

Laboratóriumi biomarkerek szerepe a szívelégtelenség reszinkronizációs
kezelése utáni prognózis becslésében

Doktori tézisek

dr. Boros András Mihály

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Széplaki Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Kardos Attila, Ph.D., főorvos
Dr. Horváth Eszter Mária, Ph.D., egyetemi
adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Járai Zoltán, Ph.D., c. egyetemi tanár
Dr. Kiss Levente, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

1. Bevezetés

Krónikus szívelégtelenségben a krónikus gyulladás konstitutív C reaktív protein (CRP) emelkedést okoz, míg az ezzel összefüggésben álló akut fázis proteinek aktivációja az összfehérje szint növekedését vonja maga után. Az oxidatív stressz és a szimpatikus aktiváció inzulin rezisztenciához és következményes hiperglikémiához vezet. A lipoproteinek [koleszterin, triglicerid, magas denzitású lipoprotein (HDL), alacsony denzitású lipoprotein (LDL)] pufferozzák a gyulladásos citokineket és endotoxinokat, így a krónikus gyulladás a koleszterin szint csökkenésével jár szívelégtelenségben. A gyulladás kapcsán fennálló mitokondriális károsodás csökkent adenosin trifoszfát termelést okoz a szívizomban és a vázizomban, melyet káhexia, kreatin foszfát deficit és csökkent kreatin kináz (CK) aktivitás kísér. A neurohormonális aktiváció volumen többlettel és redistribúcióval jár. A folyadék többlet tágítja a kamrákat, N-terminális agyi nátriuretikus propeptid (NT-proBNP) szabadul fel. A következményes szívizom károsodás és remodelláció laktát dehidrogenáz (LDH), kreatin kináz MB izoenzim (CKMB) és CKMB / CK emelkedést idéz elő. A volumen redistribúció következtében csökken a renális és a hepatikus vérellátás. Hepatikus hipoperfúziót jelezhet az emelkedett májenzim [glutamát-oxálacetát aminotranszferáz (GOT), glutamát-piruvát aminotranszferáz GPT, gamma-glutamil transzferáz (GGT), alkalikus foszfatáz (ALP)] és összbilirubin szint, míg az alacsony szérum albumin koncentráció a máj szintetizáló képességének beszűkülésére utalhat. A renális diszfunkciót megnövekedett kreatinin, húgysav és karbamid szint jellemezheti.

A neurohormonális aktiváció, az oxidatív stressz és a krónikus gyulladás a szimpatikus idegrendszeri aktiváció által katekolamin felszabadulást idéznek elő, növelik a plazma kortizol szintjét, mely csontvelő depressziót okoz. Ezáltal a limfocita klónok proliferációjának és differenciációjának „down regulációja” következik be fokozott limfocita apoptózissal. A gyulladásos citokinek ugyanakkor direkt módon fokozzák a csontvelő neutrofil granulocita termelését. A fenti mechanizmusok magyarázzák a neutrofil granulociták és a limfociták arányának (NL-arány) növekedését szívelégtelenségben, melynek emelkedése számos vizsgálatban rontotta a szívelégtelen betegek prognózisát. A csontvelői depresszió a hemopoetikus sejtvonalakat is érinti és anémia alakul ki. Az anémia mellett

a vörösvértest eloszlási szélesség (RDW) növekedését is leírták, mely a mortalitás független prediktora prediktorának bizonyult szívelégtelen betegekben. A szívelégtelenséget jellemző gyulladáshoz való válasz kialakításában alapvető feladata van a komplement rendszernek a természetes és szerzett immunitás összekapcsolásában. Szívelégtelenségben emelkedett a szérumban a komplement fehérje 3 (C3), annak aktivált formája (C3a) és a szolúbilis membrán károsító komplexum (sC5b-9) koncentrációja. A C3a emelkedése előre jelzi a szívelégtelenség miatti későbbi hospitalizációt és a betegek mortalitását egyéb tényezőktől függetlenül.

Kardiális reszinkronizációs terápia (CRT) javasolt optimális gyógyszeres kezelésben részesült, intra- és interventrikuláris vezetési zavarban szenvedő szívelégtelen betegeknek. A CRT hatásos, javítja a betegek morbiditását, azonban megfelelő feltételek ellenére is egy részük (kb. 40-50 %) nem reagál megfelelően a kezelésre. A biomarkerek olyan faktorok, melyek képesek egy jövőbeli eseményt, például a CRT-re adott választ, előre jelezni a jelen történéseiből adott statisztikai valószínűséggel és ez által döntéshozatalra alkalmasak. Az Amerikai Szív Társaság 2009-ben fektette le a biomarkeres kutatásokkal szembeni elvárásait: egy új biomarkernak megfelelően diszkriminatívnak, pontosnak kell lennie és hozzáadott értéket kell nyújtania egy standard rizikó markerhez viszonyítva a kimenetel előrejelzésében. A diszkrimináció mérésére a c-statisztika alkalmas, a pontosságot a kalibrációval és a teljesítménnyel lehet jellemezni. A hozzáadott érték bizonyítására új reklassifikációs és diszkriminációs statisztikai módszereket fejlesztettek ki: nettó reklassifikációs javulás (NRI) és integrált diszkriminációs javulás (IDI).

2. Célkitűzés

Az előzőek alapján célul tűztük ki, hogy

1. Megvizsgáljuk, hogy a klinikai gyakorlatban használt rutin kardiovaszkuláris (NT-proBNP, CK, CKMB, CKMB / CK, LDH), renális (kreatinin, húgysav, karbamid), gyulladásos (CRP, összfehérje), hepatobiliáris (GOT, GPT, GGT, ALP, összbilirubin, albumin) és metabolikus (koleszterin, triglicerid, HDL, LDL, glükóz) laboratóriumi paramétereket hogyan befolyásolja a CRT kezelés. Feltételeztük, hogy a CRT során kedvező biokémiai változások következnek be az implantáció után 6 hónappal és 2 évvel, melyek összefüggésben állnak az echokardiográfiás reverz remodellációval.

2. Tanulmányozzuk az NL-arány szerepét szívelégtelenség reszinkronizációs kezelése során. Feltételeztük, hogy a CRT csökkenti az NL-arányt és a kezdeti emelkedett NL-arány előre jelzi a betegek 2 éves mortalitását és a 6 hónapos reverz remodelláció elmaradását NT-proBNP-től és egyéb tényezőktől függetlenül.

3. Elemezzük az RDW szerepét szívelégtelenség CRT-jében. Feltételeztük, hogy a CRT befolyásolja az RDW szintjét, és a beültetés előtt mért emelkedett RDW szint előre jelzi a betegek 5 éves mortalitását és a 6 hónapos reverz remodelláció elmaradását NT-proBNP-től és egyéb tényezőktől függetlenül.

4. Feltárjuk a komplement komponensek (C3, C3a, sC5b9) szerepét szívelégtelenség reszinkronizációs kezelésében. Feltételeztük, hogy a CRT mérsékli a komplement aktiváció mértékét, és a kezdeti emelkedett C3, C3a és sC5b-9 szint előre jelzi a betegek 5 éves mortalitását és a 6 hónapos reverz remodelláció elmaradását NT-proBNP-től és egyéb tényezőktől függetlenül.

5. Összekapcsoljuk az NL-arány, RDW és komplement komponensek analíziséből származó eredményeket, megvizsgáljuk egymásra kifejtett hatásukat a predikciós számításokban.

3. Módszerek

Prospektív, obszervációs, egy centrumos vizsgálatunkban 141 szívelégtelen beteget vontunk be, akik a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán 2009 szeptembere és 2010 decembere között CRT kezelésben részesültek az aktuális szakmai irányelvek szerint. A bevonás előtt minden beteg írásos szándéknyilatkozatot tett a kutatásban való részvételéről, melyet a helyi etikai bizottság engedélyezett. A vizsgálati terv összhangban állt a Helsinki Nyilatkozatban lefektetett alapelvekkel.

Beválasztási feltétel volt az előzetesen diagnosztizált és gyógyszeresen kezelt szívelégtelenség, az aktuálisan New York Heart Association (NYHA) II-IV funkcionális stádium, széles QRS (≥ 120 msec) az EKG-n, valamint súlyosan csökkent bal kamrai ejekciós frakció (LVEF ≤ 35 %) az echokardiográfián. Kizárási kritériumnak tekintettük az akut és krónikus gyulladós folyamatokat, valamint az autoimmun, hematológiai és malignus betegségeket. A CRT implantációt standard protokoll alapján, lokális anesztéziában a következő módon végeztük: a bal kamrai elektródot a szinusz koronáriusz oldalágába implantáltuk elsősorban posztero-laterális pozícióban, míg a jobb kamrai elektródot szeptális pozícióba helyeztük. Amennyiben szükséges volt, jobb pitvari elektródát ültettünk be magas antero-laterális elhelyezkedésben. A CRT implantáció előtt és azt követően 6 hónappal és 2 évvel felvettük a betegek anamnéziséét, fizikális vizsgálatot, laboratóriumi, EKG és echokardiográfiás méréseket végeztünk. Fontos szempont volt, hogy a kezdetben alkalmazott optimális gyógyszeres kezeléshez képest nem történtek jelentős változtatások. A vizsgálat során 5 éves utánkövetést folytattunk. Elsődleges végpontnak tekintettük a mortalitást, melyet az utánkövetési periódus második és ötödik évében értékeltünk. Másodlagos végpontként a 6 hónapos reverz remodellációt határoztuk meg, melyet a bal kamrai végszisztolés térfogat (LVESV) legalább 15 %-os csökkenéseként definiáltunk.

A klinikai kémiai profil $n = 129$ betegnél volt teljes CRT beültetés előtt. Összesen $n = 122$ főnek volt kvalitatív vérkép (NL-arány) + NT-proBNP laborértéke, ugyanakkor $n = 134$ beteg rendelkezett kvantitatív vérkép (RDW) + NT-proBNP mérési eredménnyel. A CRT beültetés előtt $n = 126$ főnek volt C3, C3a, sC5b-9 és NT-proBNP értéke. Ezek alapján négy

alpopulációt (Rutin labor, NL-arány, RDW, komplement) különítettünk el és vizsgáltunk külön-külön a végső analízisekben. Tanulmányunkban 122 egészséges kontroll személy adatait is felhasználtuk, akik a Klinikánk által szervezett Budakalász populációs vizsgálatban vettek részt.

A rutin laboratóriumi méréseket a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika Központi Laboratóriumában végeztük. A kémiai paraméterek meghatározását szérumból végeztük, Cobas Integra 400 Plus[®] kémiai automatát (Roche Diagnostics, Németország) használva. A vérkép meghatározására Symex XS-1000i[®] automatát (Kobe, Japán) alkalmaztunk. Az NT-proBNP szintjét elektrokemilumineszcenciás immunkémiai vizsgálattal állapítottuk meg Cobas e 411[®] analizátor segítségével (Roche Diagnostics). A szérum C3 szint meghatározásához natív szérum mintákat használtunk és Cobas Integra 800[®] (Roche Diagnostics) automata segítségével mértünk. A komplement aktivációs termékek (C3a, sC5b-9) szintjét citrátos plazma mintákból határoztuk meg enzimhez kapcsolt immunszorbens (ELISA) vizsgálati módszerrel (A015[®] és A029[®] kitek, Quidel, USA).

Az adatok kiértékelését az IBM SPSS 22[®] (Apache Software Foundation, USA), GraphPad Prism 6.03[®] (GraphPad Softwares Inc., USA), PASS 2008[®] (NCSS, USA) és az R[®] (R version 3.1.2, PredictABEL[®] és pROC[®] csomagok) segítségével készítettük. A statisztikai analízis első lépésenként meghatároztuk az általunk vizsgált paraméterek valószínűség eloszlását Shapiro-Wilks teszttel. Mivel a paraméterek jelentős többsége eltért a normál eloszlástól, így nem-paraméteres statisztikai eljárásokat alkalmaztunk. Eredményeinket a medián érték és az interkvartilis tartomány (25-75 %), illetve az esetszám és a százalékérték megadásával ábráztuk. A statisztikai próbák eredményeit $p < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Két folytonos változó összehasonlítására t próbákat alkalmaztunk. Kettőnél több folytonos változó összehasonlítására varianciaanalíziseket használtunk. A kategorikus változók összehasonlítására khi-négyszet próbát, alkalmaztunk. Két folytonos változó közötti kapcsolat jellemzésére Spearman-féle korrelációt számoltunk. A diagnosztikai tesztek hatékonyságának elemzésére ROC analízist végeztünk a görbe alatti terület

(AUC) megadásával, majd meghatároztuk az optimális vágópontokat. A mortalitás jellemzésére long-rank tesztet végeztünk a Kaplan-Meier görbék ábrázolásával. A mortalitás predikciójára univariáns és multivariábilis Cox regressziós analíziseket végeztünk, míg a reverz remodeláció előrejelzésére univariáns és multivariábilis logisztikus regressziós analíziseket készítettünk. A folytonos változókat 1 standard deviáció emelkedés alapján standardizáltuk (Z transzformáció), a kategorikus változók változatlan formában kerültek az analízisekbe. Általános szempont volt, hogy az alap multivariábilis modell azokat a paramétereket tartalmazza, melyek az univariáns elemzésben szignifikánsak ($p < 0,05$) és klinikailag relevánsak voltak. A vizsgált biomarkereket lépésenként („forward stepwise way”) adjusztáltuk a multivariábilis alapmodellre és megadtuk a rizikóhányadost (HR) Cox regresszió esetén és az esélyhányadost (OR) logisztikus regresszió esetén, illetve ezek 95 %-os konfidencia intervallumát.

Power analíziseket végeztünk, majd a pontosságot a kalibrációval és a teljesítménnyel tanulmányoztuk. A kalibrációt a Hosmer-Lemeshow (HL) teszttel ellenőriztük és felvettük a kalibrációs görbéket. A modellek teljesítményének jellemzésére megadtuk a Nagelkerke-féle R^2 és a Brier pontszámot. A diszkrimináció mérésére c-statisztikát számoltunk DeLong teszttel és megjelenítettük az ehhez tartozó ROC görbéket. Végül hozzáadott értéket számoltunk reklassifikációs és diszkriminációs analízisekkel (NRI és IDI).

4. Eredmények

A négy vizsgálati alpopuláció (Rutin labor, NL-arány, RDW, komplement) klinikai jellemzőiben nem volt statisztikailag szignifikáns különbség CRT beültetés előtt. A teljes kohorszban a szívelégtelen betegek medián életkora 67 év volt, a vizsgálati populáció 81 %-át férfiak alkották. A betegek 57 %-ának iszkémiás eredetű szívelégtelensége volt és 86 %-ban NYHA III / IV funkcionális státuszban jelentkeztek CRT beültetésre. Az EKG-n 82 %-ban láttunk bal Tawara-szár blokkot (LBBB), a medián QRS szélesség 160 msec volt, míg a medián LVEF 27 % volt. A 122 egészséges személy medián életkora 67 év volt, a vizsgálati populáció 82 %-át férfiak alkották.

4. 1. Rutin labor vizsgálat

4.1.1. Echokardiográfiás változások

A CRT hatására statisztikailag szignifikáns mértékben nőtt az LVEF [27 % (23-33) vs. 37 % (31-41), $p < 0,001$], csökkent az LVESV [210 (153-267) vs. 167 (111-234) mL, $p < 0,001$], és a bal kamrai végdiasztolés térfogat (LVEDV) [303 (242-351) vs. 259 (202-315) mL, $p < 0,001$] 6 hónappal a beavatkozás után. A 2. év végére további statisztikailag szignifikáns mértékű változás nem következett be egyik vizsgált paraméter esetében sem [LVEF (42 % (32-48), $p = 0,05$); LVESV (160 (109-212) mL, $p = 0,57$); LVEDV (242 (195-305) mL, $p = 0,60$)], ugyanakkor a kezdeti kedvező echokardiográfiás változások megmaradtak (CRT előtt vs. 2 év, $p < 0,001$).

4.1.2. Kardiovaszkuláris biomarkerek változása

A szívelégtelen betegeknek emelkedett volt CRT beültetés előtt az NT-proBNP szintje [2608 (1331-5101) vs. 88 (45-159) pg/mL], a CKMB [17 (12-24) vs. 13 (11-17) U/L] és LDH aktivitása [389 (331-476) vs. 303 (273-335) U/L] ($p < 0,001$), azonban CK aktivitásuk alacsonyabb volt [76 (52-109) vs. 112 (85-155) U/L] ($p < 0,001$) az egészséges kontroll személyekkel összehasonlítva. A CKMB / CK is jelentősen emelkedett volt szívelégtelenségben [23 (14-40) vs. 12 (9-16)] ($p < 0,001$). Két évvel a beavatkozás után az NT-proBNP csökkent [968 (331-2312) pg/mL], a CK emelkedett [108 (74-138) U/L] ($p < 0,001$), míg a CKMB [18 (15-23) U/L] és az LDH [383 (342-443) U/L] aktivitás nem változott statisztikailag

szignifikáns mértékben ($p = 0,99$ és $p = 0,26$). A CKMB / CK [21 (11-37)] sem változott statisztikailag szignifikáns mértékben két évvel a CRT beültetés után ($p = 0,11$). Az NT-proBNP 6 hónapos változása korrelált az echokardiográfiás változásokkal [LVEF (Spearman $r = -0,26$, $p = 0,006$), LVESV (Spearman $r = 0,37$, $p < 0,001$) és LVEDV (Spearman $r = 0,28$, $p = 0,003$)]. Az NT-proBNP csökkenése 2 évvel a beavatkozás után szintén korrelált az LVEF növekedéssel (Spearman $r = -0,42$, $p < 0,001$), az LVESV (Spearman $r = 0,50$, $p < 0,001$) és az LVEDV csökkenéssel (Spearman $r = 0,55$, $p < 0,001$). A 2 éves CK változás korrelált az LVESV (Spearman $r = 0,34$, $p = 0,009$) és LVEDV változással (Spearman $r = 0,37$, $p = 0,004$). A CKMB, a CKMB / CK és az LDH változása valamint az echokardiográfiás változások között nem volt kimutatható statisztikailag szignifikáns korreláció.

4.1.3. Renális és gyulladásoz biomarkerek változása

A rutin laboratóriumi vizsgálat CRT beültetés előtt emelkedett kreatinin [107 (79-134) vs. 79 (70-91) $\mu\text{mol/L}$], húgysav [432 (331-516) vs. 322 (277-377) $\mu\text{mol/L}$] és karbamid [8,3 (6,4-11,5) vs. 5,9 (4,5-6,5) mmol/L] koncentrációt és emelkedett CRP [3,7 (1,7-9,0) vs. 1,7 (1,1-2,9) mg/L] és összfehérje [76 (72-79) vs. 70 (68-73) g/L] szintet mutatott a szívelégtelen betegekben az egészséges kontroll személyekhez viszonyítva ($p < 0,001$). A CRT hatására csökkent a kreatinin [89 (83-124 $\mu\text{mol/L}$; $p = 0,03$], a húgysav [340 (290-433) $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,001$] és a karbamid szérumszintje [6,8 (5,0-9,7) mmol/L ; $p = 0,008$] 2 évvel a beavatkozás után. Mind a CRP [2,9 (1,2-6,3) mg/L ; $p = 0,03$], mind az összfehérje szint [71 (68-73) g/L ; $p < 0,001$] mérséklődött 2 évvel a CRT beültetését követően. A 6 hónapos kreatinin szintek változása követte az LVESV változását (Spearman $r = 0,24$, $p = 0,01$), míg a húgysav csökkenése korrelált az LVEF növekedéssel (Spearman $r = -0,17$, $p = 0,04$). A karbamid szintek 2 éves változása korrelált a bal kamrai reverz remodellációval (LVESV Spearman $r = 0,23$, $p = 0,06$, és LVEDV Spearman $r = 0,29$, $p = 0,02$). A CRP szint 2 éves csökkenése párhuzamos volt az LVEF növekedéssel (Spearman $r = -0,22$, $p = 0,04$). Az összfehérje szint változása nem korrelált az echokardiográfiás változásokkal statisztikailag szignifikáns mértékben.

4.1.4. Hepatobiliáris biomarkerek változása

A CRT előtt a szívelégtelen betegeknek megnövekedett májenzim aktivitás [GOT: 25 (19-33) vs. 20 (16-24) U/L, GPT: 25 (19-34) vs. 18 (14-24) U/L, GGT: 52 (32-90) vs. 22 (16-31) U/L, $p < 0,001$; ALP: 72 (61-98) vs. 71 (60-85) U/L, $p = 0,14$] és összbilirubin szint mellett [16 (11-23) vs. 7 (5-10) $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,001$], csökkent albumin koncentrációja [45 (43-48) vs. 46 (44-47) g/L, $p = 0,04$] volt az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva. Két évvel a beültetést követően statisztikailag szignifikáns mértékben csökkent a GOT [21 (17-28) U/L], GPT [18 (14-23) U/L] és a GGT [34 (21-73) U/L] aktivitás, valamint az összbilirubin [8 (7-13) $\mu\text{mol/L}$] szint ($p < 0,001$). Az ALP nem változott [74 (59-98) U/L, $p = 0,99$], az albumin nőtt [46 (43-48) g/L, $p = 0,006$]. A vizsgált paraméterek közül egyedül a GGT 2 éves változása korrelált az LVEF változással (Spearman $r = -0,32$, $p = 0,005$).

4.1.5. Metabolikus biomarkerek változása

A CRT beültetés előtt a szívelégtelen betegek rutin laboratóriumi vizsgálata csökkent lipoprotein szintet [koleszterin: 4,3 (3,6-5,0) vs. 5,4 (4,9-6,3) mmol/L, triglicerid: 1,4 (1,0-1,9) vs. 2,0 (1,4-3,0) mmol/L, HDL: 1,1 (0,9-1,4) vs. 1,4 (1,1-1,7) mmol/L és LDL: 2,5 (2,0-3,2) vs. 3,4 (2,8-4,1) mmol/L] és emelkedett glükóz [6,2 (5,6-7,2) vs. 5,6 (5,3-6,3) mmol/L] koncentrációt mutatott az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva ($p < 0,001$). Két évvel a beültetést követően a lipoproteinek emelkedtek [koleszterin: 4,6 (3,8-5,4) mmol/L, triglicerid: 1,8 (1,2-3,0) mmol/L, HDL: 1,2 (1,0-1,5) mmol/L és LDL: 2,7 (2,0-3,3) mmol/L] ($p < 0,001$), míg a glükóz szintje csökkent [5,7 (5,1-6,8) mmol/L, $p = 0,01$]. A triglicerid 2 éves változása korrelált az LVESV (Spearman $r = -0,22$, $p = 0,06$) és az LVEDV változással (Spearman $r = -0,33$, $p = 0,005$).

4.2. NL-arány vizsgálat

4.2.1. A CRT hatására bekövetkező 6 hónapos változások

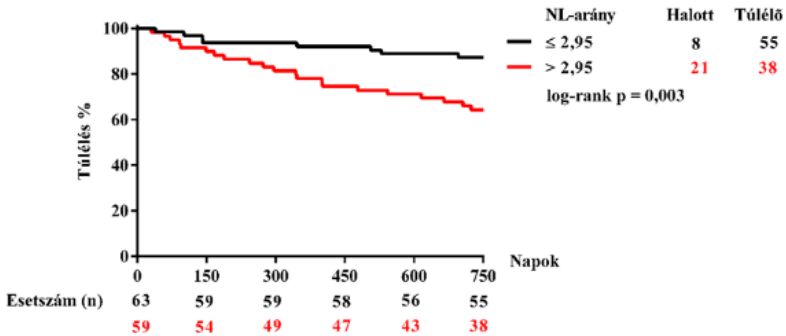
CRT beültetés előtt az NL-arány magasabb volt a szívelégtelen betegekben az egészséges kontroll személyekhez viszonyítva [2,93 (2,12-4,05) vs. 2,21 (1,64-2,81), $p < 0,0001$], mely lecsökkent 6 hónappal az implantáció után. [2,82 (2,05-3,05), $p = 0,04$].

4.2.2. A 6 hónapos reverz remodeláció előrejelzése

Az echokardiográfiás kritériumok alapján 63 betegnél (52 %) észleltünk reverz remodelációt 6 hónappal a CRT beültetés után. Ezen betegeknek a CRT beültetés előtt alacsonyabb volt az NL-arány értéke [2,62 (1,90-3,71) vs. 3,12 (2,35-4,66), $p = 0,01$] és az NT-proBNP szintje [2315 (1004-3989) vs. 3305 (1869-6019) pg/mL, $p = 0,004$] azokhoz képest, akiknél nem következtek be echokardiográfiás javulások. A biomarkerek optimális vágópont értékeit ROC analízis segítségével állapítottuk meg [NL-arány $> 2,95$ AUC = 0,63 (0,53-0,73), $p = 0,01$ és NT-proBNP > 1522 pg/mL AUC = 0,64 (0,55-0,74), $p = 0,004$]. A fiatalabb életkor, a női nem, a szélesebb QRS, a tágabb bal kamrai dimenziók, és a jobb funkcionális NYHA státusz CRT beültetés előtt statisztikailag szignifikáns mértékben előre jelezte a kedvező 6 hónapos echokardiográfiás változásokat az univariáns logisztikus regressziós elemzésben, így ezek a faktorok alkották az alap multivariábilis logisztikus regressziós referencia modellét. Első lépésben adjusztáltuk az NT-proBNP > 1522 pg/mL biomarkert a referencia modellhez, majd hozzáadtuk az NL-arány $> 2,95$ tényezőt, mely statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette a reverz remodeláció esélyét [OR = 0,38 (0,17-0,85), $p = 0,01$] NT-proBNP-től és egyéb tényezőktől függetlenül.

4.2.3. A 2 éves mortalitás előrejelzése

A 787 napos medián utánkövetés végére 29 beteg (23 %) hunyt el. A túlélőknél alacsonyabb volt CRT beültetés előtt az NL-arány [2,70 (2,05-3,68) vs. 3,90 (2,87-5,65), $p = 0,001$] és az NT-proBNP szint [2418 (1116-4050) vs. 4959 (2429-6864) pg/mL, $p = 0,002$]. A ROC analízis alapján az NL-arány $> 2,95$ [AUC = 0,69 (0,58-0,80), $p = 0,001$] és az NT-proBNP > 1522 pg/mL [AUC = 0,70 (0,60-0,80), $p = 0,0008$] optimálisnak bizonyult a mortalitás előrejelzésében is (1. ábra).



1. ábra. A betegek CRT beültetés előtti NL-arányának hatása a 2 éves túlélésre az NL-arány vizsgálatban.

Az univariáns Cox regresszió alapján az LBBB jelenléte az EKG-n, és a béta blokkoló terápia statisztikailag szignifikáns mértékben javította, míg az iszkémiás eredet, és a diabétesz mellitusz rontotta a túlélés esélyeit, így ezek a faktorok alkották az alap multivariábilis referencia modellt. Első lépésben adjusztáltuk az NT-proBNP > 1522 pg/mL biomarkert a referencia modellhez, majd hozzáadtuk az NL-arány > 2,95, mely statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette a túlélés esélyét [HR = 2,44 (1,04-5,71), p = 0,03] NT-proBNP-től és egyéb tényezőktől függetlenül.

Ellenőriztük a számításokat, a modellek kalibrációja megfelelő volt (HL teszt: reverz remodeláció p = 0,44 és mortalitás p = 0,79) és javult a teljesítmény az egymást követő lépések során (reverz remodeláció: Brier pontszám 0,22 → 0,20 és Nagelkerke-féle R² 0,12 → 0,24; mortalitás: Brier pontszám 0,14 → 0,12 és Nagelkerke-féle R² 0,24 → 0,34). Az NL-arány használatával statisztikailag szignifikáns reklasszifikációs [NRI reverz remodeláció: 0,49 (0,14-0,83), p = 0,005 és NRI mortalitás: 0,63 (0,24-1,01), p = 0,001] és diszkriminációs [IDI reverz remodeláció: 0,04 (0,00-0,07), p = 0,02 és NRI mortalitás: 0,04 (0,00-0,08), p = 0,02] javulást mutatott az NT-proBNP-re adjusztált alap modell. Az IDI = 0,04 azt mutatja, hogy a betegek 4 %-át lehet jobban kategorizálni, ha az NL-arányt is figyelembe vesszük a rizikóbecslésnél, így 5 olyan beteg volt a 122 fős populációban, akinek CRT beültetés előtt alacsony NT-proBNP szint mellett magas NL-aránya volt és

nem következett be az echokardiográfiás reverz remodeláció, vagy elhunyt a 2 éves utánkövetés során.

4.3. RDW vizsgálat

4.3.1. A CRT hatására bekövetkező 6 hónapos változások

Az RDW nem változott statisztikailag szignifikáns mértékben a szívelégtelen betegekben CRT hatására 6 hónappal az implantáció után [13,6 % (13,0-14,6) vs. 13,4 % (13,0-14,2), $p = 0,56$].

4.3.2. A 6 hónapos reverz remodeláció előrejelzése

A reverz remodeláció értékelése 123 betegben történt. Akiknél ez bekövetkezett ($n = 61$, 50 %), azok statisztikailag szignifikáns mértékben fiatalabbak voltak, gyakrabban részesültek MRI kezelésben, jobb funkcionális NYHA státusszal és tágabb bal kamrai dimenziókkal bírtak CRT beültetés előtt azokhoz képest, akiknél nem észleltünk echokardiográfiás javulást. A magasabb RDW [OR = 1,52 (1,01-2,29), $p = 0,04$, 1 standard deviáció emelkedésenként], NT-proBNP [OR = 2,00 (1,19-3,38), $p = 0,009$] és kreatinin [OR = 1,56 (1,04-2,34), $p = 0,02$] szintek előre jelezték a reverz remodeláció 6 hónapos elmaradását az univariáns logisztikus regressziós analízisben. A hematokrit nem befolyásolta a reverz remodelációt [OR = 0,70 (0,49–1,02), $p = 0,06$]. A multivariábilis elemzésben, mely magába foglalta az univariáns elemzés szignifikáns faktorait, egyedül az NT-proBNP [OR = 2,67 (1,06-6,69); $p = 0,03$] határozta meg statisztikailag szignifikáns mértékben a reverz remodeláció hiányát [RDW OR = 1,01 (0,62-0,63), $p = 0,95$].

4.3.3. Az 5 éves mortalitás előrejelzése

Az 1799 napos medián utánkövetés végével (maximum 2181 nap), 57 (42 %) beteg hunyt el. Az LBBB morfológia jelenléte az EKG-n, a béta blokkoló kezelés és a magasabb hematokrit [HR = 0,70 (0,53-0,92), $p = 0,01$, 1 standard deviáció emelkedésenként] szint CRT beültetés előtt javította a kimenetelt. A megnövekedett RDW [HR = 1,48 (1,25-1,75), $p < 0,0001$], NT-proBNP [HR = 1,43 (1,19-1,73), $p < 0,0001$], és szérum kreatinin szint [HR = 1,42 (1,18-1,71), $p < 0,0001$] statisztikailag szignifikánsan csökkentette a betegek túlélésének esélyeit. Vágópont elemzést végeztünk ROC analízis segítségével, mely során olyan vágópont értékeket választottunk, melyhez

tartozó szenzitivitás érték az összes biomarker esetén megegyezett [79 % (66-88)] és klinikailag releváns tartalommal bírt. Így a biomarkerek specificitása különbözött, de szenzitivitásuk azonos volt, mely növelte a további analizisek objektivitását és összehasonlíthatóságát.

A CRT beültetés előtt mért RDW > 13,35 % [HR = 3,20 (1,69-6,06), p = 0,0002; specificitás = 53 % (42-65)], NT-proBNP > 1975 pg/mL [HR = 2,71 (1,43-5,14), p = 0,001, specificitás = 48 % (37-60)] és szérum kreatinin > 88,5 μ mol/L [HR = 2,80 (1,45-5,42), p = 0,001, specificitás = 47 % (35-59)] jelentősen növelte a mortalitási rizikót, míg a hematokrit < 44 % [HR = 1,59 (0,84-3,00), p = 0,15; specificitás = 34 % (24-45)] nem befolyásolta azt.

Multivariábilis Cox regressziós analiziseket végeztünk. Első lépésben felépítettünk egy alap multivariábilis modellt, mely magába foglalta az univariáns elemzés statisztikailag szignifikáns klinikai (LBBB és béta blokkoló) és laboratóriumi paramétereit (szérum kreatinin > 88,5 μ mol/L). A következő lépésben külön-külön adjusztáltuk az alap modellhez az RDW > 13,35 % és az NT-proBNP > 1975 pg/mL faktorokat, és mindkét biomarker statisztikailag szignifikáns mértékben meghatározta az 5 éves mortalitást [RDW HR = 2,81 (1,45-5,44), p = 0,002; NT-proBNP HR = 2,19 (1,13-4,23), p = 0,01]. A végső lépésben a modell egyszerre tartalmazta mindkét markert, az RDW statisztikailag szignifikáns maradt [HR = 2,49 (1,27-4,86), p = 0,008], míg az NT-proBNP elvesztette prediktív értékét [HR = 1,18 (0,93-3,51), p = 0,07] az 5 éves mortalitás előrejelzésében.

Ellenőriztük a számításokat, a modellek kalibrációja megfelelő volt (végső modell HL teszt: p = 0,40) és javult a teljesítmény az egymást követő lépések során (Brier pontszám 0,20 \rightarrow 0,18 és Nagelkerke-féle R² 0,21 \rightarrow 0,30). A végső modellben, az RDW használatával statisztikailag szignifikáns reklassifikációs [NRI: 0,64 (0,33-0,95), p < 0,0001] és diszkriminációs [IDI: 0,03 (0,00-0,07), p = 0,01] javulást mutatott az NT-proBNP-re adjusztált alap modell. Ezzel ellentétben, az NT-proBNP használatával nem észleltünk statisztikailag szignifikáns reklassifikációs [NRI: 0,14 (-0,03-0,32), p = 0,11] és diszkriminációs [IDI: 0,01 (-0,01-0,03), p = 0,20] javulást az RDW-re adjusztált alap modell. Az RDW IDI = 0,03 értéke azt mutatja, hogy a betegek 3 %-át lehet jobban kategorizálni, ha az RDW-t is figyelembe vesszük a rizikóbecslésnél, azaz 4 olyan beteg volt a 134 fős populációban,

akinek CRT beültetés előtt alacsony NT-proBNP szint mellett magas RDW értéke volt és elhunyt az 5 éves utánkövetés során.

4.4. Komplement vizsgálat

4.4.1. A CRT hatására bekövetkező 6 hónapos változások

A CRT statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette a szérum C3a [212,5 (148,2-283,6) vs. 153 (119,8-218,3) ng/mL, $p < 0,0001$] és sC5b-9 [296,9 (234,2-358,8) vs. 255,1 (210,1-319,0) ng/mL, $p = 0,0006$] szintjét, azonban nem befolyásolta a C3 szintet [1,43 (1,26-1,61) vs. 1,38 (1,23-1,57) g/L, $p = 0,57$]

4.4.2. A 6 hónapos reverz remodeláció előrejelzése

A CRT a betegek 52 %-ában ($n = 65$) idézett elő reverz remodelációt, azaz legalább 15 %-os csökkenést az LVESV-ben 6 hónappal a beavatkozás után. Akiknél ez bekövetkezett, azoknál alacsonyabb volt a kezdeti C3a szint [186,4 (135,9-232,2) vs. 226,6 (157,9-289,8) ng/mL, $p = 0,02$], de nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a C3 [1,42 (1,29-1,59) vs. 1,39 (1,26-1,61) g/L, $p = 0,54$] és az sC5b-9 [278,3 (225,9-364,5) vs. 315,0 (265,4-363,7) ng/mL, $p = 0,15$] szintben azon betegekhez viszonyítva, akiknél nem észleltünk echokardiográfias javulást. A C3a változása statisztikailag szignifikáns mértékben korrelált az LVESV változással [Spearman $r = 0,19$ (0,01-0,38), $p = 0,04$]. Ugyanakkor a C3 [Spearman $r = -0,06$ (-0,26-0,14), $p = 0,53$] és az sC5b-9 [Spearman $r = -0,09$ (-0,29-0,11), $p = 0,35$] változásai nem követték az echokardiográfias változásokat.

Az univariáns logisztikus regresszió eredményei alapján a fiatalabb életkor, a szélesebb QRS, a tágabb bal kamrai dimenziók, a jobb funkcionális NYHA státusz és az alacsonyabb NT-proBNP szintek CRT beültetés előtt meghatározták a kedvező echokardiográfias változásokat. A kezdeti komplement komponensek szérum szintjei nem jelezték előre statisztikailag szignifikáns mértékben a 6 hónapos reverz remodelációt.

A klinikai válaszkészség pontosabb demonstrálására kiterjesztettük a kritérium rendszert az alábbiak szerint: legalább 15 % csökkenés az LVESV-ben és ≥ 1 egység növekedés a NYHA osztályban és szívelégtelenség miatti hospitalizáció hiánya 6 hónappal a CRT beültetés

után. Így a betegek 31 %-ánál láttunk ($n = 39$) jó klinikai válaszkészséget. Ezen klinikai responderekben is alacsonyabb volt a kezdeti C3a szint a non-responderekhez viszonyítva [186,4 (118,8-247,9) vs. 217,4 (156,6-299,9) ng/mL, $p = 0,01$], és nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a C3 [1,40 (1,25-1,63) vs. 1,43 (1,28-1,58) g/L, $p = 0,64$] és az sC5b-9 [298,4 (223,0-399,8) vs. 295,7 (246,5-362,0) ng/mL, $p = 0,81$] szintben.

4.4.3. Az 5 éves mortalitás előrejelzése

Az 5 éves utánkövetés folyamán (medián 1803 nap) a betegek 40 %-a ($n = 51$) halt meg. Az univariáns Cox regresszió eredményei alapján az LBBB jelenléte az EKG-n és a béta blokkoló terápia statisztikailag szignifikáns mértékben javította, míg az emelkedett NT-proBNP és C3a szint rontotta a túlélés esélyeit. ROC analízist végeztünk, hogy meghatározzuk a C3a és az NT-proBNP optimális vágópontjait a mortalitás előrejelzésében. Olyan vágópontokat választottunk, melyhez tartozó szenzitivitás érték mindkét biomarker esetén megegyezett [90 % (79-97)] és klinikailag releváns tartalommal bírt [C3a > 165 ng/mL (log-rank $p < 0,0001$) és NT-proBNP > 1520 pg/mL (log-rank $p = 0,0004$)]. Így a biomarkerek specificitása különbözött, de szenzitivitásuk azonos volt, mely növelte a további analízisek objektivitását és összehasonlíthatóságát.

A következőkben multivariábilis Cox regressziós analíziseket végeztünk. Először készítettünk egy multivariábilis alapmodellt, mely tartalmazta az univariáns elemzés statisztikailag szignifikáns klinikai (LBBB és béta blokkoló) és laboratóriumi (NT-proBNP) paramétereit. A C3a adjusztálásával, mind a C3a > 165 ng/mL [HR = 4,21 (1,65-10,72), $p = 0,003$], mind az NT-proBNP > 1520 pg/mL [HR = 3,39 (1,31-8,74), $p = 0,01$] megőrizte statisztikailag szignifikáns hatását az 5 éves mortalitás előrejelzésében.

Ellenőriztük a számításokat, a modellek kalibrációja megfelelő volt (végső modell HL teszt: $p = 0,95$) és javult a teljesítmény az egymást követő lépések során (Brier pontszám 0,20 \rightarrow 0,18 és Nagelkerke-féle R^2 0,21 \rightarrow 0,31). Az C3a használatával statisztikailag szignifikáns reklaszifikációs [NRI: 0,71 (0,43-0,98), $p < 0,0001$] és diszkriminációs [IDI: 0,08 (0,03-0,12), $p = 0,0002$] javulást mutatott az NT-proBNP-re adjusztált alap modell. Az IDI = 0,08 azt mutatja, hogy a betegek 8 %-át lehetett volna jobban

kategorizálni, ha a C3a-t is figyelembe vesszük a rizikóbecslésnél. Így 10 olyan beteg volt a 126-ból, akinek CRT beültetés előtt alacsony NT-proBNP érték mellett (< 1520 pg/mL) magas C3a szintje (> 165 ng/mL) volt és meghalt az 5 éves utánkövetés során.

4.5. Kiegészítő számítások

A kiegészítő számításokat, melyek irodalmi közlésre nem kerültek, azért készítettük, hogy összekapcsoljuk a négy vizsgálati alpopulációból származó eredményeket. Az univariáns Cox regressziós analízis az 5 éves mortalitás predikciójában ($n = 48$), az összevont vizsgálati alpopulációkban ($n = 114$) az LBBB-t és a béta blokkoló kezelést jelezte statisztikailag szignifikáns prediktornak, ezek képezték a multivariábilis alapmodellt. A multivariábilis alapmodellre adjusztált NT-proBNP [HR = 1,32 (1,06-1,64), $p = 0,01$, 1 standard deviáció emelkedésenként], RDW [HR = 1,24 (1,00-1,53), $p = 0,04$] és NL-arány [HR = 1,37 (1,08-1,74), $p = 0,008$] statisztikailag szignifikáns, független prediktornak bizonyult az 5-éves mortalitás előrejelzésében, míg a C3a elvesztette a statisztikailag szignifikáns predikciós képességét [HR = 1,20 (0,93-1,55), $p = 0,15$].

5. Következtetések

Ez volt az első olyan kutató munka, mely átfogóan szemlélte, hogy a kardiális reszinkronizáció hogyan befolyásolja a szívelégtelen betegekben fennálló biokémiai eltéréseket és ezek korrelációját az echokardiográfiás változásokkal. Bemutattuk a tradicionális és új, non-specifikus és specifikus gyulladással kapcsolatos biomarkerek előnyeit és hátrányait, így átfogó képet nyújtottunk a biomarker kutatások lehetőségeiről szívelégtelenség CRT kezelésében. Vizsgálatunk erőssége, hogy olyan biomarkereket tanulmányoztunk, melyeket egyszerűen ki lehet mutatni a klinikai gyakorlatban. A C3a-t hagyományos, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit segítségével rutin laboratóriumi körülmények között lehet mérni. A modern automatizált vérvégrendszerek segítségével könnyedén, gyorsan és olcsón meghatározhatók a fehérvérsejt szubpopulációk, illetve a vörösvértest frakciók. Egy egyszerű matematikai művelettel megbecsülhető a neutrofil granulociták és a limfociták aránya, az RDW-t pedig tartalmazza a laboratóriumi lelet. A klinikai gyakorlatban a vérvégadatok szinte mindig rendelkezésre állnak, így az NL-arány, vagy az RDW biomarkerként széleskörűen használható. Vizsgálataink tehát felhívják a figyelmet arra, hogy ha egy szívelégtelen beteg kivizsgálása során ezen biomarkerekben jelentős eltérés mutatkozik, fokozott rizikóra kell gondolni.

Kutatásunk legfontosabb eredményei:

1. A krónikus szívelégtelen betegek rutin laboratóriumi vizsgálata kardiális pangásra, szöveti károsodásra, gyulladással kapcsolatos aktivációra, csökkent renális és hepatobiliáris perfúzióra, valamint metabolikus eltérésekre utal CRT beültetés előtt. A CRT kedvező echokardiográfiás és biokémiai változásokat idéz elő, melyek korrelálnak egymással.

2. Az NL-arány magasabb a szívelégtelen betegekben az egészséges kontroll személyekhez viszonyítva és csökken 6 hónappal a CRT implantáció után. A CRT beültetés előtt alacsonyabb az NL-arány értéke azon betegekben, akiknél bekövetkezik a 6 hónapos reverz remodelláció. A megnövekedett kezdeti NL-arány statisztikailag szignifikáns mértékben előre jelzi a 6 hónapos reverz remodelláció elmaradását és a 2 éves mortalitást NT-proBNP-től és egyéb tényezőktől függetlenül.

3. Az RDW nem változik statisztikailag szignifikáns mértékben 6 hónappal a CRT után. A kezdeti emelkedett RDW értékek CRT beültetés előtt mutatják az echokardiográfiás reverz remodeláció későbbi elmaradását, azonban az NT-proBNP felülmúlja az RDW ezen predikciós képességét. Az RDW meghatározza a CRT kezelésben részesült szívelégtelen betegek hosszú távú túlélését az NT-proBNP-től és egyéb tényezőktől függetlenül. A reklassifikációs elemzések alapján az RDW rizikó stratifikációs ereje meghaladja az NT-proBNP értékét a mortalitás előrejelzésében.

4. A CRT csökkenti a komplement aktivációs termékek szintjét (C3a, sC5b-9), de nem befolyásolja a teljes C3 szintet. A 6 hónapos reverz remodeláción átesett betegeknél a kezdeti C3a szint alacsonyabb és változása követi az echokardiográfiás változásokat, azonban a C3a szint önmagában nem jelzi előre a reverz remodeláció kialakulását. A C3a biomarker előre jelzi a CRT-n átesett szívelégtelen betegek 5 éves mortalitását. A kezdeti magas C3a szint a mortalitás rizikót akár négyszeresére emeli NT-proBNP-től és egyéb tényezőktől függetlenül, és együtt jár a 6 hónapos klinikai válaszkészség hiányával.

5. Az NT-proBNP, RDW és NL-arány statisztikailag szignifikáns, független prediktornak bizonyult az 5-éves mortalitás előrejelzésben, még egymással való kombinációban is. A C3a elveszti a statisztikailag szignifikáns predikciós képességét, ha a predikciós modell NT-proBNP-n kívül tartalmazza az RDW-t, vagy az NL-arányt.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények össz. impakt faktora: 9,528.

Boros AM, Perge P, Nagy KV, Apor A, Bagyura Z, Zima E, Molnar L, Tahin T, Becker D, Geller L, Merkely B, Szeplaki G. (2017) Routine laboratory parameters in cardiac resynchronization therapy. *Interv Med Appl Sci*, 9: 1-8.

Boros AM, Szeplaki G, Perge P, Jenei Z, Bagyura Z, Zima E, Molnar L, Apor A, Becker D, Geller L, Prohaszka Z, Merkely B. (2015) The ratio of the neutrophil leucocytes to the lymphocytes predicts the outcome after cardiac resynchronization therapy. *Europace*, 18: 747-54. Impakt faktor: 4,521.

Boros AM, Perge P, Jenei Z, Karady J, Zima E, Molnar L, Becker D, Geller L, Prohaszka Z, Merkely B, Szeplaki G. (2016) Measurement of the Red Blood Cell Distribution Width Improves the Risk Prediction in Cardiac Resynchronization Therapy. *Dis Markers*, 7304538: 13. Impakt faktor: 2,348.

Szeplaki G, Boros AM, Szilagi S, Osztheimer I, Jenei Z, Kosztin A, Nagy KV, Karady J, Molnar L, Tahin T, Zima E, Geller L, Prohaszka Z, Merkely B. (2016) Complement C3a predicts outcome in cardiac resynchronization therapy of heart failure. *Inflamm Res*, 65: 933-40. Impakt faktor: 2,659.

A disszertációtól független közlemények össz. impakt faktora: 7,578.

Nagy VK, Szeplaki G, Apor A, Kutyifa V, Kovacs A, Kosztin A, Becker D, Boros AM, Geller L, Merkely B. (2015) Role of Right Ventricular Global Longitudinal Strain in Predicting Early and Long-Term Mortality in Cardiac Resynchronization Therapy Patients. *PLoS One*, 10: e0143907. Impakt faktor: 3,057.

Merkely B, Kosztin A, Roka A, Geller L, Zima E, Kovacs A, Boros AM, Klein H, Wranicz JK, Hindricks G, Clemens M, Duray GZ, Moss AJ, Goldenberg I, Kutyifa V. (2017) Rationale and design of the BUDAPEST-CRT Upgrade Study: a prospective, randomized, multicentre clinical trial. *Europace*, In Press. Impakt faktor: 4,521.