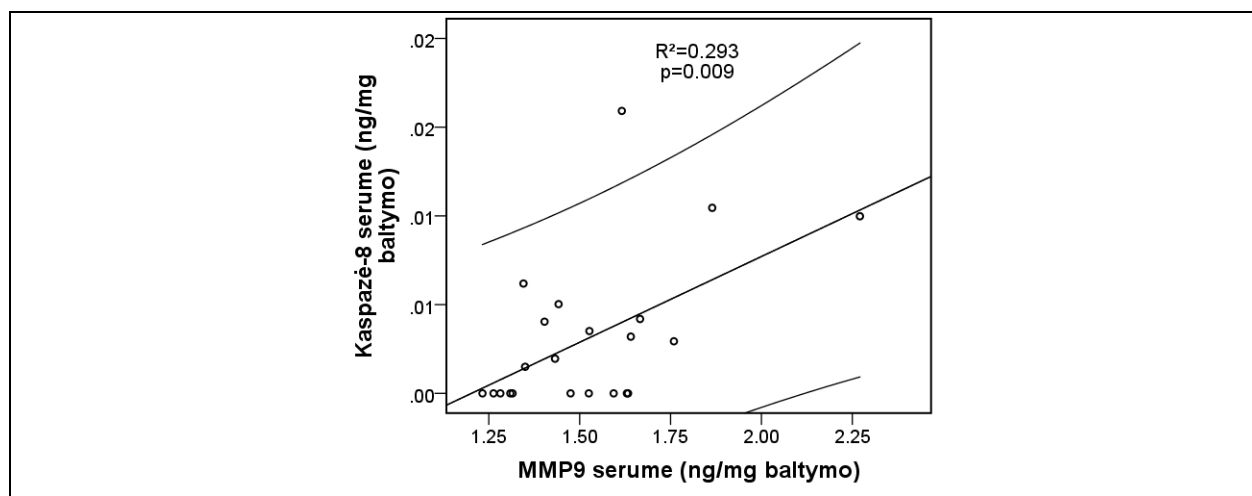
53 pav. Kaspazės-8 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės serumo mėginiuose. Čia pateikiama koreliacija tarp kaspazės-8 ir Fas receptoriaus (APO1/Fas/CD95) serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikiami diagramose



54 pav. Kaspazės-8 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės serumo mėginiuose. Čia pateikiama koreliacija tarp kaspazės-8 ir su Bcl-2 susietu X baltymu (Bax) serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikiami diagramose

Koreliacija tarp kaspazės-8 ir MMP9 (55 pav.), panašiai kaip ir su kaspaze-9, leidžia teigti, kad MMP9 taip pat prisideda prie tiesioginės prokaspazės-8 aktyvacijos.

MMP9 ir kaspazių koreliacija taip pat gali būti aktyviai susijusi su miokardo pralaidumo padidėjimu ir baltymų išskyrimu į užląstelinę erdvę.



55 pav. Kaspazės-8 koreliacija su biomolekulėmis uždegimui teigiamos pacientų grupės serumo mėginiuose. Čia pateikiama koreliacija tarp kaspazės-8 ir matrikso metaloproteinazės-9 serumo mėginiuose. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale. Regresijos koeficientai (R^2) ir statistinė reikšmė ($p < 0,05$) pateikti diagramose

4.2.7. Apoptozinių biožymenų raiška miokardo audinyje

Toliau buvo įdomu ištirti, ar apoptozinių biožymenų išsiskyrimas į kraują atspindi panašius procesus, vykstančius ir uždegimine dKMP sergančio paciento miokarde. Kaspazės-9 aktyvinimas tiek širdies audinyje, tiek serume stipriai koreliavo su uždegiminėmis ląstelėmis, ypač su uždegiminiais citokinais IL-6, o kaspazė-8 ryškiau koreliavo su Bax ir kaspaze-3 (žr. 9 lentelę, kaspazių-8 ir -9 koreliacijos). Egzekucinė kaspazė-3 reikšmingai koreliavo su vidiniais (Bax, Bcl-2) ir išoriniais (APO1/Fas/CD95 ir FasL) apoptozinių kelių aktyvintojais (žr. 2 lentelėje kaspazės-3 koreliaciją). Panašiai kaip serumuose, bioptatuose abiejų apoptozės aktyvavimo būdų dalyviai (Bcl-2, ir APO1/Fas/CD95, FasL) reikšmingai koreliavo su MMP9 ir jo inhibitoriumi TIMP-1 (9 lentelė). Taip pat buvo pastebėta stipri ($p < 0,001$) koreliacija tarp Bax pokyčių bioptatuose ir serumuose (duomenys nepateikti). Galiausiai, sarkomerinis baltymas DjTnT taip pat stipriai koreliavo su kaspaze-8, Bax ir kaspaze-3 tiek bioptatuose, tiek uždegiminės dKMP pacientų serumuose. Tai leidžia daryti išvadą, kad kaspazinių kelių aktyvinimas taip pat prisideda prie nuo kaspazių priklausomo DjTnT išsiskyrimo (žr. 9 lentelėje DjTnt koreliaciją).

9 lentelė. Apoptozinių, nekrozozių ir uždegiminių biožymenų koreliacija

	Kaspazė-9 bioptate	Kaspazė-8 bioptate	Kaspazė-3 bioptate	Bcl2 bioptate	FasR bioptate	FasL bioptate	Bax bioptate
Kaspazė-8 bioptate	0,303						
Kaspazė-3 bioptate	0,063	0,436*					
Bcl2 bioptate	-0,202	0,175	0,486*				
FasR bioptate	-0,097	-0,074	0,526*	0,739**			
FasL bioptate	-0,046	0,007	0,442*	0,835**	0,907**		
MMP-9 bioptate	-0,229	0,024	0,419	0,764**	0,730**	0,824**	
TIMP-1 bioptate	-0,012	-0,205	0,213	0,517*	0,795**	0,722**	
Bax bioptate	0,283	0,584**	0,678**	0,056	0,139	0,053	
IL-6 serume	0,518*	-0,016	-0,011	-0,262	-0,202	-0,154	0,131
DjTnT serume	0,434	0,598**	0,563*	-0,125	-0,067	-0,165	0,954**

2-tailed testo svarba: *p < 0,05; **p < 0,01. Reikšmingos koreliacijos paryškintos. Santrumpos: IL-6 – interleukinas-6; Bcl-2 – B ląstelių limfomos 2 baltymas; FasR – Fas receptorius; FasL – Fas ligandas; MMP-9 – matrikso metaloproteinazė-9; TIMP-1 – matrikso metaloproteinazės audinių inhibitorius-1; Bax – su Bcl-2 susijęs X baltymas; Hsp60 – karščio šoko baltymas-60; DjTnT – didelio jautrumo troponinas-T.

4.3. Kiekybinis miokardo fibrozės įvertinimas pasitelkiant skaitmeninę vaizdo analizę ir interaktyviąją stereologiją

Iš viso 116-os skaidrių analizei buvo panaudoti: skaitmeninis būdas, vizualus gydytojo patologo vertinimas ir stereologijos metodas.

Fibrozės vidurkis, apskaičiuotas naudojant kolokalizacijos programinę įrangą, buvo $13,72 \pm 1,14$ %. Jis buvo artimiausias stereologijos pagrindu apskaičiuotai pamatinei vertei (RVS: $13,21 \pm 1,42$ %). Vidurkių reikšmės, kurios buvo gautos pasitelkus *Genie* programinę įrangą ir vizualų patologo vertinimą: pirmojo matavimo metu nulinę savaitę ($11,20 \pm 1,44$ %) ir antrojo matavimo metu antrą savaitę ($10,76 \pm 1,61$ %), parodė nedidelę neigiamą vertinimo paklaidą, susijusią su RVS. Visgi kolokalizacijos įrangos diapazonas buvo žemiausias iš visų tikrintų metodų ir nuo jų skyrėsi apie 20 %. *Genie* įrangos diapazonas buvo 88,22 %, o vizualus patologo vertinimas – 100 %. Šie rezultatai lygintini su RVS diapazonu (96,50 %), duomenys pateikti 10 lentelėje.

10 lentelė. Širdies fibrozės (%) vertinimo metodų statistinių duomenų santrauka

	Stereologija	Kolokalizacija	<i>Genie</i>	Patologas 0 savaitė	Patologas 2 savaitė
Stebėjimų skaičius	116	116	116	116	116
Vidurkis	13,21	13,72	11,60	11,20	10,76
Mediana	8,70	11,12	7,39	5,00	5,00
Standartinė vidurkio paklaida	1,42	1,14	1,43	1,44	1,61
Diapazonas	96,50	73,79	88,22	100,00	100,00
Minimumas	0,00	1,57	0,05	0,00	0,00
Maksimumas	96,50	75,36	88,27	100,00	100,00

Tiek kolokalizacijos, tiek *Genie* metodai labai stipriai koreliavo su RVS širdies fibrozės vertinimu (atitinkamai: $R = 0,928$ ir $R = 0,946$ ($p < 0,001$)). Patologo vizualus vertinimas taip pat stipriai koreliavo su RVS: $R = 0,913$ ($p < 0,001$) nulinę savaitę ir $R = 0,929$ ($p < 0,001$) antrą savaitę (11 lentelė).

11 lentelė. Porinės koreliacijos tarp stereologijos, skaitmeninių algoritmų ir patologo vertinimo (Pirsono koeficientai, $p < 0,001$, $n = 116$)

	Stereologija	Kolokalizacija	<i>Genie</i>	Patologas 0 savaitė
Kolokalizacija	0,928			
<i>Genie</i>	0,946	0,973		
Patologas 0 savaitė	0,913	0,839	0,841	
Patologas 2 savaitė	0,929	0,853	0,856	0,965

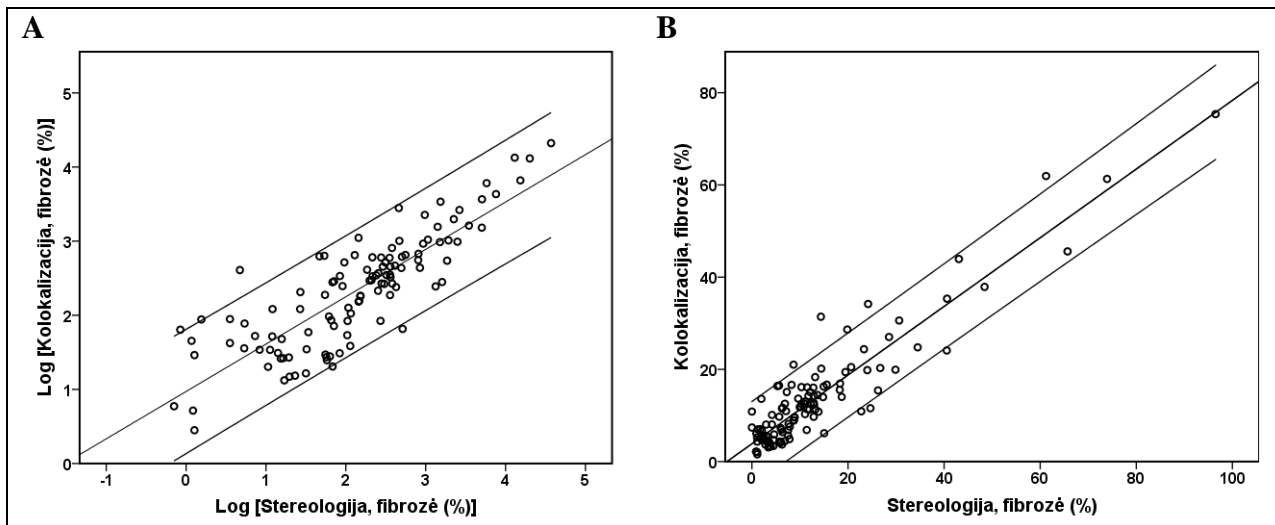
Frydmano testas atskleidė statistiškai reikšmingus širdies fibrozės vertinimo metodų rezultatų skirtumus: $\chi^2(3) = 62,405$, $p = 0,000$. Buvo taikoma *post hoc* analizė ir Vilkoksono žymėtų rangų metodika su Bonferonio pataisomis (nustatytas reikšmingumo lygis – $p < 0,0125$). Kolokalizacijos ir RVS rezultatų skirtumai buvo statistiškai nereikšmingi ($Z = -2,259$, $p = 0,024$), jų vidurkių skirtumo reikšmė buvo 0,50 %. Visgi *post hoc* analizė parodė svarbius skirtumus tarp *Genie* ir RVS ($Z = -5,000$, $p = 0,000$) bei tarp patologo vertinimo vidurkio ir RVS ($Z = -4,422$, $p = 0,000$). Jų vidurkių skirtumo reikšmė buvo -1,61 % ir 2,24 %. Panašūs reikšmingi rezultatų skirtumai buvo aptikti tarp dviejų skaitmeninių metodų (*Genie* ir Kolokalizacijos): $Z = -6,639$, $p = 0,000$, su 2,11 % dispersine paklaida (12 lentelė).

12 lentelė. Porinis širdies fibrozės (%) vertinimo metodų palyginimas

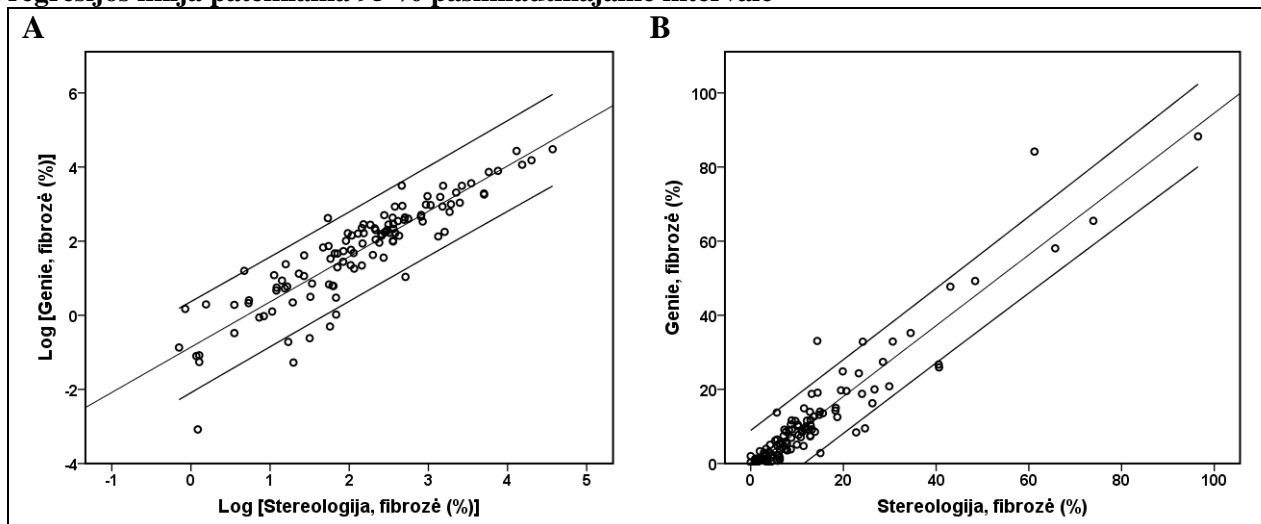
		Porų skirtumai		Z^*	p vertė*
		Vidurkis	Standartinė vidurkio paklaida		
1-a pora	Kolokalizacija – stereologija	0,50	0,56	-2,259	0,024
2-a pora	<i>Genie</i> – stereologija	-1,61	0,47	-5,000	0,000
3-a pora	Patologo vert. vidurkis – stereologija	2,24	0,56	-4,422	0,000
4-a pora	Kolokalizacija – <i>Genie</i>	2,11	0,42	-6,639	0,000

* Skaičiavimai remiasi *post hoc* analize ir Vilkoksono žymėtų rangų metodika (su Bonferonio pataisomis, nustatytas reikšmingumo lygis $p < 0,0125$).

Paprastosios tiesinės regresijos modelio taškinės diagramos parodė, kad *Genie* programinė įranga yra naudingesnė negu kolokalizacijos įranga dėl aiškiai geresnių neapdorotų ir į logaritmus transformuotų R-kvadratu matavimų: 0,896 ir 0,804 (log) palyginti su 0,861 ir 0,707 (log); nuolydis 0,956 ir 1,222 (log) palyginti su 0,745 ir 0,639 (log); susikirtimo taškas -1,033 ir -0,860 (log) palyginti su 3,875 ir 0,972 (log) (56 pav. ir 57 pav.).

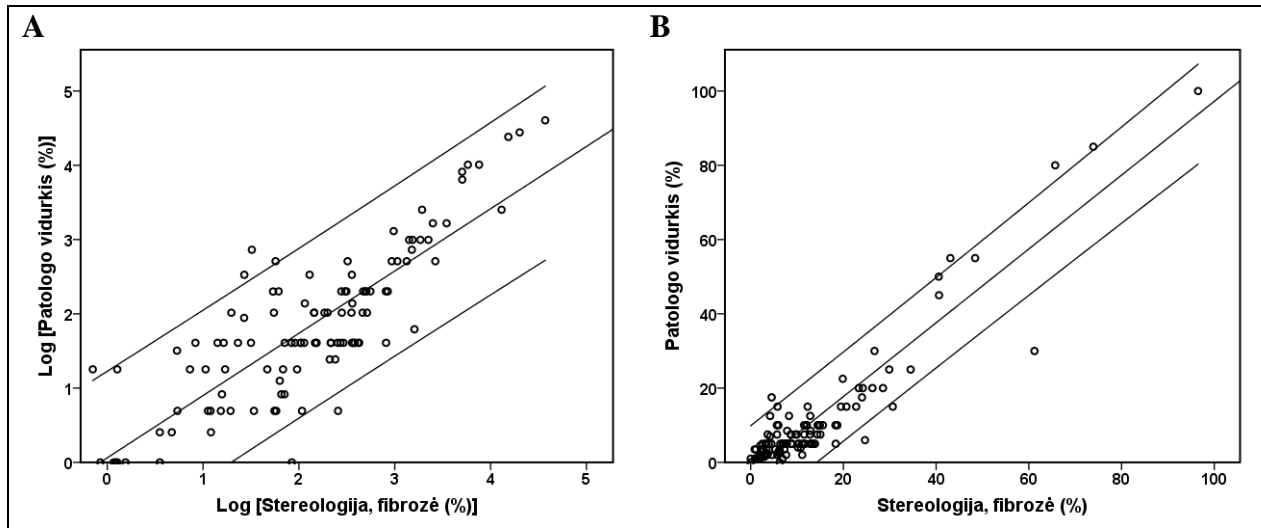


56 pav. Paprastosios linijinės regresijos modeliai ir jų ataskaitinės reikšmės. Neapdoroti (A) ir į logaritmus transformuoti matavimai (B) atlikti kolokalizacijos ir stereologijos būdu. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale

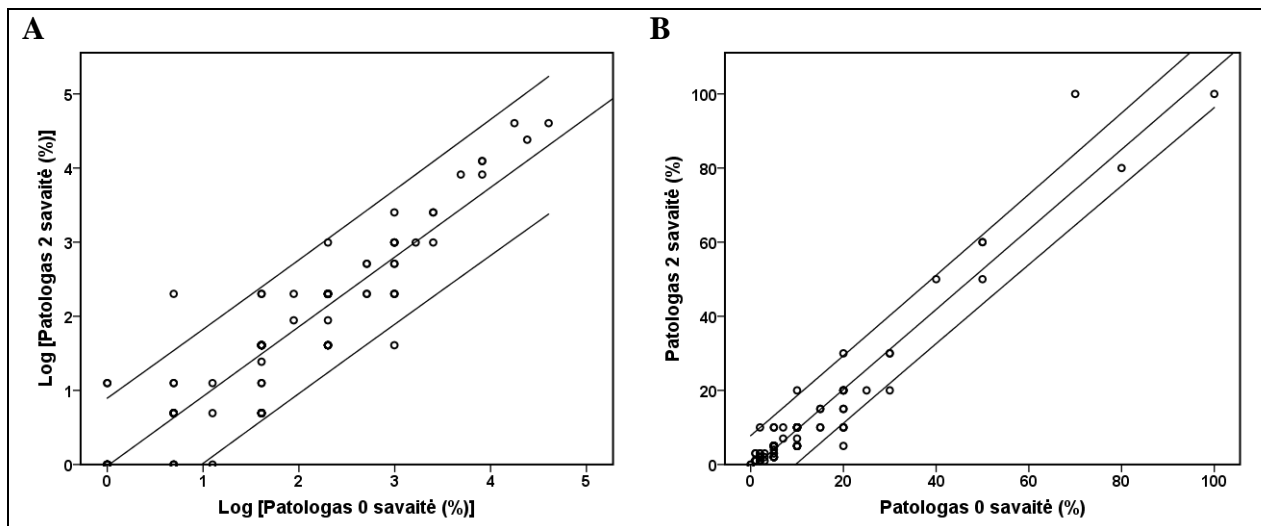


57 pav. Paprastosios linijinės regresijos modeliai ir jų ataskaitinės reikšmės. Neapdoroti (A) ir į logaritmus transformuoti (B) matavimai atlikti *Genie* ir stereologijos būdu. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale

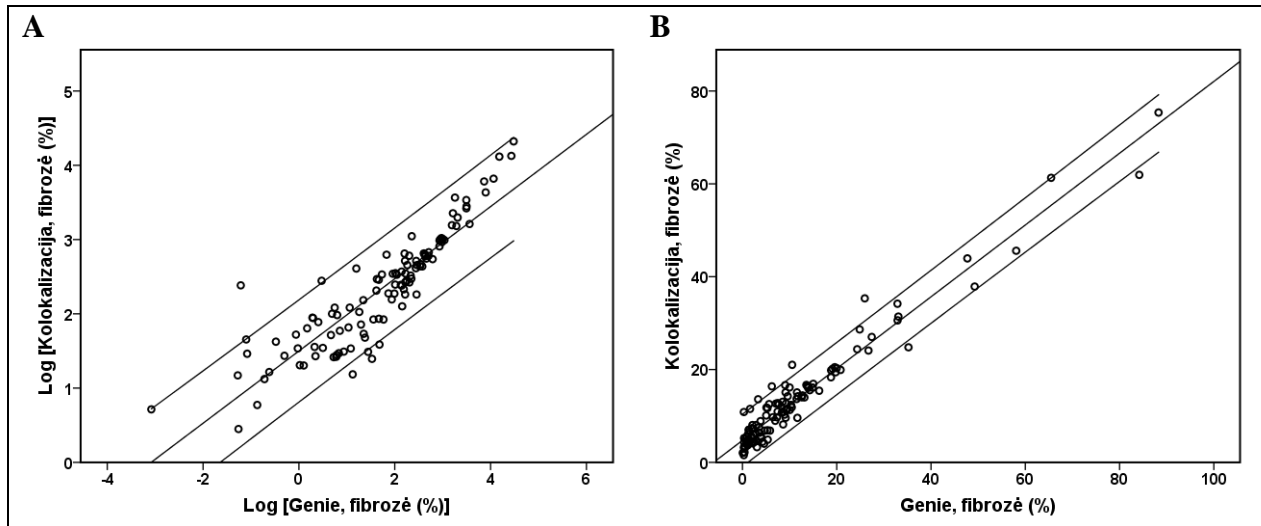
Patologo vertinimo ir RVS koreliacija buvo panaši: R-kvadratu 0,864 ir 0,684 (log), nuolydis 0,994 ir 0,838 (log); susikirtimo taškas -2,155 ir 0,062 (log); stebėtojo rezultatų variacijos, palyginus nulinę ir antrą savaites, buvo nedidelės: R-kvadratu 0,931 ir 0,824 (log), nuolydis 1,079 ir 0,939 (log), susikirtimo taškas -1,328 ir -0,020 (log). Stebėtina, kad abiejų skaitmeninių metodų rezultatai ne taip ryškiai, kaip tikėtasi, koreliavo tarpusavyje: R-kvadrato reikšmės (0,947 ir 0,794 (log)), bet aukštas susikirtimo taškas (4,744 ir 1,500 (log)) ir nuolydis, kuris buvo toli nuo idealaus varianto (0,773 ir 0,486 (log)) (58 pav., 59 pav. ir 60 pav.).



58 pav. Paprastosios linijinės regresijos modeliai ir jų atskaitinės reikšmės. Neapdoroti (A) ir į logaritmus transformuoti (B) matavimai – patologo vertinimas ir stereologijos metodas. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale

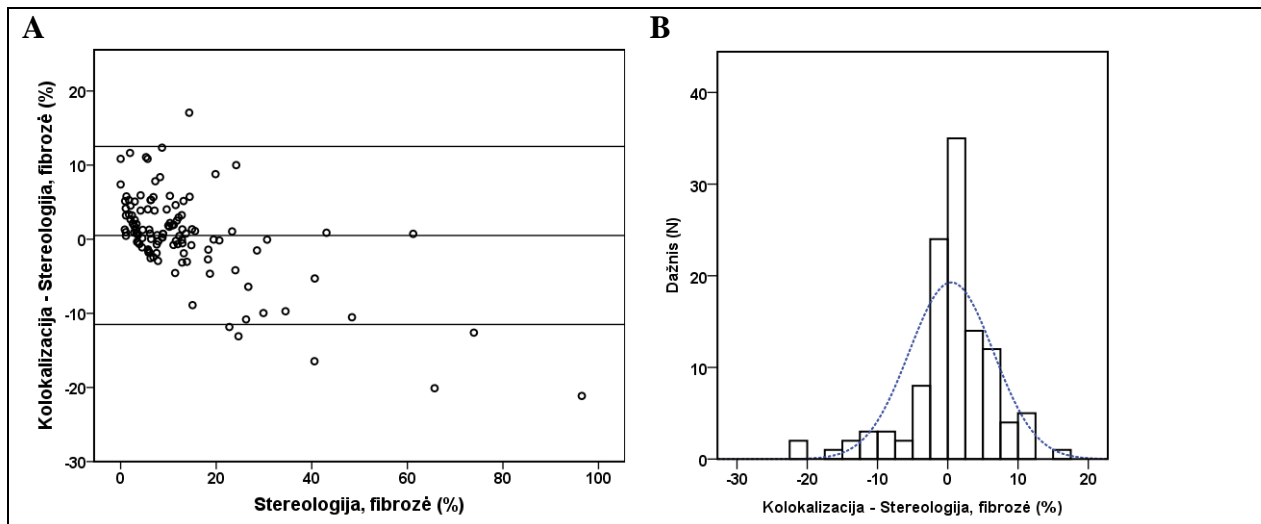


59 pav. Paprastosios linijinės regresijos modeliai ir jų atskaitinės reikšmės. Neapdoroti (A) ir į logaritmus transformuoti (B) matavimai – čia matomi patologo vertinimai nulinę savaitę ir 2-ą savaitę. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale



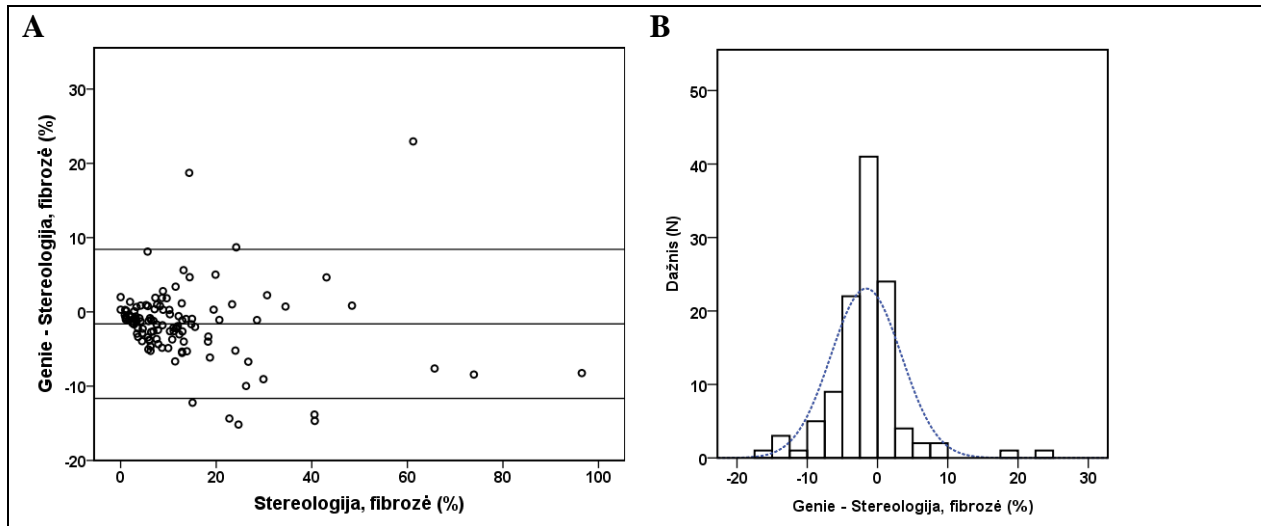
60 pav. Paprastosios linijinės regresijos modeliai ir jų atskaitinės reikšmės. Neapdoroti (A) ir į logaritmus transformuoti (B) matavimai atlikti kolokalizacijos ir *Genie* metodais. Tiesinės regresijos linija pateikiama 95 % pasikliautinajame intervale

Bland–Altman statistinė analizė parodė, kad dvikryptė paklaida priklauso nuo matavimų mastelio. Kolokalizacijos programinė įranga apskaičiavo fibrozės plotą su teigiama vertinimo paklaida apatinėje RVS skalėje, o viršutinėje RVS skalėje – su neigiama vertinimo paklaida (61 pav.).

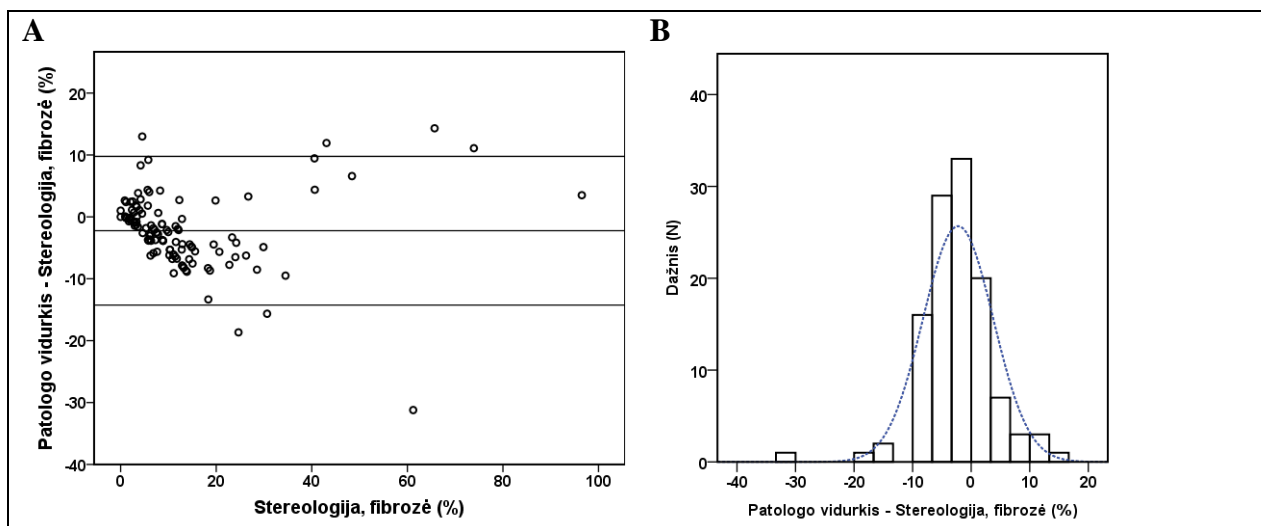


61 pav. Skirtingų metodų vertinimo rezultatų skirtumai, kuriems atskleisti naudota Bland–Altman statistinė analizė (A) ir histogramos (B). Kolokalizacijos ir stereologijos metodai. Horizontali linija parodo skirtumų vidurkį, neperžengiant susitarimo ribų (skirtumo vidurkis su ± 2 standartiniu nuokrypiu)

Genie programinės įrangos ir patologo vertinimo vidurkio rezultatai buvo vienodesni, išskyrus nedidelę neigiamą vertinimo paklaidą vidurinėje skalės dalyje (62 pav. ir 63 pav.).



62 pav. Skirtingų metodų vertinimo rezultatų skirtumai, kuriems atskleisti naudota Bland–Altman statistinė analizė (A) ir histogramos (B). Genie ir stereologijos metodai. Horizontali linija parodo skirtumų vidurkį neperžengiant susitarimo ribų (skirtumo vidurkis su ± 2 standartiniu nuokrypiu)



63 pav. Skirtingų metodų vertinimo rezultatų skirtumai, kuriems atskleisti naudota Bland–Altman statistinė analizė (A) ir histogramos (B). Patologo vizualaus vertinimo vidurkis ir stereologijos metodas. Horizontali linija parodo skirtumų vidurkį neperžengiant susitarimo ribų (skirtumo vidurkis su ± 2 standartiniu nuokrypiu)

Pateiktos histogramos parodo kiekvieno brėžinio skirtumų normalųjį skirstinį (61 pav., 62 pav. ir 63 pav.).

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. Viruso sukeltos dKMP molekuliniai mechanizmai

Miokardo sutrikimai sukelia įvairių širdies problemų, todėl, atsižvelgiant į sutrikimo priežastį ir pažeidimo sritis, gydymui reikalingi skirtingi metodai. Miokardą daugiausia sudaro miocitai, užląstelinis užpildas (ULU) ir kapiliarų mikrocirkuliacijos sistema. Miocitų veikla atsako už miokardo įsitempimo ir susitraukimo reguliaciją, o užląstelinio užpildo funkcija užtikrina struktūrinę šalia esančių miocitų ir miofilamentų vientisumą ir mikrocirkuliaciją. Kuris iš šių procesų – kardiomiocitų žūtis ar ULU degradacija – stipriau pakenkia miokardo veiklai, daugiausia priklauso nuo vieno ar kito proceso intensyvumo ir trukmės. Svarbu nustatyti, kuri iš pirmiau minėtų miokardo dalių buvo ilgą laiką pažeista (Janicki ir Brower 2002; Whelan, Kaplinskiy et al. 2010).

Šiame darbe pateikti duomenys rodo, kad lėtinei virusinei dKMP nėra būdingas miokardo uždegimas, fibrozė ar apoptozė. Sumažėjęs sarkomerinio baltymo DjTnT kiekis serume, kuris taip pat yra ir nekrozinės ląstelių žūties žymuo (Bashey, Martinez-Hernandez et al. 1992), patvirtina, kad virusinės dKMP metu nekrozinės kardiomiocitų žūties taip pat nėra. Visgi lėtinė vidumiokardinė virusinė infekcija nėra tokia „nekalta“, kaip atrodo iš pirmo žvilgsnio. Duomenys rodo, kad kolageno sintezės/degradacijos balansas (PICP/ICTP santykis) virusui teigiamuose bioptatuose sumažėjo 4,3 karto. Kadangi 85–90 % miokardo sudaro I tipo kolagenas ir tik 10–15 % III tipo kolagenas bei kiti komponentai (Kociol, Pang et al. 2010; Whelan, Kaplinskiy et al. 2010), I tipo kolageno apykaitos sutrikdymas tirtuose miokardo audiniuose gali būti vienas svarbiausių lėtinės virusinės dKMP išsivystymo veiksnių. Bioptatuose sumažėjo ne tik I tipo kolageno, bet šiek tiek (1,13 karto) ir viduląstelinis fibrozės žymens α -SMA kiekis. Teigiamą koreliaciją tarp I tipo kolageno sintezės ir bendro uždegimo žymens CRP serume leidžia teigti, kad, jeigu miokarde ilgą laiką yra virusinė infekcija, ji gali suaktyvinti uždegimą ir fibrozę. Remiantis rezultatais galima teigti, kad susitraukimą reguliuojančių baltymų, ypač I tipo kolageno, degradacija lėtinėje virusinėje dKMP yra vyraujantis procesas lyginant su uždegimu ir kardiomiocitų žūtimi.

Vienas pagrindinių veiksnių, kuris veikia I tipo kolageno sintezę miokarde, yra transformuojantis augimo faktorius beta (TGF- β 1), kuris atlieka pagrindinį vaidmenį

širdies atsinaujinimo procese. TGF- β 1 tarpininkauja kardiomiocitų augimo, fibroblastų aktyvavimo ir ULU kaupimo procesuose (Bujak ir Frangogiannis 2007). TGF- β 1 yra žinomas ne tik kaip fibrogeninis, bet ir kaip uždegimą malšinantis citokinas, todėl jo nuslopinimas galėtų paveikti tiek kolageno sintezės procesą, tiek imuninę sistemą ir aktyvinti uždegimą (Aukrust, Ueland et al. 1999; Sun, Zhang et al. 2000; Gorelik ir Flavell 2002). Duomenys parodė, kad TGF- β 1 sumažėjo 3,6 karto virusui teigiamuose dKMP bioplatuose, o serume jo lygis beveik nepakito. TGF- β 1 įtaka kolageno sintezei yra sudėtinga ir nevisiškai ištyrinėta. Taip pat buvo pastebėta, kad TGF- β 1 gali tiesiogiai aktyvinti I tipo kolageno sintezę (Pan, Chen et al. 2013) ir netiesiogiai – kolageno sintezę per SMAD baltymų fosforilinimą, padidėjusią endogliną raišką, TIMP-1 stimuliaciją, lizilo oksidazės aktyvavimą ir kitas signalines sistemas (Heldin, Miyazono et al. 1997; Kwak, Kim et al. 2011; Voloshenyuk, Landesman et al. 2011; Kapur, Wilson et al. 2012). Koreliacijos analizė parodė, kad užsitęsusi virusinė miokardo infekcija, ypač makrofagų infiltracija, aktyvina uždegimą, o tuo pačiu MMP-1, MMP-2 ir TGF- β 1 aktyvumą. Panašūs TGF- β 1 molekuliniai mechanizmai, veikiantys I tipo kolageno kaupimąsi, buvo paminėti ir kitų autorių darbuose (Kobayashi, Kim et al. 2014). Be to, MMP-9 išskyrimas į serumą buvo reikšmingai susijęs su Hsp60 pasišalinimu iš miokardo (5 lentelė) ir tai parodė, kad negydoma virusinė infekcija gali aktyvinti MMP-9 ir padidinti išorinės mitochondrijų membranos pralaidumą, kuris sukeltų mechaninį miocitų sutrikimą. Taip pat yra tikimybė, kad dalis MMP-9 yra mitochondrijų viduje ir dėl šios priežasties yra išskiriamas iš viruso pažeistų mitochondrijų (Moshal, Tipparaju et al. 2008).

Kaip ir TGF- β 1, išskirtas galektinas-3 taip pat gali įtakoti I tipo kolageno gamybą. Galektinas-3 yra beta-galaktozidą surišantis gyvūninės kilmės lektinas ir daugiausia aptinkamas makrofaguose, o jo ekspresija žmogaus širdyje yra ribota (Sharma, Pokharel et al. 2004). Buvo parodyta, kad aktyvinti makrofagai išskiria galektiną-3, kuris aktyvina fibroblastų proliferaciją, kolageno kaupimąsi ir prisideda prie širdies nepakankamumo vystymosi (Sharma, Pokharel et al. 2004). Galektinas-3 taip pat gali aktyvinti fibrozę, padidindamas užląstelinio fibrozės žymens α -SMA raišką, bei I tipo α -1 grandies kolageną, kuris yra užląstelinės fibrozės žymuo (de Boer, Voors et al. 2009). Lygia greta galektinas-3 gali paveikti fibrozės vystymąsi, prisidedamas prie TIMP-1 ir MMP-9 kiekio sumažinimo (de Boer, Voors et al. 2009). Sumažėjusių α -SMA, I tipo kolageno,

TIMP-1 ir MMP-9 kiekių virusui teigiamuose bioplatuose priežastis gali būti sumažėjęs galektino-3 ir infiltruotų makrofagų lygis serume. Kita vertus, esant vidumiokardinei virusinei infekcijai, MMP-1 ir MMP-2 aktyvacijos gali pakakti inicijuojant miokardo I tipo kolageno sintezės/degradacijos pakitimus (prisijungiant prie α -2 grandies) (Gioia, Fasciglione et al. 2010).

Dar vienas iš mechanizmų, netiesiogiai paveikiančių kolageno apykaitą, galėtų būti susiję su miokardo apsaugos sistemomis. Viena jų yra imunoreguliacinis adiponektinas, kurio vaidmuo esant skirtingoms toksinėms sąlygoms gali atrodyti paradoksalus. Daugelis atliktų tyrimų parodė, kad per didelė adiponektino raiška turi priešdiabetinį, priešapoptozinį ir priešuždegiminį poveikį (Ouchi ir Walsh 2007; Jian, Su et al. 2013). Taip pat buvo pastebėta, kad dideli adiponektino kiekiai sumažina miokardo infarkto, bet padidina širdies nepakankamumo riziką, o hipoadiponektinemija buvo susieta su širdies ir kraujagyslių ligomis (Kumada, Kihara et al. 2003; Pischon, Girman et al. 2004; Chen, Rijzewijk et al. 2011). Taip pat buvo nustatyta, kad adiponektinas ir BNP pasižymi širdį apsaugančiu poveikiu (Lyu, Zhao et al. 2014). Visgi beveik du kartus serume sumažėję BNP ir adiponektino kiekiai bei jų koreliacija su uždegimą slopinančiu citokinu TGF- β 1 ($R^2 = 0,459$, $p = 0,008$) galėtų reikšti ne tik endotelio disfunkciją, bet ir sumažėjusią miokardo apsaugą. Nedidelis pagrindinio audinių suderinamumo agentų II klasės HLA-DR padidėjimas taip pat rodė, kad buvo pažeistos virusinio miokardo endotelio ląstelės. Kadangi uždegiminių infiltratų ir citokinių lygiai virusui teigiamame miokarde, palyginus su virusui neigiamu miokardu, sumažėjo, todėl šiek tiek padidėjęs HLA-DR gali būti tiesioginis virusų poveikis. Kita vertus, adiponektino ir BNP koreliacija su uždegiminiais infiltratais leidžia manyti, kad galbūt pasigamino per daug BNP ir adiponektino, nes dėl miokardo virusinės infekcijos išsivystė širdies nepakankamumas. Panaši adiponektino, BNP ir uždegimo priklausomybė esant širdies nepakankamumui buvo aptarta ir kitų autorių darbuose (Bobbert, Scheibenbogen et al. 2011; Lindberg, Jensen et al. 2014).

5.2. Molekuliniai mechanizmai, dominuojantys esant uždegiminei dKMP

Miokarditas yra pagrindinė jauno amžiaus pacientų širdies nepakankamumo priežastis (Maron ir Pelliccia 2006). Kai imuninei sistemai nepavyksta laiku pašalinti infekcijos, prasideda lėtinė miokardo destrukcija ir apie 20 proc. miokarditu sergančių žmonių išsivysto lėtinė širdies liga, kuri skatina vystytis uždegiminę dKMP, o tuomet tik

pusė pacientų išgyvena ilgiau nei penkerius metus (Grogan, Redfield et al. 1995; Schonberger ir Seidman 2001). Ši sunki prognozė spartina detalius molekulinį mechanizmą, kurie sukelia uždegimą ir dėl to besivystančią uždegiminę dKMP bei širdies nepakankamumą, tyrimus.

dKMP vystymasis yra nepaprastai sudėtingas procesas, kurį sukelia neurohormonų ir prouždegiminių citokinų aktyvinimas. Pastebėta, kad uždegimo mediatoriai atlieka ypač svarbų vaidmenį vystantis dKMP, kuri vėliau progresuoja į širdies nepakankamumą. Buvo nustatyta, kad prouždegiminiai citokinai, tokie kaip TNF- α , IL-6 ir IL-1 β , gali sinergiškai veikti matricinės RNR (mRNR) ir baltymų lygmenyse ir sukelti širdies susitraukimo ydas (Yamagishi, Inagaki et al. 2004; Carty, Heagerty et al. 2009). Kita vertus, IL-6, dar vadinamas miokinu, aktyvina uždegimą slopinančių reakcijų seką (Wallenius, Wallenius et al. 2002; Febbraio, Rose-John et al. 2010). Ši dvejoją IL-6 poveikį paaiškina skirtinga IL-6 veikimo trukmė: trumpas ir ūmus IL-6 kiekio padidėjimas turi teigiamą efektą, o lėtinė perteklinė IL-6 gamyba skatina audinio perėjimą į patologinę būklę (Dovio ir Angeli 2001). Tyrimo duomenimis, uždegiminės dKMP serumuose IL-6 kiekis labai padidėjo (3,23 karto, $p < 0,05$), šiek tiek mažiau – TNF- α kiekis (1.76 karto) ir labai menkai – IL-1 β (0,88 karto). Kadangi uždegiminė dKMP progresuoja lėtiniu būdu, perteklinė IL-6 gamyba tirtuose serumuose greičiau pati sukėlė uždegiminę dKMP negu buvo dKMP pasekmė. Be to, labai padidėjęs IL-6 lygis serume ir jo koreliacija su miokardo CD3⁺ teigiamais T-limfocitais leidžia teigti, kad T-limfocitai prisideda prie uždegiminės dKMP apoptozės, o nedidelis infiltruotų makrofagų padaugėjimas patvirtina, kad nesivysto nekrozė. Mažą prointerleukino-1 beta (IL-1 β) aktyvaciją tirtuose serumuose gali paaiškinti mažas miokardo uždegimo intensyvumas ir kaspazės aktyvacijos nebuvimas, o tai rodo, kad nėra piroptozinės kardiomiocitų žūties (Cookson ir Brennan 2001).

Neseniai buvo nustatyta stipri ir tiesioginė IL-6 įtaka mitochondrijų veiklai: IL-6 slopina adipocitų mitochondrijų membranos potencialą, ATF gamybą ir padidėjusį viduląstelių reaktyviųjų deguonies formų (RDF) lygį (Ji, Chen et al. 2011; White, Dawson et al. 2013). Išskiriamas bendrasis uždegiminis žymuo CRB, kaip ir IL-6, koreliuoja su prasta KMP prognoze, širdies nepakankamumu ir mitochondrinio miocitų apoptoziniu keliu (Kaneko, Kanda et al. 1999; Yin, Chen et al. 2004; Yang, Wang et al. 2008). Šio tyrimo duomenys parodė, kad IL-6 ir CRB kiekiai uždegimui teigiamuose

dKMP serumuose buvo ne tik reikšmingai padidėję, bet ir stipriai koreliavo su vidinio apoptozinio kelio biožymenimis Hsp60 ir Bax. Tai leidžia manyti, kad vidinio apoptozinio kelio aktyvinami baltymai miokarde jautriau reaguoja į uždegimą nei išorinio apoptozinio kelio. Žemas Fas receptorių, Fas ligando ir kaspazės-8 padidėjimo lygis taip pat patvirtina, kad išorinis apoptozinis kelias yra mažiau svarbus uždegiminės dKMP vystymuisi.

Dauguma signalinių kelių, tame tarpe ir apoptoziniai, gali sąveikauti tarpusavyje ir pastūmėti miokardą link galutinės degradacijos. Buvo nustatyta, kad išorinio apoptozinio kelio aktyvinanti prokaspazė-8 skelia tik BH3 domeną turintį baltymą Bid, kuris, savo ruožtu, aktyvina Bax, o šis integruojasi į mitochondrijų membranas, padidina jos pralaidumą ir citochromo *c* išsiskyrimą (Chou, Li et al. 1999; Roucou, Montessuit et al. 2002). Kaip ir ankstesniuose tyrimuose, šio tyrimo duomenys parodė, kad, vystantis uždegiminei dKMP, atsiranda stipri koreliacija tarp serumo kaspazės-8 ir Bax. Tai leidžia teigti, kad Bax yra vienas iš svarbiausių vidinio ir išorinio apoptozinių kelių sankirtos taškų. Kad ir kaip būtų, apie 30 kartų didesnis pradinis kaspazės-9 lygis negu kaspazės-8 uždegiminės dKMP biopatuose leidžia manyti, kad vidinis apoptozinis kelias yra svarbesnis uždegiminės dKMP vystymesi. Kitų autorių atlikti tyrimai taip pat patvirtino, kad išorinis apoptozinis kelias mažai įtakoja kardiomiocitų žūtį (Wollert, Heineke et al. 2000).

Kartu su vidiniu apoptoziniu keliu buvo nustatyta, kad MMP-9 taip pat jautriai reaguoja į uždegimą ir dalyvavimą kardiomiopatijos patogenezėje (Fares, Gomes Jde et al. 2013). MMP-9 aktyvacijos intensyvumas rodo širdies pažeidimų sunkumo lygį: ankstyvas ir intensyvus MMP-9 aktyvinimas yra susijęs su stipresniais širdies sutrikimais. Šiame darbe atlikti abiejų dKMP sergančių pacientų grupių (su uždegimu ir be) tyrimų rezultatai parodė, kad MMP-9/TIMP-1 santykis buvo šiek tiek padidėjęs biopatuose (nuo 0,25 iki 0,35) ir serumuose (nuo 0,23 iki 0,25) uždegiminėje grupėje. Nors MMP-9/TIMP-1 santykio padidėjimas uždegiminės dKMP biopatuose buvo labai mažas ir ne visai reikšmingas, MMP-9/TIMP-1 reikšmingai koreliavo su abiejų apoptozinių kelių žymenimis (Bcl-2, Fas receptoriumi ir Fas ligandu) (9 lentelė). Šie duomenys rodo, kad MMP9 gali dalyvauti tiesioginiame vidinio ir išorinio apoptozinių kelių aktyvinime. Papildomos MMP-9, kaspazės-9 ir kaspazės-8 koreliacijos tirtuose serumuose patvirtino šį teiginį.

Kartu su apoptoze mes tyrėme ir nekrozinį miokardo ląstelių žūties būdą. Nustatėme, kad nekrozė, kaip pasyvus ir nuo ATF priklausomas procesas, yra labiau būdingas ūminiam ir visuotiniam kardiomiocitų pažeidimui negu lėtiniam procesams (Freude, Masters et al. 2000). Kita ląstelių žūties rūšis, reguliuojama nekrozė (taip pat žinoma kaip nuo kaspazės priklausoma žūtis, arba nekroptozė), būna nuslopinta aktyvios prokaspazės-8. Kadangi mūsų tirtuose pavydžiuose stebimas prokaspazės-8 aktyvinimas, nekroptozės nėra stebima. Panašūs rezultatai buvo gauti ir kitų autorių darbuose (Kaiser, Upton et al. 2011). Kadangi histologinė mėginių analizė neparodė miokardo nekrozės ir fibrozės, sarkomerinio baltymo DjTnT išskyrimas serume buvo susietas su sumažėjusiu miokardo susitraukimu. Visgi prie miofilamentų degradacijos ir neatitaisomų miokardo pažeidimų galėjo prisidėti užsitęsęs DjTnT išsiskyrimas iš miokardo. Koreliacinė analizė parodė, kad DjTnT išsiskyrimas yra susijęs su kaspazių aktyvinimu, nes išskirtas į serumą DjTnT uždegiminės dKMP bioptatuose stipriai koreliavo su apoptozės kaskada: kaspaze-8, Bax ir kaspaze-3.

5.3. Kiekybinis miokardo fibrozės vertinimas pasitelkiant skaitmeninę vaizdo analizę ir interaktyviąją stereologiją

Iki šių dienų vizualus patologo vertinimas yra plačiai suvokiamas kaip visuotinė tiesa ir jis vis dar yra naudojamas kaip pirminis histomorfometrinių vertinimų metodas, nors jau yra prieinami skaitmeniniai metodai. Daugybė bandymų įtraukti skaitmeninius metodus į klinikinę praktiką susidūrė su ta pačia teisingos validacijos problema – skaitmeninė analizė dažniausiai yra lyginama su pusiau kiekybiniu vizualiu vertinimu, o lyginimui su kriterijaus standartu reikia daug laiko atimančių procedūrų.

Vieno ankstesniųjų Vasiljevičiaus ir kitų autorių tyrimų (Vasiljevic, Popovic et al. 2001), pagrįstų žmonių endomiokardo biopsijomis, rezultatai buvo lyginami su pusiau kiekybiniu vertinimu, pažeidimų skaičiavimu (naudojant tinklę) ir kompiuteriu atliekamais metodais. Šis tyrimas buvo pirmasis, kuris atskleidė stiprią skirtingų širdies fibrozės vertinimo metodų koreliaciją, tačiau dėl didelio paties tyrėjo indėlio į kompiuterinę analizę šis tyrimas buvo laikomas šiek tiek subjektyviu, ypač dėl to, kad stereologijos taškų skaičiavimo metodika nebuvo naudojama kaip RVS. Hadi ir kiti autoriai (Hadi, Mouchaers et al. 2011) kiekybiškai įvertino širdies fibrozę pasitelkę *ImageJ* programinę įrangą ir tradicinę poliarizacijos mikroskopijos būdą. Po vertinimo

rezultatai buvo validuojami kaip kriterijų standartai naudojant stereologijos duomenis. Kiek mums žinoma, tai yra vienintelis širdies fibrozės tyrimas, kuriame panaudotos stereologinės procedūros RVS gauti. Visgi validacija buvo atlikta labiau žiurkių, o ne žmonių širdies audinio mėginiais (analizės duomenys buvo patikrinti naudojant audinio mėginius, gautus po 78-erių metų žmogaus skrodimo).

Šiame tyrime vertinant žmogaus širdies fibrozės laipsnį buvo išbandyti keli metodai, kurie galėtų būti lengvai pritaikyti šių dienų klinikinėje praktikoje. Stereologijos metodas buvo testuojamas kaip labiausiai nepriklausomas ir objektyvus RVS, o šiek tiek pakeista Bland–Altman statistinė analizė – kaip statistinis įrankis, skirtas testuoto metodo ir RVS suderinamumui pamatuoti.

Pradiniai duomenys buvo palankesni kolokalizacijos programinei įrangai: ji demonstravo, artimiausią fibrozės vidurkio reikšmę etalonui, lyginat su RVS, o 0,50 % skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas. Šiaip ar taip, kolokalizacijos įranga pasižymėjo akivaizdžiai mažesniu diapazonu – 20 % mažesniu nei RVS ir patologo diapazonas ir 15 % mažesniu nei *Genie* įrangos. Šis trūkumas galbūt neturi didelės reikšmės klinicinei praktikai, nes diapazono ribotumas buvo pastebimas tik aukštesniame intervale, o miokardo fibrozė retai pasiekia tokias dideles reikšmes. Mažesnių reikšmių rezultatai buvo priimtini. Tolesnė analizė atskleidė *Genie* programinės įrangos pranašumus: aukštesnę koreliaciją su RVS, geresnes paprastosios linijinės regresijos reikšmes, palyginti su etalonu, ir svarbiausia – vienodesnius Bland–Altman analizės rezultatus. Kolokalizacijos programinė įranga rezultatus apskaičiavo su teigiama paklaida apatinėje skalės dalyje ir su neigiama paklaida viršutinėje skalės dalyje, o *Genie* programinė įranga – su nedidele neigiama vertinimo paklaida skalės viduryje, tačiau šie rezultatai vis tiek pralenkė patologo vertinimo vidurkį. Nustebinti galėtų tai, kad abiejų skaitmeninių algoritmų rezultatai buvo šiek tiek skirtingi. Nors abu algoritmai matuoja tą pačią ypatybę, t. y. miokardo jungiamojo audinio proporcijas, jų procesai yra pagrįsti kitokiais principais ir todėl gali atsirasti matavimo klaidų. Kolokalizacijos metodas klasifikuoja kiekvieną pikselį pagal jo spalvinius bruožus, *Genie* įranga paremta daug sudėtingesnio veikimo modelio atpažinimo sistema, kuri taip pat apima erdvinius nuotraukos aspektus. Turbūt vienintelis iš *Genie* įrangos trūkumų buvo 1,61 % RVS neigiama vertinimo paklaida. Apskritai *Genie* klasifikatorius buvo

geriausias šiame tyrime. Jis buvo arčiausiai RVS, beveik tobulai koreliavo, turėjo adekvatų diapazoną ir tolygius rezultatus visose skalės vietose.

Galimi *Genie* įrangos trūkumai atsiranda todėl, kad sistemą reikia „išmokyti“ atpažinti skirtingas struktūras. Tai atimtų daug laiko ir būtų paremta „mokytoju“ būdingu subjektyvumu. Dėl šios priežasties *Genie* įranga jautriai reaguoja į tarplaboratorines atkuriamumo problemas. Visgi ši įranga, pritaikyta klinikiniam poreikiams, veiktų visiškai automatiškai ir dėl to būtų taip pat efektyvi laiko atžvilgiu, kaip ir kolokalizacijos programinė įranga. *Genie* įranga taip pat leidžia reguliuoti algoritmą, todėl jos techninė priežiūra tampa lankstesnė. Nors širdies fibrozės matavimuose iš klinikinės perspektyvos 2 % paklaida galėtų būti priimtina, šį algoritmą reikėtų geriau pritaikyti prie potencialių skaidrių kokybės variacijų.

Buvo įrodyta, jog kolokalizacijos įranga taip pat yra visiškai priimtinas širdies fibrozės matavimo metodas. Klinikinėje praktikoje ši įranga taip pat pridėtų tikslumo ir patikimumo, panašiai kaip ir *Genie* įrankis, nes širdies fibrozės reikšmės retai pasiekia daugiau nei 40 %, ir šiek tiek per didelės vertės paskaičiavimas apatinėje skalėje būtų priimtinas. Kolokalizacijos sistema yra ne tokia sudėtinga, ja paprasčiau naudotis ir ją kalibruoti, be to, ir pigiau kainuoja. Ji taip pat gali veikti visiškai automatiškai: atlikti operacijas nuo nuotraukų skenavimo iki galutinių rezultatų per trumpą laiką. Kolokalizacijos algoritmas bet kuriuo proceso momentu yra mažiau priklausomas nuo tyrėjo indėlio (išskyrus pradinis spalvų dekonvoliucijos nustatymus) ir dėl to juo lengviau naudotis.

5.4. Santrauka

Apibendrinami šiame tyrime pateiktus duomenis galime teigti, kad miokardito ir dKMP gydymo strategijos turėtų būti atrandamos analizuojant ūmines, poūmines ir lėtines ligų fazes. Daugiausia šiuolaikinių tyrimų yra sutelkta į ūmius miokardo pažeidimus. Nors lėtiniai miokardo pažeidimai turi mažiau simptomų, bet jų tyrimas ir gydymas yra sudėtingesnis. Šiame darbe tyrinėjome molekulinis mechanizmus, kurie dominuoja: lėtinės virusinės dKMP raidoje dėl ilgo viruso išsilaikymo išsiplėtusioje širdyje ir neaiškios kilmės lėtinės uždegiminės dKMP. Neaiškios kilmės uždegiminės dKMP priežastys gali būti labai įvairios, tokios kaip infekcinės, toksinės arba autoimuninės. Žinoma, idealiausia dKMP gydymo pradžia būtų širdies pažeidimus

sukeliančių priežasčių pašalinimas, tačiau tai dažnai yra sunkiai įgyvendinama užduotis. Svarbiausia šiame darbe tai, kad abi tyrinėtos lėtinės dKMP rūšys atskleidė skirtingus molekulinis mechanizmus, kurie nurodė daugiau dKMP gydymo būdų ir jų derinių.

Kad ir kaip būtų, pacientai, sergantys lėtine dKMP, dažniausiai gydomi pagal bendras rekomendacijas nepaisant ligos etiologijos. Mūsų tyrimo duomenys parodė, kad įprastus vaistus, skirtus lėtinei dKMP ir širdies nepakankamumui gydyti, tokius kaip β -blokatoriai, angiotenziną konvertuojančio fermento (AKF) inhibitoriai, angiotenzino receptorių blokatoriai ir kt., būtų galima derinti su kitais medikamentais, pavyzdžiui, reguliuojančiais I tipo kolageno metabolizmą (jei sergama lėtine virusine dKMP) ir mažinančiais apoptozę (jei sergama idiopatine lėtine uždegimine dKMP). Artimiausioje ateityje medikamentinis įvairių lėtinių dKMP gydymo būdas turėtų būti kreipiamas į progresuojančios dKMP molekulinį mechanizmų tyrimus ir jų galimą reguliavimą. Technologinė ir mokslinė pažanga leidžia pagerinti dKMP reguliuojančių procesų, tokių kaip fibrozė tyrimų kokybę. Nuoširdžiai tikimės, kad mūsų tyrimai padės ne tik geriau suprasti molekulinis lėtinės dKMP progresavimo mechanizmus, bet ir atrasti naujus gydymo būdus.

6. IŠVADOS

1. Lėtinė virusinė dKMP nesukėlė uždegimo, fibrozės ir kardiomiocitų žūties. Esant virusui teigiamai dKMP, vyravo molekuliniai mechanizmai, reguliuojantys miokardo susitraukimą, ypač dėl pasikeitusios I tipo kolageno apykaitos.
2. I tipo kolageno veiklos sutrikimui virusui teigiamuose dKMP bioptatuose įtakos turėjo sumažėjęs TGF- β 1 lygis (3,55 karto) ir aktyvios MMP-1 ir MMP-2 (2,19 ir 2,43 karto). Sumažėję galektino-3, adiponektino ir BNP lygiai serume (1,16; 1,88 ir 1,97 karto) netiesiogiai mažino I tipo kolageno apykaitą ir silpnino bendrą miokardo atsparumą virusui.
3. Uždegiminiame miokarde, palyginus su neuždegiminiu, buvo pastebėtas didžiausias infiltruotų T limfocitų ($14,6$ ląstelių/ mm^2) skaičius, kuris reikšmingai koreliavo su 3,50 karto padidėjusia uždegiminių citokinų sekrecija, ypač IL-6.
4. Lėtinis miokardo uždegimas stipriai didino kaspazių 9, -8, ir -3 (6,24; 3,10; 3,62 karto, ($p < 0,05$)) išsiskyrimą į serumą. Reikšmingas Hsp60 lygio serume (8,97 karto) padidėjimas rodo mitochondrijų funkcijos sutrikimus ir tai, kad uždegiminės dKMP atveju svarbesnis yra vidinis apoptozinis kelias.
5. Išorinis apoptozinis kelias (FasR, FasL ir kaspazė-8) yra papildomas, tačiau ne pagrindinis progresuojant uždegiminei dKMP. Proapoptozinis Bax yra svarbus vidinio ir išorinio apoptozinių kelių susikirtimo taškas.
6. Lėtinio miokardo uždegimo metu nedidelis MMP-9/TIMP-1 santykio padidėjimas tiek bioptatuose (nuo 0,19 iki 0,48, $p < 0,05$), tiek serume (nuo 0,23 iki 0,25) bei du kartus padidėjusi DjTnT koncentracija serume susilpnino fibrozės procesus.
7. *Genie* algoritmas yra labiau tinkamas fibrozės procesų įvertinimui. Šiuo metodu įvertinta fibrozė turi mažesnes skaitines reikšmes, tačiau jos yra priimtinos vertinant fibrozės laipsnį miokardo bioptatuose tiek klinikinėms, tiek mokslinių tyrimų reikmėms.

7. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

7.1. Publikacijos

1. Daunoravičius D, Grabauskienė V, Bogomolovas J, Jablonskienė V, Vitkus D. Galectin-3: a novel marker of fibrosis and heart failure. *Laboratorinė medicina*. 2011; 4 (52): 205–211.
2. Daunoravičius D, Grabauskienė V, Jasulaitis A. Inflammatory dilated cardiomyopathy: new perspective in diagnostics and treatment. *Medicinos teorija ir praktika* 2012; 3: 39–44.
3. Daunoravičius D, Jasulaitis A, Grabauskienė V. Inflammatory dilated cardiomyopathy: the use of new diagnostic tools for diagnosis of disease sub-entities and for aetiology directed treatment. *Proceedings of International Conference Biomedical Engineering* 2012, p. 87–90.
4. Daunoravičius D, Laurinavičius A, Žurauskas E, Laurinavičienė A, Grabauskienė V. Quantitative evaluation of cardiac fibrosis by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Proceedings of International Conference Biomedical Engineering* 2012, p. 91–95.
5. Daunoravičius D, Jasulaitis A, Jablonskienė V, Grabauskienė V. Matrix metalloprotrinasas in the pathogenesis of viral heart disease. *Laboratorinė medicina* 2012; 4 (56): 224–228.
6. Daunoravičius D, Besusparis J, Žurauskas E, Laurinavičienė A, Bironaitė D, Pankuweit S, Plancoulaine B, Herlin P, Bogomolovas J, Grabauskienė V, Laurinavičius A. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology. *Diagnostic Pathology* 2014; 9: 114.
7. Bogomolovas J, Brohm K, Čelutkienė J, Balčiūnaitė G, Bironaitė D, Bukelskienė V, Daunoravičius D, Witt C, Fielitz J, Grabauskienė V, Labeit S. Induction of Ankrd1 in dilated cardiomyopathy correlates with the heart failure progression. *BioMed Research International* 2014.

7.2. Pranešimai

1. Daunoravičius D, Grabauskienė V. The diagnostics and etiopathogenetic treatment possibilities for inflammatory cardiomyopathy – first experience in Lithuania. 5th National Scientific Conference „Science for the human health”, Kaunas, Lithuania. 2011 April 7, 2011.
2. Daunoravicius D, Jakubauskas A, Griskevicius L, Cibiras S, Zurauskas E, Maneikiene V, Celutkiene J, Rucinskas K, Jasulaitis A, Grabauskiene V. Inflammatory cardiomyopathy: aetiopathogenetic markers for diagnosis of disease subentities and for aetiology directed treatment. Heart failure 2012 Congress, Bergrade, Serbia. May 19–22, 2012.
3. Daunoravičius D, Grabauskienė V. Dilated cardiomyopathy: evolution of aetiopathogenetic diagnosis and new possibilities of treatment. International Conference „Evolutionary Medicine: New Solutions for the Old Problems", Vilnius, Lithuania. June 12–15, 2012.
4. Daunoravicius D, Besusparis J, Zurauskas E, Laurinaviciene A, Bironaite D, Grabauskiene V, Laurinavicius A. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis methods and pathologist visual scoring versus digital stereology. Heart failure 2014 Congress, Athens, Greece. May 17–20, 2014.
5. Bironaite D, Daunoravicius D, Bogomolovas J, Jakubauskas A, Vitkus D, Zurauskas E, Zasytyte I, Rucinskas K, Brunk U, Venalis A, Grabauskiene V. The role of collagen in virus-positive dilated cardiomyopathy. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2014, Melbourne, Australia. May 4–7, 2014. Supplement to Global Heart, Vol 9, Issue 1C, 2014, PM051, e71. doi:10.1016/j.gheart.2014.03.1461
6. Bironaite D, Daunoravicius D, Bogomolovas J, Jakubauskas A, Vitkus D, Zurauskas E, Zasytyte I, Rucinskas K, Brunk U, Venalis A, Grybauskiene V. Apoptotic markers in diagnosing inflammatory dilated cardiomyopathy. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2014, Melbourne, Australia. May 4–7, 2014. Supplement to Global Heart, Vol 9, Issue 1C, 2014, PM050, e71 doi:10.1016/j.gheart.2014.03.1460
7. Bironaite D, Daunoravicius D, Bogomolovas J, Cibiras S, Vitkus D, Zurauskas E, Zasytyte I, Labeit S, Venalis A, Grabauskiene V. Mechanism of fibrosis in

inflammatory dilated cardiomyopathy. The 18th Annual Scientific Meeting of the HFSA, Las Vegas, Nevada. September 14–17, 2014. *Journal of Cardiac Failure* August 2014: Volume 20, Issue 8, Supplement, S81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2014.06.229>.

8. APIE AUTORIŲ

Dainius Daunoravičius

Gimimo data: 1980 m. kovo 1 d.

Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21, 03101 Vilnius, Lietuva

Tel.: +37068770076

El. Paštas: dainius.daunoravicius@mf.vu.lt

Išsilavinimas:

1995-1996 m. Vilniaus Licėjus

1996-1997 m. *Streator Township High school*, Ilinojus, JAV

1997-1999 m. Tarptautinio bakalaureato diplomą mokslų ir matematikos srityje, suteiktas Vilniaus Licėjuje

2000-2006 m. Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas

Darbo patirtis:

2007-2008 m. VšĮ Respublikinė Vilniaus universiteto ligoninė, Kraujagyslių chirurgijos skyrius

Nuo 2007 m. Vilniaus universiteto, Medicinos fakultetas

Nuo 2011 VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos

Nuo 2012 VšĮ Vilniaus miesto klinikinė ligoninė

2012-2014 Projektas „Molekulinių biožymenų tyrimas diagnozavimo ir į etiologiją nukreipto gydymo tikslais“ (MIP-086/2012), tyrėjas. Projektą parėmė Lietuvos mokslo taryba.

Stażuotės:

1. Manheimo universitetinė ligoninė, Integratyvos patofiziologijos skyrius, Manheimas, Vokietija. 2011 m. lapkričio 5 - gruodžio 3 d.
2. Tarptautinis uždegiminių širdies sutrikimų simpoziumas, Marburgo universitetinė ligoninė, Marburgas, Vokietija. 2012 m. rugsėjo 20-21 d.
3. *EtiCS* projekto dalyvių susitikimas, Vurzburgas, Vokietija. 2012 m. lapkričio 16-17 d.

Apdovanojimai:

1. Pirma vieta už geriausią pranešimą 5-ojoje nacionalinėje mokslo konferencijoje *Science for the Human Health*, Kaunas, Lietuva. 2011 m. balandžio 7 d.
2. Lietuvos mokslų tarybos stipendija už akademinis pasiekimus. 2012-2013 m.
3. Padėkos raštas tarptautinėje konferencijoje *Evolutionary Medicine: New Solutions for the Old Problems*, Vilnius, Lietuva. 2012 m. birželio 12-15d.
4. HFA jaunųjų tyrėjų stipendija *Heart Failure 2012* kongrese, Belgrade, Serbijoje. 2012 m., gegužės 19-22 d.

9. TYRIMO FINANSAVIMAS

Šį tyrimą finansavo (Nr. MIP-086/2012) Lietuvos mokslo taryba.

10. KONFIDENCIALIOS INFORMACIJOS ATSKLEIDIMAS

Nėra jokio interesų konflikto.

11. PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo mokslinio darbo vadovei prof. Virginijai Grabauskienei bei visiems, kurie prisidėjo prie šio tyrimo: Justinui Besuspariui, dr. Juliiui Bogomolovui, dr. Jelenai Čelutkienei, dr. Sigitui Čibirui, prof. dr. Paulette Herlin, dr. Artūriui Jakubauskui, doc. dr. Algimantui Jasulaičiui, Kęstučiui Mikalajūnui, doc. dr. Aidai Laurinavičienei, prof. dr. Arvydui Laurinavičiui, prof. dr. Sabine Pankuweit, dr. Benoit Plancoulaine, dr. Kęstučiui Ručinskui, Beatričei Valatkaitei, doc. dr. Daliui Vitkui, Ievai Zasytytei, doc. dr. Edvardui Žurauskui.

Su didele pagarba tariau ačiū dr. Daivai Bironaitei už galias įžvalgas, dalinamą patirtį ir nuolatinę pagalbą.

TABLE OF CONTENTS

1. ABBREVIATION LIST	86
2. INTRODUCTION	89
2.1. Background	89
2.2. Hypothesis	93
2.3. Aims	93
2.4. Objectives	93
2.5. The novelty and significance	93
2.6. Cooperation	94
3. MATERIALS AND METHODS	96
3.1. Secreted and intramyocardial biomarkers in DCM	96
3.1.1. Inclusion and Exclusion Criteria	96
3.1.2. Basic medical examinations	96
3.1.3. Cardiac catheterization and endomyocardial biopsy	97
3.1.4. Collection and preparation of blood samples	98
3.1.5. Detection of viral genome on endomyocardial biopsy	98
3.1.6. ELISA assays	100
3.1.7. Additional biochemical measurements	100
3.1.8. Histology and immunohistochemistry of endomyocardial biopsies	101
3.1.9. Evaluation of histochemical and immunohistochemical stainings in endomyocardial biopsies	102
3.2. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology	105
3.2.1. Experimental model	105
3.2.2. Colocalization algorithm	105
3.2.3. Genie algorithm	106
3.2.4. Stereology	107
3.2.5. Pathologist's visual scoring	109
3.3. Statistical analyses	110

3.3.1. Analysis of DCM data	110
3.3.2. Analysis of fibrosis quantification data	110
3.4. Ethical approval	110
4. RESULTS	111
4.1. Virus-positive DCM patient study group	111
4.1.1. Identification of viral genome in endomyocardial biopsy	111
4.1.2. Basic clinical parameters	111
4.1.3. Estimation of inflammation and cardiomyocyte death in virus-positive and virus-negative DCM samples	113
4.1.4. Impact of virus on contraction proteins in myocardial tissue	116
4.1.5. Changes of released contraction-regulating proteins in virus-positive serums	120
4.1.6. Other mechanisms regulating progression of viral DCM	122
4.2. Inflammation-positive DCM patient study group	125
4.2.1. Detection of inflammatory infiltrate in endomyocardial biopsy	125
4.2.2. Basic clinical parameters	125
4.2.3. Inflammatory markers in dilated cardiomyopathy	127
4.2.4. Changes of apoptotic biomarkers in inflammatory DCM samples	129
4.2.5. Induction of necrosis in inflammatory DCM samples	133
4.2.6. The interaction between apoptotic pathways supporting progression of inflammatory DCM	134
4.2.7. The expression of apoptotic biomarkers in myocardial tissue	137
4.3. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology	139
5. DISCUSSION	145
5.1. Molecular mechanisms of virus-induced DCM	145
5.2. Molecular mechanisms dominating in inflammatory DCM	148
5.3. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology	150
5.4. Summary	152

6.	CONCLUSIONS	154
7.	LIST OF PUBLICATIONS ON THE TOPIC OF THE DISSERTATION	155
7.1.	Publications	155
7.2.	Oral presentations	156
8.	ABOUT THE AUTHOR	158
9.	FUNDING	159
10.	DISCLOSURE	159
11.	ACKNOWLEDGEMENTS	159

1. ABBREVIATION LIST

Activated partial thromboplastin time (aPTT)

Active memory T-lymphocytes (CD45Ro⁺)

Adenosine triphosphate (ATP)

Adenovirus (ADV)

Adiponectin (APN)

American Heart Association (AHA)

Apoptosis protease-activating factor (APAF)

Aspartate aminotransferase (AST)

Atrial fibrillation (AF)

Bovine serum albumin (BSA)

Brain natriuretic protein (BNP)

Cardiac index (CI)

Cardiac resynchronization therapy (CRT)

Collagen I 1- α chain (COL1A1)

Collagen I C-terminal telopeptide (CITP)

Collagen type I (Col I)

Collagen type III (Col III)

Coronary artery disease (CAD)

Creatine kinase MB (CK-MB)

Cytomegalovirus (CMV)

Death-inducing signaling complex (DISC)

Dilated cardiomyopathy (DCM)

Endomyocardial biopsy (EMB)

Enterovirus (EV)

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Epstein-Barr virus (EBV)

European Society of Cardiology (ESC)

Extracellular matrix (ECM)

Fas ligand (FasL)

Fas-associated death domain (FADD)

Fatty acid synthetase (Fas)
Haematoxylin and Eosin (H&E)
Heart failure (HF)
Heat shock protein-60 (HSP60)
Hemoglobin A1c (HbA1c)
Hepatitis C virus (HCV)
High sensitivity C-reactive protein (hsCRP)
High-density lipoprotein (HDL)
High-sensitivity troponin T (hsTnT)
Human herpesvirus type 6 (HHV-6)
Human immunodeficiency virus (HIV)
Human leukocyte antigen (HLA)
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)
Implantable cardiac defibrillator (ICD)
Inducible nitric oxide synthase (iNOS)
Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs)
Interleukin-1 (IL-1)
Interleukin-6 (IL-6)
Left ventricle (LV)
Left ventricular ejection fraction (LVEF)
Left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD)
Left ventricular end-diastolic diameter index (LVEDDI)
Low-density lipoprotein (LDL)
Macrophages (CD68⁺)
Matrix metalloproteinase (MMP)
Matrix metalloproteinase-1 (MMP1)
Matrix metalloproteinase-13 (MMP13)
Matrix metalloproteinase-2 (MMP2)
Matrix metalloproteinase-9 (MMP9)
Messenger RNA (mRNA)
Mitochondrial outer membrane permeability (MoMP)
Natural killer cells (NK)

New York Heart Association (NYHA)
Parvovirus B19 (PVB19)
Platelet cells (PT)
Polymerase chain reaction (PCR)
Procollagen I C-terminal propeptide (PICP)
Procollagen I N-terminal propeptide (PINP)
Procollagen III C-terminal propeptide (PIIICP)
Procollagen III N-terminal propeptide (PIIINP)
Pro-interleukin-1 beta (IL-1 β)
Prothrombin time (PT)
Pulmonary artery (PA)
Pulmonary artery pressure (PAP)
Pulmonary capillary wedge pressure (PCWP)
Pulmonary hypertension (PH)
Pulmonary vascular resistance (PVR)
Reactive oxygen species (ROS)
Receptor-interacting protein (RIP)
Red blood cells (RBC)
Regions of interest (ROI)
Relative light units (RLU)
Restrictive cardiomyopathy (RCM)
Right atrial pressure (RAP)
Right ventricular cardiomyopathy (RVCM)
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1)
T-lymphocytes (CD3⁺)
TNF receptor-associated death domain (TRADD)
Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)
Tumor necrosis factor (TNF)
Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)
Unclassified cardiomyopathy (UCM)
Varicella-zoster virus (VZV)
White blood cells (WBC)

2. INTRODUCTION

2.1. Background

Cardiomyopathies constitute a group of myocardial disorders in which the structural and functional abnormality of the heart muscle is the dominant feature (in the absence of coronary artery disease, hypertension, valvular disease and congenital heart disease sufficient to cause the observed myocardial abnormality). Cardiomyopathies are classified into five morphological and functional phenotypes with distinct hemodynamic properties that can be caused by genetic and non-genetic mechanisms: dilated (DCM), hypertrophic (HCM), restrictive (RCM), arrhythmogenic right ventricular (ARVC) and unclassified cardiomyopathies (UCM) (Elliott, Andersson et al. 2008). Dilated cardiomyopathy, mainly characterized by left ventricular chamber enlargement and impaired myocardial contractility, is the most common form of cardiomyopathy in both adults and children and currently is the most frequent indication for heart transplantation (Magnani and Dec 2006; Maron, Towbin et al. 2006; Pankuweit, Ruppert et al. 2013). The management of patients with non-ischemic DCM can be extremely challenging with a disease course, difficult to predict. DCM occurs more frequently in men than in women, and is most common between the ages of 20 and 60 years (Robbins, Kumar et al. 2010). The history and clinical features are often nonspecific. Clinical manifestation of inflammatory cardiomyopathy varies, with a broad spectrum of symptoms ranging from asymptomatic courses over presentations with signs of myocardial infarction to devastating illness with cardiogenic shock. Symptoms usually develop gradually, and some patients are asymptomatic despite left ventricular dilatation for months or even years. The most striking symptoms of DCM are those of left ventricular systolic failure, but right-sided heart failure may also occur and is associated with a particularly poor prognosis (Towbin and Bowles 2002; Yoshikawa, Baba et al. 2009). The diagnosis of inflammatory DCM cannot be established without endomyocardial biopsy. Practical and specific serological markers are not available during the acute phase of the disease.

The recent progress in study on etiology of DCM has shown that viral infection, genetic abnormalities and autoimmune mechanisms are the major causes (Fildes, Shaw et al. 2009; Yajima and Knowlton 2009; Watkins, Ashrafian et al. 2011). Starting from the early 1950s at least three distinct mechanisms were identified to explain the

development of DCM. Currently the most accepted potential disease mechanism was developed in 1990s. It encompasses a slow, chronic, and continuous destruction of cardiac myocytes or impairment of myocyte function, which is considered as a direct, albeit delayed, consequence of the initial viral infection and/or a virus-initiated immunologic process. Although viral infection has been already identified as a main cause of DCM, the heart can be also the primary target for bacterial, protozoa or parasitic infection. Moreover, it could be involved in the “collateral damage” of infective organisms (by toxins, chemokines or cytokines) and cross-reactive antibodies. A causal involvement of myocardial inflammation and viral agents in the pathogenesis of DCM is supported by the findings of myocardial viral genome persistence in DCM patients (Kuhl, Pauschinger et al. 2005; Kuhl, Pauschinger et al. 2005; Mahrholdt, Wagner et al. 2006; Elliott, Andersson et al. 2008). The spectrum of the infectious agents that could be involved in the inflammatory cardiomyopathy varies with the geographic region, the patient’s age, application of different therapeutic procedures, and additional diseases. Infective agents show a remarkable organotropicity: viral infections, toxic and auto-reactive processes primarily affect the myocardium and the pericardium (Maisch, Richter et al. 2006).

The heart relies on a complex network of cells to maintain appropriate function. The contracting cells in the heart (cardiomyocytes) exist in a three-dimensional network of endothelial cells, vascular smooth muscle, and an abundance of fibroblasts as well as transient populations of immune cells. The connections of cardiomyocytes to the extracellular matrix (ECM) transduce the force and coordinate the overall contraction of the heart. The development of interstitial and perivascular fibrosis is a hallmark of pathology in the heart. Focal fibrosis composed primarily of collagen types I and III, occurs in the early stages of cardiomyopathy, but over time fibrosis increases and directly compromises the function of cardiomyocytes. The presence of collagen-rich regions in the myocardium cause disruption of excitation–contraction coupling between cardiomyocyte and increased stiffness of the myocardium, which leads to decreased contractility in the heart (Menon, Eidem et al. 2009). The different types of cell death, such as apoptosis, necrosis/oncosis, autophagy and proteasome degradation are contributing to the loss of cardiac myocytes depending on the intensity and origin of heart damage (Guerra, Leri et al. 1999; Predmore, Wang et al. 2010; Vigliano, Cabeza

Meckert et al. 2011). Given the complexity of the coordinated efforts of many proteins existing in multimeric complexes, and also complexity of inter-cellular signaling, dysfunction of heart occurs when these interactions are disrupted (Harvey and Leinwand 2011). Although the heart may functionally tolerate a variety of pathological insults, adaptive responses that aim to maintain function eventually fail resulting in a wide range of functional deficits or cardiomyopathy.

Myocardial inflammation has been identified as an important causal factor responsible for the progression to DCM (Kawai 1999; Feldman and McNamara 2000; D'Ambrosio, Patti et al. 2001; Mason 2003; Pauschinger, Noutsias et al. 2006; Cooper, Baughman et al. 2007). This includes autoimmune, viral or post-viral inflammation, mediated by the native and acquired immune response (cytotoxic T-lymphocytes, natural killer (NK) cells and macrophages) (Maisch, Bauer et al. 1993; Caforio, Goldman et al. 1996; Pankuweit, Portig et al. 1997). The damage of myocardium is carried out by a loco-regional effects of inflammatory mediators such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cytokines released by the infiltrated lymphocytes, macrophages and/or endothelial cells. The further heart damage is caused by direct interaction of the antibodies against the β - and other plasma membrane receptors, myolemma, mitochondrial and microsomal membrane or intra-organelle proteins (Schultheiss, Kuhl et al. 1988; Limas, Limas et al. 1990; Wallukat, Wollenberger et al. 1995; Pohlner, Portig et al. 1997). Finally, certain toxins (alcohol, anthracyclines, cocaine, etc.) might impair the membrane transport mechanisms or biochemical processes also induce the loss or dysfunction of the matrix proteins such as dystrophin, laminins, etc. Initial myocardial insults are difficult to identify, however, they very often lead to an autoimmune response and development of inflammatory DCM (Mason 2003). DCM is a consequence of persistent heart exposure to various stress signals, including pro-inflammatory, viral, oxidative, neuro-hormonal, and other micro- or macro-environmental factors subsequently leading to chronic heart failure (CHF) (Maisch, Noutsias et al. 2012). The understanding of CFH development has been changed from a simplistic disease to a multisystem disorder affecting immune, musculoskeletal, renal, and other systems.

The application of molecular-biological, histological and immunohistochemical diagnostic techniques has identified the sub-groups of specific diseases which may better

respond to certain therapies such as immuno-modulation, immuno-suppression or antiviral based on the underlying pathomechanisms (Frustaci, Chimenti et al. 2003; Kuhl, Pauschinger et al. 2003; Maisch, Hufnagel et al. 2004; Maisch, Richter et al. 2006; Frustaci, Russo et al. 2009). These new insights of the disease are mandatory allowing developing novel etiology-directed treatment strategies. Although significant progress has been achieved in the treatment of heart failure, as a result of cardiomyopathy, it is still a matter of fact that there are many patients with refractory heart failure that do not respond to available treatment. No doubt, that the best way to treat inflammatory DCM is to identify exactly and then eliminate the causes initiating heart injury. Since this is often a hard task, it is of high importance to understand the molecular mechanisms behind myocarditis progressing to inflammatory DCM. This breakthrough could facilitate the search of the better treatment for the injured myocardium. As a proof of it, recent studies have provided evidence of a positive clinical impact of immunosuppressive therapy in up to 90% of patients with negative cardiac PCR for the main cardiotropic viruses (Wojnicz, Nowalany-Kozielska et al. 2001; Maisch, Richter et al. 2006; Frustaci, Russo et al. 2009). Unfortunately, so far there are no unanimous agreements about the benefit of specific treatment in addition to conventional anti-heart failure therapy.

2.2.Hypothesis

Molecular mechanisms ongoing in chronic dilated cardiomyopathy can differ depending on the intensity and origin of toxic exposures. Digital evaluation of cardiac fibrosis is more accurate and can replace the pathologist evaluation.

2.3.Aims

The aim of this study was to establish molecular mechanisms dominating in virus-positive and idiopathic inflammatory dilated cardiomyopathy, and to develop and validate a tool for cardiac fibrosis quantification.

2.4.Objectives

1. To analyze virus-positive and virus-negative DCM biopsies and serums and investigate:
 - 1.1. Induction of inflammation, fibrosis and molecular mechanisms of intra-myocardial cell death.
 - 1.2. Molecular mechanisms regulating extracellular matrix and fibrosis.
2. To analyze biopsies and serums of inflammation-positive and inflammation-negative sub groups and to:
 - 2.1. Estimate the release of inflammatory cytokines and infiltration of inflammatory cells in myocardium.
 - 2.2. Investigate role of intrinsic apoptotic pathway in cardiomyocyte death.
 - 2.3. Explore role of extrinsic apoptotic pathway in cardiomyocyte death.
 - 2.4. Investigate molecular mechanisms regulating development of cardiac fibrosis and changes of extracellular matrix.
3. To evaluate the accuracy of digital image analysis (Genie and Colocalization) and the pathologist's visual scoring for the measurement of fibrosis in human myocardial biopsies.

2.5.The novelty and significance

Despite intensive search for therapeutic interventions, DCM remains the major cause of heart failure in the patients of relatively young age eventually leading to heart transplantation. Limited availability of donor hearts results in long waiting of transplantation. Many patients with end-stage of heart failure perish before a donor heart

becomes available.

The common proof of presence of the virus in the DCM myocardium is PCR analysis, whereas the inflammatory infiltrates in EMB supports the inflammatory origin of the disease. However, the data about the molecular mechanisms playing a key role in the pathogenesis of development of various origins of DCM are still missing. Therefore, the main goal of this study was to investigate in more details the molecular mechanisms in virus-positive and inflammatory-positive myocardiums. The identification of the processes dominating in DCM development and also the ability to regulate and control them is one of the main aims for clinicians. Additionally, the search of biomarkers for early identification of myocardial failure is not of less importance. Only the timely identification of secreted biomarkers being coincident with processes in the myocardium will allow us to improve diagnosis and proper treatment of heart preventing further destructive processes of DCM.

One more important objective of this study was to develop a tool to quantify the cardiac fibrosis and also to evaluate the immunohistochemical stainings of the EMB. As a matter of fact, so far the interpretation of histomorphometric parameters in most clinical routine analysis and research studies is still primarily based on human visual scoring, which is not only hugely subjective and involving a substantial workload on a pathologist, but also has many limitations inherent to the traditional pathology (such as significant intra- and inter-observer variation along with low efficiency). Consequently, since the evaluation of fibrosis was important for the interpretation of DCM molecular mechanisms, the digital algorithms for fibrosis estimation were validated against a criterion standard obtained by point counting used in interactive stereology.

2.6.Cooperation

This study was conducted in cooperation with the following science institutions:

1. Vilnius University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Vilnius, Lithuania.
2. State Research Institute, Center for Innovative Medicine, Dept. of Stem Cell Biology, Vilnius, Lithuania.
3. National Center of Pathology, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, Vilnius, Lithuania.

4. Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos; Hematology, Oncology and Transfusion Medicine Center, Vilnius, Lithuania.
5. Vilnius University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Vilnius, Lithuania.
6. Universitätsmedizin Mannheim, Department of Integrative Pathophysiology, Mannheim, Germany.
7. University of Heidelberg, Medical Faculty Mannheim, Mannheim, Germany.
8. University Hospital Gießen & Marburg, Department of Cardiology, Marburg, Germany.
9. University of Normandy, Path-Image/BioTiCla, Unicaen, Caen, France.
10. Hull York Medical School, Department of Cardiology, Castle Hill Hospital, Cottingham United Kingdom.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Secreted and intramyocardial biomarkers in DCM

3.1.1. Inclusion and Exclusion Criteria

Study subjects were 32 consecutive patients (25 males, 7 females, mean age 43.14 ± 11.86 years), admitted to a tertiary referral Centre with clinically suspected DCM and post-myocarditis cardiomyopathy during the time period of July, 2010 to February, 2013.

Inclusion criteria: 1) Newly-onset heart failure (HF) of two weeks' duration associated with a normal-sized or dilated left ventricle (LV) and hemodynamic compromise; 2) Newly-onset HF of two weeks' to three months' duration associated with a dilated LV and new ventricular arrhythmias, second- or third-degree heart block, or failure to respond to usual care within one to two weeks; 3) Echocardiographic or angiographic evidence of global or regional LV dysfunction and/or LV dilation and/or LV reduced systolic LV ejection fraction less than 45 %; 4) Angiographic exclusion of significant coronary artery disease, defined as evidence of a proximal stenosis of one or more main coronary arteries of 50 % or greater, in one or more main coronary arteries.

Exclusion criteria: 1) Known causes of heart failure, such as hypertension, significant coronary artery disease, valvular heart diseases, although not relative mitral regurgitation, endocrine disease, significant renal disease or drug or alcohol abuse; 2) Acute myocarditis and history of myocardial infarction; 3) Patients were excluded if they did not give written informed consent to EMB.

All patients above the age of 16 years (the oldest patient was 67 years old) who met the previously mentioned criteria were included in the study. There was no upper age limit for inclusion.

All patients were subjected to coronary angiography, right heart haemodynamic evaluation and endomyocardial biopsies. The same basic medical treatment scheme was applied to all patients.

3.1.2. Basic medical examinations

All patients were interviewed about their medical history and underwent a careful physical examination, as well as selected laboratory studies, including test of thyroid

function, serum electrolytes (sodium, potassium), high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), glucose, hemoglobin A1c (HbA1c), cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), cardiac enzymes: creatine kinase (CK), creatine kinase MB (CK-MB), aspartate aminotransferase (AST), high-sensitivity troponin T (hsTnT), urea, creatinine, uric acid, coagulation tests: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), blood count (hemoglobin, haematocrit, red blood cells (RBC), white blood cells (WBC) and platelet (PT) count.

On admission, each patient underwent anthropometrical and blood pressure measurement, as well as electrocardiography, echocardiography, MRI, Holter monitoring and spirometry. All laboratory measurements were done according to the routine clinical protocols.

3.1.3. Cardiac catheterization and endomyocardial biopsy

Before EMB, each patient underwent coronary angiography to exclude coronary artery disease as well as right heart catheterization to assess haemodynamic parameters: mean pulmonary artery (PA) pressure, pulmonary capillary wedge pressure (PCWP), pulmonary vascular resistance (PVR) and cardiac index (CI).

Right ventricular EMB was obtained using a flexible biptome via the right femoral vein (Cooper, Baughman et al. 2007). Biopsies were taken from the right inter-ventricular septum at three different levels (upper, medial and lower) from patients with confirmed absence of ischemia and cardiovascular pathology (stenosis and occlusion). Collected heart tissue biopsies were immediately inserted into clean cryovials, carefully labeled and registered. At least three EMBs from different septum levels were subjected to conventional histological and immunohistochemical evaluation, three EMBs to DNA and RNA extraction for the amplification of viral genomes and two EMBs were stored at -70°C in a biobank as retained biosamples and further processed for appropriate studies. Biopsy specimens were investigated within 24 hours.

Before measurements tissue samples were lysed in 100 μl of RIPA lysis buffer (Thermo Scientific Inc., USA), supplemented with protease and phosphatase mini inhibitor tablets, 1 mM PMSF, 1 mM Na_2VO_4 , 25 mM NaF according to the manufacturer's suggestion (Thermo Scientific Inc., USA). Biopsy samples were

sonicated at 10 mV for 2 x 5 s on ice using a Bandelin Sonopuls sonicator, kept 30 min on ice, centrifuged at 12,000g for 15 min, aliquated and stored at -70°C.

3.1.4. Collection and preparation of blood samples

Three serum-separating (SST II) 8.5ml tubes (BD Vacutainer®) were collected for serum sampling from each patient at the same time as the EMB. Collected blood tubes were kept at room temperature for 30-45 min (no longer than 60 min) to allow clotting. Samples were centrifuged for 15 min at the manufacturer's recommended speed (1,000-2,000 RCF). The upper layer was carefully aspirated, checked for turbidity, aliquated into cryovials, labeled and stored at -70°C.

Before measurement, all serum samples were thawed on ice, centrifuged at 12,000 RCF for 5 min and, if necessary, appropriately diluted.

3.1.5. Detection of viral genome on endomyocardial biopsy

Genomic DNA and total RNA were extracted from endomyocardial biopsies using ZR-Duet™ DNA/RNA Miniprep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). RNA (1 µg) was reversely transcribed in 20 µl reaction volumes using random hexamers and First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania) according to the vendor's recommendations and diluted up to 100 µl with deionized water after reaction. Nested PCR primers for the detection of adenovirus (Allard, Albinsson et al. 2001), Herpes simplex viruses 1 and 2, varicella zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, parvovirus B19, hepatitis C virus, enterovirus, rubella virus (McIver, Jacques et al. 2005), human herpes virus 6 (HHV-6A and HHV-6B, GenBank accession no. **NC001664.2** and **NC000898.1**, respectively), Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS, GenBank accession no. **NM033360**) and ubiquitin C (UBC, GenBank accession no. **NM021009**) genes (Table 1) were synthesized by Metabion (Martinsried, Germany). Forward primers of the second round PCR were labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM) at the 5' end.

Table 1 Oligonucleotides used in nested PCRs.

<i>Target</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequence</i>	<i>Size (bp)</i>
HHV-6	HHV6-N1Fw	ACCCGAGAGATGATTTTTCGCTG	128
	HHV6-N1Rev	GCAGAAGACAGCAGCGAGATAG	
	HHV6-N2Fw	CATAGCAACCTTTTCTAGCTTTGAC	
	HHV6-N2Rev	TCTATAACATAAATGACCCCTGGGA	
UBC	UBC-N1Fw	TTCTTTCCAGAGAGCCGAAC	150
	UBC-N1Rev	CCCATCTTCCAGCTGTTTTTC	
	UBC-N2Fw	TGGGTCGCAGTTCTTGTTTG	
	UBC-N1Rev	CCTTCCTTATCTTGGATCTTTGCC	
KRAS	KRAS-N1Fw	CTTTGGAGCAGGAACAATGTCT	160
	KRAS-N2Fw	AATCCAGACTGTGTTTCTCCCT	
	KRAS-N1Rev / N2Rev	TACACAAAGAAAGCCCTCCCC	

All PCRs were run on a TProfessional Standard thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) as described (McIver, Jacques et al. 2005). KRAS and UBC detection was used to validate extraction of nucleic acids and was performed in parallel according to the conditions for DNA and RNR viruses, respectively. First round PCRs for DNA and RNA viruses were performed in a 50 µl reaction volume containing Maxima Probe qPCR Master Mix (Fermentas), 0.2 µM final concentration of each first-round primer, and 10 µl extracted DNA or cDNA solution. Uracil-DNA glycosylase (Fermentas) was added into each reaction mix (0.4 units) to prevent PCR cross-contamination. Amplification conditions for DNA viruses included uracil-DNA glycosylase treatment at 50 °C for 2 min; initial denaturation step at 95 °C for 10 min; 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, extension at 72 °C for 60 s; the final extension step was 72 °C for 7 min. Amplification conditions for RNA viruses included uracil-DNA glycosylase treatment at 50 °C for 2 min; initial denaturation step at 95 °C for 10 min; 35 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s, annealing at 57 °C for 45 s, extension at 72 °C for 60 s; the final extension step was 72 °C for 7 min. Each primer pair was tested in a reaction setup without DNA sample (negative template control). Second round PCRs were performed in a 50 µl reaction volume containing Maxima Hot Start PCR Master Mix (Fermentas), 0.2 µM final concentration of each second-round primer, and 2 µl of first-round product. Amplification conditions for DNA viruses were the same as for the first round except excluded uracil-DNA glycosylase treatment step. Amplification conditions for RNA viruses included initial denaturation step at 95 °C for 10 min; 35 cycles of denaturation

at 95 °C for 20 s, annealing at 57 °C for 20 s, extension at 72 °C for 20 s; the final extension step was 72 °C for 7 min. Ubiquitin C PCR detection was used to validate extraction and was performed in parallel according the conditions for DNA viruses.

Final PCR products were 10-fold diluted and analyzed by capillary electrophoresis on a Genetic Analyzer 3130*xl* using GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard and Gene Mapper Software v4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for sizing PCR fragments. In the case of positive result, the genomic DNA or RNR specimens extracted from whole blood samples were tested to exclude biopsy contamination with viruses circulating in the blood.

3.1.6. ELISA assays

Apoptotic and collagen synthesis/degradation protein levels in endomyocardial biopsies and serum samples were measured by specific ELISA assays. The following molecules were assessed: Bcl-2, Caspase-9, Caspase-8 (Novus Biologicals Europe, Cambridge, UK); Bax (Elabscience Biotechnology Co., Ltd, China); Caspase-3, TGF β 1, matrix metalloproteinase-9 (MMP9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1), APO1/Fas/CD95, Fas ligand (FasL) (Invitrogen, Paisley, UK); Procollagen I C-Terminal Propeptide, PICP (Bio-Medical Assay Co., Ltd., China); Cross-linked Carboxy-terminal telopeptide of type I collagen, ICTP (Shanghai BlueGene Biotech Co., Ltd, China); Heat Shock Protein-60 HSP60 (AssayPro, Saint Charles, Missouri, USA).

Protein in serum and biopsy samples was measured using a modified Lowry Protein Assay kit according to the manufacturer's recommendations (Thermo scientific Inc., USA). Absorbance was measured with a spectrophotometer (Asys UVM 340 Microplate Reader UK - Biochrom Ltd.) set at 750 nm. A bovine serum albumin (BSA) standard curve was made to determine the protein concentration of each unknown sample. Protein concentration was expressed as μ g/ml. Final concentration of searching molecules was expressed as ng/mg of protein.

3.1.7. Additional biochemical measurements

The pro-inflammatory cytokine TNF α , IL-6 and IL-1 β in serum samples were assayed by solid-phase, chemoluminescent immunometric assays using IMMULITE/Immuline 1000 systems (Immuline, Siemens) according to manufactures instructions: TNF α (Catalog No: LKNFZ (50 test), LKNF1 (100 tests); IL-6 (Catalog

No: LK6PZ (50tests), LK6P1 (100 tests); IL-1 β (Catalog No: LKL1Z (50 tests), LKL11 (100 tests).

Adiponectin was measured by Millipore Adiponektin assay according manufacturers' recommendations (Milipore, USA).

The myocardial necrosis marker, a high-sensitivity troponin T (hsTnT) was measured in serum using an Elecsys 2010 analyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana) and expressed as $\mu\text{g/ml}$.

Brain natriuretic protein (BNP) was measured by a two-step immunoassay in human plasma using CMIA technology and protocols referred as Chemiflex. Briefly, sample and anti-BNP coated paramagnetic particles were combined. After incubation, samples were washed and combined with an anti-BNP acridinium-labeled conjugate. Samples were incubated, washed again and the chemoluminescence initiating mixture was added. Resulting chemoluminescent reaction was measured as relative light units (RLU) by a chemoluminometer.

Galectin-3 in serum samples was estimated using an in vitro diagnostic device of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) on a micro plate according to the manufacturers' instructions (BG Medicine, Inc.).

3.1.8. Histology and immunohistochemistry of endomyocardial biopsies

EMB samples for histological analysis were fixed in 10 % buffered formalin and subsequently paraffin-embedded in a tissue processor. 3 μm -thick sections were used through the study. The EBM sections were stained with Haematoxylin and Eosin (H&E) according to the standard protocol for the routine histological evaluation. The experienced pathologist evaluated: endocardium (thickness, subendocardial fat, fibrosis and inflammation); myocardium (muscle fibre number, size and damage); interstitium (fibrosis, fat, edema and inflammation) and intramural vessels (size, signs of inflammation, damage and luminal stenosis). To estimate the extent of fibrosis the EMB specimens were stained with Masson's trichrome connective tissue stain according to a standard protocol. Keratin and muscle fibers stained red, whereas collagen stained blue.

Immunohistochemical staining was performed on fixed, paraffin-embedded material using antibodies: anti-CD3 (DAKO Hamburg, Germany), anti-CD45Ro (DAKO Hamburg, Germany) and anti-CD68 (DAKO Hamburg, Germany), anti- α smooth muscle

actin (α -SMA) (Biocompare, USA); anti-MMP1 (Spring Bioscience Corp., USA); anti-MMP2 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK); anti-MMP9 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK), anti-MMP13 (Novus Biologicals Europe, Cambridge, UK), anti-HLA-DR (DAKO Hamburg, Germany), anti-PICP (EMD Millipore, Temecula, USA).

3.1.9. Evaluation of histochemical and immunohistochemical stainings in endomyocardial biopsies

Inflammatory infiltrates in the biopsies were immunohistochemically classified on tissue sections, according to expression of CD3⁺ (T lymphocytes), CD45Ro⁺ (active-memory T lymphocytes) and CD68⁺ (macrophages). The number of positively stained cells in each biopsy sample was scored by a highly experienced pathologist and expressed as number of positive cells/mm². According to the World Health Organization / International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies, EMB were considered to be inflamed after immunohistochemical detection of focal or diffuse mononuclear infiltrates with >14 leukocytes per 1 mm² (CD3⁺ T lymphocytes and/or CD68⁺ macrophages) in the myocardium (Richardson, McKenna et al. 1996; Mahrholdt, Wagner et al. 2006; Kindermann, Kindermann et al. 2008).

Additionally myocardial necrosis was estimated by routine histochemical staining of fixed biopsy samples with Haematoxylin and Eosin (H&E). Normal myofibres had peripheral nuclei, intact sarcolemma and non-fragmented nuclei. Pyknosis of muscle fibers nuclei, edema, and beginning of leuco-diapedesis from the capillaries suggested that these myocardial cells reached the stage of necrosis. A pathologist scored the number of necrotic myofibres on at least three independent tissue sections.

Digital images from the experimental glass slides were obtained using ScanScope Digital Slide Scanner (Aperio, Vista, CA) at x20 magnification and archived on a devoted Spectrum Server 11.1.0.751 (Aperio). Quality control of the scanned images and all further analysis were performed using ImageScope V11.1.2.760 (Aperio) and WebScope V11.1.0.756 (Aperio).

Genie algorithm was used to measure the extent of fibrosis, to calculate immunostained cells and to evaluate the area of immunohistochemically stained elements in the myocardium. Genie (GENetic Imagery Exploration (Holland 1992)) is a pattern recognition algorithm that distinguishes spatial and morphological features based

on structures (classes) provided by the user. The algorithm was run for the whole slide, ignoring the number of overlapped tissue sections on it – making the process fully automated. Specific Genie classifiers were developed for this study:

1. Myocardial fibrosis identification was made by using basic tissue recognition Genie classifier v1 algorithm. Total cardiac fibrosis (including interstitial and perivascular) was assessed. For better identification fibrosis, we used only spatial recognition, disabling the detection of morphological features. For this purpose, the Genie system was trained to distinguish the myocardium, fibrous tissue (fibrosis) and glass (Fig. 1). Total cardiac fibrosis percentage was adjusted to a total tissue area in the image analyzed, ignoring the glass.

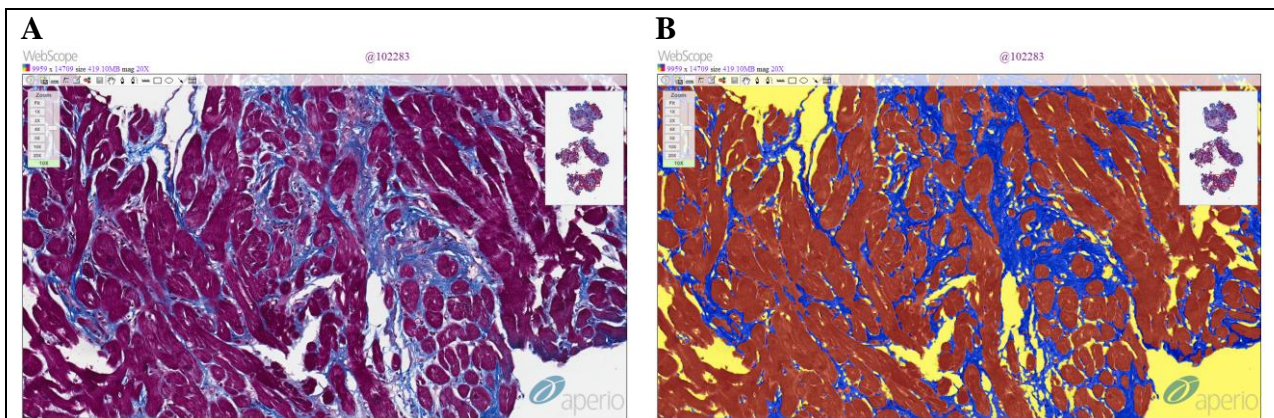


Fig. 1 Fibrosis mark-up on digitized slide at x10 magnification. (A) Masson trichrome original staining, (B) Genie algorithm.

2. For counting activated immune cells (HLA-DR) and cardiac fibroblasts (α -SMA) in myocardium tissue Genie Nuclear v9.0 algorithm was used. This algorithm distinguishes and counts immunostained positive and negative cells (Fig. 2). Depending on parameters it can mark different size and shape cells. Thus, in order to get accurate analysis, for different immunocell types, different Nuclear v9.0 parameters were set. After analysis the results were shown as total amount of immunopositive cells in the tissue area measured and expressed as cells/mm².

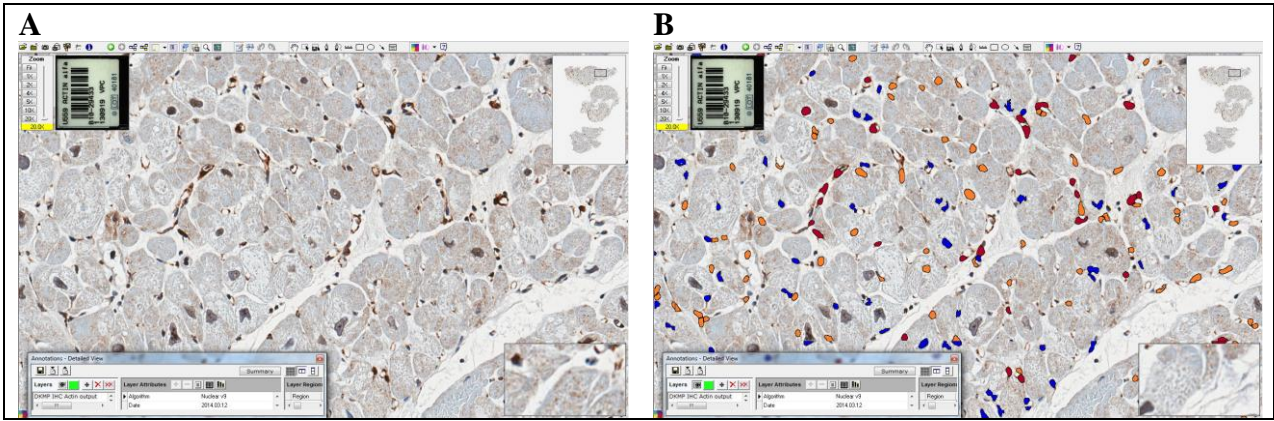


Fig. 2 Immunopositive cell mark-up on digitized slide at x20 magnification. (A) α -SMA staining, (B) Genie algorithm.

3. For measuring immunostained proteins (MMP1, MMP2, MMP9, MMP13 and PICP) in myocardial biopsies Genie pixel counting Algorithm was used. Firstly on digital slide the region of interest (myocardial biopsy) was marked and after that the algorithm was ran in this area. The results were shown as total amount of weak/ moderate/ strong positive and negative pixels (Fig. 3). For each protein a sum of weak, moderate and strong positive pixels was calculated as “positive”. After that the percentage of positive pixels were counted manually and adjusted to a total tissue area.

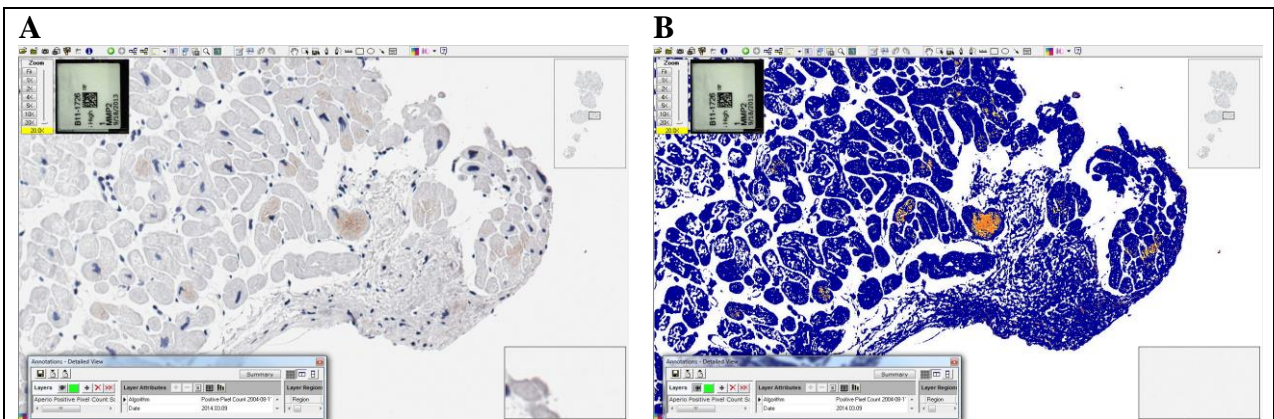


Fig. 3 Immunostained protein mark-up on digitized slide at x20 magnification. (A) MMP2 staining, (B) Genie algorithm.

3.2. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology

3.2.1. Experimental model

The study was conducted on endomyocardial biopsy (EMB) material from 38 patients (29 males, 9 females, mean age 42.3 ± 12.2 years) diagnosed with inflammatory dilated cardiomyopathy. All EMB specimens were collected between July, 2010 and February, 2013. Before EMB, each patient underwent coronary angiography to exclude coronary artery disease. Right ventricular EMB was obtained using a flexible biptome via the right femoral vein (Cooper, Baughman et al. 2007). At least 3 EMBs were subjected to histological evaluation. All specimens were included in the study to provide a full range of fibrosis.

Tissue samples for histological analysis were fixed in 10 % neutral buffered formalin with subsequent routine paraffin embedding. 3 μm -thick sections were used through the study. Sections were stained with Masson's trichrome according to a standard protocol. Whole slide images (WSI) from the experimental glass slides were obtained at a resolution of 0.5 μm using a digital microscopic scanner (ScanScope[®] XT, Aperio Technologies, Vista, CA, USA) at a 20x objective magnification and stored in a tiled Tiff format on a devoted WSI server (Spectrum 11.1.0.751, Aperio) (Fig. 4). One section was later randomly chosen from the slide for all subsequent analyses. Aperio Colocalization and Genie algorithms were used for image analysis.

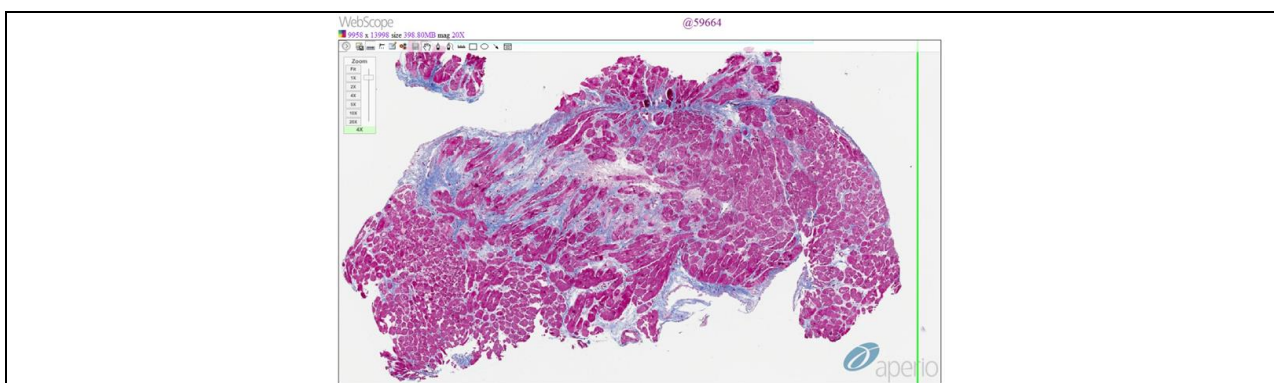


Fig. 4 Fibrosis mark-up on digitized slide (Masson trichrome original staining).

3.2.2. Colocalization algorithm

Colocalization uses the color deconvolution (Ruifrok and Johnston 2001) to separate the stains and classifies each pixel according to the number of stains present. For Colocalization, the threshold for each stain is specified for a required stain (e.g.

Masson's trichrome) and the algorithm reports the percentage of total tissue area for which each stain combination is detected: 1, 2, 3, 1+2, 1+3, 2+3, 1+2+3, or none (up to 3 stains are supported). The algorithm also provides an eight-color mark-up image for the visualization of the colocalized stains. The total percentage of cardiac fibrosis in biopsy samples was calculated according to the sums of the following stain combinations: 3, 2+3 and 1+3 (Fig. 5).

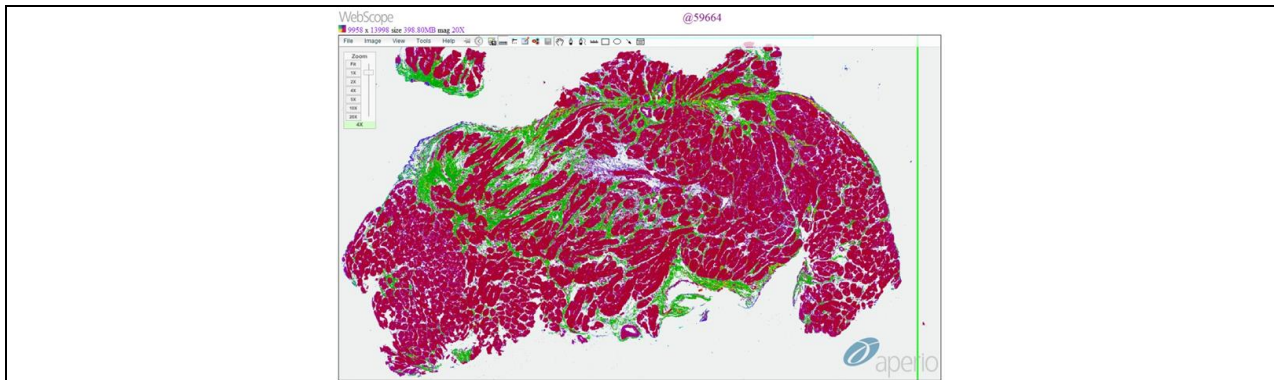


Fig. 5 Fibrosis mark-up on digitized slide (Colocalization algorithm).

3.2.3. Genie algorithm

Genie (GENetic Imagery Exploration (Holland 1992)) is a pattern recognition algorithm that distinguishes spatial and morphological features based on structures (classes) provided by the user. A specific Genie classifier was developed as follows: 1. New Genie project and training set created; 2. Digital slides added to a training set; 3. The classes of interest defined and marked in the digital slides in the training set (Fig. 6); 4. Training montage created by running Genie Training v1 algorithm (1000 training iterations set) on user-selected tissue sub-regions (the algorithm estimated the training accuracy at 99.4 %); 5. Based on the training macro, Genie Classifier v1 algorithm was used to create the specific Classifier to be tested and used (Fig. 7). After testing the classifier the classes can then be selected for subsequent analysis using specific task algorithms. For better identification of cardiac fibrosis, we used only spatial recognition, disabling the detection of morphological features. For this study, the Genie system was trained to distinguish the myocardium, fibrous tissue (fibrosis) and glass (Fig. 7). Total cardiac fibrosis percentage was adjusted to a total tissue area in the image analyzed, ignoring the glass (Fig. 8).

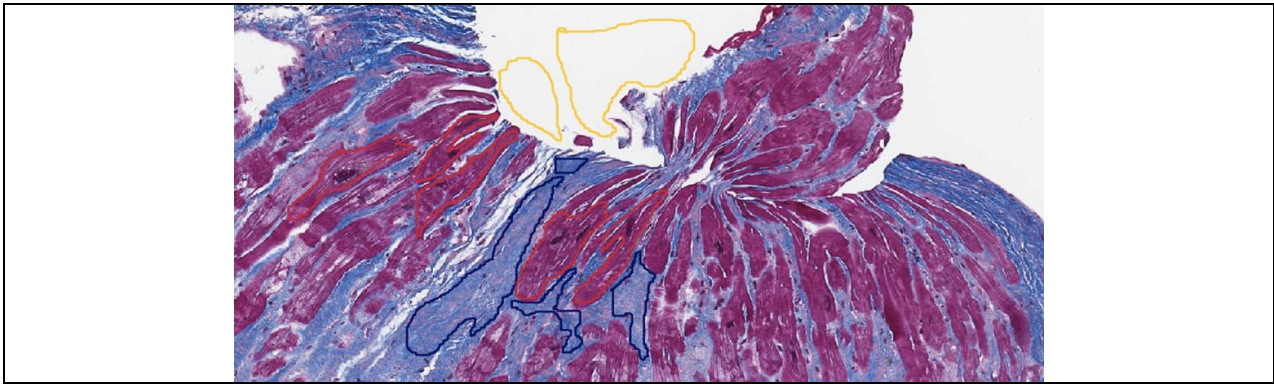


Fig. 6 Training and using of the Genie. Defining and marking the classes of interest.

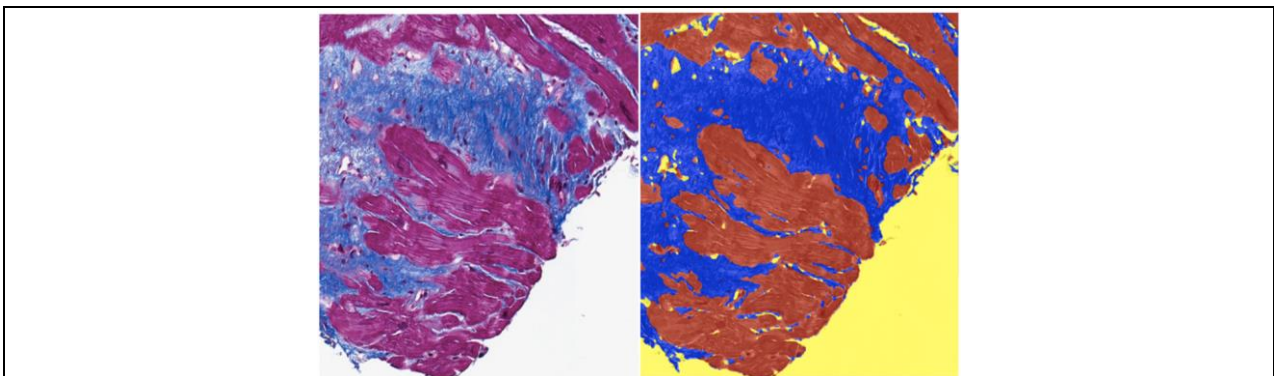


Fig. 7 Training and using of the Genie. Testing and using the new specific classifier.

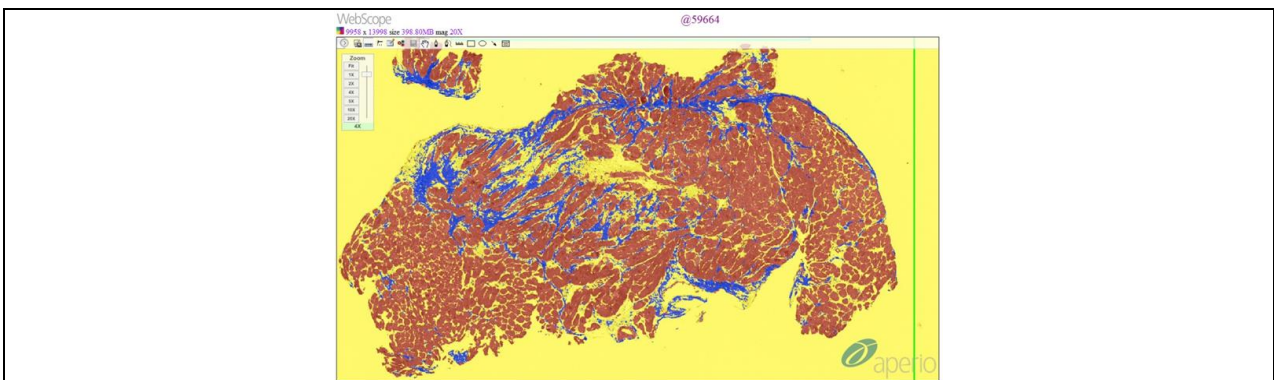


Fig. 8 Fibrosis mark-up on digitized slide (Genie algorithm).

3.2.4. Stereology

Stereology is an interdisciplinary field for volume estimation of three-dimensional structures by their planar sections. We performed the study on tissue sections of 3 μm , thus the stereology was performed on a projection rather than on ideal 2D plane. A point counting grid was used to estimate the fraction area (Baddeley 2005). "Stereology toolkit 4.2.0" from ADCIS (Saint Contest, France) was used in this study. This stereology module allows defining a ROI and a grid that overlay an area of a virtual slide. Then the type, the spacing and the pattern size of the grid must be adjusted (Fig. 9). 150-200 test

points are recommended for acceptable analysis precision (Weibel 1979). The grid of point counting, with the sampling interval of 200 pixels and a pattern size of 20 pixels was chosen to evaluate the area fraction of myocardial tissue and cardiac fibrosis. These adjustments of the stereology grid ensured a minimum of 500 test points in the smallest myocardial biopsies and higher counting precision. The structures of interest: glass, fibrosis, myocardium, other (including inflammation, necrosis, glass areas inside the myocardium) were manually highlighted by the observer (Fig. 10). The total percentage of cardiac fibrosis was counted using the number of points ignoring the “glass” and “other” category. The area fraction, equivalent to the volume fraction of cardiac fibrosis was then estimated as the ratio between the number of test marked as fibrosis and the total number of test points included in the ROI, points ignoring the “glass” and “other” categories. The results were expressed as percentages together with the corresponding uncertainty computed according to Weibel (Weibel 1979).

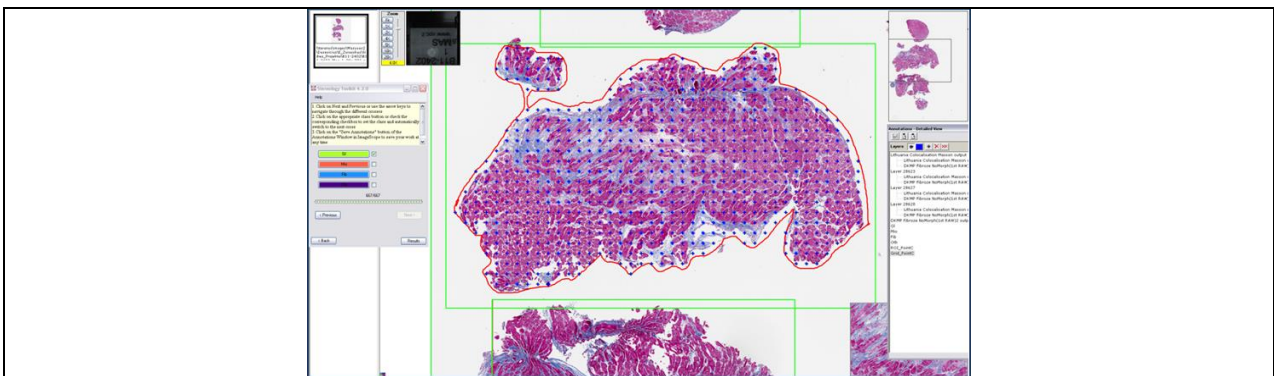


Fig. 9 Fibrosis mark-up on digitized slide using Stereology protocol. ImageScope V11 view incorporating grid (sampling step of 200 pixels and size of the pattern 20 pixels).

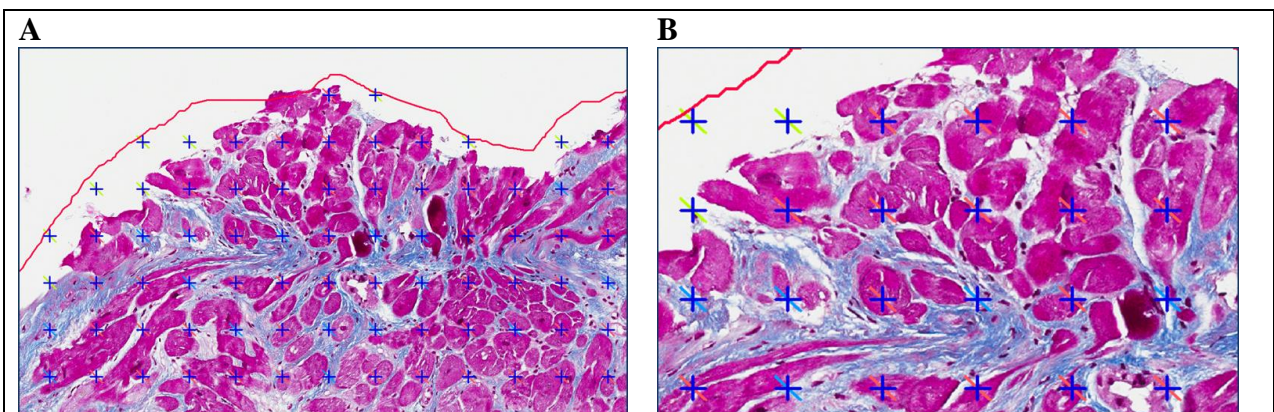


Fig. 10 Fibrosis mark-up on digitized slide using Stereology protocol. Structures of interest (glass, fibrosis, myocardium, other) manually highlighted by observer. (A) View at x10 magnification, (B) View at x20 magnification.

3.2.5. Pathologist's visual scoring

The extent of total cardiac fibrosis in the samples was also evaluated as a percentage of the sample area by a highly-experienced pathologist using a light microscope. Two evaluations were performed for each section with the time interval of two weeks.

3.3. Statistical analyses

Data are presented as the mean and standard error of mean (Mean \pm SEM). All statistical analyses of data were performed using the SPSS package (version 19.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) at 5 % significance level.

3.3.1. Analysis of DCM data

The normality of the data distribution was tested by the Shapiro-Wilk test. Differences in parameters of virus-negative and virus-positive and also inflammation-negative and inflammation-positive patient groups were tested by Student's *t* test or the Wilcoxon–Mann–Whitney rank sum nonparametric test (specified in figure legends and table titles). For comparative purposes Pearson's correlation coefficient was used. Pearson's Chi-square test was used when appropriate to compare categorical variables.

3.3.2. Analysis of fibrosis quantification data

For the statistical comparison of data, the Pearson's correlation coefficient, Friedman's test with post hoc (Wilcoxon signed-rank with a Bonferroni correction applied) and scatter-dot graphs (with R^2 , intercept and slope) were used. To enable a standard approach to the data, a natural logarithmic transformation of all measurements was performed before drawing scattered-dot plots. The agreement between fibrosis measurement methods was tested with Bland-Altman plots (Bland and Altman 1999), using the stereology estimation as a reference method for the X axis (Krouwer 2008). All statistical analysis was performed using the SPSS package (version 19.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) at 5 % significance level.

3.4. Ethical approval

The study was approved by the Vilnius Regional Biomedical Research Ethics committee (License Nr.158200-09-382-103). All patients gave written informed consent to include their data in the study for each investigational procedure.

The investigation conforms to the principles outlined in the *Declaration of Helsinki*.

4. RESULTS

4.1. Virus-positive DCM patient study group

4.1.1. Identification of viral genome in endomyocardial biopsy

From a total of 32 patient included in this study, viral genome was detected in the myocardium of 14 subjects (43.8 %). The following virus species were detected: parvovirus B19 (PVB19) (n = 11; 34.4 %), human herpes virus type 6 (HHV6) (n = 4; 12.5 %), enterovirus (EV) (n = 1; 3.1 %), hepatitis C virus (HCV) (n = 1; 3.1 %), Epstein-Barr virus (EBV) (n = 1; 3.1 %), Varicella-zoster virus (VZV) (n = 1; 3.1 %). Among the 3 (9.38 %) patients with double infections: co-detection of PVB19 and HHV6 prevailed in 2 EMB samples, whereas 1 EMB sample had PVB19 and HCV co-infection. There was one patient with triple infection with PVB19, HHV6 and EV.

All patients were subdivided into two groups: virus-negative (n = 18) and virus-positive (n = 14) according to detection of virus genomes in the EMB analysis.

4.1.2. Basic clinical parameters

Patient baseline characteristics for the study groups are shown in Table 2. No significant differences in distribution of sex, age and heart failure symptoms between groups were observed.

Heart failure is described as the symptomatic syndrome, graded according to the New York Heart Association (NYHA) functional classification (Dolgin 1994). Most of the patients enrolled to the study had moderate NYHA III class symptoms (11 (61 %) patients in virus negative group, 12 (85 %) patients in virus positive group). There were more patients with severe symptoms of cardiac insufficiency (NYHA IV class) in virus negative group (6 (33 %) patients) than in virus positive group (1 (7 %) patient), however the difference was not significant ($p = 0.075$).

The prevalence of atrial fibrillation (AF) or left bundle branch block (LBBB) on ECG did not significantly differ between the groups (AF 3 (17 %) versus 1 (7 %), $p = 0.360$; LBBB 5 (28 %) versus 2 (14 %), $p = 0.360$) and was even lower in virus-positive patient group.

Generally, main parameters of echocardiography demonstrated characteristic signs of DCM: reduced left ventricular ejection fraction (LVEF), dilatation of left

ventricular. However, there were no significant differences in these parameters between the groups: LVEF 23.11 ± 1.6 % versus 24.93 ± 1.39 % ($p = 0.413$), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) 6.87 ± 0.24 cm versus 6.64 ± 0.18 cm, left ventricular end-diastolic diameter index (LVEDDI) 3.66 ± 0.12 cm/m² versus 3.54 ± 0.12 cm/m².

Table 2 Baseline characteristics of patients.

<i>Variable</i>	<i>Virus-negative group</i>		<i>Virus-positive group</i>		<i>p Value</i>
	No. of pts.	Value	No. of pts.	Value	
Sex (male/female)	18	16 (89 %) / 2 (11 %)	14	9 (64 %) / 5 (36 %)	0.095
Age (years)	18	45.11 ± 3.18	14	40.79 ± 2.29	0.279
NYHA					
II	18	1 (6 %)	14	1 (7 %)	0.854†
III	18	11 (61 %)	14	12 (85 %)	0.125†
IV	18	6 (33 %)	14	1 (7 %)	0.075†
Cardiac parameters					
LBBB (%)	18	5 (28 %)	14	2 (14 %)	0.360†
Permanent AF (%)	18	3 (17 %)	14	1 (7 %)	0.419†
LVEF (%)	18	23.11 ± 1.6	14	24.93 ± 1.39	0.413
LVEDD (cm)	18	6.87 ± 0.24	14	6.64 ± 0.18	0.460
LVEDDI (cm/m ²)	13	3.66 ± 0.14	14	3.54 ± 0.12	0.522
Mean Ao (mmHg)	11	91.73 ± 3.26	10	84.6000 ± 3.44	0.149
Mean RAP (mmHg)	15	17.00 ± 2.22	11	9.00 ± 1.54	0.011*
Mean PCWP (mmHg)	16	29.00 ± 2.62	12	17.75 ± 2.18	0.004*
Mean PAP (mmHg)	16	40.19 ± 3.45	12	25.42 ± 2.6	0.003*
CI (L/min/m ²)	13	2.08 ± 0.2	8	2.41 ± 0.17	0.309

* Significant at $p < 0.05$ level. † Chi-square test. Data are presented as means \pm SEM. Abbreviations: NYHA – New York Heart Association functional class; LBBB – left bundle branch block; AF – atrial fibrillation; LVEF – left ventricular ejection fraction; LVEDD – left ventricular end-diastolic diameter; LVEDDI – left ventricular end-diastolic diameter index; Ao – aortic; RAP – right atrial pressure; PCWP – pulmonary capillary wedge pressure; PAP – pulmonary artery pressure; CI – cardiac index.

Cardiac catheterization was performed to evaluate hemodynamic impairment, to confirm pulmonary hypertension (PH) diagnosis or to access severity of PH (PH is confirmed when the mean pulmonary artery pressure (PAP) is ≥ 25 mmHg at rest (Badesch, Champion et al. 2009), mean pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) is necessary for differential diagnosis of PH due left heart impairment (Simonneau, Robbins et al. 2009). In both groups these hemodynamic parameters were elevated, which confirms PH diagnosis due to left heart disease. However hemodynamic parameters (PAP, PCWP, RAP) were significantly higher in virus negative group (mean PAP 40.19 ± 3.45 versus 25.42 ± 2.6 , $p = 0.003$; mean PCWC 29.00 ± 2.62 versus 17.75 ± 2.18 , $p = 0.004$; mean RAP 17.00 ± 2.22 versus 9.00 ± 1.54 , $p = 0.011$). The difference among the groups shows more advanced PH in virus negative group and is associated

with worse prognosis (D'Alonzo, Barst et al. 1991). Cardiac index (CI) was reduced in both groups, although, did not differ significantly (2.08 ± 0.2 versus 2.41 ± 0.17 , $p = 0.309$). The better hemodynamic situation in virus-positive patients compared to the virus-negative ones might be explained by reduced myocardial fibrosis and decreased levels of heart contraction regulating proteins. The persistent presences of virus in myocardium can swift hemodynamic parameters to the expansion direction indicating worse prognosis.

Additionally, the inverse correlation between LVEF with hsCRP and BNP ($R = -0.803$, $p = 0.005$; $R = -0.630$, $p = 0.016$, respectively) also revealed that further presence of virus in myocardium might increase inflammation, fibrosis and subsequent release of ventricular natriuretic protein that may unbalance proper functioning of myocardium and induce heart failure (Table 2 and Table 4).

Both patient groups received the same basic treatment according to guidelines (Table 3) (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008; Dickstein, Vardas et al. 2010; McMurray, Adamopoulos et al. 2012). No significant difference in prescribed medication was observed between the groups.

Table 3 Basic treatment for the study patient groups (according ESC guidelines).

<i>Conventional treatment of heart failure</i>	<i>Virus-negative group</i>	<i>Virus-positive group</i>
ACE inhibitors	9 (50 %)	7 (50 %)
β -blockers	16 (89 %)	13 (93 %)
Digitalis (in atrial fibrillation)	3 (17 %)	6 (43 %)
Diuretics	18 (100 %)	14 (100 %)
Anticoagulation (atrial fibrillation, EF < 40 %)	14 (78 %)	7 (50 %)
Antiarrhythmics (class III: amiodarone)	5 (28 %)	2 (14 %)
Interventions		
Implantable cardiac defibrillator (ICD)	0 (0 %)	0 (0 %)
Cardiac resynchronization therapy (CRT)	3 (17 %)	1 (7 %)

4.1.3. Estimation of inflammation and cardiomyocyte death in virus-positive and virus-negative DCM samples

Intramyocardial viral infection has been suggested to be mainly an inflammatory-related process leading to myocardial cell death. However, the data show that levels of inflammation and apoptosis were reduced both in serum and biopsy samples. The decrease of inflammatory cytokines IL-6 and hsCRP in sera was statistically significant

(Fig. 11), whereas changes of apoptotic markers were significant only in biopsies (Fig. 12 and Fig. 13 $p < 0.05$).

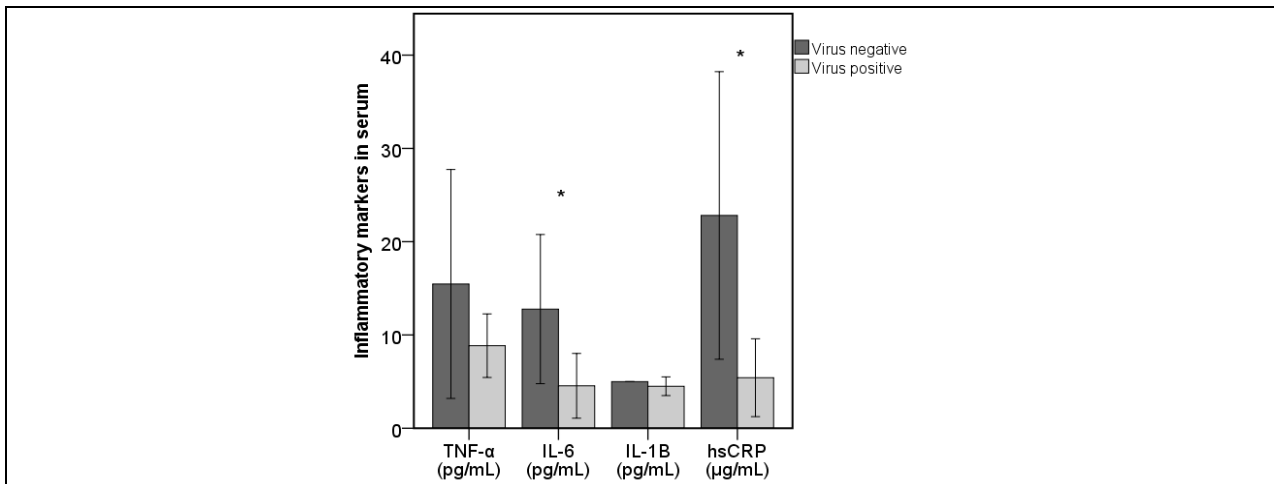


Fig. 11 Levels of the inflammatory markers in serum. ELISA data are presented as means \pm SEM. Data were considered significant at $*p < 0.05$.

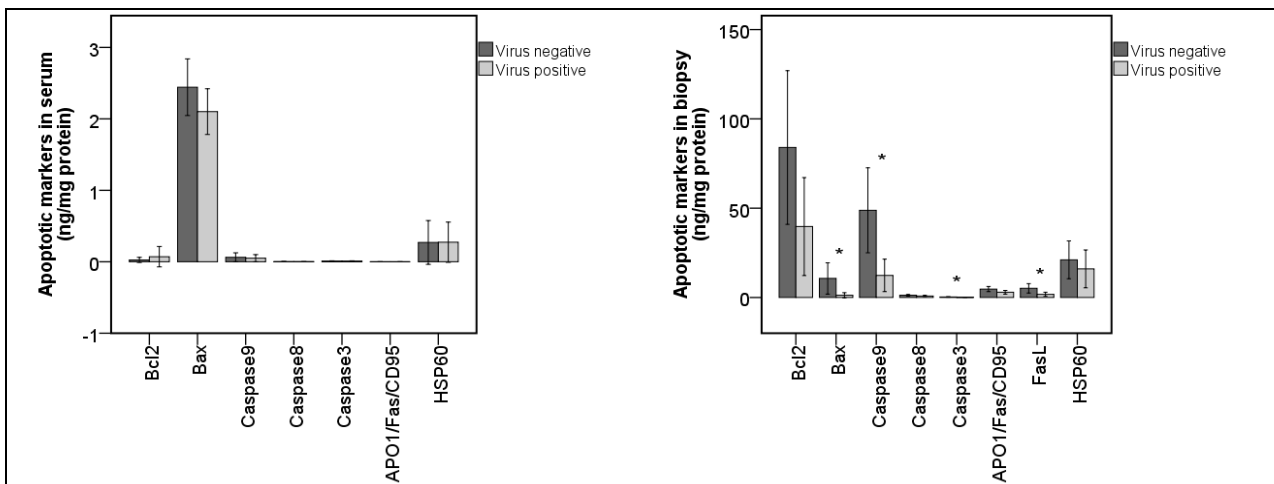


Fig. 12 Levels of the apoptotic markers in serum. ELISA data are presented as means \pm SEM.

Fig. 13 Levels of the apoptotic markers in biopsy. ELISA data are presented as means \pm SEM. Data were considered significant at $*p < 0.05$.

The level of inflammatory infiltrates, $CD3^+$, $CD45Ro^+$ and $CD68^+$, in virus-positive biopsies was also depressed, confirming the absence or low level of intramyocardial inflammation (Fig. 14).

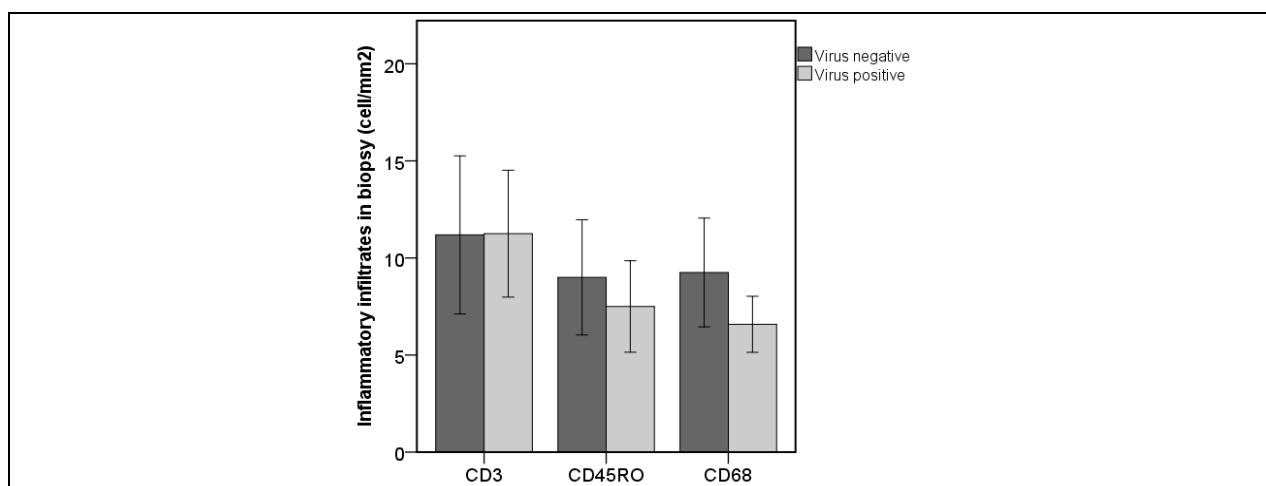


Fig. 14 Levels of the inflammatory infiltrates in biopsy. Immunohistochemically positive stained cell count data are presented as means \pm SEM from at least three independent locations by highly experienced pathologist.

Additionally, the biomarker of myocardial necrosis, the high-sensitivity troponin T (hsTnT), was also 2.6 fold down-regulated in virus positive serum samples, revealing the absence of necrosis (Table 4). The absence of necrosis was also confirmed by histological analysis of biopsies stained with hematoxylin and eosin.

Table 4 Summary data of estimated proteins in virus-negative and virus-positive DCM serums and biopsies.

<i>Variable</i>	<i>Virus-negative group</i>		<i>Virus-positive group</i>		<i>p Value</i>
	No. of pt.	Value	No. of pt.	Value	
ELISA assays of proteins in serums					
MMP9 (ng/mg protein)	18	1.4886 \pm 0.0648	14	1.4320 \pm 0.0630	0.536
TIMP1 (ng/mg protein)	18	6.1611 \pm 0.2028	14	5.7538 \pm 0.2945	0.266
MMP9/TIMP1	18	0.2428 \pm 0.0084	14	0.2529 \pm 0.0108	0.465
PICP (ng/mg protein)	18	0.1589 \pm 0.0321	14	0.0792 \pm 0.0180	0.039*
ICTP (ng/mg protein)	18	0.0177 \pm 0.0023	14	0.0148 \pm 0.0033	0.495
PICP/ICTP	18	11.2537 \pm 2.1036	14	8.6832 \pm 3.9652	0.573
TGF β (pg/mg protein)	18	13.9515 \pm 1.9427	14	13.7339 \pm 2.1101	0.940
ELISA assays of proteins in biopsies					
MMP9 (ng/mg protein)	18	2.9149 \pm 1.0740	13	1.3321 \pm 0.3952	0.089 _j
TIMP1 (ng/mg protein)	18	9.6116 \pm 1.4578	13	5.8772 \pm 1.6243	0.266
MMP9/TIMP1	18	0.3434 \pm 0.0838	13	0.4107 \pm 0.1461	0.694
PICP (ng/mg protein)	18	4.2779 \pm 2.3323	13	1.0708 \pm 0.5718	0.312 _j
ICTP (ng/mg protein)	18	0.0733 \pm 0.0337	13	0.2636 \pm 0.1184	0.196 _j
PICP/ICTP	18	14.6047 \pm 6.3008	13	3.4117 \pm 2.1170	0.154
TGF- β 1 (pg/mg protein)	18	122.0955 \pm 82.6902	13	34.3392 \pm 29.0622	0.622 _j

Immuno- and histochemical assays of proteins in biopsies

MMP1 (%)	15	6.6747 ± 1.5248	14	14.6564 ± 22.9998	0.022*
MMP2 (%)	15	2.8940 ± 0.3412	14	7.0350 ± 3.9725	0.292
MMP9 (%)	15	10.9707 ± 4.2136	14	9.6871 ± 1.5709	0.783
MMP13 (%)	15	12.2860 ± 2.5354	14	12.6650 ± 2.6789	0.919
α-SMA (%)	15	24.1400 ± 4.6102	14	21.4821 ± 2.5839	0.620
HLA-DR (%)	15	0.8253 ± 0.21629	14	0.8886 ± 0.21432	0.837

Other determinations in serums

Adiponectin (µg/mL)	18	28.3389 ± 3.4627	14	15.0143 ± 2.7360	0.005*
BNP (pg/mL)	18	1841.7944 ± 341.4525	14	936.4786 ± 260.1920	0.044*
hsCRP (µg/mL)	17	22.8118 ± 7.7080	10	5.4170 ± 2.0884	0.043*
hsTnT (pg/mL)	18	74.0878 ± 29.8031	13	28.8277 ± 4.9154	0.151
Galectin-3 (ng/mL)	18	12.8344 ± 0.8536	14	11.0579 ± 1.0107	0.190
Cardiac fibrosis (%)	18	17.9724 ± 2.2076	14	10.4818 ± 1.6854	0.012*

Data are presented as the mean ± SEM. * Significant at 0.05 level; j Wilcoxon–Mann–Whitney rank sum nonparametric test. Abbreviations: Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 protein; Bax – Bcl-2-associated X protein; MMP – matrix metalloproteinases; TIMP – tissue inhibitors of matrix metalloproteinases; PICP – type I procollagen carboxy-terminal propeptide; ICTP – type I collagen carboxyterminal telopeptide; TNF-a – tumour necrosis factor-alfa; IL-1β – interleukin 1 beta; IL-6 – interleukin 6; hsCRP – high sensitivity C-reactive protein; hsTnT – high sensitivity troponin T; TGF-β1 - transforming growth factor β1; BNP – brain natriuretic protein.

4.1.4. Impact of virus on contraction proteins in myocardial tissue

The absence of inflammation (Fig. 15), apoptosis and necrosis in virus-positive myocardium, stimulated to investigate contraction properties and proteins mostly regulating it.

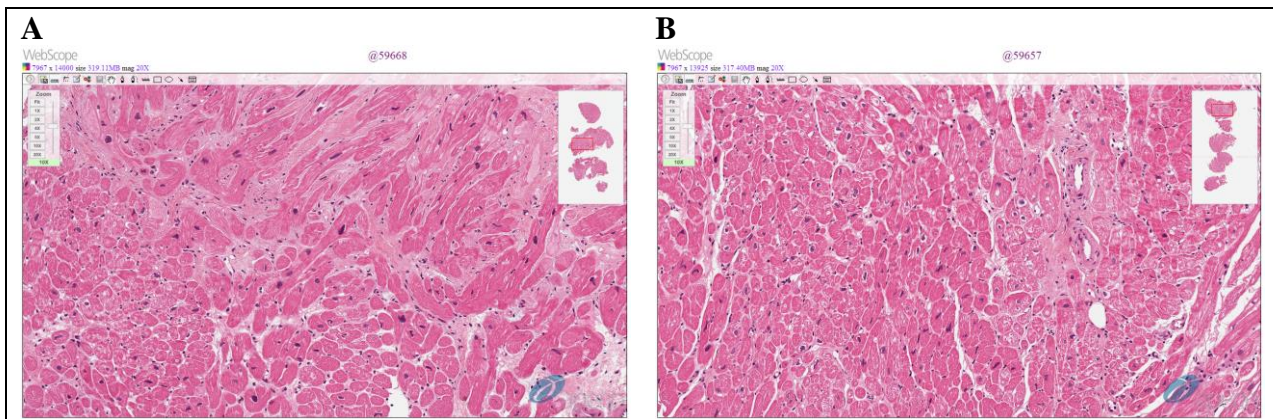


Fig. 15 Inflammation representation in right ventricular EMB. Micrographs show one representative picture from one patient of each group. (A) virus-negative; (B) virus-positive. Hematoxylin and Eosin staining. Magnification: x10.

Data presented in Table 4, Fig. 16 and Fig. 17 show lower intensity of fibrosis in virus-positive myocardium.

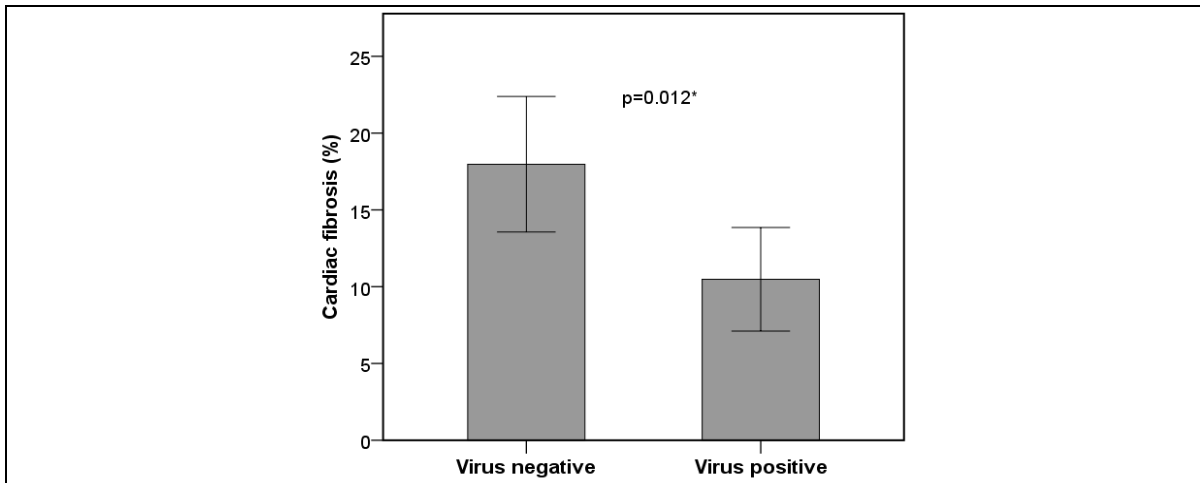


Fig. 16 Levels of fibrosis in biopsies. Data are presented as means \pm SEM from at least three independent measurements. Data were considered significant at * $p < 0.05$.

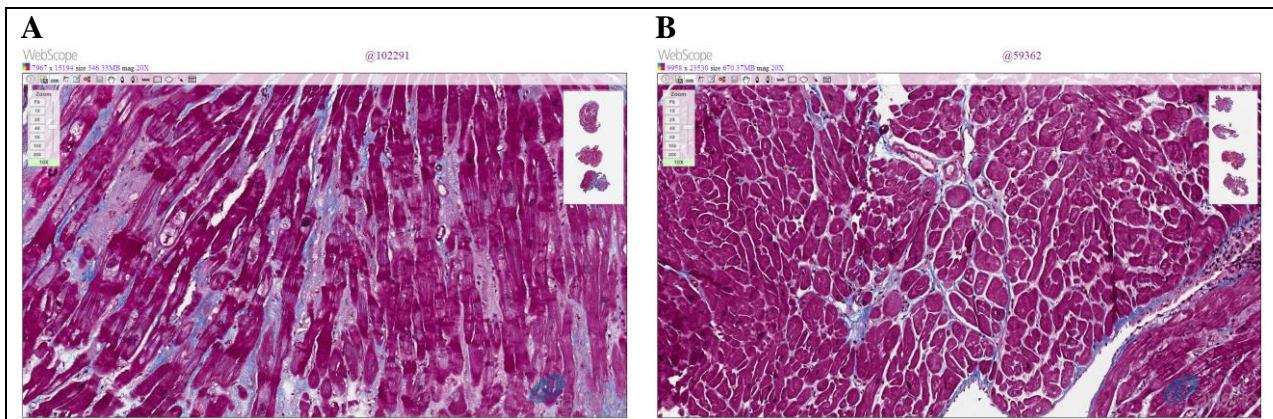


Fig. 17 Fibrosis in right ventricular EMB. Micrographs show one representative picture from one patient of each group. (A) virus-negative patient (digitally quantified fibrosis – 21.20 %); (B) virus-positive patient (digitally quantified fibrosis – 9.79 %). Masson trichrome staining for cardiac fibrosis (collagen is colored blue). High amounts of collagen reflect a high level of fibrosis. Magnification: x10.

Additionally, the carboxy-terminal propeptide of procollagen type I (PICP), a marker of collagen I biosynthesis in biopsies was reduced four-fold, whereas carboxy-terminal telopeptide of collagen type I (ICTP), a marker of collagen I degradation, was increased 3.6 fold (Fig. 18, Fig. 19 and Fig. 20). Change of ICTP in myocardial tissue was not confirmed immunohistochemically due to the absence of appropriate antibodies.

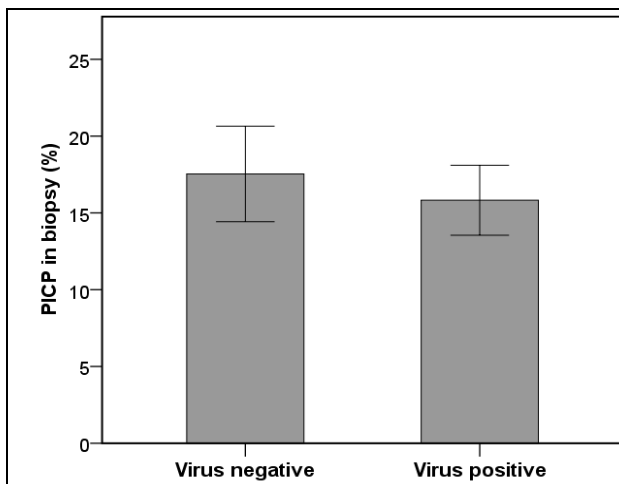


Fig. 18 Levels of the collagen I synthesis (type I procollagen carboxy-terminal propeptide (PICP)) biomarker. Data are presented as means \pm SEM from at least three independent measurements.

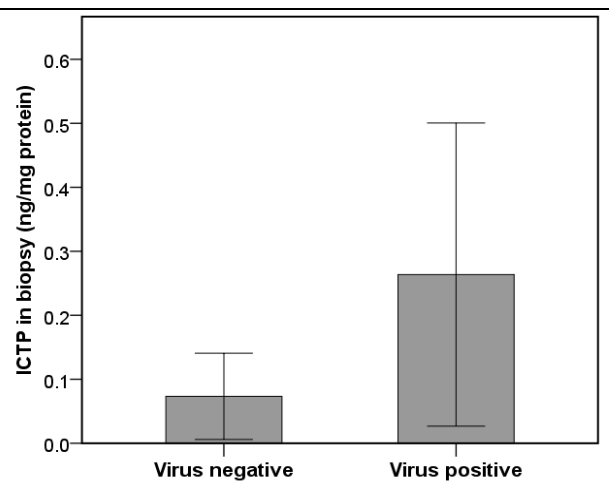


Fig. 19 Levels of the collagen I degradation (type I collagen carboxyterminal telopeptide; ICTP) biomarker in virus-negative and virus-positive serum samples. Data are presented as means \pm SEM.

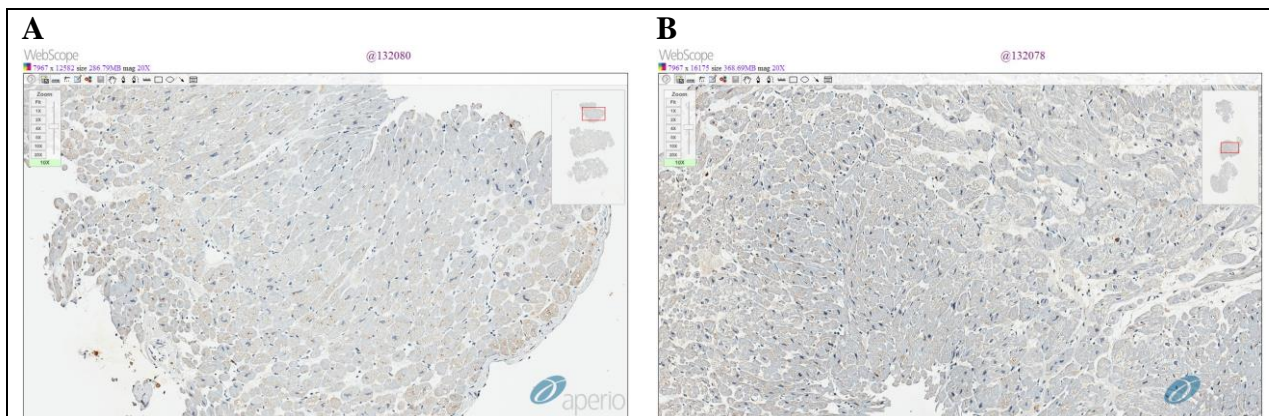


Fig. 20 Collagen I synthesis (type I procollagen carboxy-terminal propeptide (PICP)) biomarker in right ventricular EMB. Micrographs show one representative picture from one patient of each group. (A) virus-negative patient (digitally quantified PICP – 13.70 %); (B) virus-positive patient (digitally quantified PICP – 16.43 %). Immunohistochemical staining was performed using anti-PICP antibodies (brown color represents a positive staining for PICP). Magnification: x10.

We also found that myocardial fibrosis in virus-positive biopsies significantly correlated with the PICP/ICTP ratio and the general serum inflammatory marker hsCRP, suggesting activation of inflammation and fibrosis in further presence of intramyocardial virus (Fig. 21).

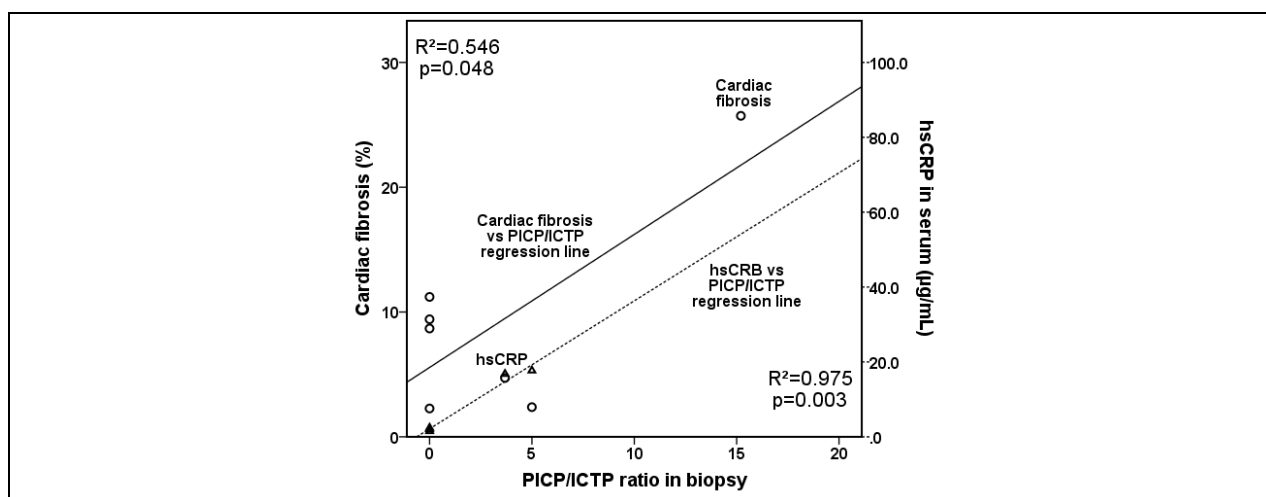


Fig. 21 Correlation analysis of additional markers in virus-positive patient serum samples. Correlation of collagen synthesis/degradation biomarkers (PICP/ICTP) ratio in biopsy (by ELISA) with cardiac fibrosis and the general inflammatory biomarker high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in serum. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

A more detailed correlation analysis, presented in Table 5, show that the marker of collagen I synthesis (PICP) as well as MMP9 level in virus-positive biopsies were mostly associated with secreted inflammatory cytokine IL-6. Moreover, the turnover of collagen I, and MMP9 activation significantly depended on proper functioning of the mitochondrial outer membranes: the release of mitochondrial outer membrane stabilizing protein Hsp60 strongly correlated with serum markers of collagen I synthesis (PICP) and degradation (ICTP), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and inflammation (IL-6) (Table 5). The correlation data suggest that further presence of virus in myocardium will activate inflammation leading to increased release of Hsp60 and MMP9 activation. Our data show that chronic intramyocardial viral infection is able to induce processes initiating heart failure.

Table 5 Correlation of collagen I turnover markers in biopsy and serum samples.

	PICP in biopsy	ICTP in biopsy	MMP9 in biopsy	IL-6 in serum	hsCRP in serum
ICTP in biopsy	0.806**				
MMP9 in biopsy	0.283	0.385			
IL-6 in serum	0.572*	0.489	0.584*		
hsCRP in serum	0.913**	0.933**	0.527	0.576	
HSP60 in serum	0.641*	0.641*	0.646*	0.756**	0.591

Two tailed significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Significant correlations are in bold phase type. Abbreviations: PICP – type I procollagen carboxy-terminal propeptide; ICTP – type I collagen carboxyterminal telopeptide; MMP9 – matrix metalloproteinase 9; IL-6 – interleukin-6; hsCRP – high sensitivity C-reactive protein ; Hsp60 – heat shock protein 60.

4.1.5. Changes of released contraction-regulating proteins in virus-positive serums

The data show that the release of most tested intramyocardial apoptotic, inflammatory, and contraction-regulating proteins such as TGF- β 1, MMP9, TIMP1, hsTnT, galectin-3 and PICP/ICTP in virus-positive serums were reduced Table 4.

The decrease of collagen I synthesis biomarker (PICP) in serum was even significant (Fig. 22, $p < 0.05$). However, the level of collagen I synthesis (PICP) in biopsy inversely correlated with its level in serum, showing that further presence of viral infection will impair myocardial permeability (Fig. 23).

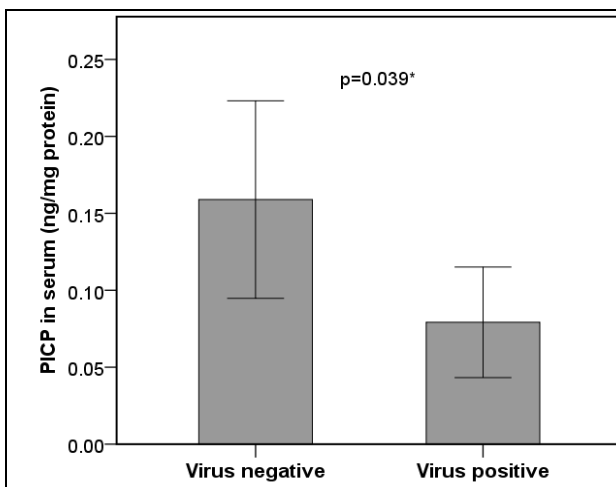


Fig. 22 Levels of collagen I synthesis biomarker (type I procollagen carboxy-terminal propeptide; PICP) in virus-negative and virus-positive serum samples. Data are presented as means \pm SEM and considered to be significant at * $p < 0.05$.

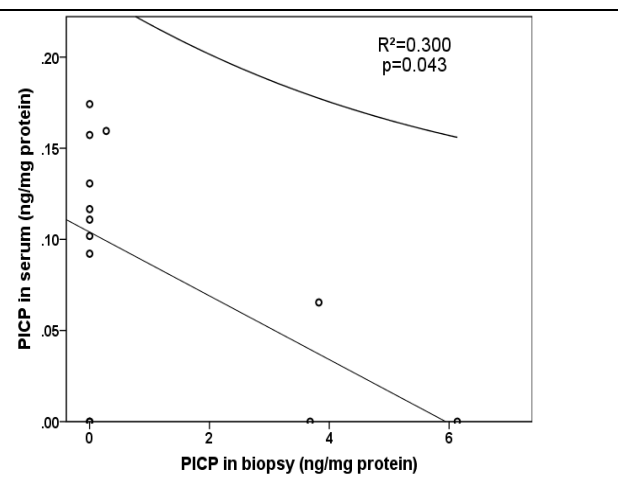


Fig. 23 Inverse correlation between distribution of collagen synthesis biomarker PICP (type I procollagen carboxy-terminal propeptide) in virus-positive patient group serum and biopsy samples. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

Additional correlation analysis showed that markers of apoptotic pathways, the intrinsic (Bcl-2 and caspase-9) and the extrinsic (FasL and caspase-8) also were strongly associated with the release of collagen I turnover biomarkers (Fig. 24 and Fig. 25).

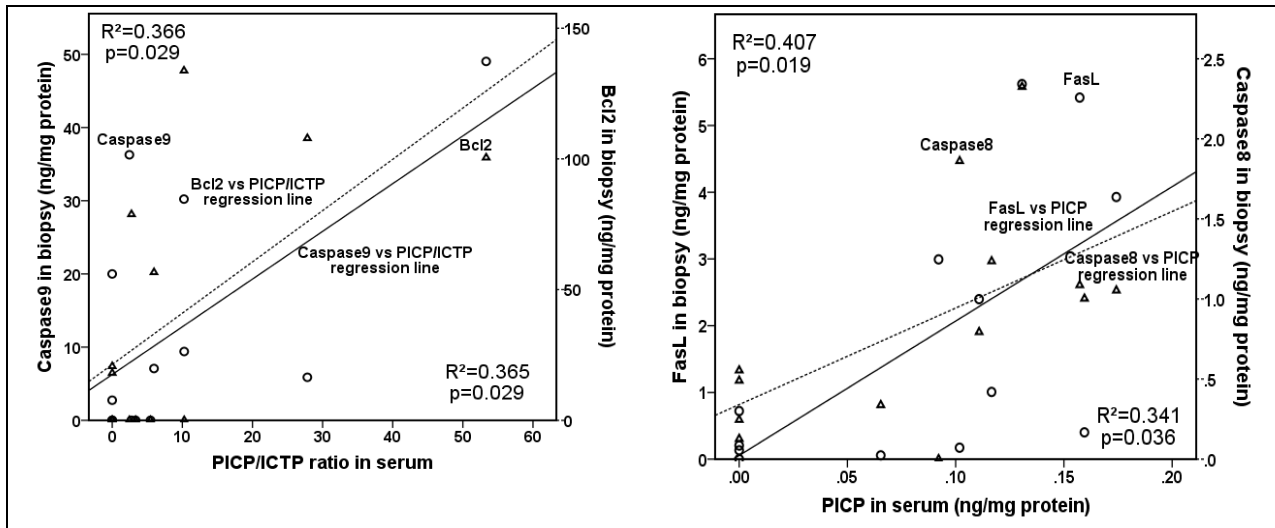


Fig. 24 Correlation analysis of contraction-regulating proteins in virus-positive patient group. Correlation of collagen synthesis/degradation biomarkers (PICP/ICTP) ratio in serum with the markers of intrinsic apoptotic pathway (Bcl-2 and caspase-9) in biopsies. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95% confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

Fig. 25 Correlation analysis of contraction-regulating proteins in virus-positive patient group. Correlation between the collagen I synthesis biomarker PICP with markers of the extrinsic apoptotic pathway (Fas ligand and caspase-8). Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95% confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

Data in Fig. 26 show that release of intracellular fibrosis-related proteins cardiac high-sensitivity troponin T (hsTnT) and galectin-3 into serum was also reduced. Moreover, galectin-3 significantly correlated with macrophage-secreted cytokines TNF- α and IL-6, suggesting possible its co-localization and secretion by infiltrated macrophages (Fig. 27).

The lower level of infiltrated macrophages and secreted cytokines TNF- α and IL-6 in tested samples can be a reason of lower serum level of galectin-3 (Fig. 14). The detection of intracellular proteins in plasma indicates the loss of integrity of cell membrane due to the acute myocardium and cardiovascular injuries. Considering this, data show that viral infection in tested samples is not acute but chronic and does not impair cell membrane permeability. However, the correlation analysis shows that prolonged intramyocardial viral infection will activate inflammation, cardiomyocyte apoptotic death and fibrosis leading to heart failure.

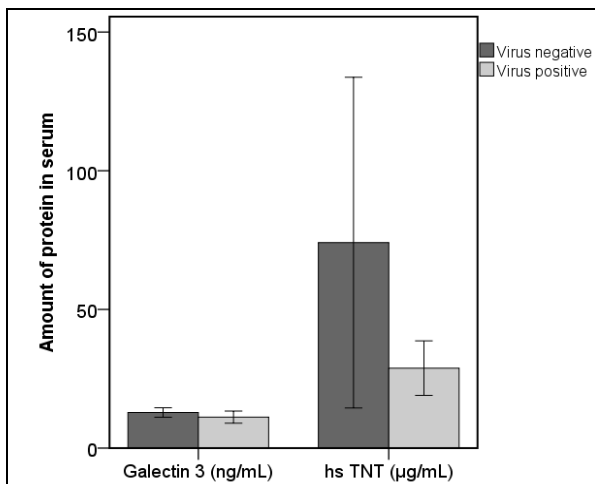


Fig. 26 Levels of the contraction-regulating proteins: cardiac high-sensitivity troponin T (hsTnT) and galectin-3 in serum samples. Data are presented as means \pm SEM.

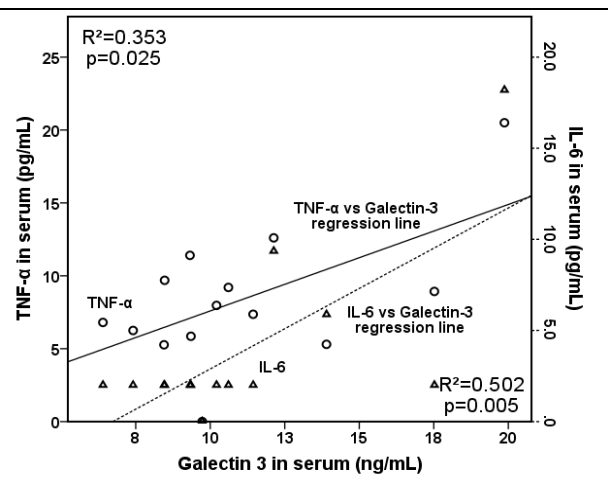


Fig. 27 Correlation of galectin-3 in serum with pro-inflammatory cytokines: tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

4.1.6. Other mechanisms regulating progression of viral DCM

In the last experiments, it was found that the serum levels of adipocytokine adiponectin and BNP in virus-positive serums were significantly (almost two fold) lower as compared to the virus-negative ones (Fig. 28 and Fig. 29; Table 3).

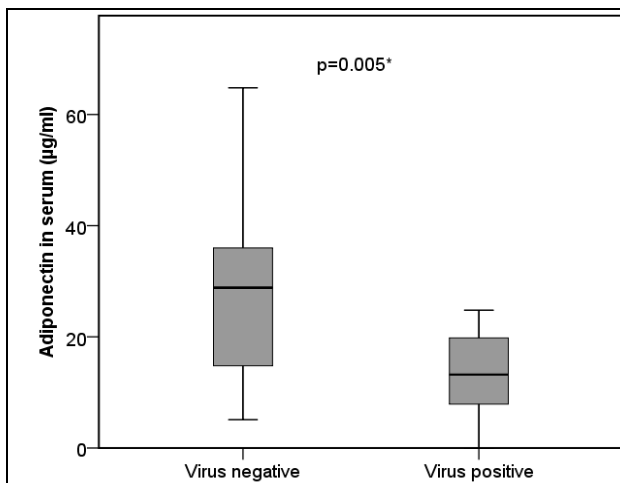


Fig. 28 Levels of adiponectin in virus-negative and virus-positive serum samples. Data are presented as means \pm SEM and considered to be significant at $*p < 0.05$.

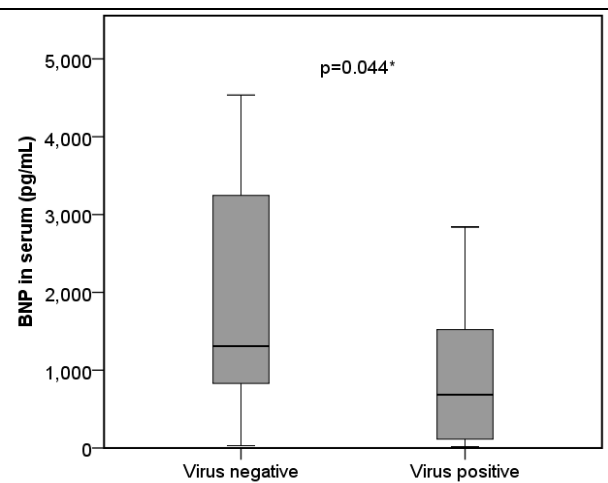


Fig. 29 Levels of brain natriuretic protein B (BNP) in virus-negative and virus-positive serum samples. Data are presented as means \pm SEM and considered to be significant at $*p < 0.05$.

A correlation analysis revealed that serum adiponectin significantly correlated with main regulator of collagen I transformed growth factor- β 1 (TGF- β 1) (Fig. 30) and brain natriuretic protein (BNP) (Fig. 31).

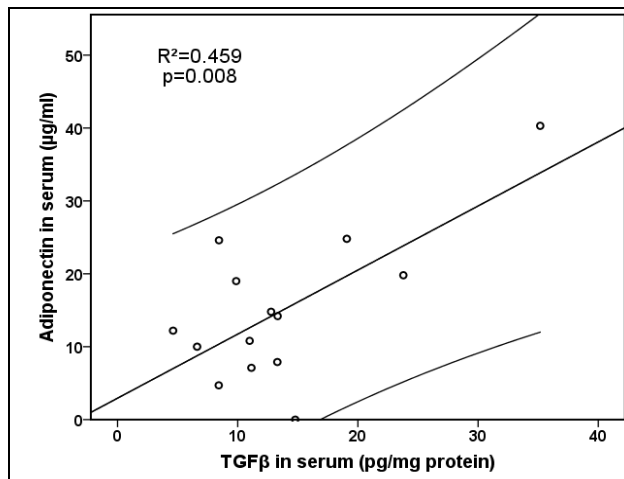


Fig. 30 Correlation analysis of additional markers in virus-positive patient serum samples. Correlation between adiponectin and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1). Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

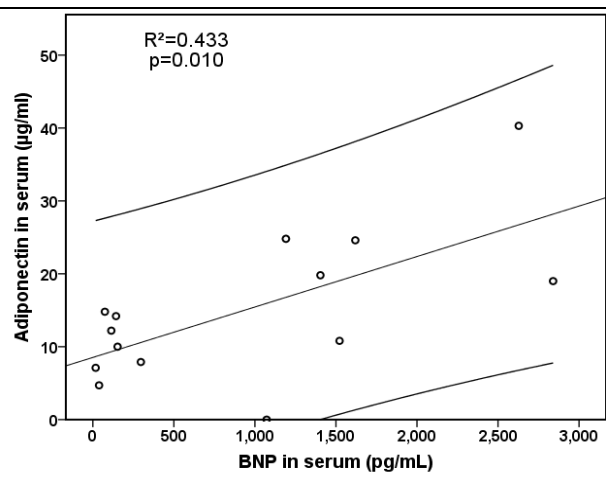


Fig. 31 Correlation analysis of additional markers in virus-positive patient serum samples. Correlation between adiponectin and brain natriuretic protein B (BNP). Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

Additionally, serum adiponectin significantly correlated with macrophages (CD68⁺) (Fig. 32), whereas BNP correlated with memory T cells (CD45Ro⁺) and T lymphocytes (CD3⁺) (Fig. 33). Serum TGF- β 1 also showed strong correlation with intramyocardial macrophages (CD68⁺, $R = 0.649$; $p = 0.022$) and MMP9 ($R = 0.689$; $p = 0.009$).

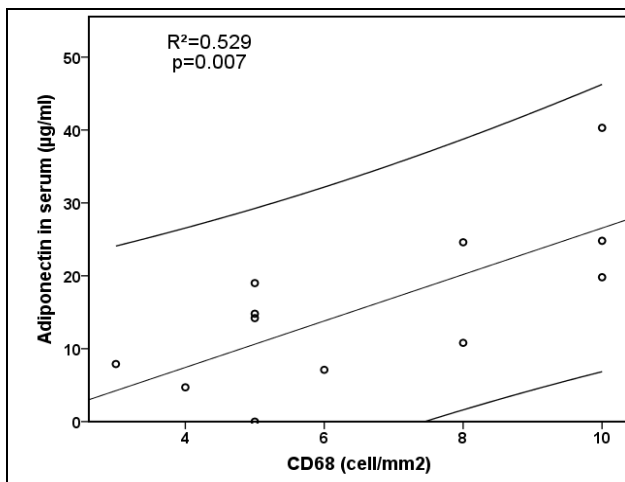


Fig. 32 Correlation analysis of additional markers in virus-positive patient group. Correlation between adiponectin in serum and infiltrated macrophages (CD68⁺) in cardiac biopsy. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

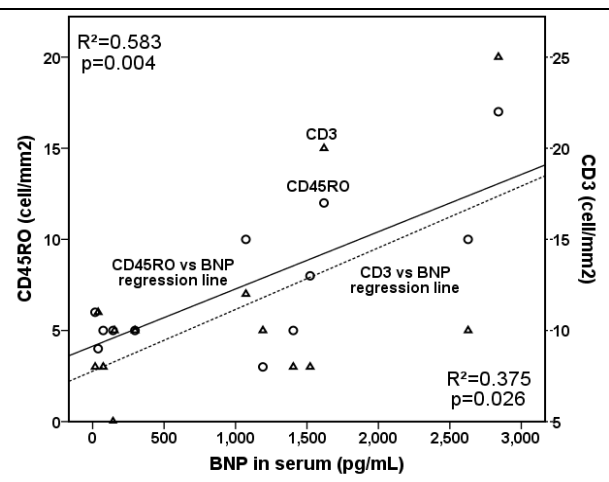


Fig. 33 Correlation analysis of additional markers in virus-positive patient group. Correlation of BNP in serum with T cells (CD3⁺) and T memory cells (CD45Ro⁺) in cardiac biopsies. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

Data of this section shows that increased intramyocardial inflammations due to sustained presence of viruses will upregulate levels of serum adiponectin and BNP leading to further activation of TGF- β 1, collagen synthesis and fibrosis. The main collagen I synthesis regulator, TGF- β 1, can be also activated directly by inflammation infiltrates, particularly macrophages. The sustained presence of the virus in the heart will increase inflammation leading to activation of fibrosis and heart failure.

4.2. Inflammation-positive DCM patient study group

4.2.1. Detection of inflammatory infiltrate in endomyocardial biopsy

Not only can the persistent presence of virus influence the inflammatory processes in myocardium. In most of the cases DCM is caused by inflammatory processes of unknown origin. Since it is always the goal to determine the origin of inflammation, (which is not always achieved), in this part of our study we have explored the molecular mechanisms dominating in the inflammatory DCM of unknown origin. The inflammatory process in the myocardium was determined by the presence of inflammatory infiltrates. From the immunohistochemically assessed inflammatory cells in EMB T lymphocytes (CD3⁺) was the most frequently detected cell (11.28 ± 1.21), followed by active-memory T lymphocytes (CD45Ro⁺) (8.29 ± 0.91) and macrophages (CD68⁺) (7.75 ± 0.85).

All patients were subdivided into two groups: inflammation-negative (n = 10) and inflammation-positive (n = 22) according to the presence of inflammatory infiltrate following the World Health Organization / International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies recommendations (Richardson, McKenna et al. 1996; Mahrholdt, Wagner et al. 2006; Kindermann, Kindermann et al. 2008).

4.2.2. Basic clinical parameters

Patient baseline characteristics for the study groups are shown in Table 6. No significant differences in distribution of sex, age and heart failure symptoms between the groups.

Heart failure is described as the symptomatic syndrome, graded according to the New York Heart Association (NYHA) functional classification (Dolgin 1994). Most of the patients enrolled to the study had moderate (NYHA III class 7 (70 %) patients in inflammation negative group, 15 (68 %) patients in inflammation positive group) or severe symptoms of cardiac insufficiency (NYHA IV class 2 (20 %) patients versus 7 (32 %) patients).

Table 6 Baseline characteristics of patients

Variable	Inflammation-negative group		Inflammation-positive group		p Value
	No. pts.	of Value	No. pts.	of Value	
Sex (male/female)	10	8 (80 %) / 2 (20 %)	22	17 (77 %) / 5 (33 %)	0.863 _χ
Age (years)	10	46.7 ± 5.87	22	42.36 ± 2.07	0.389
NYHA					
II	10	1 (10 %)	22	0 (0 %)	0.132 _χ
III	10	7 (70 %)	22	15 (68 %)	0.918 _χ
IV	10	2 (20 %)	22	7 (32 %)	0.491 _χ
Cardiac parameters					
LBBB (%)	10	3 (30 %)	22	5 (22.7 %)	0.659 _χ
Permanent AF (%)	10	2 (20 %)	22	0 (0 %)	0.000 _χ *
LVEF (%)	10	24.10 ± 2.28	22	23.05 ± 1.35	0.678
LVEDD (cm)	10	6.89 ± 0.17	22	6.89 ± 0.19	0.998
LVEDDI (cm/m ²)	10	3.68 ± 0.21	22	3.71 ± 0.09	0.847
Mean Ao (mmHg)	10	92.00 ± 3.95	22	86.06 ± 2.71	0.291
Mean RAP (mmHg)	10	16.22 ± 3.19	22	11.44 ± 1.74	0.164
Mean PCWP (mmHg)	10	25.00 ± 2.79	22	23.45 ± 2.70	0.731
Mean PAP (mmHg)	10	34.89 ± 4.33	22	32.95 ± 3.24	0.734
CI (L/min/m ²)	10	2.38 ± 0.33	22	2.2 ± 0.14	0.573

Data are presented as the means ± SEM. * Significant at 0.05 level. _χ Chi-square test. Abbreviations: NYHA – New York Heart Association functional class; LBBB – left bundle branch block; AF – atrial fibrillation; LVEF – left ventricular ejection fraction; LVEDD – left ventricular end-diastolic diameter; LVEDDI – left ventricular end-diastolic diameter index; Ao – aortic; RAP – right atrial pressure; PCWP – pulmonary capillary wedge pressure; PAP – pulmonary artery pressure; CI – cardiac index.

The prevalence of atrial fibrillation (AF) was significantly higher in inflammation negative group compared to inflammation positive 2 (20 %) versus 0 (0 %) respectively, $p < 0.001$, which might be explained by a lower degree of fibrosis (Fig. 44) in the former group (Table 1). There was no significant difference noticed in the prevalence of left bundle branch block on ECG among the groups 3 (30 %) versus 5 (22 %), $p = 0.659$.

Generally, main parameters of echocardiography demonstrated characteristic signs of DCM: reduced left ventricular ejection fraction (LVEF), dilatation of left ventricular. However, there were no significant differences in these parameters between the groups: LVEF 24.10 ± 2.2 % versus 23.05 ± 1.3 %, left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) 6.89 ± 0.17 cm versus 6.89 ± 0.19 cm, left ventricular end-diastolic diameter index (LVEDDI) 3.68 ± 0.21 cm/m² versus 3.71 ± 0.09 cm/m².

Cardiac catheterization was performed to assess the severity of hemodynamic impairment. Although, hemodynamic parameters did not differ significantly between the groups, the average values of pulmonary artery pressure (PAP) in both groups: $34.89 \pm$

4.33 mmHg versus 32.95 ± 3.24 mmHg, $p = 0.734$) were increased, which confirms pulmonary hypertension (PH) diagnosis (PH is confirmed when the mean PAP is ≥ 25 mmHg at rest (Badesch, Champion et al. 2009)). Elevated mean pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) (>15 mmHg) among the groups 25.00 ± 2.79 mmHg versus 23.45 ± 2.70 mmHg, $p = 0.731$ shows post-capillary PH due to left heart impairment (Simonneau, Robbins et al. 2009). Elevated mean right atrial pressure (RAP), elevated mean PAP and decreased cardiac index (CI) in both groups indicate a worse prognosis (D'Alonzo, Barst et al. 1991).

Both patient groups received the same basic treatment according to guidelines (Table 7) (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008; Dickstein, Vardas et al. 2010; McMurray, Adamopoulos et al. 2012). No significant difference in prescribed medication was observed between the groups.

Table 7 Basic treatment for the study patient groups (according ESC guidelines).

<i>Conventional treatment of heart failure</i>	<i>Inflammation-negative group</i>	<i>Inflammation-positive group</i>
ACE inhibitors	5 (50 %)	10 (46 %)
β -blockers	10 (100 %)	19 (87 %)
Digitalis (in atrial fibrillation)	2 (20 %)	7 (32 %)
Diuretics	10 (100 %)	22 (100 %)
Anticoagulation (atrial fibrillation, EF < 40 %)	7 (70 %)	15 (68 %)
Antiarrhythmics (class III: amiodarone)	1 (10 %)	5 (23 %)
Interventions		
Implantable cardiac defibrillator (ICD)	1 (10 %)	0 (0 %)
Cardiac resynchronization therapy (CRT)	1 (10 %)	3 (14 %)

4.2.3. Inflammatory markers in dilated cardiomyopathy

The inflammatory process was monitored by detecting CD3⁺, CD45Ro⁺ and CD68⁺ expression in inflammatory infiltrates by immunohistochemistry. In addition, we determined the inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β . Representative immunohistochemical micrographs show expression of CD3⁺, CD45Ro⁺ and CD68⁺ from individual inflammatory DCM patients (Fig. 34, Fig. 35 and Fig. 36).

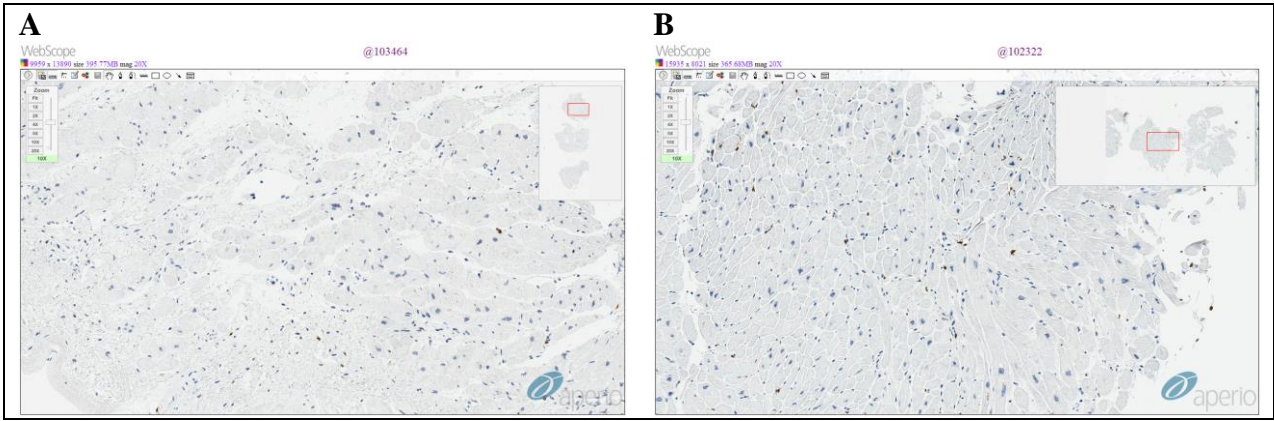


Fig. 34 Inflammatory infiltrate in right ventricular EMB represented by CD3⁺ cells (T lymphocytes). (A) inflammation-negative (CD3⁺ = 3 cell/mm²); (B) inflammation-positive (CD3⁺ = 20 cell/mm²). Immunohistochemical staining was performed using anti-CD3 antibodies. Magnification: x10.

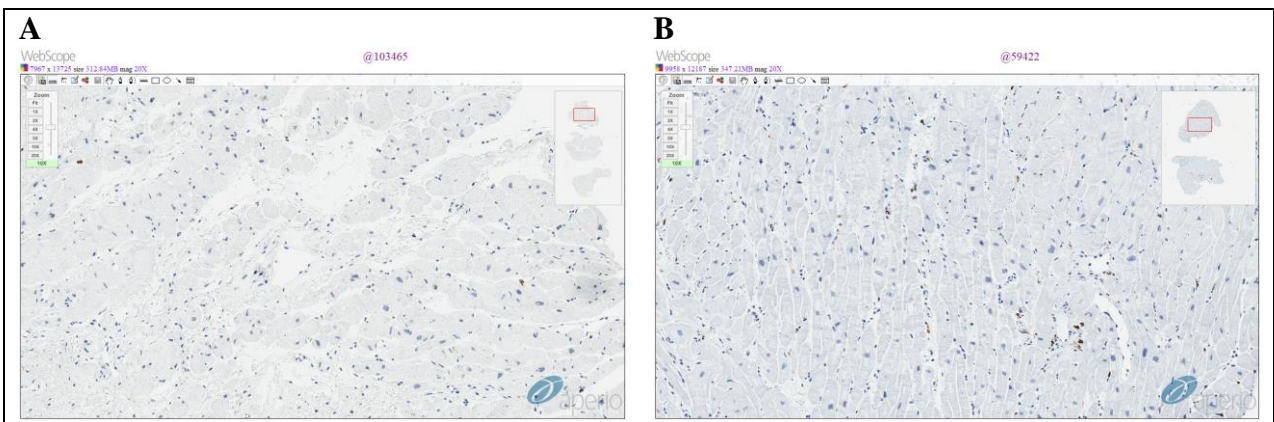


Fig. 35 Inflammatory infiltrate in right ventricular EMB by CD45Ro⁺ cells (active-memory T lymphocytes). (A) inflammation-negative (CD45Ro⁺ = 3 cell/mm²); (B) inflammation-positive (CD45Ro⁺ = 17 cell/mm²). Immunohistochemical staining was performed using anti-CD45Ro antibodies. Magnification: x10.

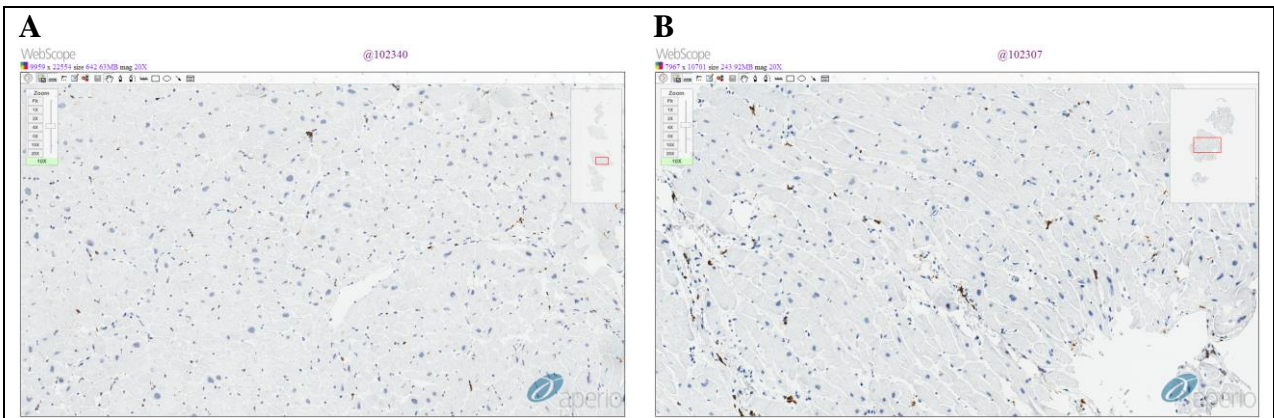


Fig. 36 Inflammatory infiltrate in right ventricular EMB by CD68⁺ cells (macrophages). (A) inflammation-negative (CD68⁺ = 5 cell/mm²); (B) inflammation-positive (CD68⁺ = 20cell/mm²). Immunohistochemical staining was performed using anti-CD68 antibodies. Magnification: x10.

Total expression of cytokines in infiltrates from inflammatory-negative and inflammatory-positive groups is shown in Fig. 37. The inflammatory infiltrates mostly

upregulated in inflammatory DCM patients were: T-lymphocytes (CD3⁺) and active memory T-lymphocytes (CD45Ro⁺) (2.38-fold and 2.1; $p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively), whereas the macrophages (CD68⁺) were only enhanced 1.63 fold (Fig. 38). Significant accession of CD3⁺ and CD45Ro⁺ in inflammatory DCM myocardium also suggests increased myocardial micro-vascular permeability.

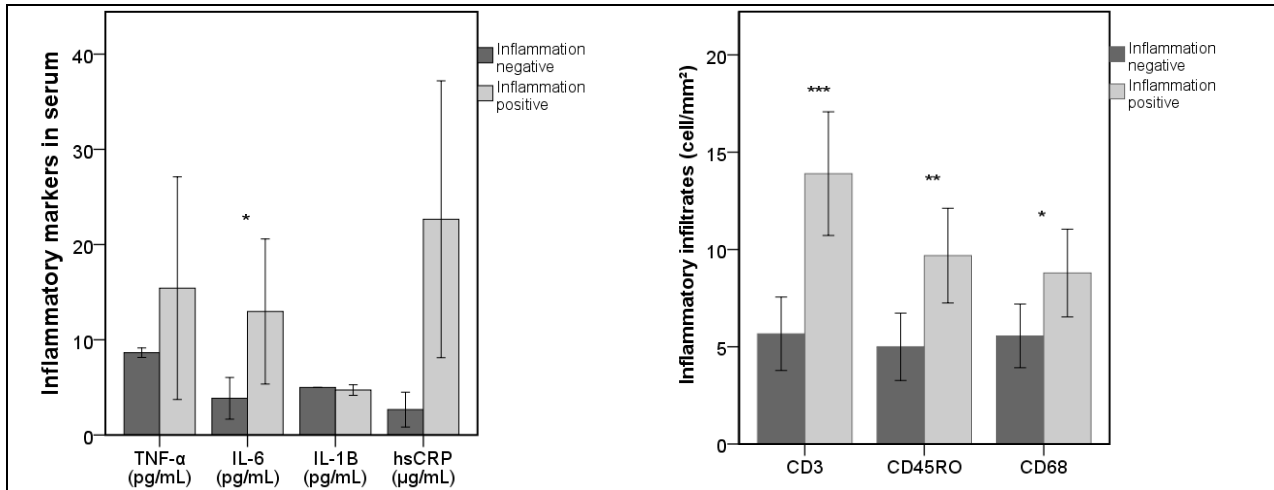


Fig. 37 Levels of the inflammatory markers in serum. ELISA data are presented as means \pm SEM from at least three independent measurements. Data were considered significant at * $p < 0.05$.

Fig. 38 Levels of the inflammatory infiltrates in biopsy. Immunohistochemically positive stained cell count data are presented as means \pm SEM from at least three independent locations, evaluated by highly experienced pathologist. Data were considered significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Data in Table 8 summarize the upregulation of specific and general inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), respectively, in inflammatory DCM serum samples (3.45, and 2.76 folds). The mean value of the inflammatory cytokine IL-6 was three times increased in inflammatory DCM serum samples ($p < 0.05$). The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) level in inflammatory-positive DCM serum samples was approximately two folds enhanced compared to non-inflammatory DCM patients, suggesting its possible activation of caspase-8 (Table 8). Interleukin-1beta (IL-1 β), also known as catabolin, did not show significant changes in serum samples.

4.2.4. Changes of apoptotic biomarkers in inflammatory DCM samples

Correlation analysis of inflammatory cytokines and other secreted biomarkers pointed to importance of the intrinsic apoptotic mechanism in inflammatory DCM. Data presented in Fig. 39 show significant correlation between CD3⁺ and IL-6.

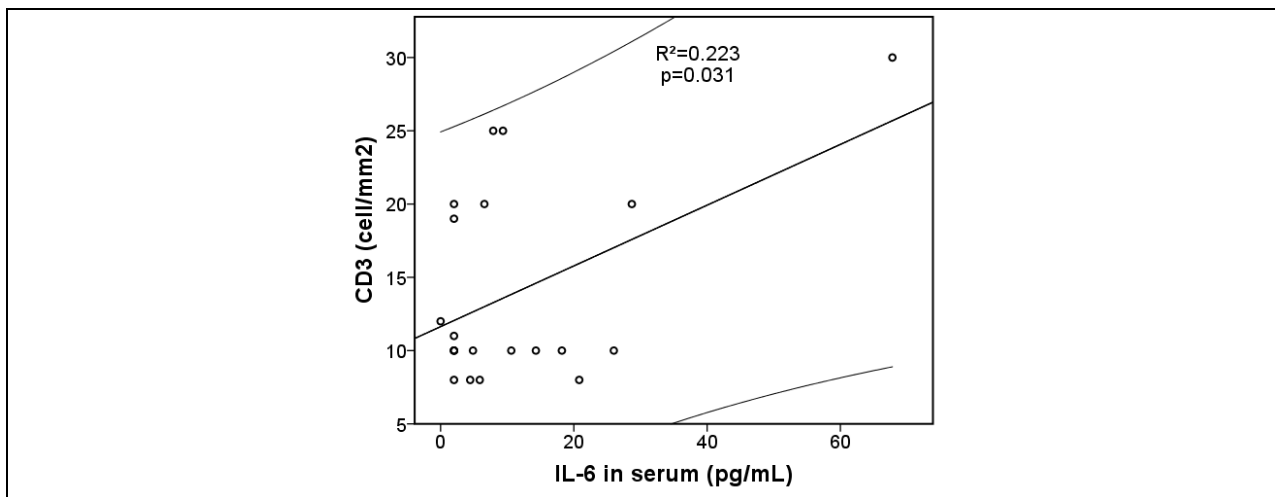


Fig. 39 Correlation between inflammatory and mitochondrial membrane destabilization markers in inflammation-positive patient group. Correlation between serum inflammatory cytokine IL-6 and CD3⁺ cell count on EMB. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

Moreover, significant correlation of IL-6 and hsCRP with the mitochondrial chaperonic protein Hsp60 and pro-apoptotic Bax, respectively, in serums suggests that myocardial inflammation mostly affected integrity of mitochondrial membranes and activated Bax-dependent apoptotic pathway (Fig. 40 and Fig. 41).

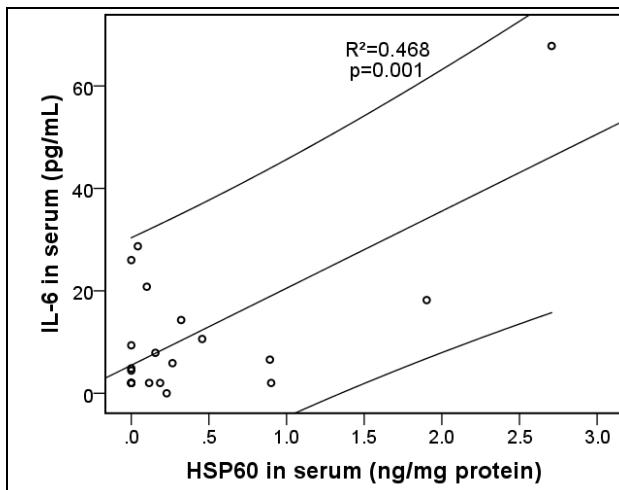


Fig. 40 Correlation between inflammatory and mitochondrial membrane destabilization markers in inflammation-positive patient group. Correlation between IL-6 and mitochondrial membrane stabilizing chaperone Hsp60 in serums. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

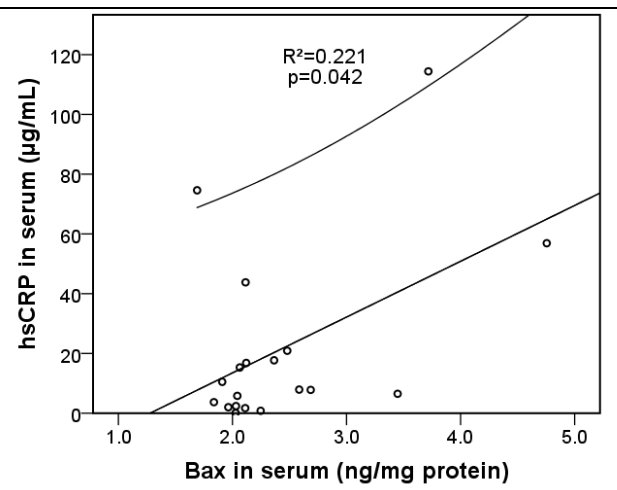


Fig. 41 Correlation between inflammatory and mitochondrial membrane destabilization markers in inflammation-positive patient group. Correlation between high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and Bax in serums. Correlation was significant at a level of $p < 0.05$. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Regression coefficients (R^2) are shown in the graphs.

Additionally, the levels of the mitochondrial membrane stabilizing protein Bcl-2 and Hsp60 in inflammatory-positive serums were 1.86 and 8.97 ($p < 0.05$) folds higher, respectively, supporting the theory of increased permeability of both outer mitochondrial and myocardial cell plasma membranes in inflammatory DCM (Table 8). In parallel, Bcl-2 in inflammatory DCM biopsies was depressed 1.34 fold, whereas Bax was 1.22 fold increased, revealing activation of the Bcl-2/Bax-dependent apoptotic pathway (Table 8). Parallely, the level of APO1/Fas/CD95 (FasR), a main receptor of the extrinsic apoptotic pathway, was only slightly increased in serum and biopsy samples from inflammatory DCM patients, whereas Fas ligand (FasL) in biopsies was even down-regulated (Table 8).

Data presented in Fig. 42 demonstrate statistically significant ($p < 0.05$) increase of caspase-9, -8 and -3 in serums with most prominent expression of caspase-9. Increased expression of the same caspases in endomyocardial biopsy samples (Fig. 43) was not statistically significant due to high variation. However, the basic mean value of caspase-9 in inflammatory DCM patients was 31 and 118 folds higher compared to caspase-8 and -3, respectively, additionally pointing on the higher role of intrinsic apoptotic pathway in inflammatory DCM (Fig. 43).

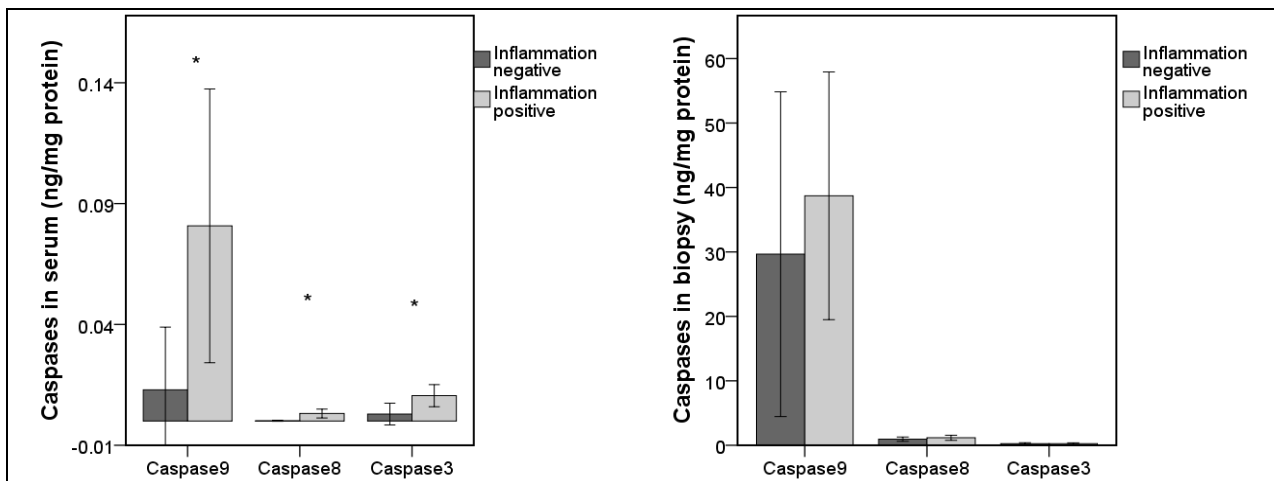


Fig. 42 Levels of pro-caspases-9, -8, and -3 in serum samples. Data are presented as means \pm SEM from at least three independent measurements. Data were considered significant at * $p < 0.05$.

Fig. 43 Levels of pro-caspases-9, -8, and -3 in EMB samples. Data are presented as means \pm SEM from at least three independent measurements.

Table 8 Summarized data of measured biomarkers.

<i>Variable</i>	<i>Inflammation-negative group</i>		<i>Inflammation-positive group</i>		<i>p Value</i>
	No. of pts.	Value	No. of pts.	Value	
Markers of inflammation in serum					
TNF- α (pg/mL)	8	7.9313 \pm 0.5106	21	14.2819 \pm 5.0280	0.223
IL-6 (pg/mL)	8	3.3938 \pm 0.8554	21	11.4038 \pm 3.3614	0.031*
IL-1 β (pg/mL)	8	5.0000 \pm 0.0000	21	4.7619 \pm 0.2381	0.329
hsCRP (μ g/mL)	8	7.6875 \pm 5.0460	19	21.5563 \pm 6.9633	0.066 _j
Markers of apoptosis in serum					
Bcl2 (ng/mg protein)	10	0.0288 \pm 0.0288	22	0.0536 \pm 0.0455	0.889 _j
Bax (ng/mg protein)	10	2.1527 \pm 0.2400	22	2.3354 \pm 0.1606	0.535
Caspase-9 (ng/mg protein)	10	0.0130 \pm 0.0013	22	0.0808 \pm 0.0283	0.038*
Caspase-8 (ng/mg protein)	10	0.0010 \pm 0.0001	22	0.0031 \pm 0.0009	0.043* _j
Caspase-3 (ng/mg protein)	10	0.0029 \pm 0.0022	22	0.0105 \pm 0.0023	0.025*
APO1/Fas/CD95 (ng/mg protein)	10	0.0000 \pm 0.0000	22	0.0000 \pm 0.0000	0.857 _j
FasL (ng/mg protein)	10	0.0000 \pm 0.0000	22	0.0000 \pm 0.0000	N.A.
HSP60 (ng/mg protein)	10	0.0419 \pm 0.0253	22	0.3760 \pm 0.1468	0.035*
Markers of apoptosis in biopsy					
Bcl2 (ng/mg protein)	10	83.5523 \pm 26.2936	21	63.8790 \pm 17.2137	0.540
Bax (ng/mg protein)	10	5.6452 \pm 2.6905	21	6.8873 \pm 3.7924	0.724 _j
Caspase-9 (ng/mg protein)	10	29.6575 \pm 12.5969	21	38.7122 \pm 9.6108	0.950 _j
Caspase-8 (ng/mg protein)	10	0.9483 \pm 0.1640	21	1.1611 \pm 0.1962	0.413
Caspase-3 (ng/mg protein)	10	0.2503 \pm 0.0773	21	0.2586 \pm 0.0649	0.935
APO1/Fas/CD95 (ng/mg protein)	10	3.4651 \pm 0.6568	21	4.1921 \pm 0.6607	0.443
FasL (ng/mg protein)	10	4.5550 \pm 1.3594	21	4.0588 \pm 1.1083	0.780
HSP-60 (ng/mg protein)	10	24.1262 \pm 6.9102	21	19.2656 \pm 4.5617	0.565
Marker of heart tissue contraction in serum					
hsTnT (pg/mL)	8	35.4988 \pm 9.0908	20	66.4145 \pm 26.9755	0.289
Markers of extracellular matrix degradation in serum					
MMP9 (ng/mg protein)	10	1.3867 \pm 0.0674	22	1.5261 \pm 0.0508	0.115
TIMP1 (ng/mg protein)	10	5.9610 \pm 0.3597	22	6.1223 \pm 0.1497	0.686
MMP9/TIMP1	10	0.2355 \pm 0.0090	22	0.2511 \pm 0.0086	0.223
Markers of extracellular matrix degradation in biopsy					
MMP9 (ng/mg protein)	10	2.3698 \pm 1.1931	21	2.7630 \pm 0.9394	0.798
TIMP1 (ng/mg protein)	10	9.4917 \pm 1.7605	21	7.8056 \pm 1.4029	0.462
MMP9/TIMP1	10	0.1931 \pm 0.0729	21	0.4760 \pm 0.1048	0.035*
Other measurements					
BNP (pg/mL)	10	1277.8500 \pm 428.5054	22	1603.2591 \pm 276.3777	0.532
Adiponectin (μ g/mL)	8	24.1000 \pm 3.5914	21	22.9048 \pm 3.5287	0.815
Galectin-3 (ng/mL)	10	12.4670 \pm 1.9009	22	12.3895 \pm 0.8635	0.971
Cardiac fibrosis (%)	10	15.8447 \pm 2.6319	22	14.5632 \pm 1.9258	0.699

Data are presented as the means \pm SEM. * Significant at 0.05 level. _j Wilcoxon–Mann–Whitney rank sum nonparametric test. Abbreviations: TNF- α —tumor necrosis factor α ; IL-6 – interleukin-6; IL-1 β – interleukin 1 β ; Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 protein; Bax – Bcl-2-associated X protein; Hsp60 – heat shock protein 60; MMP9 – matrix metalloproteinase 9; TIMP1 – tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1; TNF-a – tumor necrosis factor-alfa; IL-1 β – interleukin 1 beta; IL-6 – interleukin 6; hs TnT – high sensitivity troponin T; hsCRP – high sensitivity C-reactive protein, N.A. – not available.

4.2.5. Induction of necrosis in inflammatory DCM samples

The mean value of the high-sensitivity troponin T (hsTnT), a major structural sarcomeric protein in the heart, was two folds upregulated in serums of inflammatory-positive patient group (Table 8). The release of hsTnT from the myocardium revealed chronic structural and functional degradation of myocardium that corresponded to a decreased level of fibrosis in inflammatory DCM biopsies (Fig. 44 and Fig. 45).

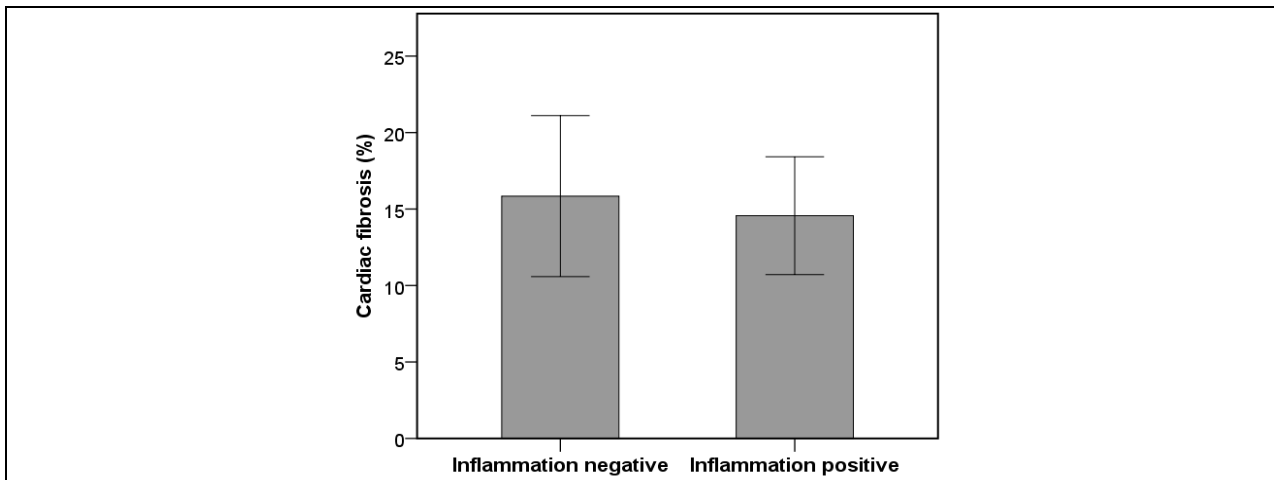


Fig. 44 Cardiac fibrosis in right ventricular EMB. Data are presented as means \pm SEM from at least three independent measurements.

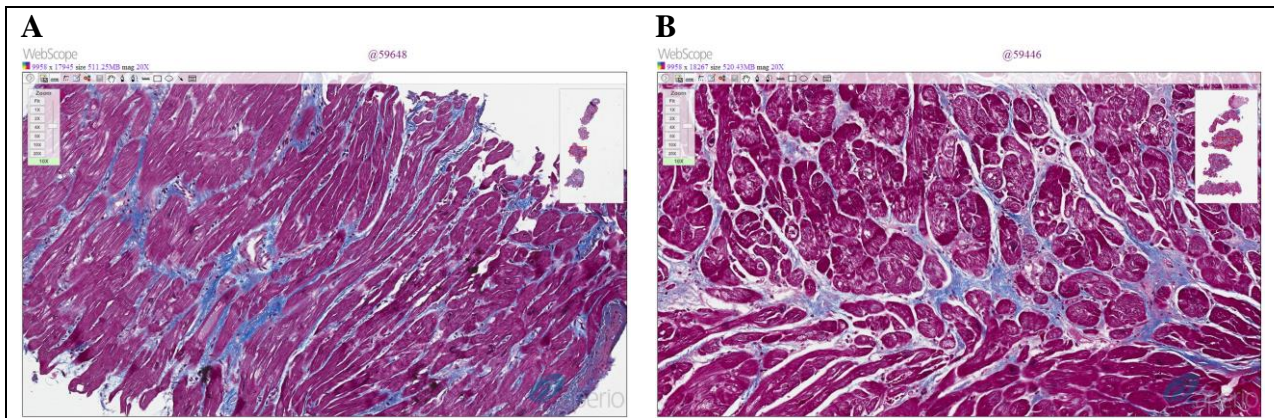


Fig. 45 Micrographs show one representative picture from one patient of each group. (A) inflammation-negative (quantified fibrosis – 20.34 %); (B) inflammation-positive (quantified fibrosis – 18.65 %). Masson trichrome staining for cardiac fibrosis (collagen is colored blue). High amounts of collagen reflect a high level of fibrosis. Magnification: x10.

Additionally, there was no necrosis in the samples assayed by histological analysis in myocardial biopsies (Fig. 46). The two fold of hsTnT upregulation in tested inflammatory DCM serums suggests a steady hsTnT release and slow impairment of striated muscle contraction rather than induction of necrosis in inflammatory DCM.

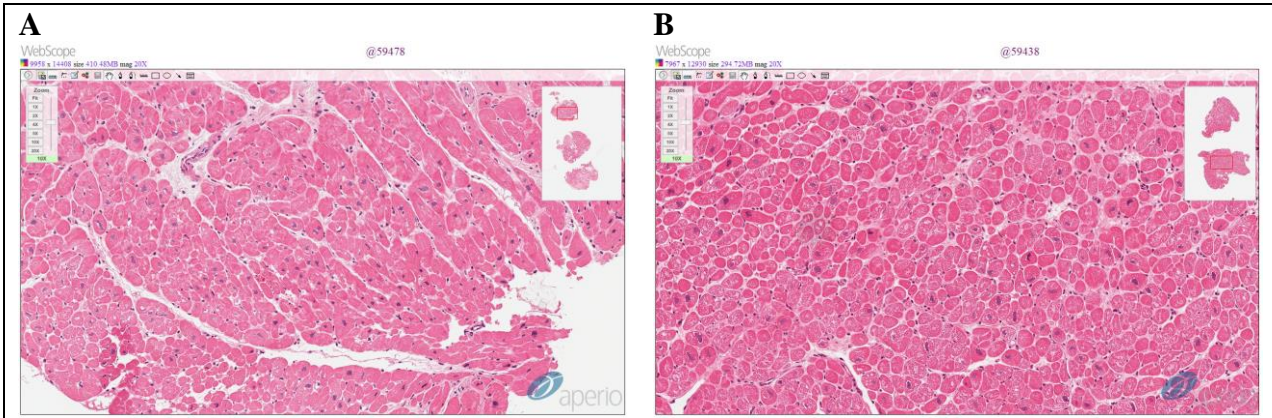


Fig. 46 Inflammation representation in right ventricular EMB. Micrographs show one representative picture from one patient of each group. (A) inflammation-negative; (B) inflammation-positive. Hematoxylin and Eosin staining. Magnification: x10.

4.2.6. The interaction between apoptotic pathways supporting progression of inflammatory DCM

Data in Fig. 47 demonstrate that caspase-9, a serum cysteine-aspartic acid specific protease, named apoptosis-initiating caspase, strongly correlated with the general inflammatory marker high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) additionally confirming sensitivity of intrinsic apoptotic pathway to inflammation.

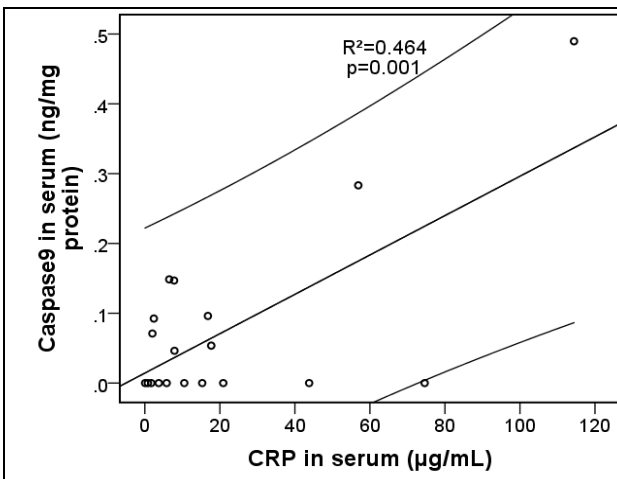


Fig. 47 Correlation of caspase-9 with biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-9 with high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

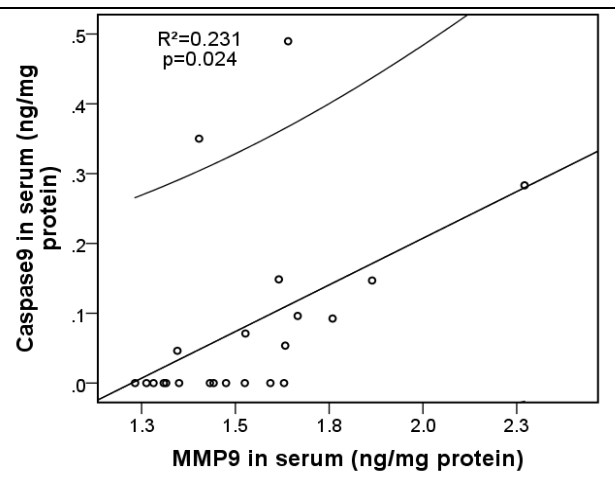


Fig. 48 Correlation of caspase-9 with biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-9 with matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

In parallel, the correlation between caspase-9 and MMP9 (Fig. 48) tells us that caspase-9 might either be directly activated by the MMP9 or, alternatively, through other mediators of intrinsic apoptotic pathways, such as Bcl-2 and Bax (Fig. 49 and Fig. 50; $p < 0.05$).

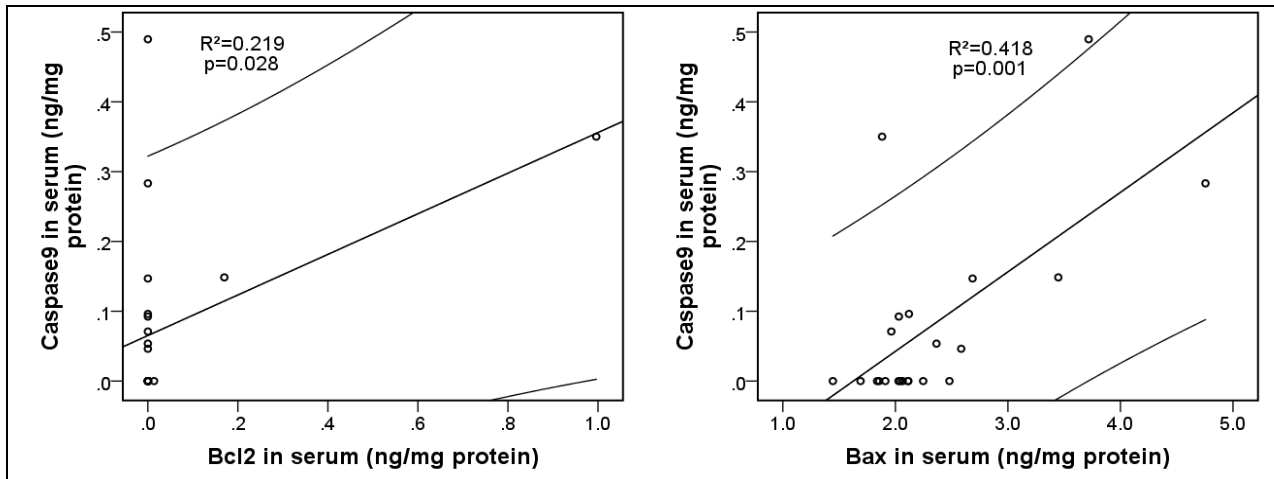


Fig. 49 Correlation of caspase-9 with biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-9 with B-cell lymphoma 2 protein (Bcl-2) in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

Fig. 50 Correlation of caspase-9 with biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-9 with Bcl-2-associated X protein (Bax) in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

Data in Fig. 51 and Fig. 52 also demonstrate that intrinsic apoptotic pathway-initiating caspase-9 is not the only caspase participating in regulation of myocardium destruction. A strong correlation ($p < 0.05$) between caspase-9 and executing caspase-3, and extrinsic apoptotic pathway-initiating caspase-8 suggest an interaction between intrinsic and extrinsic apoptotic pathways.

Furthermore, Fig. 53 shows a statistically significant correlation between main players of extrinsic apoptotic pathway caspase-8 and the APO1/Fas/CD95 in inflammatory DCM serums. The significant correlation between caspase-8 and Bax additionally confirms the intersection of extrinsic and intrinsic pathways at mitochondrial level with particular role of pro-apoptotic Bax in it (Fig. 54).

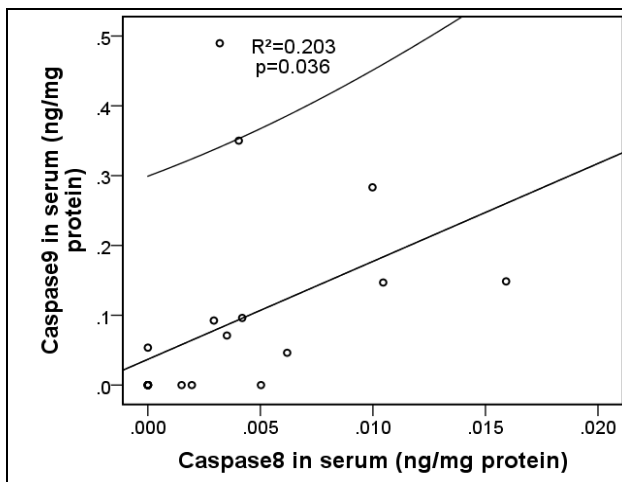


Fig. 51 Correlation of caspase-9 with biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-9 with Caspase-8 in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

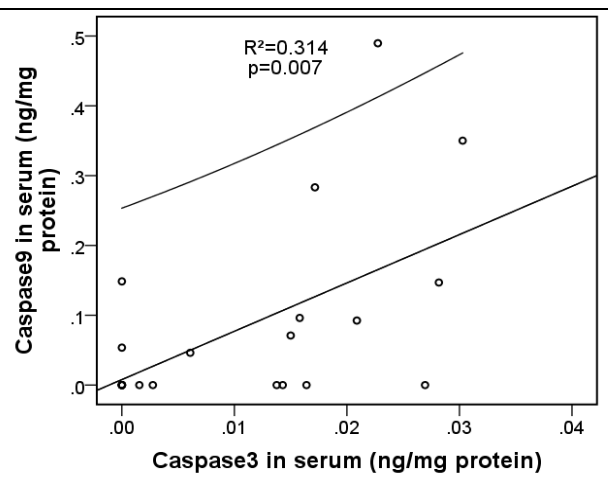


Fig. 52 Correlation of caspase-9 with biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-9 with Caspase-3 in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

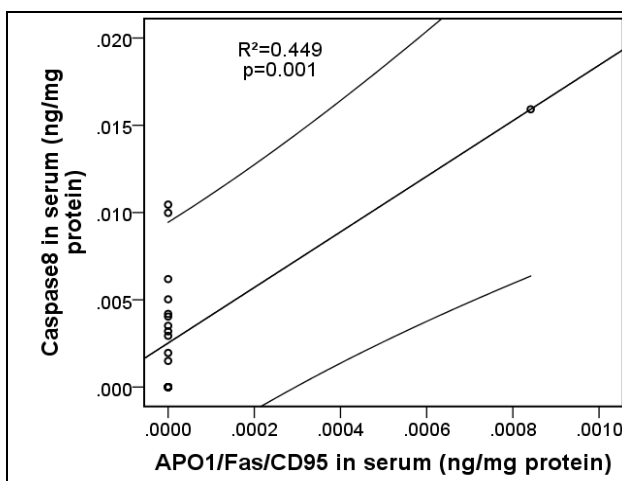


Fig. 53 Correlation between caspase-8 and biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-8 with Fas receptor (APO1/Fas/CD95) in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

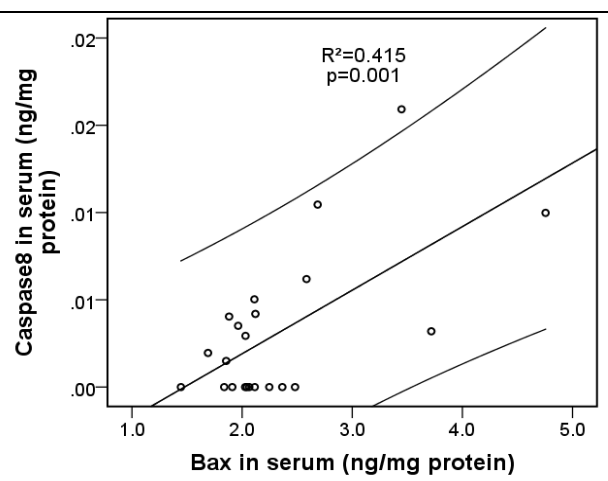


Fig. 54 Correlation between caspase-8 and biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-8 with Bcl-2-associated X protein (Bax) in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

Additionally, a correlation between caspase-8 and MMP9, similarly to caspase-9, suggested an involvement of matrix metalloproteinases, in direct pro-caspases' activation and/or in the relocation of proapoptotic proteins into the extracellular space (Fig. 55).

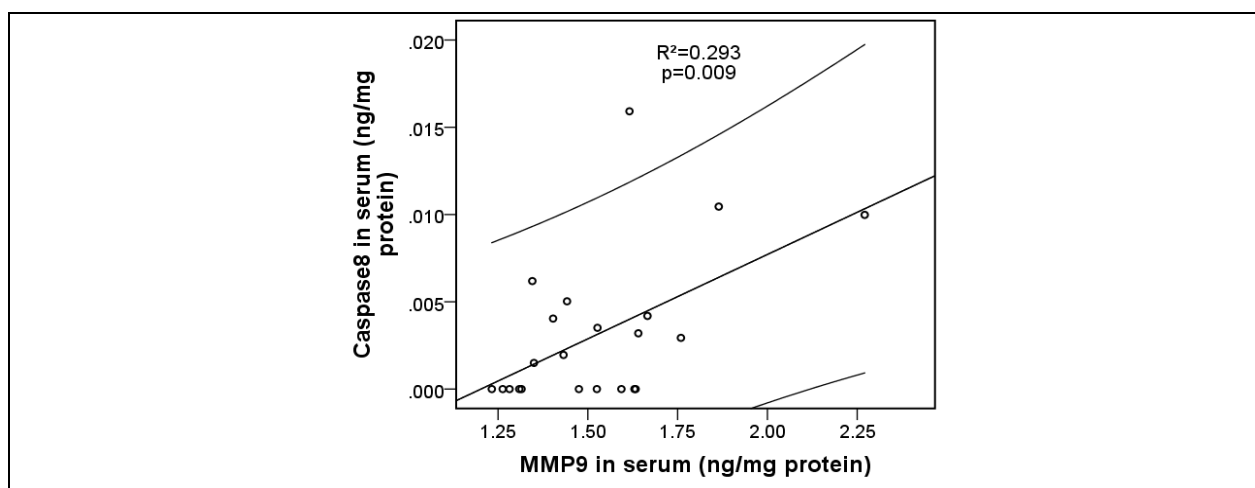


Fig. 55 Correlation between caspase-8 and biomolecules in inflammation-positive patient group serum samples. Correlation of caspase-8 with matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in serum samples. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval. Coefficients of regression (R^2) and statistical significance ($p < 0.05$) are shown in the graphs.

4.2.7. The expression of apoptotic biomarkers in myocardial tissue

Next, it was investigated if secretion of apoptotic biomarkers to the blood reflects similar processes in inflammatory DCM myocardium. Caspase-9 in heart tissue, similarly to that in serum, had a high correlation with inflammation, particularly inflammatory cytokine IL-6, whereas caspase-8 showed more prominent correlation with Bax and caspase-3 (see caspase-8 and -9 correlations in Table 9). An executing caspase-3 demonstrated a significant correlation with activators of both intrinsic (Bax, Bcl-2) and extrinsic (APO1/Fas/CD95 and FasL) pathways (see caspase-3 correlation in Table 2). Similarly to serums, members of both apoptotic pathways (Bcl-2, and APO1/Fas/CD95, FasL) in biopsies had significant correlation with MMP9 and its inhibitor TIMP1 (Table 9). We also observed a strong ($p < 0.001$) correlation between changes of Bax in biopsies and Bax in sera (data not shown). Finally, the sarcomeric protein hsTnT in inflammatory DCM sera also strongly correlated with caspases-8, Bax and caspase-3 in biopsies, suggesting the present apoptotic pathway to be mostly involved in caspase-regulated release of hsTnT (see hsTnT correlation in Table 9).

Table 9 Correlation of apoptotic, necrotic and inflammatory biomarkers.

	Caspase 9 in biopsy	Caspase 8 in biopsy	Caspase 3 in biopsy	Bcl2 in biopsy	FasR in biopsy	FasL in biopsy	Bax in biopsy
Caspase 8 in biopsy	0.303						
Caspase 3 in biopsy	0.063	0.436*					
Bcl2 in biopsy	-0.202	0.175	0.486*				
FasR in biopsy	-0.097	-0.074	0.526*	0.739**			
FasL in biopsy	-0.046	0.007	0.442*	0.835**	0.907**		
MMP9 in biopsy	-0.229	0.024	0.419	0.764**	0.730**	0.824**	
TIMP1 in biopsy	-0.012	-0.205	0.213	0.517*	0.795**	0.722**	
Bax in biopsy	0.283	0.584**	0.678**	0.056	0.139	0.053	
IL-6 in serum	0.518*	-0.016	-0.011	-0.262	-0.202	-0.154	0.131
hsTnT in serum	0.434	0.598**	0.563*	-0.125	-0.067	-0.165	0.954**

Two tailed significance: *p < 0.05; **p < 0.01. Significant correlations are in bold phase type. Abbreviations: IL-6 – interleukin-6; Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 protein; FasR—Fas receptor; FasL – Fas ligand; MMP9 – matrix metalloproteinase 9; TIMP1 – tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1; Bax – Bcl-2–associated X protein; Hsp60 – heat shock protein 60; hsTnT – high sensitivity troponin T.

4.3. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology

A total of 116 slides were analyzed digitally, by visual scoring and using stereology grids.

The mean result of fibrosis obtained by Colocalization software was 13.72 ± 1.14 % being closest to the reference value of stereology (RVS: 13.21 ± 1.42 %). The mean values obtained by the Genie software (11.60 ± 1.43 %) and the pathologist's score at week 0 (11.20 ± 1.44 %) and week 2 (10.76 ± 1.61 %) indicated a slight underestimation relative to RVS. However, the range of Colocalization software was 73.79 % being the lowest of all tested methods with a difference of around 20 %. The range of the Genie software was 88.22 % and the pathologist's score had the highest range of 100 %. These results were comparable to the range of the RVS (96.50 %), Table 10.

Table 10 Summary statistics for cardiac fibrosis (%) evaluation methods.

	Stereology	Colocalization	Genie	Pathologist week 0	Pathologist week 2
Number of observations	116	116	116	116	116
Mean	13.21	13.72	11.60	11.20	10.76
Median	8.70	11.12	7.39	5.00	5.00
Std. Error of Mean	1.42	1.14	1.43	1.44	1.61
Range	96.50	73.79	88.22	100.00	100.00
Minimum	0.00	1.57	0.05	0.00	0.00
Maximum	96.50	75.36	88.27	100.00	100.00

Both the Colocalization and Genie methods correlated very strongly with the RVS cardiac fibrosis estimates, yielding $R = 0.928$ and $R = 0.946$ ($p < 0.001$), respectively. Similarly, the pathologist's visual score strongly correlated with RVS: $R = 0.913$ ($p < 0.001$) at week 0 and $R = 0.929$ ($p < 0.001$) at week 2 (Table 11).

Table 11 Pairwise correlations between stereology, digital algorithms and pathologist score (Pearson's coefficients, $p < 0.001$, $n = 116$).

	Stereology	Colocalization	Genie	Pathologist week 0
Colocalization	0.928			
Genie	0.946	0.973		
Pathologist week 0	0.913	0.839	0.841	
Pathologist week 2	0.929	0.853	0.856	0.965

Friedman's test revealed statistically significant differences in the results of tested cardiac fibrosis evaluation methods $\chi^2(3) = 62.405$, $p = 0.000$. Post hoc analysis with

Wilcoxon signed-rank tests with a Bonferroni correction (significance level set at $p < 0.0125$) was applied. The differences in the results of Colocalization *versus* RVS were statistically insignificant ($Z = -2.259$, $p = 0.024$) with a mean difference value of 0.50 %. However, post hoc analysis showed significant differences between the results of Genie *versus* RVS ($Z = -5.000$, $p = 0.000$) and the pathologist's mean score *versus* RVS ($Z = -4.422$, $p = 0.000$) with mean difference values of: -1.61 % and 2.24 %. Similarly significant difference of the results between both digital methods (Genie *versus* Colocalization) was noted: $Z = -6.639$, $p = 0.000$ with a variance bias of 2.11 % (Table 12).

Table 12 Paired comparison of cardiac fibrosis (%) evaluation methods.

		Paired Differences		Z*	p Value*
		Mean	Std. Error Mean		
Pair 1	Colocalization – Stereology	0.50	0.56	-2.259	0.024
Pair 2	Genie – Stereology	-1.61	0.47	-5.000	0.000
Pair 3	Pathologist mean – Stereology	2.24	0.56	-4.422	0.000
Pair 4	Colocalization – Genie	2.11	0.42	-6.639	0.000

* Based on post hoc analysis with Wilcoxon signed-rank tests (Bonferroni correction applied with significance level set at $p < 0.0125$).

Single linear regression model plots demonstrated some advantage of Genie software over the Colocalization software with noticeably better values in both original raw and log-transformed measurements for R-square 0.896 and 0.804 (log) *versus* 0.861 and 0.707 (log); slope 0.956 and 1.222 (log) *versus* 0.745 and 0.639 (log); intercept -1.033 and -0.860 (log) *versus* 3.875 and 0.972 (log) (Fig. 56 and Fig. 57).

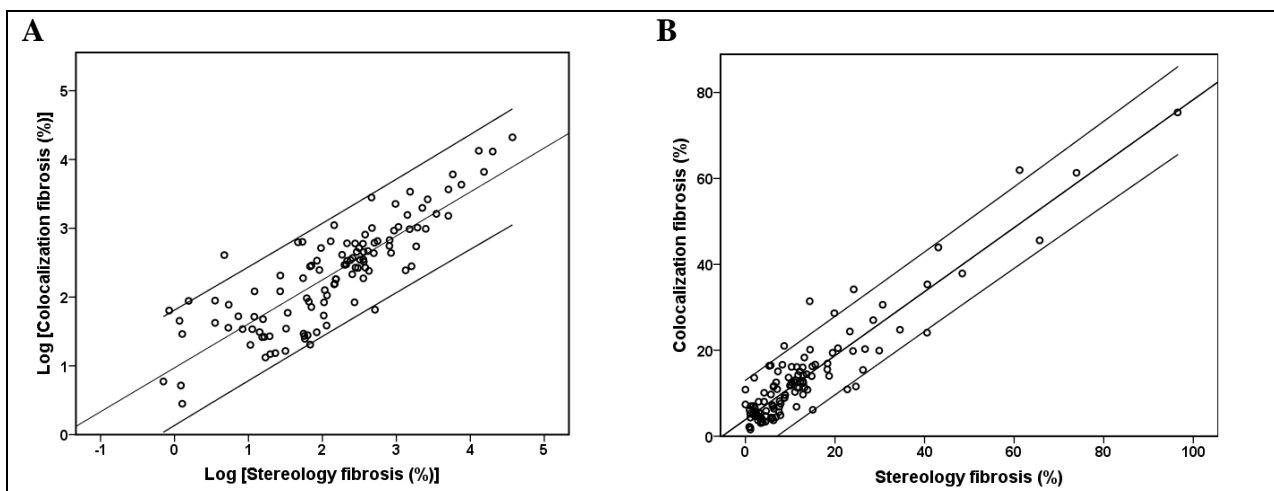


Fig. 56 Single linear regression models with reference values. Original raw (A) and log-transformed measurements (B) for Colocalization and Stereology. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval.

The pathologist's mean score correlation with RVS was similar: R-square 0.864 and 0.684 (log), slope 0.994 and 0.838 (log), intercept -2.155 and 0.062 (log); the inter-observer variation at week 0 and week 2 was negligible: R-square 0.931 and 0.824 (log), slope 1.079 and 0.939 (log), intercept -1.328 and -0.020 (log). Surprisingly, both digital methods did not correlate as well as expected with still acceptable R-square values (0.947 and 0.794 (log)), but high intercept (4.744 and 1.500 (log)) and slope far from ideal (0.773 and 0.486 (log)) (Fig. 58, Fig. 59 and Fig. 60).

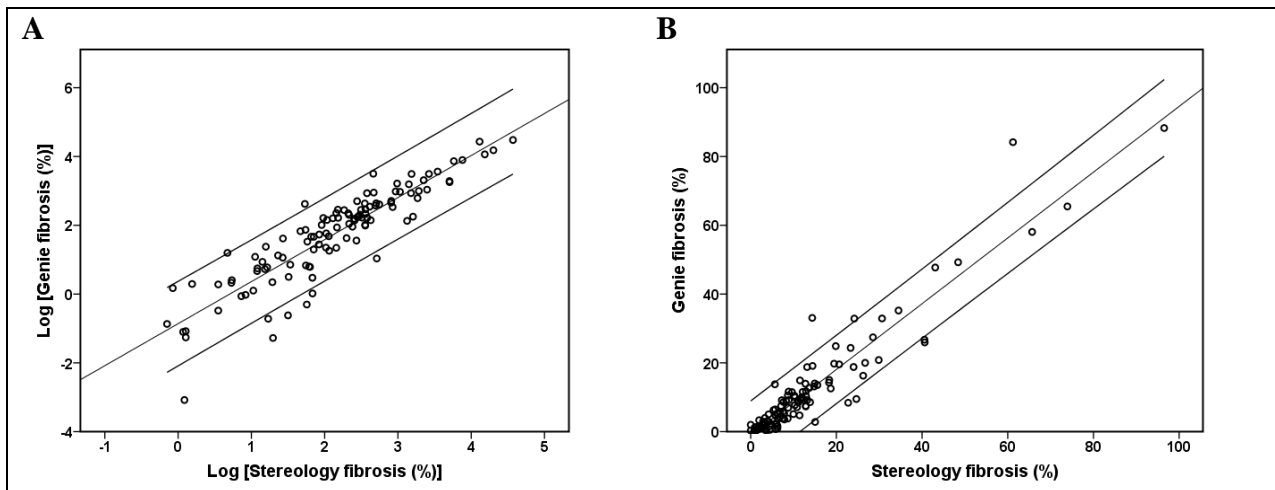


Fig. 57 Single linear regression models with reference values. Original raw (A) and log-transformed measurements (B) for Genie and Stereology. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval.

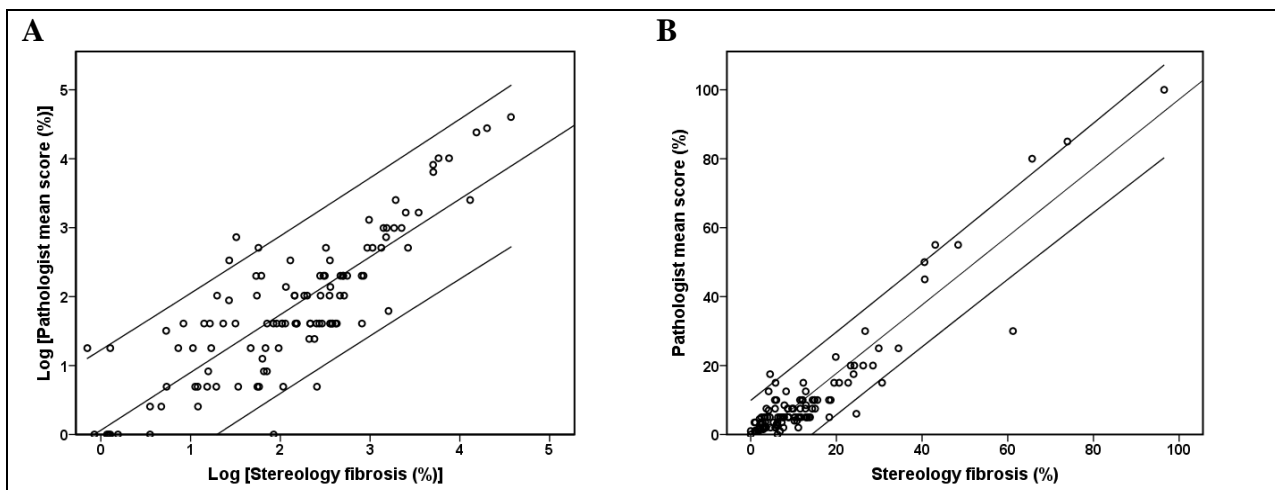


Fig. 58 Single linear regression models with reference values. Original raw (A) and log-transformed measurements (B) for Pathologist mean score and Stereology. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval.

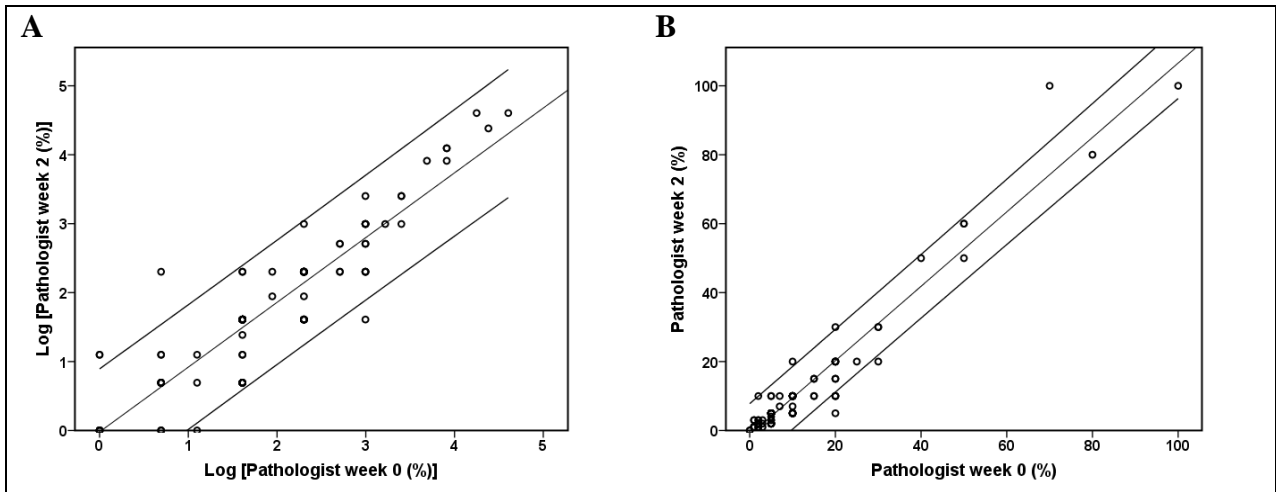


Fig. 59 Single linear regression models with reference values. Original raw (A) and log-transformed measurements (B) for Pathologist score at week 0 and week 2. Linear regression line is presented within 95% confidence interval.

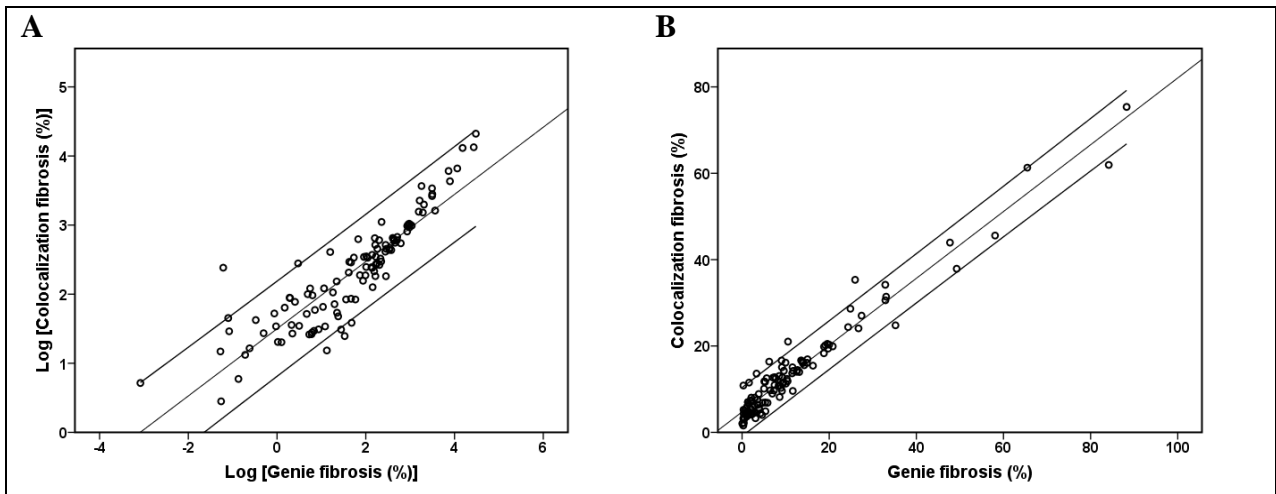


Fig. 60 Single linear regression models with reference values. Original raw (A) and log-transformed measurements (B) for Colocalization and Genie. Linear regression line is presented within 95 % confidence interval.

Bland-Altman plots showed a bidirectional bias dependent on the magnitude of the measurement: Colocalization software overestimated the area fraction of fibrosis in the lower end, and underestimated it in the higher end of the RVS scale (Fig. 61).

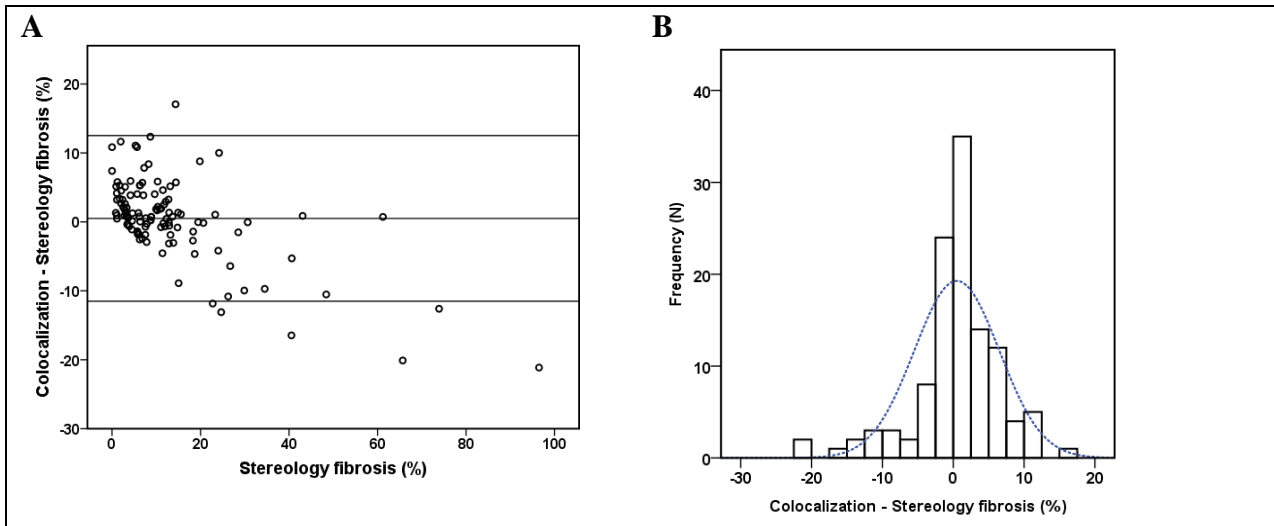


Fig. 61 Bland-Altman plots (A) and histograms (B) of the method score differences. Colocalization and Stereology. Horizontal line represents mean difference within limits of agreement, which are defined as the mean difference \pm 2 standard deviations.

Meanwhile, Genie software as well as the pathologist’s mean score showed more uniform results throughout the complete scale with a slight underestimation in the mid-range for both (Fig. 62 and Fig. 63).

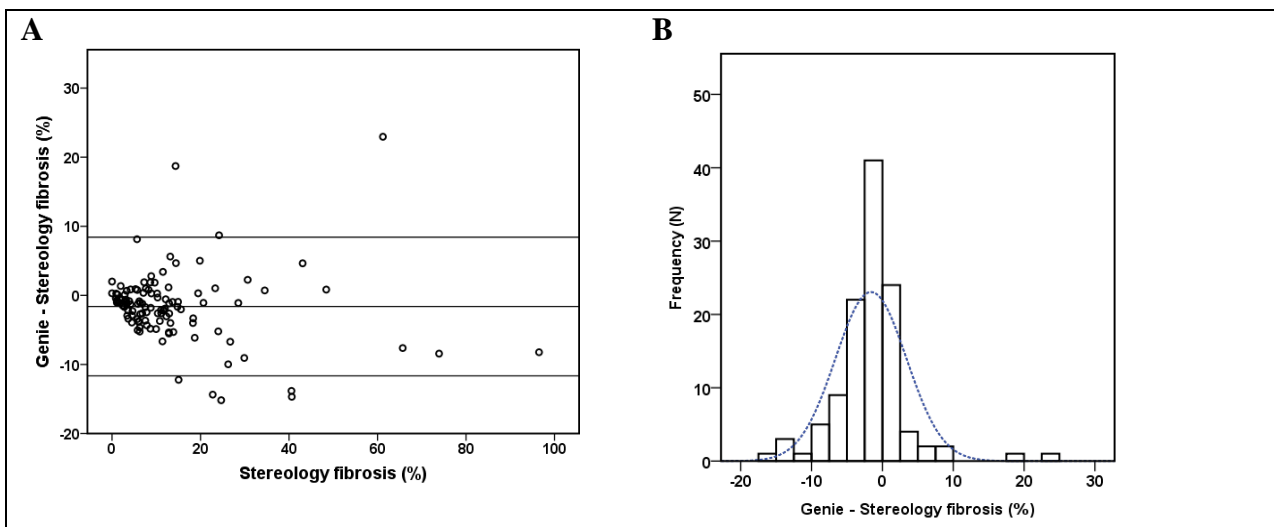


Fig. 62 Bland-Altman plots (A) and histograms (B) of the method score differences. Genie and Stereology. Horizontal line represents mean difference within limits of agreement, which are defined as the mean difference \pm 2 standard deviations.

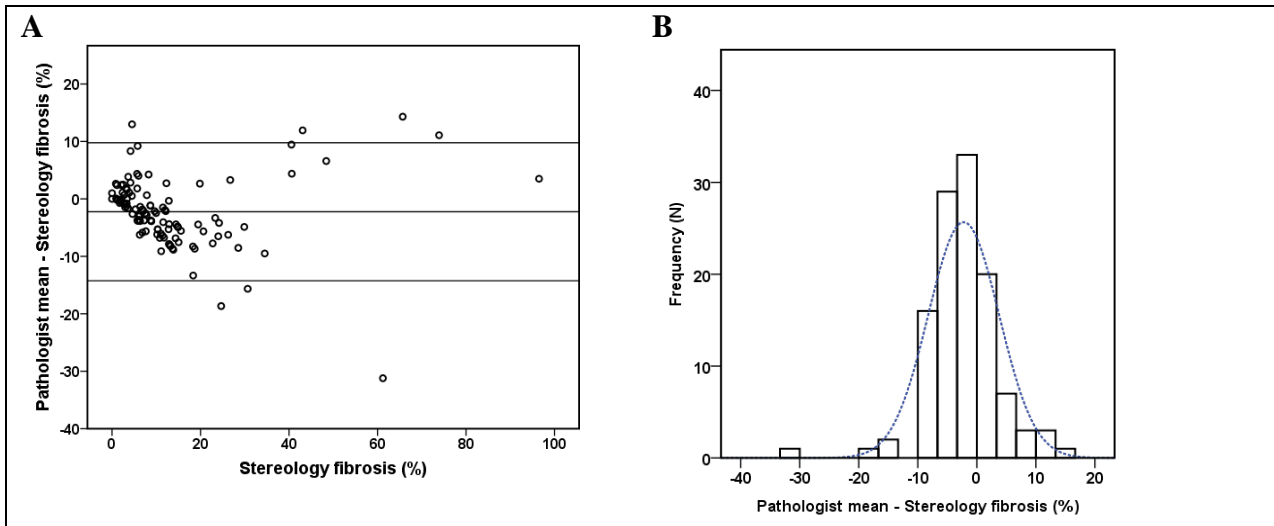


Fig. 63 Bland-Altman plots (A) and histograms (B) of the method score differences. Pathologist mean score and Stereology. Horizontal line represents mean difference within limits of agreement, which are defined as the mean difference \pm 2 standard deviations.

Presented histograms indicate a normal distribution of the differences for each plot (Fig. 61, Fig. 62 and Fig. 63).

5. DISCUSSION

5.1. Molecular mechanisms of virus-induced DCM

The myocardium consists mainly of myocytes, extracellular matrix (ECM) and a capillary microcirculation system, the impairment of which causes various heart problems that demand different treatment strategies. A proper myocyte function is responsible for myocardial tension and contractile functioning, whereas ECM function ensures structural integrity of adjoining myocytes, myofilaments and microcirculation. Which of these processes: cardiomyocyte death or ECM degradation impairs myocardial functioning mostly depends on intensity and duration of the injury. It is important to estimate which part of myocardium from previously mentioned is injured by persistent presence of virus (Janicki and Brower 2002; Whelan, Kaplinskiy et al. 2010).

Data presented in this study show that persistent presence of vira (chronic viral infection) in myocardial tissue do not initiate inflammation, fibrosis and apoptosis. Decreased serum level of the sarcomeric protein hsTnT, a marker of necrotic cell death (Bashey, Martinez-Hernandez et al. 1992), confirms the absence of necrotic cardiomyocytic death as well. However, chronic viral infection may not be as innocent as it seems because the collagen synthesis/degradation balance (PICP/ICTP ratio) in virus-positive biopsies was found to be reduced 4.3 fold. Since the myocardium up to 85-90 % consists of collagen I and only up to 10-15 % of collagen III and other components (Kociol, Pang et al. 2010; Whelan, Kaplinskiy et al. 2010), the disturbance of collagen I turnover in the tested myocardiums may be one of the most significant factors in development of chronic viral DCM. In addition to the decrease of collagen I turnover in biopsies, α -SMA, an intracellular fibrosis marker, was also slightly down-regulated (1.13 fold). The positive correlation of collagen I synthesis with the general inflammation marker CRP in serum suggests that the sustained presence of vira in the myocardium may further upregulate inflammation and fibrosis. Based on the results, it may be stated that degradation of contracting proteins, particularly collagen I, in a persistently virus-infected myocardium overshadows induction of inflammation and cardiomyocyte death.

One of the main factors strongly implicating collagen I synthesis in myocardium is transforming growth factor β 1 (TGF- β 1). TGF- β 1 plays a key role in heart remodeling through mediating cardiomyocyte growth, fibroblast activation and ECM deposition (Bujak and Frangogiannis 2007). The TGF- β 1 is not only known as fibrogenic, but also as an anti-inflammatory cytokine; therefore its suppression might affect both collagen synthesis as well as the immune system and activate inflammation (Aukrust, Ueland et al. 1999; Sun, Zhang et al. 2000; Gorelik and Flavell 2002). The data show that TGF- β 1 was 3.6 fold down-regulated in virus-positive DCM biopsies, whereas in serums its level was almost non-altered. The mechanism by which TGF- β 1 affects collagen synthesis is very complex and not fully known. It was also shown that TGF- β 1 can directly activate synthesis of collagen I (Pan, Chen et al. 2013). Additionally, TGF- β 1 can activate collagen synthesis indirectly through the phosphorylation of SMAD proteins, increased endoglin expression, stimulation of TIMP1, activation of lysyl oxidase and other signaling systems (Heldin, Miyazono et al. 1997; Kwak, Kim et al. 2011; Voloshenyuk, Landesman et al. 2011; Kapur, Wilson et al. 2012). The correlation analysis shows that prolonged intramyocardial viral infection will activate inflammation, particularly macrophage activity, with subsequent activation of MMP1, MMP2 and TGF- β 1. Similar molecular mechanisms of TGF- β 1 activation and collagen I deposition has been shown by other authors (Kobayashi, Kim et al. 2014). Moreover, the release of MMP9 to serum was significantly associated with Hsp60 (Table 5), showing that untreated viral infection might activate MMP9 and increase mitochondrial outer membrane permeability leading to mechanical myocyte dysfunction. There is also a possibility that part of MMP9 is located in and, therefore, released from virus-damaged mitochondria (Moshal, Tipparaju et al. 2008).

In parallel to TGF- β 1, secreted galectin-3 may also induce collagen I production. Galectin-3 is a member of β -galactoside-binding animal lectins and is predominantly located in macrophages, whereas its expression in human hearts is limited (Sharma, Pokharel et al. 2004). It is shown that activated macrophages secrete cardiac galectin-3 that activates fibroblast proliferation, collagen deposition and contributes to the development of heart failure (Sharma, Pokharel et al. 2004). Galectin-3 can also activate fibrosis by increasing expression of α -SMA, an intracellular fibrosis marker, and collagen I α -1 chain (COL1A1), an extracellular fibrosis marker (de Boer, Voors et al.

2009). Parallely, galectin-3 might also affect fibrosis through the down-regulation of TIMP1 and MMP9 (de Boer, Voors et al. 2009). The depressed levels of α -SMA, collagen I, TIMP1 and MMP9 observed in the virus-positive biopsies may be a result of reduced serum level of galectin-3 and infiltrated macrophages. On the other hand, activation of MMP1 and MMP2 by intramyocardial viral infection might be enough to remodel myocardial collagen I through binding to the α -2 chain (Gioia, Fasciglione et al. 2010).

The last ones of the tested mechanisms indirectly affecting collagen turnover might be related to myocardial protecting systems. One of them is immunoregulator adiponectin, the role of which under different toxic conditions seems to be quite paradoxical. The majority of evidences show that over-expression of adiponectin has anti-diabetic, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects (Ouchi and Walsh 2007; Jian, Su et al. 2013). It has been also indicated that high adiponectin levels lower the risk for myocardial infarction but increases the risk for heart failure, whereas hypo-adiponectinemia was connected to cardiovascular diseases (Kumada, Kihara et al. 2003; Pischon, Girman et al. 2004; Chen, Rijzewijk et al. 2011). Additionally to adiponectin, BNP was also shown to have a cardio-protective effect (Lyu, Zhao et al. 2014). However, the significantly and almost two fold decreased serum levels of BNP and adiponectin, and its correlation with anti-inflammatory cytokine TGF- β 1 ($R^2 = 0.459$, $p = 0.008$) might not only show some endothelial dysfunction but also the reduced myocardial protection. Slight upregulation of major histocompatibility agent class II HLA-DR also pointed on endothelial cell injury in viral myocardium. Since levels of pro-inflammatory infiltrates and cytokines in virus-positive myocardium were reduced compared to virus-negative ones, the slight HLA-DR upregulation might be a direct effect of virus. On the other hand, correlation of adiponectin and BNP with pro-inflammatory infiltrates suggests a possible BNP and adiponectin overproduction due to persistent presence of intramyocardial viral infection leading to heart failure. Similar dependence of adiponectin, BNP and inflammation in heart failure were also observed by other authors (Bobbert, Scheibebogen et al. 2011; Lindberg, Jensen et al. 2014).

5.2. Molecular mechanisms dominating in inflammatory DCM

Myocarditis is a predominant cause of heart failure of young age patients (Maron and Pelliccia 2006). When the immune system fails to eliminate infections in a timely fashion, a chronic myocardial destruction starts. Thereby, approximately 20 % of myocarditis-affected individuals develop a chronic heart disease leading to inflammatory DCM and only half of the patients survive longer than 5 years (Grogan, Redfield et al. 1995; Schonberger and Seidman 2001). This severe prognosis urges detailed investigations of the molecular mechanisms triggering progression of inflammation into inflammatory DCM and heart failure.

The pathophysiology of DCM is an exceedingly complex process caused by activation of neurohormones and pro-inflammatory cytokines. It is becoming apparent that inflammatory mediators play a crucial role in the development of DCM, subsequently progressing to heart failure. It is shown that the pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β , may act synergistically at both messenger RNA (mRNA) and protein levels inducing cardiac contractile defects (Yamagishi, Inagaki et al. 2004; Carty, Heagerty et al. 2009). On the other hand, IL-6 also referred to as myokine, activates anti-inflammatory pathways (Wallenius, Wallenius et al. 2002; Febbraio, Rose-John et al. 2010). This dual IL-6 effect might be explained by different durations of IL-6 exposure: a short and acute IL-6 increase has a positive effect, whereas chronic hyperproduction results in a pathological condition (Dovio and Angeli 2001). Data of the study revealed a significant upregulation of IL-6 (3.23 fold, $p < 0.05$), much less for TNF- α (1.76 fold) and none for IL-1 β (0.88 fold) in inflammatory DCM sera. Since inflammatory DCM has a chronic way of progression, the significant overproduction of IL-6 in the tested sera may be a cause of inflammatory DCM rather than its consequence. Additionally, the significantly increased serum level of IL-6 and its correlation with myocardial CD3⁺ suggest T-lymphocytes to be involved in inflammatory DCM apoptosis, whereas only a slight increase of infiltrated macrophages confirmed the absence of necrosis. The default of pro-interleukin-1 beta (IL-1 β) activation in the tested sera might be explained by the low intensity of myocardium inflammation, absence of caspase-1 cleavage-activation and a pyroptotic way of cardiomyocyte death (Cookson and Brennan 2001).

Recently, a strong and direct influence of IL-6 was shown on mitochondrial function: IL-6 inhibits adipocyte mitochondrial membrane potential, ATP production and increased intracellular reactive oxygen species (ROS) level (Ji, Chen et al. 2011; White, Dawson et al. 2013). Additionally, a general inflammatory biomarker secreted C-reactive protein (CRP), similarly to IL-6, also correlates with poor DCM prognosis, heart failure and mitochondrion-mediated myocyte apoptosis (Kaneko, Kanda et al. 1999; Yin, Chen et al. 2004; Yang, Wang et al. 2008). Findings in this study showed that IL-6 and CRP levels in inflammatory-positive DCM serums were not only significantly upregulated but also significantly correlated with the secreted mitochondria-related apoptotic biomarkers Hsp60 and Bax suggesting that the intrinsic apoptotic pathway in myocardium is more sensitive to inflammation than the extrinsic one. The low level of upregulations of the Fas receptor, Fas ligand and caspase-8 also confirmed that extrinsic apoptotic pathway is less important in development of inflammatory DCM.

Many signaling pathways, including the intrinsic and extrinsic apoptotic ones, might have mutual interaction leading to the synergistic implication on final myocardial response. It was shown that the member of the extrinsic apoptotic pathway pro-caspase-8 might cleave the BH3 domain-only protein Bid, which in turn, activates Bax that integrates to mitochondrial membranes, thereby releasing cytochrome C (Chou, Li et al. 1999; Roucou, Montessuit et al. 2002). In agreement with previous observations, data in the present study show a significant correlation between caspase-8 and Bax in inflammatory DCM sera, suggesting that Bax is one of the most important intersection points between the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. However, the approximately 30 folds higher initial level of caspase-9 compared to caspase-8 in inflammatory DCM biopsies suggests the intrinsic apoptotic pathway to be leading in inflammatory DCM. Similarly, other authors also have observed a low impact of the extrinsic apoptotic pathway on cardiomyocyte death (Wollert, Heineke et al. 2000).

In addition to the intrinsic apoptotic pathway, MMP-9 was also found to be sensitive to inflammation and to participating in the pathogenesis of cardiomyopathy (Fares, Gomes Jde et al. 2013). The intensity of MMP9 activation also indicates the level of heart damage: higher proteolytic MMP9 activity is related to more pronounced heart damage. Data of this study show a slight increase of MMP9/TIMP1 ratios both in biopsies (from 0.25 to 0.35) and in serums (from 0.23 to 0.25) of inflammatory DCM

patients. Even if the increase of the MMP9/TIMP1 ratio in inflammatory DCM biopsies was mild and not fully significant, it significantly correlated with markers of both apoptotic pathways (Bcl-2, Fas receptor and Fas ligand, Table 9) supporting the idea of chronic remodeling of the mitochondrial outer membrane and activation of the extrinsic apoptotic pathway. Additional correlation of MMP-9 with caspase-9 and -8 in the tested serums confirmed previous statement.

In parallel to apoptosis, we investigated the necrotic way of myocardial cell death. Necrosis, as a passive and adenosine triphosphate (ATP)-independent process, was shown to be more characteristic to acute and global cardiomyocyte damage than to chronic processes (Freude, Masters et al. 2000). Another way of cell death, a regulated necrosis (also known as caspase-independent death or necroptosis), is suppressed by activated pro-caspase-8 and therefore absent in tested samples similar to what has been shown by others (Kaiser, Upton et al. 2011). Since histological analysis of the samples did not show myocardial necrosis and fibrosis, the release of serum sarcomeric protein hsTnT is related to decreased myocardium contraction. However, the myofilament degradation and irreversible myocardium damage might be supported by prolonged hsTnT leakage out of myocardium. Additionally, we suggest that the release of hsTnT is a caspase-related process, as the secreted hsTnT significantly correlated with activation of the apoptotic signaling cascade: caspases-8, Bax and caspase-3 in inflammatory DCM biopsies.

5.3. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology

To this day a pathologist's visual score is widely accepted as ground truth and, despite already available digital methods, it is still used as a primary method for histomorphometric evaluations. Many attempts to incorporate digital methods into clinical practice face the same issue of proper validation – the digital analysis data are commonly compared to semi-quantitative visual evaluation, while most direct criterion standard yet requires time-consuming procedures.

The early study of Vasiljevic et al. (Vasiljevic, Popovic et al. 2001) based on human endomyocardial biopsies compared results of semi-quantitative scoring, point-lesion counting (using a grid) to computer-assisted methods. This was the first study to

demonstrate strong correlation of different cardiac fibrosis scoring methods, however, due to considerable input by the investigator in computer analysis it still can be considered as subjective to some degree. Particularly since a stereology test grid was not used for RVS. Hadi et al. (Hadi, Mouchaers et al. 2011) quantified cardiac fibrosis by automated analysis using ImageJ software and traditional polarization microscopy, with subsequent validation of the results, using stereology data as criterion standard. To our knowledge, it is the only study of cardiac fibrosis that applied stereology procedures to obtain RVS; however, the validation was performed on rat cardiac rather than human samples (the analysis was then tested on a post-mortem tissue samples from a 78 year old man).

In this study, several methods were tested to evaluate the extent of human cardiac fibrosis, which can be readily implemented in clinical practice today. Stereology was used as the most independent and objective RVS available and a modified Bland-Altman plot as the best statistical tool to measure agreement between the tested method and a RVS.

The initial data were somewhat in favor of the Colocalization software: it demonstrated the closest fibrosis mean value to a reference and resulting difference of 0.50 % was statistically insignificant. However, the Colocalization software had a noticeably narrower variation, which was 20 % behind the RVS and the pathologist's range, and also 15 % behind the Genie software. This drawback may be not of great importance in clinical practice, as the range limitation was only evident in the higher range and myocardium fibrosis hardly reaches these values, whereas the lower range was acceptable. Further analysis revealed the superiority of Genie software: the higher correlation with RVS, the better values in single linear regression against the reference and, most importantly, more uniform results in Bland Altman analysis. While the Colocalization software was overestimating at the lower end and underestimating at the higher end, Genie software was only slightly underestimating in a mid-range with the results still exceeding those of the pathologist's mean score. Of note, both digital algorithms produced slightly different results, a fact that might appear surprising. Despite both algorithms are aimed to measure the same feature, namely, the proportion of connective tissue in the myocardium, they are still based on different principles and may result in different measurement errors. While Colocalization classifies each pixel

according to its color characteristics, the Genie software is based on a far more complex pattern recognition system, which also refers to spatial aspects of the image. Probably, the only relevant drawback of Genie was the underestimation bias of 1.61 % from the RVS. Overall, the Genie classifier performed best in this study, being closest to the RVS, with almost perfect correlation, adequate range and uniform results throughout the whole scale.

Potential limitations of the Genie software are related to the necessity to train the system to identify the various structures of interest, which is time-consuming and based on the inherent subjectivity of the “human trainer”. This fact also makes the Genie software sensitive to inter-laboratory reproducibility issues. However, after the adaptation of Genie software to the clinical needs it can be run fully automated and as a result it can be equally as time-efficient as the Colocalization software is. The Genie software has the possibility of tuning the algorithm, which makes it more flexible in practical maintenance. Even if 2 % is an acceptable error for cardiac fibrosis estimate in clinical sense, this algorithm may require further adaptation to potential sources of slide quality variation.

The Colocalization software has also proved to be a fully acceptable method for cardiac fibrosis measurement. In clinical practice, the Colocalization software should provide similar precision and accuracy as the Genie tool, because cardiac fibrosis values are rarely exceeding 40 %, and a slight overestimation in the lower range may be acceptable. The Colocalization software is less complex, simpler to use and calibrate, and less expensive. Furthermore it can be run fully automated from image scanning to the final results and it is very time efficient. The Colocalization algorithm is less dependent on human investigator input at any point of the process (except initial settings for color deconvolution), making it more transparent and manageable for users.

5.4. Summary

Finalizing data presented in this study we can state that therapeutic strategies for myocarditis and dilated cardiomyopathy should be obtained through analysis of the acute, subacute and chronic phases. Most of recent studies are concentrated on the investigation of acute myocardial injuries, whereas chronic myocardial injuries are less symptomatic but more complicated for investigation and treatment. In this study we

investigated molecular mechanisms dominating in chronic viral cardiomyopathy due to viral persistence in dilated heart without ongoing inflammation and chronic inflammatory DCM. The aetiology of inflammatory DCM was assumed to be either infectious, toxic or autoimmune. The most important thing is that both types of investigated chronic DCM, showed different molecular mechanism suggesting more options for further DCM treatment.

However, chronic DCM patients are usually treated according to general guidelines regardless of their etiology. Our data suggest that conventional therapeutic agents for chronic DCM and heart failure such as β -blockers, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, angio-tensin receptor blockers and other can be combined with others such as collagen I metabolism regulating (in case of chronic viral DCM) and anti-apoptotics (in case of idiopathic chronic inflammatory DCM). The foreseeable future therapeutic approach for various types of chronic dilated cardiomyopathy should be directed to control and regulation of molecular mechanisms progressing DCM. The technological and scientific progress is also improving a quality of estimation of myocardial functioning regulating processes such as fibrosis. We sincere hope that our data contribute not only to a better understanding of molecular mechanism progressing chronic DCM but also to new therapeutic options.

6. CONCLUSIONS

1. Chronic viral DCM did not induce inflammation, fibrosis and cardiomyocyte death. Destruction of myocardial contraction, particularly through changed collagen I turnover, dominates in virus-positive DCM.
2. The improper functioning of collagen I in virus-positive biopsies is affected by reduction of TGF- β 1 (3.55 fold) and activation of MMP1 and MMP2 (2.19 and 2.43 fold). Decreased serum levels of galectin-3, adiponectin and BNP (1.16, 1.88 and 1.97 fold) indirectly down-regulated collagen I turnover and diminished general resistance of viral myocardium.
3. Chronic inflammatory-positive myocardium compared to inflammatory-negative showed the highest level of infiltrated T-lymphocytes (14.6 cell/mm²) that significantly correlated with 3.50 fold augmented secretion of inflammatory cytokines, particularly IL-6.
4. Chronic myocardial inflammation significantly increased the release of caspase-9,-8, and-3 (6.24, 3.10, 3.62 folds, ($p < 0.05$)) into serum. Significant increase of Hsp60 (8.97 fold) in serum showed the impairment of mitochondria and also the importance of intrinsic apoptotic pathway in inflammatory DCM.
5. The extrinsic apoptotic pathway (FasR, FasL and caspase-8) was a supporter, but not a main leader in the progression of chronic inflammatory DCM. The pro-apoptotic Bax is an important intersection point for the extrinsic-and intrinsic apoptotic pathways.
6. Slight increase of MMP9/TIMP1 ratios both in biopsies (from 0.19 to 0.48, $p < 0.05$) and in serums (from 0.23 to 0.25) and two fold increased release of hsTnT into serum attenuated fibrosis in chronically-inflamed myocardium.
7. The Genie algorithm proved to be the method of choice with the single drawback of a slight underestimation bias that can be acceptable for clinical and research demands to quantify the extent of fibrosis in myocardial biopsies.

7. LIST OF PUBLICATIONS ON THE TOPIC OF THE DISSERTATION

7.1. Publications

1. Daunoravičius D, Grabauskienė V, Bogomolovas J, Jablonskienė V, Vitkus D. Galectin-3: a novel marker of fibrosis and heart failure. *Laboratorinė medicina*. 2011; 4 (52): 205–211.
2. Daunoravičius D, Grabauskienė V, Jasulaitis A. Inflammatory dilated cardiomyopathy: new perspective in diagnostics and treatment. *Medicinos teorija ir praktika* 2012; 3: 39–44.
3. Daunoravičius D, Jasulaitis A, Grabauskienė V. Inflammatory dilated cardiomyopathy: the use of new diagnostic tools for diagnosis of disease sub-entities and for aetiology directed treatment. *Proceedings of International Conference Biomedical Engineering* 2012, p. 87–90.
4. Daunoravičius D, Laurinavičius A, Žurauskas E, Laurinavičienė A, Grabauskienė V. Quantitative evaluation of cardiac fibrosis by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Proceedings of International Conference Biomedical Engineering* 2012, p. 91–95.
5. Daunoravičius D, Jasulaitis A, Jablonskienė V, Grabauskienė V. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of viral heart disease. *Laboratorinė medicina* 2012; 4 (56): 224–228.
6. Daunoravičius D, Besusparis J, Žurauskas E, Laurinavičienė A, Bironaitė D, Pankuweit S, Plancoulaine B, Herlin P, Bogomolovas J, Grabauskienė V, Laurinavičius A. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology. *Diagnostic Pathology* 2014; 9: 114.
7. Bogomolovas J, Brohm K, Čelutkienė J, Balčiūnaitė G, Bironaitė D, Bukelskienė V, Daunoravičius D, Witt C, Fielitz J, Grabauskienė V, Labeit S. Induction of Ankrd1 in dilated cardiomyopathy correlates with the heart failure progression. *BioMed Research International* 2014.

7.2. Oral presentations

1. Daunoravičius D, Grabauskienė V. The diagnostics and etiopathogenetic treatment possibilities for inflammatory cardiomyopathy – first experience in Lithuania. 5th National Scientific Conference „Science for the human health”, Kaunas, Lithuania. 2011 April 7, 2011.
2. Daunoravicius D, Jakubauskas A, Griskevicius L, Cibiras S, Zurauskas E, Maneikiene V, Celutkiene J, Rucinskas K, Jasulaitis A, Grabauskiene V. Inflammatory cardiomyopathy: aetiopathogenetic markers for diagnosis of disease subentities and for aetiology directed treatment. Heart failure 2012 Congress, Bergrade, Serbia. May 19–22, 2012.
3. Daunoravičius D, Grabauskienė V. Dilated cardiomyopathy: evolution of aetiopathogenetic diagnosis and new possibilities of treatment. International Conference „Evolutionary Medicine: New Solutions for the Old Problems", Vilnius, Lithuania. June 12–15, 2012.
4. Daunoravicius D, Besusparis J, Zurauskas E, Laurinaviciene A, Bironaite D, Grabauskiene V, Laurinavicius A. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis methods and pathologist visual scoring versus digital stereology. Heart failure 2014 Congress, Athens, Greece. May 17–20, 2014.
5. Bironaite D, Daunoravicius D, Bogomolovas J, Jakubauskas A, Vitkus D, Zurauskas E, Zasytyte I, Rucinskas K, Brunk U, Venalis A, Grabauskiene V. The role of collagen in virus-positive dilated cardiomyopathy. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2014, Melbourne, Australia. May 4–7, 2014. Supplement to Global Heart, Vol 9, Issue 1C, 2014, PM051, e71. doi:10.1016/j.gheart.2014.03.1461
6. Bironaite D, Daunoravicius D, Bogomolovas J, Jakubauskas A, Vitkus D, Zurauskas E, Zasytyte I, Rucinskas K, Brunk U, Venalis A, Grybauskiene V. Apoptotic markers in diagnosing inflammatory dilated cardiomyopathy. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2014, Melbourne, Australia. May 4–7, 2014. Supplement to Global Heart, Vol 9, Issue 1C, 2014, PM050, e71 doi:10.1016/j.gheart.2014.03.1460
7. Bironaite D, Daunoravicius D, Bogomolovas J, Cibiras S, Vitkus D, Zurauskas E, Zasytyte I, Labeit S, Venalis A, Grabauskiene V. Mechanism of fibrosis in

inflammatory dilated cardiomyopathy. The 18th Annual Scientific Meeting of the HFSA, Las Vegas, Nevada. September 14–17, 2014. *Journal of Cardiac Failure* August 2014: Volume 20, Issue 8, Supplement, S81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2014.06.229>.

8. ABOUT THE AUTHOR

Dainius Daunoravičius

Date of birth: March 1, 1980

Address: M. K. Čiurlionio str. 21, 03101 Vilnius, Lithuania

Tel.: +37068770076

E-mail: dainius.daunoravicius@mf.vu.lt

Education:

1995-1996 Vilnius Lyceum of Sciences and Mathematics;

1996-1997 Streator Township High School Illinois, USA;

1997-1999 International Baccalaureate entered by Vilnius Lyceum of Sciences and Mathematics;

2000-2006 Vilnius University Medical Faculty.

Work experience:

2007-2008 Vilnius City University Hospital, department of vascular surgery;

Since 2007 Vilnius University Faculty of Medicine;

Since 2011 Vilnius University Hospital Santariškių Clinics;

Since 2012 Vilnius City Clinical Hospital;

2012-2014 researcher at the project “Investigation of molecular biomarkers for diagnosis and for aetiology-directed treatment strategies” (MIP-086/2012) sponsored by the Research Council of Lithuania.

Traineeships:

1. Department of Integrative Pathophysiology, Universitätsmedizin Mannheim (Germany). November 5 – December 3, 2011.
2. International Symposium on Inflammatory Heart Disease, Universitätsklinikum Marburg (Germany). September 20-21, 2012.
3. ETiCS project meeting, Universitätsklinikum Wuerzburg (Germany). November 16-17, 2012.

Awards:

1. 1st place for the best presentation in 5th National Scientific Conference „Science for the human health”, Kaunas, Lithuania. 2011 April 7, 2011.
2. Research Council of Lithuania grant for the academic achievements. 2012-2013.
3. Honorary certificate in International Conference „Evolutionary Medicine: New Solutions for the Old Problems", Vilnius, Lithuania. June 12-15, 2012.
4. HFA Young Researcher Grant in Heart failure 2012 Congress, Belgrade, Serbia. May 19-22, 2012.

9. FUNDING

This work was supported by a grant (No. MIP-086/2012) from the Research Council of Lithuania.

10. DISCLOSURE

There is no conflict of interest.

11. ACKNOWLEDGEMENTS

I would like express my sincere thankfulness to my scientific supervisor prof. V. Grabauskienė and everyone involved in this study: Justinas Besusparis, dr. Julius Bogomolovas, dr. Jelena Čelutkienė, dr. Sigitas Čibiras, Prof. dr. Paulette Herlin, dr. Arturas Jakubauskas, Assoc. Prof. dr. Algimantas Jasulaitis, Kęstutis Mikalajūnas, Assoc. Prof. dr. Aida Laurinavičienė, Prof. (HP) dr. Arvydas Laurinavičius, Prof. dr. Sabine Pankuweit, dr. Benoit Plancoulaine, dr. Kęstutis Ručinskas, Beatričė Valatkaitė, Assoc. Prof. dr. Dalius Vitkus, Ieva Zasytytė, Assoc. Prof. dr. Edvardas Žurauskas.

With great respect and gratitude to dr. Daiva Bironaitė – thank you for your deep scientific insights, shared experience and continuous help.