

PROGETTO DI RICERCA - MODELLO A
Anno 2008 - prot. 20083EWHYR

1 - Titolo del Progetto di Ricerca

Testo italiano

Progressione verso la disfunzione sistolica ventricolare e lo scompenso cardiaco nella cardiomiopatia ipertrofica: meccanismi molecolari e predittori clinici

Testo inglese

Progression toward left ventricular systolic dysfunction and heart failure in hypertrophic cardiomyopathy: molecular mechanisms and clinical predictors.

2 - Area Scientifico-disciplinare

06: Scienze mediche 80% *

05: Scienze biologiche 20%

* Area prescelta ai fini della valutazione

3 - Settori scientifico-disciplinari interessati dal Progetto di Ricerca

MED/11 - Malattie dell'apparato cardiovascolare

BIO/09 - Fisiologia

MED/36 - Diagnostica per immagini e radioterapia

3 bis Settori di ricerca ERC (European Research Council) interessati dal Progetto di Ricerca

LS Life Sciences

LS6 Medical and health science research: aetiology, diagnosis and treatment of disease, public health, epidemiology, pharmacology, regenerative medicine, veterinary medicine, medical ethics

LS6_1 Biological basis of non-communicable diseases, except for neural/psychiatric, immunityrelated and metabolism-related disorders. E.g. cancer and cardiovascular diseases

LS2 Genetics, genomics, bioinformatics and systems biology: molecular and cell genetics, genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, bioinformatics, computational biology, biostatistics, biological modelling and simulation, systems biology

LS2_6 Human genetics

4 - Parole chiave

Testo italiano

CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA

SCOMPENSO CARDIACO

GENETICA

Testo inglese

HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

HEART FAILURE

GENETICS

5 - Coordinatore Scientifico

BETOCCHI

SANDRO

Professore Associato confermato

11/09/1949

BTCSDR49P11F839G

Università degli Studi di NAPOLI "Federico II"

6 - Curriculum scientifico

Testo italiano

Laurea in Medicina e Chirurgia, 1974. Specializzazione in Cardiologia, 1977. Professore Associato di Cardiologia, dal 1999. FORMAZIONE: Dal 1983 al 1985, Exchange Visitor presso la Cardiology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, U.S.A., e 1992 presso la Kardiologie Abteilung, Universitaet Zuerich, CH. AREA DI RICERCA: Cardiomiopatia ipertrofica, meccanica cardiaca diastolica. Oltre 90 lavori su riviste "peer reviewed", 20 capitoli di libri. ATTIVITÀ EDITORIALE: Membro dell'Editorial Board di Current Cardiology Reviews, Revisore per Circulation, Journal of the American College of Cardiology, American Journal of Cardiology, European Heart Journal, European Journal of Heart Failure, Heart and Vessels, Journal of Cardiovascular Medicine; "abstract grader" di Società Italiana di Cardiologia e European Society of Cardiology. SOCIETÀ SCIENTIFICHE: Società Italiana di Cardiologia; Fellow, European Society of Cardiology; dal 1997 al 2004 Nucleus Member, European Society of Cardiology - Working Group on Myocardial Function. FONDI DI RICERCA: MURST 60% per 8 anni, Responsabile scientifico Unità di ricerca per PRIN 1998, Coordinatore scientifico Programma di ricerca per PRIN 2000, PRIN 2002, PRIN 2004, PRIN 2006, PRIN 2008.

Testo inglese

Graduated in Medicine: 1974. Board certified in Cardiology: 1977. Associate Professor in Cardiology: since 1999. TRAINING: From 1983 to 1985 Exchange Visitor at the Cardiology Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, U.S.A., and 1992 at the Kardiologie Abteilung, Universitaet Zuerich, CH. RESEARCH FIELDS: hypertrophic cardiomyopathy, diastolic cardiac mechanics. More than 90 papers on peer reviewed journals, 20 chapters in books. EDITORIAL TASKS: Editorial Board Member of Current Cardiology Reviews, Reviewer for Circulation, Journal of the American College of Cardiology, American Journal of Cardiology, European Heart Journal, European Journal of Heart Failure, Heart and Vessels, Journal of Cardiovascular Medicine; abstract grader for: Società Italiana di Cardiologia, European Society of Cardiology. SCIENTIFIC SOCIETIES: Società Italiana di Cardiologia, Fellow of the European Society of Cardiology, from 1997 to 2004 Nucleus Member of the European Society of Cardiology - Working Group on Myocardial Function. RESEARCH FUNDS: MURST 60% for 8 years; scientific officer in charge of a research Unit, PRIN 1998; scientific coordinator of a research Program, PRIN 2000, PRIN 2002, PRIN 2004, PRIN 2006, and PRIN 2008.

7 - Pubblicazioni scientifiche più significative del Coordinatore Scientifico

1. Losi Maria Angela, BETOCCHI S., Barbati Giovanni, Parisi Valentina, Tocchetti Carlo Gabriele, Pastore Fabio, Migliore Teresa, Contaldi Carla, Caputi Armando, Romano Rosalba, Chiariello Massimo (2009). Prognostic significance of left atrial volume dilatation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF ECHOCARDIOGRAPHY, vol. 22; p. 76-81, ISSN: 0894-7317
2. CIAMPI Q, BETOCCHI S., LOSI MA, FERRO A, CUOCOLO A, LOMBARDI R, VILLARI B, CHIARIELLO M (2007). Abnormal blood-pressure response to exercise and oxygen consumption in patients with hypertrophic cardiomyopathy. JOURNAL OF NUCLEAR CARDIOLOGY, vol. 14; p. 869-875, ISSN: 1071-3581
3. LOSI MA, BETOCCHI S., CHINALI M, BARBATI G, DALESSANDRO G, CACACE A, LOMBARDI R, CONTALDI C, G. DE SIMONE, CHIARIELLO M (2007). Myocardial Texture in Hypertrophic Cardiomyopathy. EUROPEAN JOURNAL OF ECHOCARDIOGRAPHY, vol. 20; p. 1253-1259, ISSN: 1525-2167
4. MARON BJ, SPIRITO P, SHEN WK, HAAS TS, FORMISANO F, LINK MS, EPSTEIN AE, ALMQUIST AK, DAUBERT JP, LAWRENZ T, BORIANI G, ESTES NA RD, FAVALE S, PICCININNO M, WINTERS SL, SANTINI M, BETOCCHI S, ARRIBAS F, SHERRID MV, BUJA G, SEMSARIAN C, BRUZZI P (2007). Implantable cardioverter-defibrillators and prevention of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. JAMA, vol. 298; p. 405-412, ISSN: 0098-7484
5. CECCHI F, OLIVOTTO I, BETOCCHI S., RAPEZZI C, CONTE MR, SINAGRA G, ZACHARA E, GAVAZZI A, RORDORF R, CARNEMOLLA G, PORCU M, NISTRI S, GRUPPILLO P, GIAMPAOLI S. (2005). The Italian Registry for hypertrophic cardiomyopathy: a nationwide survey. AMERICAN HEART JOURNAL, vol. 150; p. 947-954, ISSN: 0002-8703
6. OMMEN SR, MARON BJ, OLIVOTTO I, MARON MS, CECCHI F, BETOCCHI S., GERSH BJ, ACKERMAN MJ, MCCULLY RB, DEARANI JA, SCHAFF HV, DANIELSON GK, TAJIK AJ, NISHIMURA RA. (2005). Long-term effects of surgical septal myectomy on survival in patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 46; p. 470-476, ISSN: 0735-1097
7. BETOCCHI S., LOMBARDI R (2004). Clinical significance of diastolic dysfunction and the effect of therapeutic interventions. In: MARON BJ. Diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. Blackwell Publishing, ISBN/ISSN: 140511732X
8. CUOMO S, MARCIANO F, MIGAUX ML, FINIZIO F, PEZZELLA E, LOSI MA, BETOCCHI S. (2004). Abnormal QT interval variability in patients with hypertrophic cardiomyopathy: can syncope be predicted?. JOURNAL OF ELECTROCARDIOLOGY, vol. 37; p. 113-119, ISSN: 0022-0736
9. VIGORITO F, BETOCCHI S., HESS OM (2004). Hypertrophic obstructive cardiomyopathy. In: RUSCONI C; HESS OM; POGGESI C. Left ventricular diastolic function, dysfunction and failure. p. 849-856, ROMA: C.E.S.I. Publisher, ISBN/ISSN: 88-86062-89-3
10. CIAMPI Q, BETOCCHI S., VIOLANTE A, LOMBARDI R, LOSI MA, STORTO G, MANGANELLI F, TOCCHETTI CG, AVERSA M, PEZZELLA E, FINIZIO F, CUOCOLO A (2003). Hemodynamic effects of isometric exercise in hypertrophic cardiomyopathy: comparison with normal subjects. JOURNAL OF NUCLEAR CARDIOLOGY, vol. 10; p. 154-160, ISSN: 1071-3581
11. LOMBARDI R, BETOCCHI S., LOSI MA, TOCCHETTI CG, AVERSA M, D'ALESSANDRO G, CACACE A, CIAMPI Q, CHIARIELLO M (2003). Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. CIRCULATION, vol. 108; p. 1455-1460, ISSN: 0009-7322
12. LOSI MA, BETOCCHI S., AVERSA M, LOMBARDI R, MIRANDA M, CACACE A, CIAMPI Q, TOCCHETTI CG, GUIDA A, CHIARIELLO M (2003). Dobutamine stress echocardiography in hypertrophic cardiomyopathy. CARDIOLOGY, vol. 100; p. 93-100, ISSN: 0008-6312
13. MARON MS, OLIVOTTO J, BETOCCHI S., CASEY SA, LESSER JR, LOSI MA, CECCHI F, MARON BJ (2003). Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 348; p. 295-303, ISSN: 0028-4793
14. BETOCCHI S., ELLIOTT PM, BRIGUORI C, VIRDEE M, LOSI MA, MATSUMURA Y, MIRANDA M, MC KENNA WJ, CHIARIELLO M (2002). Dual chamber pacing in hypertrophic cardiomyopathy: long-term effects on diastolic function. PACING AND CLINICAL ELECTROPHYSIOLOGY, vol. 25; p. 1433-1440, ISSN: 0147-8389
15. CIAMPI Q, BETOCCHI S., LOMBARDI R, MANGANELLI F, STORTO G, LOSI MA, PEZZELLA E, FINIZIO F, CUOCOLO A, CHIARIELLO M (2002). Hemodynamic determinants of exercise-induced abnormal blood pressure response in hypertrophic cardiomyopathy. JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 40; p. 278-284, ISSN: 0735-1097
16. LOMBARDI R, BETOCCHI S. (2002). Aetiology and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy. ACTA PAEDIATRICA, vol. 439; p. 10-14, ISSN: 0803-5253
17. MANGANELLI F, BETOCCHI S., CIAMPI Q, STORTO G, LOSI MA, VIOLANTE A, BRIGUORI C, TOCCHETTI CG, LOMBARDI R, CUOCOLO A, CHIARIELLO M (2002). Comparison of hemodynamic adaptation to orthostatic stress in patients with hypertrophic cardiomyopathy with or without syncope and in vasovagal syncope. THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY, vol. 89; p. 1405-1410, ISSN: 0002-9149
18. BRIGUORI C, BETOCCHI S., MANGANELLI F, GIGANTE B, LOSI MA, CIAMPI Q, GOTTILLA R, VIOLANTE A, TOCCHETTI CG, VOLPE M, CHIARIELLO M (2001). Determinants and clinical significance of natriuretic peptides in hypertrophic cardiomyopathy. EUROPEAN HEART JOURNAL, vol. 22; p. 1328-1326, ISSN: 0195-668X

19. BETOCCHI S., HESS OM (2000). LV hypertrophy and diastolic heart failure. *HEART FAILURE REVIEWS*, vol. 5; p. 333-336, ISSN: 1382-4147
20. MARON B.J., SHEN W.K., LINK M.S., EPSTEIN A.E., ALMQUIST AK, DAUBERT JP, BARDY GH, FAVALE S, REA RF, BORIANI G, ESTES NA, SPIRITO P, CASEY SA, STENTON MS, BETOCCHI S. (2000). Efficacy of implantable cardioverter-defibrillators for the prevention of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, vol. 342; p. 365-373, ISSN: 0028-4793
21. BRIGUORI C., BETOCCHI S., ROMANO M., MANGANELLI F., LOSI MA, CIAMPI Q, GOTTILLA R, LOMBARDI R, CONDORELLI M, CHIARIELLO M (1999). Exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy depends on left ventricular diastolic function. *THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY*, vol. 84; p. 309-315, ISSN: 0002-9149
22. MANGANELLI F., BETOCCHI S., LOSI M.A., BRIGUORI C., PACE L, CIAMPI Q, PERRONE FILARDI P, SALVATORE M, FINIZIO P, PEZZELLA E, CHIARIELLO M (1999). Influence of left ventricular cavity size on clinical presentation in hypertrophic cardiomyopathy. *THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY*, vol. 83; p. 547-552, ISSN: 0002-9149
23. SPIRITO P., RAPEZZI C., BELLONE P., BETOCCHI S., AUTORE C., CONTE MR, BEZANTE GP, BRUZZI P (1999). Infective endocarditis in hypertrophic cardiomyopathy: prevalence, incidence, and indications for antibiotic prophylaxis. *CIRCULATION*, vol. 99; p. 2132-2137, ISSN: 0009-7322
24. BETOCCHI S., LOSI MA, BRIGUORI C, CHIARIELLO M (1998). DDD pacing in hypertrophic cardiomyopathy: state of the art. In: CAMERINI F; TAVAZZI A; DE MARIA R. *Advances in cardiomyopathies*. p. 76-80, MILANO: Springer Verlag
25. BRIGUORI C., BETOCCHI S., LOSI M.A., MANGANELLI F., PISCIONE F, PACE L, BOCCALATTE M, GOTTILLA R, SALVATORE M, CHIARIELLO M (1998). Noninvasive evaluation of left ventricular diastolic function in hypertrophic cardiomyopathy. *THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY*, vol. 81; p. 180-187, ISSN: 0002-9149
26. LOSI M.A., BETOCCHI S., MANGANELLI F, BRIGUORI C., CHIARIELLO M (1998). Pattern of left ventricular filling in hypertrophic cardiomyopathy. Assessment by Doppler echocardiography and radionuclide angiography. *EUROPEAN HEART JOURNAL*, vol. 19; p. 1261-1267, ISSN: 0195-668X
27. BONADUCE D., PETRETTA M., BETOCCHI S., IANNICIELLO A., CHIARIELLO M. (1997). Heart rate variability in patients with hypertrophic cardiomyopathy: association with clinical and echocardiographic features. *AMERICAN HEART JOURNAL*, vol. 134; p. 165-172, ISSN: 0002-8703
28. BETOCCHI S., LOSI M.A., PISCIONE F., BOCCALATTE M., CHIARIELLO M (1996). Effects of dual-chamber pacing in hypertrophic cardiomyopathy on left ventricular outflow tract obstruction and on diastolic function. *THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY*, vol. 77; p. 498-504, ISSN: 0002-9149
29. BETOCCHI S., PISCIONE F., LOSI M.A., PACE L., CHIARIELLO M (1996). Effects of diltiazem on left ventricular systolic and diastolic function in hypertrophic cardiomyopathy. *THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY*, vol. 78; p. 451-457, ISSN: 0002-9149
30. BETOCCHI S., HESS OM, LOSI MA, NONOGI H, KRAYENBUEHL HP (1993). Regional left ventricular mechanics in hypertrophic cardiomyopathy. *CIRCULATION*, vol. 88; p. 2206-2214, ISSN: 0009-7322

8 - Elenco delle Unità operative

Unità	Responsabile dell'Unità di Ricerca	Qualifica	Ente	Disponibilità temporale indicativa prevista	
				1° anno	2° anno
I	BETOCCHI Sandro	Professore Associato confermato	Università degli Studi di NAPOLI "Federico II"	39	38
II	CECCHI Franco	Professore Associato non confermato	Università degli Studi di FIRENZE	85	85
III	MELACINI Paola	Ricercatore confermato	Università degli Studi di PADOVA	51	29

9 - Abstract del Progetto di Ricerca

Testo italiano

Questo progetto di ricerca mira a studiare la patogenesi della cardiomiopatia ipertrofica (CMI), in relazione all'evento più clinicamente rilevante: l'evoluzione verso lo scompenso sistolico (cosiddetta forma end-stage, ES). Lo studio, data la sua complessità, è multidisciplinare e si avvale di tecniche in vitro e dell'analisi di pazienti.

Per verificare l'ipotesi che vede nelle proteine sarcomeriche mutate uno stimolo maladattativo alla base dello sviluppo della disfunzione contrattile, si studierà la meccanica di miofibrille muscolari cardiache contenenti proteine mutate (mutazioni riscontrabili in patologia spontanea).

Nell'uomo saranno verificate le ipotesi genetica ed ischemica di patogenesi della forma ES.

Saranno studiati i genotipi di pazienti con CMI ES per verificare se la prevalenza di mutazioni complesse è maggiore in questi pazienti. L'altro aspetto analizzato sarà quello delle mutazioni di geni responsabili di cardiomiopatia dilatativa in pazienti con CMI ES.

L'ischemia sarà studiata, oltre che con metodi classici, anche sotto il profilo dello stress ossidativo, nell'ipotesi che ripetuti episodi di ischemia/riperfusion siano alla base dell'evoluzione verso la forma ES in CMI.

Testo inglese

This research project aims at studying pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy (HCM), with regards to the most clinically relevant event: evolution toward systolic heart failure (the so called end-stage form, ES). Owing to its complexity, this study will be multidisciplinary and will use in vitro and in vivo techniques, as well as patients' analysis.

The hypothesis that mutated sarcomeric proteins represent a maladaptive stimulus, leading to contractile impairment, will be studied under a mechanical and biochemical standpoint by using isolated muscle myofibrils with mutated sarcomeric proteins (spontaneous mutations yielding HCM).

In patients, the genetic and ischemic hypothesis of the pathogenesis of ES HCM will be studied.

ES HCM patients will be genotyped to assess if complex mutations are more prevalent in these patients. Another aspect will concern mutations of genes that are known to be responsible for dilated cardiomyopathy in patients with ES HCM.

Ischemia will be analyzed, besides the usual approaches, by the REDOX state, in light of the hypothesis that repeated ischemia/reperfusion bursts underlie evolution toward the ES form in HCM.

10 - Obiettivi finali che il Progetto si propone di raggiungere

Testo italiano

Questo progetto continua e sviluppa ulteriormente un precedente progetto PRIN, presentato e finanziato nel 2006: quel progetto si concentrava sul rischio aritmico (valutato mediante lo studio dei canali ionici), e sull'evoluzione verso la forma dilatativa della cardiomiopatia ipertrofica (CMI). In questo nuovo progetto le 2 Unità di Firenze si sono unite in un'unica Unità. Nel progetto precedente, le Unità avevano lavorato in cooperazione, e i risultati sono stati pubblicati su riviste internazionali, totalizzando un Impact Factor superiore a 90. Inoltre le Unità hanno scritto 2 capitoli di libri.

Scopo di questo nuovo progetto di ricerca è investigare la relazione tra eziologia e patogenesi e della più temuta manifestazione clinica della CMI: la cosiddetta forma end-stage (ES).

Mentre la morte improvvisa, altra pericolosa complicanza della CMI, può essere prevenuta impiantando un defibrillatore (nonostante si stiano ancora identificando i migliori candidati tra i pazienti che necessitano di tale trattamento), per la CMI ES il solo trattamento risolutivo è il trapianto cardiaco, oltre alla terapia medica per il trattamento dei sintomi dello scompenso. Recentemente, il pacing bi-ventricolare è stato suggerito come opzione terapeutica a breve termine in una piccola coorte, ma tale strategia necessita di una validazione in una popolazione più ampia e a più lungo termine.

La CMI è la malattia genetica cardiaca più comune, con una prevalenza stimata di 1/500. La CMI ES, al contrario, è una rara complicanza della malattia, con una prevalenza di circa il 5%. Quindi la prevalenza della CMI ES dovrebbe essere di 1/10000, e tale numero richiede un approccio multicentrico. Vista la complessa eziologia e patogenesi della CMI (è causata da mutazioni di geni codificanti proteine sarcomeriche, ma può anche essere simulata da altre patologie del muscolo cardiaco o periferico), per ottenere dei risultati è necessario un approccio multidisciplinare. Questo progetto, benché si affidi per lo più a cardiologi, ha bisogno della collaborazione di fisiologi, biologi molecolari, genetisti, ed esperti di diagnostica per immagini.

Studieremo la fisiopatologia della CMI in modelli in vitro, così come nei pazienti. È interessante il fatto che secondo l'ipotesi oggi più accreditata, l'incorporazione di una proteina sarcomerica mutata conduca a diminuita contrattilità miocitaria. In contrasto, studi precedenti non hanno mostrato riduzione nella tensione sviluppata da miofibrille isolate contenenti proteine mutate. Svilupperemo studi in vitro su miofibrille da pazienti CMI, e su modelli murini transgenici di CMI, per valutare i cambiamenti meccanici e biochimici nei sarcomeri CMI in relazione a geni, età e stadio della malattia. La nostra ipotesi è che le mutazioni delle proteine sarcomeriche, oltre ad essere responsabili delle alterazioni funzionali che portano al fenotipo CMI, possano scatenare e sostenere il rimodellamento maladattativo responsabile della progressione verso la disfunzione sistolica.

Nei pazienti, testeremo 2 ipotesi per spiegare il motivo per cui talvolta la CMI evolve verso l'ES: l'ipotesi genetica e quella ischemica.

L'ipotesi genetica si basa sull'osservazione che la CMI ES è meno rara in alcune famiglie rispetto alla popolazione generale con CMI. Dall'Unità di Firenze sono stati osservati genotipi complessi che sono associati con disfunzione sistolica, dilatazione della cavità, e sintomi di scompenso. Quindi, i pazienti con CMI saranno studiati per valutare la prevalenza della progressione verso la ES, alla luce dei biomarkers della progressione della malattia e della correlazione con gli endpoints clinici. La prevalenza gene-specifica del decorso clinico e della disfunzione sistolica e diastolica sarà valutata comparando le mutazioni della catena pesante della β -miosina, Myosin-Binding Protein C, Troponina ed eventuali genotipi complessi. Saranno studiati anche altri geni responsabili di Cardiomiopatia Dilatativa. Infine si cercheranno altri geni che simulano la CMI (le cosiddette fenocopie) in pazienti ES.

Inoltre si valuterà l'ipotesi che ripetuti episodi di ischemia/riperfusion portano allo sviluppo di CMI ES studiando l'equilibrio REDOX tramite numerosi marcatori di stress ossidativo da plasma e da cellule mononucleate di pazienti. Questo nuovo approccio consentirà lo studio dell'ischemia in CMI, che è problematico con altre tecniche. I risultati si compareranno tra 3 differenti gruppi di soggetti: 2 gruppi di controllo (soggetti normali e pazienti CMI con normale funzione sistolica) e un gruppo di pazienti con CMI ES.

La complessità di questo progetto di ricerca potrà aiutarci ad identificare le caratteristiche e i meccanismi dell'evoluzione verso la ES CMI.

Testo inglese

The present project continues and further develops a previous project presented and financed in 2006: that project focused on arrhythmic burden (assessed by the study of ion channels), and the evolution to the dilative form. The 2 Florence Units have merged into one in the present project. In the context of that project, the Units have been working in cooperation and results have been published, totaling an Impact Factor of over 90; moreover Units wrote 2 chapters in books.

The aim of the present research project is to investigate the relationship between the etiology and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and the most feared clinical manifestations of the disease: the so called end-stage (ES) form.

While the other ominous complication of HCM, sudden death, can be prevented by implanting a defibrillator (although room for research still exists in identifying those patients in need of such treatment), for ES HCM the only treatment is heart transplant, besides the medical therapy for symptoms of heart failure. Recently, bi-ventricular pacing has been suggested as an option in small cohorts in the short term, but this option still awaits validation in larger populations with longer follow up.

HCM is the most common genetic heart disease, with an estimated prevalence of 1/500. ES HCM is, in contrast, a rare complication of this disease, with an approximate prevalence of 5%. Thus, the prevalence of ES HCM should be 1/10000; this figure warrants a multicenter approach. Because of the complex etiology of the disease, caused by mutations of genes encoding for sarcomeric proteins, but also mimicked by other cardiac or peripheral muscle diseases, and the pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy, which is still under debate, a multidisciplinary approach is also needed to achieve results. This project, although mostly led by cardiologists, also includes physiologists, molecular biologists, geneticists, and experts in medical imaging.

We will study the pathophysiology of HCM in in vitro models, as well as in patients. Interestingly, according to current hypotheses, the incorporation of a mutated sarcomeric protein leads to decreased contractility of the cardiac myocytes. In contrast, previous studies showed no reduction in the tension developed by isolated myofibrils containing mutated proteins. We will perform in vitro studies on myofibrils from HCM patients, and transgenic HCM mouse models, to assess the mechanical and biochemical changes in HCM sarcomeres in relation to gene, age, and stage of the disease. Our hypothesis is that mechanisms at the level of sarcomeric proteins, besides being responsible of the functional alterations leading to HCM disease, can trigger and sustain maladaptive remodeling responsible for disease progression towards systolic dysfunction.

In patients, we will test 2 hypotheses as to why HCM occasionally evolves toward ES: genetics, and ischemia.

The genetic hypothesis is based on the observation that ES HCM is less rare in some families than in the general population with HCM. Complex genotypes have been seen by the Florence Unit to be associated with systolic impairment, cavity dilatation, and symptoms of heart failure. Thus, patients with HCM will be studied to assess the prevalence of disease progression to ES, in light of biomarkers of disease progression and correlation with clinical outcome endpoints: gene-specific

prevalence of clinical outcome and systolic and diastolic dysfunction will be evaluated by comparing mutations of: β Myosin Heavy Chain, Myosin-Binding Protein C, Troponin and complex genotypes. Other genes, known to be responsible for Dilated Cardiomyopathy, will also be screened. Finally, other diseases mimicking HCM (the so called phenocopies) will be sought in patients with ES form.

The hypothesis that repeated bursts of ischemia/reperfusion lead to the development of ES HCM will be pursued by assessing the REDOX state from plasma and mononuclear cells, using an array of parameters. This approach will allow study of ischemia in HCM, which is rather unreliable by other techniques. Findings will be compared in 3 groups of subjects: 2 control groups (i.e. normal subjects and patients with HCM but normal systolic function) and ES HCM.

The complexity of the present research project could help identify the characteristics and mechanisms of evolution toward ES HCM.

11 - Stato dell'arte

Testo italiano

La cardiomiopatia ipertrofica (CMI) è caratterizzata dalla presenza di ipertrofia ventricolare sinistra (VS), tipicamente asimmetrica, in assenza di malattia sistemica o altra cardiopatia (1). CMI è la più frequente cardiomiopatia primitiva su base genetica con una prevalenza di 1 su 500 nella popolazione generale. La presentazione clinica e la storia naturale sono particolarmente eterogenee, variando da forme benigne e asintomatiche a manifestazioni maligne, quale la morte improvvisa e prematura nei giovani. Un piccolo ma rilevante sottogruppo di pazienti sviluppa disfunzione sistolica VS e scompenso cardiaco severo, di solito associato ad assottigliamento parietale e a dilatazione della cavità VS. Ciò accade in circa il 5% dei pazienti; questa condizione è stata chiamata CMI end-stage (ES). La diagnosi si basa sull'evidenza inspiegata di un ventricolo sinistro ipertrofico e non dilatato; quando la CMI evolve nella sua forma dilatativa, la diagnosi è spesso solo possibile in presenza di progressiva evidenza di ipertrofia e piccolo volume di camera.

Il sottogruppo di CMI ES è eterogeneo ed è stato fino ad oggi poco caratterizzato. La CMI ES ha diverse espressioni cliniche, con un eterogeneo rimodellamento, frequente fibrillazione atriale, e alterata funzione VS che precede la dilatazione, l'assottigliamento parietale e i sintomi di scompenso cardiaco. L'ES è una complicanza sfavorevole con una mortalità dell'11%/anno ed è fattore di rischio per morte improvvisa. Le opzioni terapeutiche sono limitate al trattamento dello scompenso cardiaco ed al trapianto cardiaco (2).

Dal punto di vista eziopatogenetico la cardiomiopatia ipertrofica è considerata una malattia del sarcomero caratterizzata da un'ampia variabilità genetica e studi

recenti hanno evidenziato come il meccanismo finale sia da attribuire ad un deficit energetico cellulare (14). Fino ad oggi sono state identificate più di 450 mutazioni relative a 20 geni. I 4 geni più frequentemente coinvolti sono quelli codificanti la catena pesante della β -miosina (MYH7), la proteina C legante la miosina (MYBPC3), la troponina T (TNNT2) ed I (TNNI3). Gli altri geni target di mutazioni patologiche comprendono l' α -tropomiosina (TPM1), le catene leggere essenziali e regolatrici della β -miosina (MYL2 e MYL3), la titina (TTN), l' α -actina cardiaca (ACTC), la catena pesante dell' α -miosina (MYH6), la troponina C (TNNC1), la telethonina (TCAP) e la proteina LIM (CSR3) (3).

Quali siano i meccanismi alla base del profilo clinico di CMI ES non è noto. L'ipotesi corrente è che in CMI l'ipertrofia è compensatoria all'ipocontrattilità delle proteine sarcomeriche mutate, stimolo potente per la crescita ed il rimodellamento cardiaci. Lo stress cellulare è aumentato, da cui l'espressione dei fattori mitotici e trofici sensibili allo stress quali l'insulin-like growth factor I (IGF-1), il transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) e l'angiotensina II, risulta up-regolata (4).

Sono state proposte numerose ipotesi circa l'evoluzione verso lo scompenso sistolico in CMI; esse non sono mutualmente esclusive, dal momento che diversi meccanismi possono determinare l'evoluzione in differenti pazienti, oppure concorrere nello stesso paziente. Fattori genetici possono essere rilevanti in ES CMI, perchè essa è più comune in alcune famiglie rispetto alla popolazione generale con CMI. Da notare come mutazioni in geni che codificano alcune proteine sarcomeriche (la catena pesante della β miosina, la troponina T, la proteina C legante la miosina, la titina, il fosfolambano, e l' α tropomiosina) siano comuni sia a forme di cardiomiopatia ipertrofica che dilatativa, il che suggerisce una comune convergenza finale di questi 2 fenotipi (3). Sebbene non vi sia relazione genetica tra cardiomiopatia dilatativa e CMI che dilata, è probabile che alcune mutazioni impongono uno stress maggiore ai cardiomiociti e stimolano l'apoptosi. Genotipi complessi, come quelli con più di una mutazione di proteine sarcomeriche, sviluppano CMI ES con maggiore prevalenza. Anche se non c'è un singolo gene responsabile di CMI ES, il gene MYBPC3 sembra più spesso coinvolto.

L'ischemia ha probabilmente un ruolo rilevante, dal momento che le arterie coronarie intramurali sono caratterizzate da ispessimento della media e possono essere considerate come una forma di malattia del microcircolo. Queste alterazioni di architettura e il mismatch tra massa miocardica e circolazione coronaria sono presumibilmente responsabili della ridotta riserva coronaria e dell'ischemia miocardica seguita da riperfusione, seguita da morte cellulare e cicatrizzazione. Detta cicatrice può servire come substrato per la morte improvvisa oppure, se il fenomeno è sufficientemente esteso, per lo scompenso cardiaco. L'ischemia/riperfusione conduce allo stress ossidativo, che è stato valutato nella fisiopatologia della ipertrofia e dello scompenso cardiaco. Nel miocardio umano, i livelli NADPH sono più alti nello scompenso cardiaco (5). Nei soggetti ipertesi, il sistema del glutatione, ma non quello del sistema della tioredossina, è alterato, con più bassi livelli di GSH con aumento parallelo dei markers di stress ossidativi. L'ischemia miocardica inibisce la catena respiratoria mitocondriale, il che genera Reactive Oxygen Species (ROS). Si ritiene che bassi livelli di ROS giochino un ruolo nel normale signaling cardiaco, nell'adattamento durante la crescita e nelle variazioni della matrice. Più alti livelli attivano il rimodellamento fisiopatologico, l'apoptosi e la disfunzione di camera. La produzione di ROS è aumentata da stimoli come l'angiotensina II, TNF- α , fattori di crescita e di carico. L'aumento della produzione di ROS è implicato nella ipertrofia cardiomiocitaria in vitro e nella fisiopatologia della ipertrofia ventricolare e dello scompenso cardiaco in vivo in differenti modelli sperimentali tra cui un modello di CMI da mutazioni di cTnT. I ROS modulano la proliferazione fibroblastica e la sintesi del collagene (6). Inoltre, proteine chiave coinvolte nella eccitazione-contrazione miocardica, come i canali ionici, i canali che rilasciano Ca⁺⁺ del reticolo sarcoplasmatico (RyR2) e le proteine dei miofilamenti, possono portare ad alterazioni nella attività dipendenti da REDOX.

Bibliografia essenziale.

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classifications of the cardiomyopathies. *Circulation* 2006; 113:1807-1816.
2. Harris KM, Spirito P, Maron MS, Zenovich AG, Formisano F, Lesser JR, Mackey-Bojack S, Manning WJ, Udelson JE, Maron BJ. Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2006;114:216-25.
3. Ashrafian H, Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49:1251-64.
4. Marian AJ and Roberts R. The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:655-70
5. Heymes C, Bendall JK, Rajczak P, Cave AC, Samuel J-L, Hasenfuss G, Shah AM. Increased Myocardial NADPH Oxidase Activity in Human Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2164-71
6. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520-30.

Testo inglese

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a primary clinically heterogeneous but relatively common autosomal dominant genetic heart disease (1:500 of the general population)(1). HCM is characterized morphologically and defined by a hypertrophied, non dilated left ventricle (LV) in the absence of another systemic or cardiac disease capable of producing it.

The clinical course of HCM is very heterogeneous, more often with benign outcome in asymptomatic forms but also with malignant presentation in patients who die suddenly. A small but important subgroup of HCM patients develops systolic ventricular dysfunction and severe heart failure, usually associated with LV wall thinning and chamber enlargement. This occurs in about 5% of patients and has been termed "end stage" (ES) HCM. Clinical diagnosis is typically made by 2-dimensional echocardiography by detection of unexplained LV wall thickening, in presence of a small LV cavity; when cavity dilatation occurs, diagnosis is often only possible based on previous evidence of hypertrophy and small cavity size.

The subgroup of ES HCM is pretty heterogeneous, and has been so far poorly characterized. ES HCM has a diverse clinical expression, including heterogeneous pattern of remodeling, frequent association with atrial fibrillation, and impaired LV contractility that precedes cavity dilatation, wall thinning, and heart failure symptoms. ES is an unfavorable complication with a mortality rate of 11%/year and a sudden death risk factor (2).

Hypertrophic cardiomyopathy is considered a disease of sarcomere with wide genetic variability and cellular energy deficiency as final pathogenetic mechanism. Currently, over 450 mutations in 20 different genes encoding sarcomeric and non-sarcomeric proteins have been associated with HCM, but the 4 genes most commonly involved are β -myosin heavy chain (MYH7), myosin-binding protein C (MYBPC3), troponin T (TNNT2), and troponin I (TNNI3) genes. Mutations involving α -tropomyosin (TPM1), essential and regulatory myosin light chain (MYL2 and MYL3), titin (TTN), cardiac α -actin (ACTC), α -myosin heavy chain (MYH6), cardiac troponin C (TNNC1), telethonin (TCAP), and cardiac muscle LIM protein (CSR3) are less common (3).

What mechanisms may be involved in determining the clinical profiles of heart failure is not known. Current hypothesis suggests that hypertrophy in HCM is compensatory, triggered by the mutant, hypo-contractile sarcomeric proteins, a potent stimulus for stress-dependent cardiac growth and remodeling. Cell stress is increased and, as a result, expression of the stress-responsive trophic and mitotic factors such as insulin-like growth factor I (IGF-1), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and angiotensin II are upregulated (4).

Several hypothesis have been proposed, which are not mutually exclusive, as different mechanisms might be involved in adifferent patients, or even concur in the same patient. Genetic factors may be relevant, as ES HCM is more prevalent in some families than in the general population with HCM. Mutations in some sarcomeric proteins (β -myosin heavy chain, myosin-binding protein C, troponin T, titin, phospholamban and α -tropomyosin) have been shown to cause both HCM and dilated cardiomyopathies, suggesting a common final pathway for these two phenotypes (3). Also apoptosis represents a critical pathway in the progression of heart failure. Although there is no relationship between mutations of dilative cardiomyopathy and of HCM that dilate, it is likely that these mutations stress myocytes more severely and trigger apoptosis. Complex genotypes, such as those harboring more than one sarcomeric mutations, are more likely to develop LV dysfunction and heart failure. Although there is not a specific gene involved, MYBPC3 mutations seem to be associated with highest rate of progression to ES.

Ischemia could also play a role, as HCM is characterized by abnormal intramural coronary arteries, a form of small vessel disease. Such architectural alterations of the microvasculature, as well as the mismatch between myocardial mass and coronary circulation, are likely responsible for impaired coronary vasodilator reserve and bursts of myocardial ischemia followed by reperfusion and subsequent cell necrosis and scar, which may serve as substrate for sudden death or, if diffuse enough, heart failure. Ischemia/reperfusion leads to oxidative stress, that has been evaluated in the pathophysiology of human hypertrophy and heart failure. In human myocardium, NADPH levels are higher in heart failure compared to controls (5). In hypertensive subjects, the glutathione system, but not the thioredoxin system, is altered, with lower GSH levels which paralleled an increase in markers of oxidative stress. Myocardial ischemia inhibits the mitochondrial respiratory chain, ensuing Reactive Oxygen Species (ROS). Low levels of ROS are thought to play a role in normal cardiac signaling, growth adaptations, and matrix changes. Higher levels play a role in pathophysiologic remodeling, apoptosis, and chamber dysfunction. ROS generating activity is increased by stimuli such as angiotensin II, TNF- α , growth factors and cyclical load. Increased ROS production is implicated in cardiomyocytes hypertrophic growth in vitro and in the pathophysiology of LV hypertrophy and heart failure in different experimental models, including an experimental model of HCM caused by a mutation in cTnT. ROS modulate fibroblast proliferation and collagen synthesis (6). Furthermore, key proteins involved in myocardial excitation-contraction coupling, such as ion channels, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channels and myofibrillar proteins, can undergo REDOX-sensitive alterations in activity.

Relevant references.

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classifications of the cardiomyopathies. *Circulation* 2006; 113:1807-1816.

- Harris KM, Spirito P, Maron MS, Zenovich AG, Formisano F, Lesser JR, Mackey-Bojack S, Manning WJ, Udelson JE, Maron BJ. Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2006;114:216-25.
- Ashrafian H, Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49:1251-64.
- Marian AJ and Roberts R. The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:655-70
- Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel J-L, Hasenfuss G, Shah AM. Increased Myocardial NADPH Oxidase Activity in Human Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2164-71
- Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520-30.

12 - Articolazione del Progetto e tempi di realizzazione

Testo italiano

Questo progetto dipende dall'arruolamento di pazienti e dalla disponibilità di campioni biologici (sangue o muscolo cardiaco). Pertanto, è impossibile dettare i tempi del progetto.

Grazie alla stretta collaborazione tra Unità, l'arruolamento dei pazienti sarà relativamente facile: ogni Unità segue alcune centinaia di pazienti con cardiomiopatia ipertrofica (CMI), una minoranza dei quali in fase end-stage (ES). Pazienti con CMI ES già presenti nei databases saranno contattati ed arruolati dopo aver ottenuto il consenso informato; nuovi pazienti saranno valutati ed arruolati se presentano le condizioni adatte. Il numero previsto di pazienti dovrebbe essere raggiunto entro 1 anno. Le indagini di diagnostica per immagini (ecocardiografia, imaging di risonanza magnetica etc.) saranno eseguite subito dopo l'arruolamento.

I campioni di sangue per studi sullo stress ossidativo e per estrazione di DNA saranno raccolti all'arruolamento ed analizzati appena se ne sarà raccolto un numero sufficiente a giustificare i costi.

I campioni di muscolo cardiaco (ottenuti da biopsie in corso di interventi di miotomia-miectomia o da cuori espantati) saranno valutati immediatamente.

La raccolta e l'analisi dei dati, e la stesura di risultati preliminari sarà possibile entro i limiti di tempo del progetto (2 anni).

Testo inglese

This project relies on patients' enrollment and availability of biological samples (blood and heart muscle). As of such, a schedule would be impossible to arrange.

Thanks to the close cooperation among Units, patients' enrollment should be relatively easy: each Unit follows several hundreds patients with HCM, a minority of them in ES phase. These patients with ES HCM will be contacted and asked informed consent to enrollment, while new patients will be screened and, if appropriate, enrolled. The target number of patients should be reached within 1 year. Imaging procedures (echocardiography, magnetic resonance imaging etc.) will follow shortly enrollment.

Blood samples for REDOX studies and for DNA extraction will be collected upon enrollment and analyzed as soon as a sufficient number is reached to justify costs.

Heart muscle samples will be collected as biopsies during myotomy-myectomy surgery or from heart explants, and will be processed immediately.

Data collection and analysis, as well as preliminary results can be obtained within the time frame of the project (2 years).

13 - Ruolo di ciascuna unità operativa in funzione degli obiettivi previsti e relative modalità di integrazione e collaborazione

Testo italiano

Il progetto sarà realizzabile solo se sussisterà una solida collaborazione tra le Unità. Le nostre Unità lavorano strettamente ed hanno creato una rete nel campo della cardiomiopatia ipertrofica (CMI) da 10 anni. Questa integrazione tra le Unità è testimoniata da molti lavori in collaborazione pubblicati in questi anni. Le Unità si propongono di accertare, alla luce delle attuali ipotesi patogenetiche della CMI, cosa porta allo sviluppo dell'alterazione contrattile, della dilatazione ventricolare ed al quadro clinico dello scompenso cardiaco congestizio (chiamato fase end-stage, ES, della CMI). Ciascuna Unità sarà coinvolta in un aspetto specifico del progetto.

Unità 1 (Napoli)

L'Unità analizzerà l'impatto di ripetuti episodi di ischemia/riperfusion sulla disfunzione sistolica, partendo dal riconosciuto ruolo che questi fenomeni rivestono nel rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che portano ad alterazioni della contrattilità miocardica. Arruoleranno 50 pazienti con CMI ES e 2 gruppi di controllo appaiati per età e sesso: 50 pazienti con CMI e funzione sistolica normale e 15 soggetti normali. Verranno registrati i sintomi dei pazienti. La tolleranza all'esercizio sarà valutata in ogni paziente sia come classe funzionale NYHA sia con l'esecuzione di esercizio fisico al cicloergometro con ergospirometria. Al momento della valutazione, un campione di sangue venoso periferico sarà ottenuto al fine di misurare i livelli di proteina C reattiva, Troponina I, e lo stress ossidativo. Quest'ultimo verrà valutato tramite il rapporto GSSG/GSH nel plasma e nei monociti e dosando i prodotti indotti dai ROS: prodotti di proteine ossidate (AOPP), LDL ossidate (OxLDL) e malondialdeide (MDA). La risposta allo stress ossidativo cronico sarà ulteriormente valutata misurando i livelli di mRNA di componenti del GSH e del sistema Trx. Lo stress ossidativo sarà correlato ai parametri clinici, come la presenza di angina pectoris, di segni/sintomi di scompenso cardiaco, alle misure ottenute con ecocardiografia (compresa l'analisi strain e strain rate), la tolleranza all'esercizio (compresa la risposta pressoria anomala all'esercizio) e l'imaging di Risonanza Magnetica (IRM) (comprese la somministrazione di gadolinio e l'acquisizione di immagini per il "late enhancement", indicativo di fibrosi)

Unità 2 (Firenze)

Questa Unità caratterizzerà l'espressione clinica e molecolare della progressione della CMI in pazienti e loro familiari genotipizzati, in relazione ad una specifica base genetica. La valutazione sarà clinica, ecocardiografica (incluso la valutazione dell'ostruzione durante esercizio), inoltre sarà valutata la tolleranza all'esercizio con ergospirometria, e verrà eseguita in ciascun paziente IRM. La valutazione dei marcatori biologici della progressione della malattia (peptici natriuretici atriali, prodotti del metabolismo del collagene, proteina C reattiva, Troponina I, CK, TGF β -1, TNF α) sarà effettuata in ogni paziente. Questi dati saranno messi in relazione con il genotipo, con particolare attenzione ad eventuali genotipi complessi. Una seconda parte del loro progetto prevederà lo studio in vitro di miofibrille isolate da pazienti con CMI (ES o con normale funzione sistolica e gradiente al tratto d'efflusso). L'Unità valuterà le caratteristiche meccaniche e biochimiche in relazione al gene, all'età, alle caratteristiche cliniche, e alle mutazioni (MYBPC3 and MYH7). Verranno anche analizzate le proteine alterate dei miofilamenti. Oltre alle proteine mutate, l'espressione di altre proteine sarcomeriche, che potrebbero essere alterate in CMI in risposta allo stress cardiaco ed alla progressione della malattia, verrà analizzata in base al pattern di fosforilazione della Troponina I, Troponina T, cMyBP-C, e catene leggere della miosina 2. Un approccio simile verrà usato in campioni di muscolo cardiaco di modelli animali (topi MYBPC3 knock-out e knocked-in)

Unità 3 (Padova)

Questa Unità analizzerà i pazienti selezionati da Padova, Napoli e Firenze che svilupperanno scompenso cardiaco severo e progressive da un punto di vista genetico. I pazienti saranno genotipizzati sia per mutazioni causali sia per altri geni riconosciuti responsabili per la cardiomiopatia dilatativa. Inoltre, in pazienti con forme di CMI familiare trasmessa con modalità dominante X-linked e con elevati livelli sierici di creatin fosfochinasi (segno di coinvolgimento dei muscoli scheletrici), sarà eseguita l'analisi del gene LAMP2. I pazienti genotipizzati saranno inoltre studiati con ecocardiografia integrata con il TDI, a riposo e durante esercizio, con il test cardiopolmonare, e con IRM (incluse la somministrazione di gadolinio e l'acquisizione di immagini tardive per l'identificazione della fibrosi). Campioni di sangue saranno ottenuti per dosare il NT pro-BNP, il collagene, le Troponine I e T, la proteina C reattiva ad alta sensibilità, l'albumina modificata dall'ischemia e l'endotelina. I reperti macroscopici e microscopici (necrosi, apoptosi, fibrosi interstiziale e riparativa, ponti miocardici, arterie coronarie epicardiche) saranno ottenuti da cuori espantati o da autopsie per studiare i differenti modelli di forme evolutive di scompenso cardiaco da un punto di vista patologico e per correlare i dati in vivo con quelli post-mortem.

Testo inglese

This project will be feasible only if a close cooperation among Units exists. Our Units have been working in the field of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) as a network for 10 years. An array of publications have been produced in these years that witness the integration among Units.

The Units will try to ascertain, in light of current pathogenetic hypothesis of HCM, what leads to the development of contractile impairment, cavity dilation, wall thinning, and the clinical picture of congestive heart failure (the so called end stage phase, ES). Each Unit will be involved on a specific aspect.

Unit 1 (Naples).

This Unit will analyze the impact of repeated bursts of ischemia/reperfusion on systolic impairment, as the ensuing release of reactive oxygen species (ROS) is known to impair myocardial contractility. They will enroll 50 patients with ES HCM and 2 age- and sex-matched control groups: 50 patients with HCM and normal systolic function, and 15 normal subjects. Patients' symptoms will be recorded. Exercise tolerance will be assessed as NYHA functional class and by symptom-limited treadmill exercise testing with continuous measurement of expired gas analysis. At the time of evaluation, a blood sample will be drawn to measure C-Reactive Protein, Troponin I, and oxidative stress. This latter will be assessed as the GSSG/GSH ratio in plasma and mononuclear cells, as well as the ROS-induced byproducts: Advanced Oxidation Protein Products (AOPP), oxidized LDL (OxLDL), malondialdehyde (MDA). The response to chronic oxidative stress will further be assessed by measuring the mRNA levels of the components of the GSH and Trx systems in mononuclear cells. Oxidative stress will be correlated to clinical parameters, such as the presence of angina pectoris, symptoms/signs of heart failure, and measurements obtained by echocardiography (including strain and strain rate analysis), exercise tolerance (including abnormal blood pressure response to exercise), and Magnetic Resonance Imaging (MRI) (including gadolinium administration and acquisition of images for late enhancement, which corresponds to fibrosis).

Unit 2 (Florence).

This Unit will characterize the clinical and molecular expressions of disease progression in HCM, and genotyped family members, in relation to its specific genetic basis. The assessment will be clinical, echocardiographic (including exercise-provoked outflow tract obstruction), by exercise test with expired gas analysis, and by MRI. Assessment of biomarkers of disease progression (atrial natriuretic peptides, collagen byproducts, C-Reactive Protein (CRP), Troponin, CK, TGF- β 1, TNF α) will also be performed. These findings will be compared to the genotype, with particular emphasis on complex genotypes. A 2nd part of their project will involve in vitro studies of isolated myofibrils from patients with HCM (ES or with normal systolic function and outflow tract obstruction). They will assess mechanical and biochemical changes in relation to gene, age and clinical features, and mutations (MYBPC3 and MYH7). In these samples, analysis of altered myofilament proteins will be carried out. Apart from the mutant proteins, expression of other sarcomeric proteins, which might be altered in HCM heart in response to cardiac stress and disease progression, will be analyzed in light of the pattern of phosphorylation of troponin I, troponin T, cMyBP-C, and myosin light chain 2. A similar approach will be used in heart muscle samples from animal models (MYBPC3 knock-out and knocked-in mouse).

Unit 3 (Padua).

This Unit will analyze HCM patients selected from Padua, Florence and Naples series who developed severe and progressive heart failure, by a genetic approach. These patients will be genotyped, looking for causal mutations and other genes, known to be responsible for Dilated Cardiomyopathy. Furthermore, in patients with X-linked dominant inheritance familial HCM forms and with elevated creatine phosphokinase serum level (skeletal muscle involvement sign), genetic analyses of LAMP2 gene will be performed. Genotyped patients will further be studied by echocardiography with TDI, at rest and during exercise, by cardio-pulmonary test, and by MRI (including gadolinium administration and delayed images acquisition for identification of fibrosis). Blood samples will be drawn for NT pro-BNP, collagen, troponin I and T, high sensitivity CRP, ischemia-modified albumin, and endothelin dosages. Macroscopic and microscopic findings (necrosis, apoptosis, interstitial or substitutive fibrosis, muscular bridges, epicardial coronary artery disease) will be obtained from explanted hearts or autopsy for studying the different patterns of heart failure evolution from a pathological point of view and for correlating post-mortem and in vivo data.

14 - Risultati attesi dalla ricerca, il loro interesse per l'avanzamento della conoscenza e le eventuali potenzialità applicative

Testo italiano

Lo scopo di questo progetto è di valutare il meccanismo (o i meccanismi) che portano da uno stato iperdinamico alla disfunzione sistolica, alla dilatazione di camera ed allo scompenso cardiaco conclamato in cardiomiopatia ipertrofica (CMI). Una conseguenza di questo progetto, che tuttavia non ricade tra i suoi obbiettivi, potrebbe essere la generazione di un modello animale che riassume la forma evolutiva verso l'end stage (ES) della CMI.

Come indicato in precedenza, verificheremo 2 ipotesi: che la forma ES si verifichi in pazienti con uno specifico genotipo, o piuttosto che sia la conseguenza di ripetuti episodi di ischemia/riperfusione (cioè che la forma ES si può verificare con qualunque genotipo). Queste 2 ipotesi non si escludono a vicenda: è infatti possibile che alcuni genotipi conducano di per se alla forma ES, ma che alcune caratteristiche fenotipiche (come ad esempio la ridotta riserva coronarica, l'ipertrofia massiva etc.) attraverso un meccanismo ischemico conducano allo stesso risultato.

Osservazioni non ancora pubblicate da parte dell'Unità di Firenze indicano un'augmentata prevalenza di disfunzione sistolica in pazienti con genotipi complessi (cioè con più di una mutazione "causale"). Sembra dunque probabile che queste osservazioni siano confermate in un più ampio e significativo numero di pazienti. Parallelamente, ma da una diversa prospettiva, si analizzeranno le mutazioni responsabili di cardiomiopatie dilatative per studiare se questi geni possono comportarsi come modificatori, contribuendo allo sviluppo del fenotipo CMI ES.

Il fenotipo CMI ES verrà caratterizzato tramite una serie di metodi, dall'autopsia all'imaging di risonanza magnetica, associato allo studio del late enhancement per identificare la fibrosi, all'ecocardiografia con nuove tecniche come il tissue Doppler imaging, e l'analisi di strain e strain rate. Questo approccio integrato dovrà fornire una migliore caratterizzazione del fenotipo CMI ES; le informazioni disponibili attualmente non derivano da studi approfonditi in popolazioni di sufficiente ampiezza.

L'ipotesi del meccanismo ischemico alla base della evoluzione verso la forma ES della CMI è rafforzata da uno studio dell'Unità di Firenze con tomografia ad emissione di positroni (PET) (Cecchi F, Olivetto I, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Camici PG. Coronary microvascular dysfunction and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 2003;349:1027-35). Questo studio dimostra che pazienti con CMI e ridotta riserva coronarica o ridotto flusso coronarico durante massima vasodilatazione evolvono verso segni e sintomi di scompenso cardiaco ed hanno una prognosi più sfavorevole. L'ischemia è un potente fattore di sviluppo di disfunzione sistolica in pazienti coronaropatici e nell'animale da esperimento. I pazienti con CMI, qualunque sia la loro funzione sistolica, hanno frequenti episodi di ischemia/riperfusione, le cui conseguenze si manifestano sotto la forma di fibrosi riparativa a tralci e sono note da lungo tempo. Sembra perciò probabile che questa ipotesi possa essere provata; l'approccio che sarà adoperato è piuttosto innovativo (lo studio dello stress ossidativo) e dovrebbe essere utile, in considerazione del fatto che altre tecniche di valutazione del danno ischemico, a parte la PET, non sono affidabili in CMI.

Testo inglese

The goal of this project is to assess the mechanism(s) which lead from a hyperdynamic state to systolic dysfunction, cavity dilation, and overt heart failure in hypertrophic cardiomyopathy (HCM). An ultimate spinoff, that falls outside the purposes of the present project, could be the development of an animal model recapitulating HCM that evolves toward the end stage (ES) form.

As outlined above, we will test 2 hypothesis: that ES occurs in patients with a given genotype, or that it is the consequence of repeated episodes of ischemia/reperfusion (i.e. ES can occur in any patient, regardless of the genotype). The 2 hypothesis are not mutually exclusive: it is in fact possible that a given genotype will evolve per se toward ES, and that some phenotype characteristics (such as impaired coronary reserve, extreme hypertrophy etc.) also evolve toward ES by the ischemia/reperfusion pathway.

Unpublished observations of the Florence Unit show an increased prevalence of ES HCM in patients with complex genotypes (i.e. patients with more than 1 "causal" mutation). Therefore it is likely that these observations will be confirmed in a meaningful number of patients. In parallel to this aspect, mutations of genes known to yield dilated cardiomyopathy will be screened, to verify if these genes can act as modifier genes and contribute to the ES HCM phenotype.

The ES HCM phenotype will be characterized by an array of methods (from autopsy, to magnetic resonance imaging, in association with late enhancement analysis to identify fibrosis, to echocardiography with newer techniques such as tissue Doppler imaging, strain and strain rate analysis. This approach is expected to yield a much better description of ES HCM phenotype than that currently available: in fact this topics has not been studied in depth in a sizable population.

The hypothesis that ischemia be responsible of ES HCM is supported by a study by positron emission tomography (PET) performed by the Florence Unit: Cecchi F, Olivetto I, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Camici PG. Coronary microvascular dysfunction and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 2003;349:1027-35. This study shows that patients with subnormal coronary flow reserve and reduced blood flow during maximal vasodilation evolve toward signs and symptoms of congestive heart failure, and have a worse prognosis. Ischemia is a potent determinant of systolic dysfunction in coronary artery disease patients and in the experimental animal. Patients with HCM, regardless of systolic function, experience bursts of ischemia/reperfusion, the consequences thereof have been known for a long time (patchy, reparative fibrosis). It is therefore likely that this hypothesis will be proved; the approach is rather novel (study of the oxidative stress), and is expected to be useful as other methods of assessing ischemia in HCM (aside from PET) are elusive.

15 - Elementi e criteri proposti per la verifica dei risultati raggiunti

Testo italiano

Il prodotto di questo tipo di progetto di ricerca è costituito da pubblicazioni su riviste scientifiche di settore. La produttività scientifica (valutata in termini di Impact Factor) costituisce il principale metro di valutazione del nostro programma.

CRITERI DI VERIFICABILITÀ SCIENTIFICA

Dopo il primo anno del programma, risultati preliminari saranno presentati a congressi internazionali. Alla fine del periodo di durata del programma l'efficacia sarà valutata in base al numero ed alla qualità dei lavori pubblicati o sottoposti per pubblicazione.

CRITERI DI VERIFICABILITÀ TEMPORALE

La distribuzione temporale di alcune fasi del protocollo non è prevedibile. In particolare, la parte di protocollo che prevede l'impiego di tessuto miocardico umano è esposto alla occasionalità di reperimento dei materiali. Il reclutamento di pazienti non prevede alcuna difficoltà, poiché le Unità dispongono di ambulatori dedicati allo studio della cardiomiopatia ipertrofica, ognuno con un ampio database di pazienti. Le metodiche per le parti dello studio (imaging di risonanza magnetica, ecocardiografia, ergospirometria, sequenziamento del DNA per identificazione di mutazioni, studio meccanico e biochimico di miofibrille private di membrana e isolate etc.) sono già implementate presso le Unità. Dopo i primi 18 mesi, gran parte dei risultati dovranno esser acquisiti; il completamento dell'intero programma è prevedibile entro i 2 anni. La struttura del programma di ricerca rende molto probabile il rispetto della sua durata totale.

Testo inglese

This kind of program yields publications on specific scientific journals. Scientific productivity (assessed in terms of Impact Factor) constitutes the main parameter upon which our program can be judged.

SCIENTIFIC CRITERIA

After the first year of this program, preliminary results obtained will be submitted for presentation in international meetings. At the end of the program's time frame, its efficacy will be evaluated in terms of quantity and quality of published (or submitted for publication) papers.

TIME CRITERIA

Time distribution of this program is unpredictable. Particularly, the part that relies on human myocardial tissue depends on availability of materials. Patients' enrollment will be no problem, as all Units run outpatient clinics on hypertrophic cardiomyopathy, each with a large patients' database; therefore it is reasonable to predict that enrollment will be complete within 1 year. Most of the methods that will be used in the program (magnetic resonance imaging, echocardiography, exercise test with expired gas analysis, DNA sequencing for identification of mutations, mechanical and biochemical study of skinned, isolated myofibrils etc.) are already implemented in the Units. After 18 months of the program, the majority of results is expected to be acquired; completion of the entire program is expected to occur within 2 years. The scaffold of this program makes it very likely for it to be completed within the allotted time.

16 - Mesi persona complessivi dedicati al Progetto di Ricerca

	Numero	Disponibilità temporale indicativa prevista		Totale mesi persona
		Impegno 1° anno	Impegno 2° anno	
Componenti della sede dell'Unità di Ricerca	9	42	41	83
Componenti di altre Università /Enti vigilati	0	0	0	0
Titolari di assegni di ricerca	2	11	11	22
Titolari di borse	Dottorato	4	25	25
	Post-dottorato	0		
	Scuola di Specializzazione	4	12	12
Personale a contratto	Assegnisti	4	44	33
	Borsisti	0		
	Altre tipologie	0		
Dottorati a carico del PRIN da destinare a questo specifico progetto	0	0	0	0
Altro personale	6	41	30	71
TOTALE	29	175	152	327

17 - Costo complessivo del Progetto articolato per voci

Voce di spesa	Unità I	Unità II	Unità III	TOTALE
Materiale inventariabile	0	15.000	0	15.000
Grandi Attrezzature	0	0	0	0
Materiale di consumo e funzionamento (comprensivo di eventuale quota forfettaria)	5.000	45.000	34.000	84.000
Spese per calcolo ed elaborazione dati	1.000	0	0	1.000
Personale a contratto	39.100	76.000	19.000	134.100
Dottorati a carico del PRIN da destinare a questo specifico progetto	0	0	0	0
Servizi esterni	0	0	0	0
Missioni	700	6.000	2.500	9.200
Pubblicazioni (*)	0	2.000	1.000	3.000
Partecipazione / Organizzazione convegni (*)	2.900	5.000	3.500	11.400
Altro (voce da utilizzare solo in caso di spese non riconducibili alle voci sopraindicate)	0	1.000	0	1.000
Costo convenzionale	5.000	5.000	4.000	14.000
TOTALE	53.700	155.000	64.000	272.700

18 - Prospetto finanziario suddiviso per Unità di Ricerca

	Unità I	Unità II	Unità III	TOTALE
a.1) finanziamenti diretti, disponibili da parte di Università/Enti vigilati di appartenenza dei ricercatori dell'unità operativa	4.200	10.500	8.700	23.400
a.2) finanziamenti diretti acquisibili con certezza da parte di Università/Enti vigilati di appartenenza dei ricercatori dell'unità operativa	8.100	31.000	6.500	45.600
a.3) finanziamenti connessi al costo convenzionale	5.000	5.000	4.000	14.000
b.1) finanziamenti diretti disponibili messi a disposizione da parte di soggetti esterni	0	0	0	0
b.2) finanziamenti diretti acquisibili con certezza, messi a disposizione da parte di soggetti esterni	2.300	0	0	2.300
c) cofinanziamento richiesto al MIUR (max 70% del costo complessivo)	34.100	108.500	44.800	187.400
TOTALE	53.700	155.000	64.000	272.700

I dati contenuti nella domanda di finanziamento sono trattati esclusivamente per lo svolgimento delle funzioni istituzionali del MIUR. Incaricato del trattamento è il CINECA- Dipartimento Servizi per il MIUR. La consultazione è altresì riservata al MIUR - D.G. della Ricerca -- Ufficio IV -- Settore PRIN, alla Commissione di Garanzia e ai referee scientifici. Il MIUR potrà anche procedere alla diffusione dei principali dati economici e scientifici relativi ai progetti finanziati. Responsabile del procedimento è il coordinatore del settore PRIN dell'ufficio IV della D.G. della Ricerca del MIUR.

Firma _____

Data 16/02/2009 ore 12:23