

A reszinkronizációs terápia kimenetelének előrejelzése új biomarkerek segítségével szívelégtelen betegekben

Doktori tézisek

**dr. Perge Péter**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Szabó Gergely, Ph.D. egyetemi adjunktus  
Dr. Vámos Máté, Ph.D., Med. Habil., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Igaz Péter, DSc., egyetemi tanár

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

Budapest  
2020

## 1. Bevezetés

A szívelégtelenség komplex szindrómájában a szív csökkenő funkciója a többi szervrendszer diszfunkcióját is kiváltja a betegség előre haladtával. A volumen redisztribúció a vese véráramlásának csökkenését és így a vesefunkció beszűkülését is okozza. A kialakuló veseelégtelenség tovább rontja a krónikus szívelégtelen betegek túlélését, köztük a CRT-vel élő betegeket is. A hiperurikémia, a vesefunkció beszűkülésével és a szimpatikus aktivációval összefüggésben, fontos prognosztikai tényező a konzervatív kezelésben részesülő szívelégtelen betegekben.

A D-vitamin elsődlegesen a csontrendszer metabolizmusának egyik fő szabályozó hormonjaként került leírásra, azonban számos fontos extraszkeletális hatására is fény derült. A legfrissebb adatok alapján a D-vitamin fontos szabályozó szerepet tölt be a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS), a proinflammatorikus citokinek termelődése és az extracelluláris mátrix (ECM) turnover szabályozásában. Ezen felül a D-vitamin hiány közvetlenül hozzájárul a szívelégtelenség kialakulásához, a fenti szabályozó mechanizmusok kiesése révén, a szívizomzat kóros remodellációját okozva. Számos keresztmetszeti és követéses vizsgálat igazolta, hogy a D-vitamin hiány a szívelégtelenség kialakulásának rizikóját megnöveli, ismerten szívelégtelen betegekben pedig jelentősen rosszabb prognózist vetít előre.

A nátriuretikus peptidekhez nagyon hasonló módon, az NT-proBNP-vel szorosan korrelálva emelkedik meg szívelégtelenségben a karbohidrát antigén 125 (CA-125) szintje is. A klinikai gyakorlatban az ovarium karcinoma diagnózisának felállítására és a kezelés monitorozására használt biomarker. Szintje akut és krónikus szívelégtelenségben is emelkedett, szorosan korrelál a betegség súlyosságával, a szisztolés és disztolés diszfunkciót jelző echokardiográfias paraméterekkel, valamint a prognózissal.

A pentraxin-3 (PTX-3), a C-reaktív proteinhez (CRP) hasonlóan a pentraxin citokin szupercsalád tagja, szintén fontos szabályozó szerepet tölt be a humorális immunitás szabályozásában. A gyulladás helyén termelődik számos sejtféleség által. Emelkedett szintjét igazolták szívelégtelen betegekben, mely arányos a betegség súlyosságával, valamint előre jelzi a prognózist is akut és krónikus szívelégtelen betegekben.

A szívelégtelenségben kialakuló gyulladással válasz fontos komponense a multifunkcionális kemokin hatású fraktalkin, mely eltérő hatásokat fejt ki membrán-asszociált és szolubilis formában. A membrán-kötött forma adhéziós molekulaként funkcionál, míg szolubilis formában erőteljes kemoattraktáns hatással bír a citotoxikus immunsejtekre. Szívelégtelenségben a szérumban és miokardiális szintje is emelkedik, mely korrelál a betegség súlyosságával, súlyos szisztolés szívelégtelen betegekben a mortalitás független prediktora volt iszkémiás és non-iszkémiás etiológia esetén is.

A hepatocita növekedési faktor (HGF) egy klasszikus, tirozin-kináz receptorhoz kötődő növekedési faktor, termelődését számos sejtféleségben kimutatták. Részt vesz a természetes fejlődési folyamatokban is, azonban szintje jelentősen megemelkedik a szívet érő különböző káros behatásokat követően. A vizsgálatok alapján legfontosabb szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben van, ahol pleiotrop protektív ágensként angiogenetikusan, antifibrotikus és antiapoptotikus hatásokat fejt ki. Ezen hatások klinikai jelentőségét számos gén transzfert használó állatkísérletes modell is igazolta. Emelkedett HGF szintet igazoltak akut és krónikus szívelégtelen csoportokban, ahol ez meglepő módon a kedvezőtlen klinikai kimenetelt jelezte előre.

A remodeláció egyik legfontosabb eleme az ECM módosulása, mely a krónikus szívelégtelenségben szerepet játszó gyulladással járó folyamatok végeredménye. Az ECM kollagén koncentrációját számos stimulus befolyásolja, a mátrix metalloproteinázok (MMP) és a szöveti mátrix metalloproteináz inhibitorok (TIMP) expressziójának módosításán keresztül. A MMP és a TIMP aránya jellemzi a kollagén turnover mértékét, ezáltal a kóros remodelling progresszióját. A kollagén lebontásáért elsősorban a MMP-1, MMP-2 és az MMP-9 felelős. Az AMI-t követő remodelációban elsődleges a MMP-9 szerepe, azonban DCM-ben szenvedő betegpopulációban is jelentősen emelkedett a szérumban szintje, ami a prognózis valamint a szisztolés és diasztolés diszfunkció független markere.

Számos randomizált, multicentrikus vizsgálat eredménye igazolta a CRT kedvező hatásait. Optimális programozás és elektródapozíciók esetén helyreállítja a kontrakciók atrioventrikuláris, interventrikuláris és intraventrikuláris szinkronitását. Ennek hatására javul a betegek fizikai terhelhetősége, az életminőség. Csökken morbiditás és a mortalitás. Változás

figyelhető meg a szív szerkezetében és funkciójában, a betegség progressziója visszafordul, ezt a folyamatot nevezzük reverz remodelációnak.

Optimális betegszelekció ellenére is, a fent említett kedvező változásokat nem mutató, úgynevezett non-responder betegek aránya 25 és 40 % között mozgott a különböző vizsgálatokban. A kezelés jelentős kezdeti költsége elkerülhetetlenné teszi a költséghatékonyság vizsgálatát. Ezen felül jelentős klinikai szerepe van a kezelésre várhatóan kisebb mértékben reagáló betegek idejekorán történő azonosításának.

## **2. Célkitűzés**

Ezek alapján részletes célkitűzéseink a következők voltak:

1. Meghatározzuk, hogy a kezelés előtti szérum húgysav szintek előre jelzik-e a klinikai kimenetelt CRT-ben részesülő szívelégtelen betegekben. Célunk volt ezen felül annak vizsgálata, hogy a húgysav prediktív értéke független-e az NT-proBNP-től és egyéb releváns klinikai faktoroktól.
2. Meghatározzuk a D-vitamin hiány prediktív szerepét a CRT utáni hosszú távú halálozásban, valamint megerősítjük a feltételezett összefüggést a középtávú klinikai válasszal.
3. Felmérjük, hogy a fraktalkin, a PTX-3, a HGF, a CA-125 és az MMP-9 képes-e előre jelezni a klinikai kimenetelt CRT-t követően. Ezen felül célul tűztük ki, hogy amennyiben a fenti biomarkerek független és additív prognosztikai szereppel bírnak, ezt reklassifikációs modellek segítségével megerősítjük.

## **3. Módszerek**

A prospektív, egy centrumos, obszervációs vizsgálatunkba 141 konsekutív krónikus szívelégtelenségben szenvedő beteget vontunk be. A bevonás előtt minden beteg írásos beleegyező nyilatkozatot tett, mellyel megerősítette a részvételi szándékát a vizsgálatban. A vizsgálat megfelelt a Helsinki Nyilatkozatban részletezett irányelveknek, a vizsgálati protokollt a helyi Etikai Bizottság jóváhagyta.

A vizsgálatba 2009. szeptember és 2010. december között CRT implantáción átesett krónikus szívelégtelen betegeket vontunk be a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív és Érgyógyászati Klinikán, az aktuálisan érvényes, az ESC által kiadott szakmai útmutatónak megfelelően.

A bevonási kritériumok a stabil, optimális gyógyszeres kezelés ellenére tünetes, a NYHA klasszifikáció alapján II-IVa stádiumú krónikus szívelégtelenség, a nyugalmi EKG-n 120 ms-nál szélesebb QRS komplexum és súlyosan csökkent, 35% alatti EF volt. A kizárási kritériumok a szisztémás gyulladáso, autoimmun és hematológiai betegségek, valamint az aktív malignus folyamatok voltak.

A betegeket öt évig követtük, ellenőrző viziteket a beültetést követően hat hónappal és két évvel végeztünk. A CRT beültetés előtt részletes fizikális vizsgálatot és laboratóriumi vizsgálatokat végeztünk, EKG és szívultrahang felvételeket készítettünk. Minden ellenőrző viziten ismételtlen felmértük a betegek funkcionális státuszát, az aktuális gyógyszeres kezelést és rögzítettük a releváns kardiovaszkuláris eseményeket. Ismételt laborvizsgálatot, EKG és szívultrahang felvételeket készítettünk a beültetést követően hat hónappal.

Elsődleges végpontnak minden vizsgálatunkban az öt éves összhálalozást tekintettük. A biomarker vizsgálatunkban másodlagos végpontnak a hat hónapos reverz remodeláció elmaradását tekintettük, melyet a LVESV legalább 15%-os relatív csökkenése elmaradása esetén állapítottunk meg. A hiperurikémia és D-vitamin hiány vizsgálatainkban a másodlagos végpont a kedvezőtlen hat hónapos klinikai válasz volt, az EF legalább 15%-os relatív növekedése elmaradásával definiálva.

A kutatásba 141 beteget vontunk be a fenti beválasztási kritériumok alapján, közülük 4 beteg esetében derült fény kizárási kritériumra, így adatbázisunkban 137 fő adatait rögzítettük. A biomarker és a D-vitamin hiány vizsgálatokban 1 fő echokardiográfiás adatsora nem volt teljes, így az elemzéseket 136 fő adataival végeztük, a hiperurikémia vizsgálatban a rutin laboratóriumi klinikai kémia profil ezen belül 129 beteg esetében volt teljes a CRT beültetés előtt, így az analízisbe az ő adataik kerültek be.

A részletes fizikális vizsgálat során felmértük a betegek funkcionális státuszát a NYHA klasszifikáció szerinti stádium rögzítésével, megmértük a testsúlyt, testmagasságot, a vérnyomást és a pulzust. A CRT beültetés előtt vénás vérmintát vettünk rutin laboratóriumi mérésekhez, illetve vérmintát tároltunk a biomarker szintek mérései céljából. Az anamnézis felvétel során rögzítettük a korábbi megbetegedéseket, műtéteket és az aktuális gyógyszeres kezelést. A szívelégtelenség etiológiájaként iszkémiás kardiomiopátiát (CM) véleményeztünk, amennyiben a beteg korábban AMI-

t szenvedett el, perkután koronária intervenció (PCI) vagy koszorúér áthidaló (CABG) műtéten esett át. A D-vitamin mérések értékelésekor figyelembe vettük a napsütés szerepét. A napsütés expozíciós idejét a beültetést megelőző 30 nap napsütéses óráinak kumulatív idejével jellemeztük.

Az transztorakális echokardiográfiás méréseket Philips iE33® (Philips Healthcare, Hollandia) készülékkel, S5-1 transzducerrel (Philips Healthcare, Hollandia) végeztük, standard csúcsi két-, három és négyüregű, valamint paraszternális rövid- és hossz tengelyű felvételeket készítettünk. Az EF-t a Simpson biplán módszerrel, a LVESV-t és LVEDV-t Teicholz módszerrel számoltuk. A felvételeket független echokardiográfia specialista szakemberek végezték. A reprodukálhatóság igazolására inter- és intraobszerver variabilitást határoztunk meg 12-12 pár minta felhasználásával, a Lin-féle konkordancia korreláció koefficiens segítségével, mely jelentős korrelációt igazolt [interobszerver variabilitás:  $\rho=0,956$  (0,89-0,98); intraobszerver variabilitás:  $\rho=0,96$  (0,89-0,97)].

A CRT implantációt a standard intézeti protokollnak megfelelően, lokális érzéstelenítéssel végeztük. A jobb kamrai elektródát szeptális pozícióba, bal kamrai elektródát a szinusz koronáriusz oldalágába pozícionáltuk, ezen felül amennyiben szükséges volt jobb pitvari elektródát helyeztünk el, végül a telepet az infraclavicularis régióba implantáltuk. CRT-D készüléket implantáltunk, amennyiben az anamnézisben dokumentált tartós kamrai ritmuszavar szerepelt.

A CRT beültetés előtt illetve a hat hónapos kontroll során a betegektől vénás vérmintát vettünk rutin laboratóriumi és biomarker szint mérések céljából. A szérum és etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) plazma mintákat két órán belül feldolgoztuk, majd  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a későbbi biomarker szint meghatározáshoz. A laboratóriumi vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív és Érgyógyászati Klinika Központi Laboratóriumában és a III. Belgyógyászati Klinika Központi Laboratóriumában végeztük.

A vesefunkció laboratóriumi paramétereit és a szérum kalcium szinteket abszorpciós fotometriával határoztuk meg kémiai analizátorral [Cobas Integra 400 Plus® (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország)]. A felhasznált Roche Diagnostics laboratóriumi reagensek a következők voltak: kreatinin [Katalógus szám (Kat. sz.): 04810716190]; húgysav (Kat.

sz.: 03183807190); karbamid (Kat. sz.: 04460715190), kalcium (Kat. No.: 05061482190). Az NT-proBNP (Roche Elecsys NT-proBNP II Kit, Kat. sz.: 04842464190, Roche Diagnostics) és a teljes szérum 25(OH)-D-vitamin (Roche Elecsys Vitamin D total Kit, (Kat. sz.: 05894913190, Roche Diagnostics) szinteket Cobas e 411 (Roche Diagnostics) immunkémiai analizátor segítségével határoztuk meg immun kemilumineszcenciás módszerrel. Kereskedelmi forgalomban elérhető enzim-kötött immunoszorbens vizsgáló (ELISA) kitek segítségével határoztuk meg a fraktalkin (Human CX3CL1/Fractalkine Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA, Kat. sz.: RD-DCX310), a PTX-3 (Human Pentraxin3 / TSG-14 ELISA System, CosmoBio, Tokió, Japán, Kat. sz.: PPX-PP-PD03-E0), a HGF (Human HGF Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Kat. sz.: RD-DHG00) és az MMP-9 (Human MMP-9, Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Kat. sz.: RD-DMP900) plazma szinteket.

A CA-125 szinteket Liaison CA 125 II immuno kemilumineszcenciás módszerrel határoztuk meg (Kat. sz.: 314211) Liaison Analyzer segítségével (DiaSorin, Saluggia, Olaszország).

A számítások első lépésében Shapiro-Wilk teszt segítségével meghatároztuk a paraméterek valószínűségi eloszlását. A vizsgált paraméterek döntő többsége nem normális eloszlást mutatott, ezért további analíziseink során nem-paraméteres statisztikai eljárásokat használtunk. Az adatokat a folytonos változók esetén a medián érték és az interkvartilis tartományok (25-75%), a kategorikus változók esetén az esetszámok és százalékos arányok megadásával jellemeztük. Vizsgálatainkban a  $<0,05$  alatti p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az analízisekhez IBM SPSS 22 (Apache Software Foundation, USA), GraphPad Prism 6.03 (GraphPad Software Inc., USA), PASS 2008 (NCSS, USA) és az R (R version 3.1.2, PredictABEL és pROC csomagok) szoftvereket használtuk. A folytonos változók összehasonlítására független csoportok esetén a Mann-Whitney- féle U-próbát, összefüggő csoportok esetén a Wilcoxon-féle próbát használtuk. Kategorikus változók összehasonlítását a Khi-négyzet teszttel végeztük. Folytonos változók közötti összefüggés jellemzésére a Spearman-féle korrelációt használtuk.

Receiver operating characteristic (ROC) analízist használtunk az optimális vágópontok meghatározására az AUC megadásával, ennek megfelelően dichotomizáltuk a folytonos változókat, a vágópontok

kiválasztásánál elsődleges szempontunk az volt, hogy a klinikai jelentőséggel bíró lehető legmagasabb szenzitivitási értékhez a lehető legmagasabb specificitási érték tartozzon. A halálozás elemzéséhez az ábrázolt Kaplan-Meier görbéket log rank teszt segítségével hasonlítottuk össze, a klinikai válasz vizsgálatokhoz oszlop diagramokat és kontingencia táblázatokat alkalmaztunk.

Univariáns logisztikus regressziót használtunk a klinikai válasz, univariáns Cox-regressziót a halálozás prediktorainak meghatározásához. A folytonos változókat 1 standard deviáció (SD) emelkedés alapján standardizáltuk. A multivariáns logisztikus és Cox-regressziós analízisekben az alap modellbe az univariáns analízis alapján releváns változókat (biomarker vizsgálat:  $p < 0,05$ ; hiperurikémia és D-vitamin hiány vizsgálat:  $p < 0,1$ ) illesztettük. Az alap modellbe illesztett paraméterek száma nem haladta meg az  $n / 10$ -et, „n” az adott modellben vizsgált végpont események száma volt, ezzel biztosítva a modell megfelelő kalibrálását. A vizsgált biomarkereket az ezt követő lépésben („forward stepwise” módon) illesztettük a multivariáns modellbe, megadva Cox-regresszió esetén a rizikó hányadost (HR), logisztikus regresszió esetén az esély hányadost (OR), valamint ezek 95%-os konfidencia intervallumát (CI) (233). Minden lépésben ellenőriztük a változás és a teljes modell validitását a p és a Wald-féle Khi-négyzet ( $\chi^2$ ) kiszámításával, ezt követően power analízist végeztünk. Modelljeink sikeresen azonosították a kapott regressziós koeficienseket, legalább 80%-os statisztikai erő mellett.

A modellek pontosságát a kalibráció és a teljesítmény vizsgálatával ellenőriztük; a kalibrációt a HL teszt segítségével vizsgáltuk, ábrázoltuk a kalibrációs görbéket, míg a teljesítményt a Nagelkerke-féle R<sup>2</sup> és a Brier pontszám értékével jellemeztük. A diszkriminációt a c-statisztika és a DeLong teszt kiszámításával határoztuk meg. Ezt követően végeztük el a reklassifikációs és diszkriminációs analíziseket a vizsgált biomarker hozzáadott predikciós értékének vizsgálatához (NRI, IDI).

## **4. Eredmények**

### **4.1. A hiperurikémia előre jelzi a kedvezőtlen klinikai kimenetelt kardiális reszinkronizációs terápiát követően**

#### **4.1.1. A betegek jellemzői**



A laborparaméterek beültetés előtti szérum szintjei a következőképpen alakultak: kreatinin 79 (70-91)  $\mu\text{mol/l}$ , húgysav 432 (331-516)  $\mu\text{mol/l}$ , karbamid 5,9 (4,5-6,5)  $\text{mmol/l}$ , NT-proBNP 2608 (1331-5101)  $\text{pg/ml}$ .

#### 4.1.2. Az öt éves halálozás előrejelzése

A követés mediánja 1796 (922-2023) nap volt, ez alatt 55 beteg (43%) hunyt el. A túlélési esélyek szignifikánsan jobbak voltak azon betegek esetében, ahol a CRT beültetés előtt béta-blokkoló kezelést és típusos BTSZB-t észleltünk, míg a kacsdiuretikum kezelés szükségessége növelte a halálozást.

A laboratóriumi paraméterek univariáns Cox regressziós analízisét elvégezve az emelkedett NT-proBNP, kreatinin, karbamid és húgysav szintek jelezték előre az öt éves halálozást. Multivariáns modellt hoztunk létre, melyben az NT-proBNP és a releváns klinikai jellemzők (BTSZB, béta-blokkoló és kacsdiuretikum kezelés, NYHA III-IV osztály, férfi nem és életkor) szerepeltek, ezt követően külön-külön illesztettük a kreatinin, karbamid és húgysav szintek prediktív értékét a fenti modellben. Tekintettel a szignifikáns korrelációra a kezdeti húgysav szintekkel, a kreatinin ( $r=0,35$ ;  $p<0,001$ ) és karbamid szinteket ( $r=0,28$ ;  $p=0,0016$ ) nem illesztettük be a multivariáns modellbe. A CRT beültetés előtt mért  $386 \mu\text{mol/l}$ -nél magasabb húgysav koncentráció közel 2,4-szeresére emelte az öt éves halálozás rizikóját [HR = 2,39 (1,30-4,39),  $p < 0,01$ ], 73%-os negatív prediktív értékkel. Ezen felül a multivariáns illesztést követően a karbamid is előre jelezte az öt éves halálozást [HR 1,39 (1,12-1,75),  $p < 0,01$ ], míg a kreatinin elvesztette prediktív értékét.

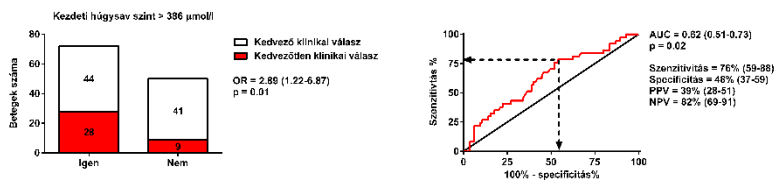
#### 4.1.3. A hat hónapos klinikai válasz előre jelzése

A megadott echocardiographiás kritérium alapján 85 beteg (70%) esetében észleltünk kedvező klinikai választ. A megelőző MRA kezelés szignifikáns összefüggést mutatott a kedvező klinikai válasszal. A csökkent kezdeti EF a kedvezőtlen klinikai választ jelezte előre, míg a férfi nem, hipertónia és a megnövekedett bal kamrai volumenek tendenciaszerű összefüggést mutattak ( $p < 0,1$ ).

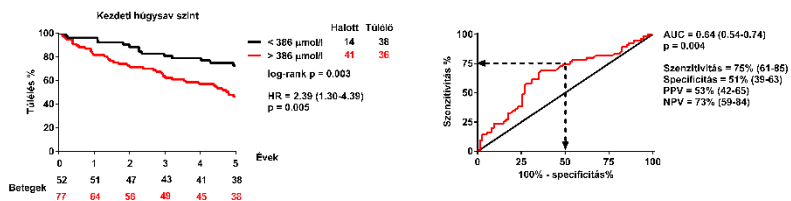
Az univariáns logisztikus regressziós analízis alapján az emelkedett kezdeti NT-proBNP, kreatinin, karbamid és húgysav szintek előre jelezték a

kedvezőtlen klinikai választ. Multivariáns predikciós modellt hoztunk létre, melyben az NT-proBNP és a releváns klinikai jellemzők (EF, MRA kezelés, férfi nem és hipertónia) szerepeltek. Tekintettel a szignifikáns korrelációra a kezdeti ejekciós frakcióval, a bal kamrai végszisztólés- ( $r = -0,52$ ;  $p < 0,001$ ) és végdiasztólés-volumeneket ( $r = -0,44$ ;  $p < 0,001$ ) nem illesztettük be a multivariáns modellbe. Külön-külön végzett multivariáns illesztést követően az emelkedett kreatinin-, karbamid- és húgysav szintek is szignifikáns független prediktornak bizonyultak. Tekintettel a szignifikáns korrelációra a kezdeti húgysav szintekkel, a kreatinin- ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,001$ ) és karbamid szinteket ( $r = 0,28$ ;  $p = 0,0016$ ) nem illesztettük be a multivariáns modellbe. A CRT beültetés előtt mért  $386 \mu\text{mol/l}$ -nél magasabb húgysav koncentráció közel háromszorosára emelte a kedvezőtlen klinikai válasz rizikóját [OR = 2,89 (1,22-6,87),  $p < 0,01$ ], 82%-os negatív prediktív értékkel (1. ábra).

## A Klinikai válasz



## B Halálozás



**1. ábra** A hat hónapos klinikai válasz és az öt éves mortalitás előrejelzése a kezdeti szérumszint segítségével.

Az optimális vágópontot ROC analízis használatával határoztuk meg (jobb oldal).

A: A kedvező klinikai választ hat hónappal a CRT beültetést követően, az EF legalább 15%-os relatív növekedése esetén határoztuk meg, túlélő betegek esetén (bal oldal).

B: A Kaplan-Meier görbét log-rank tesztek segítségével hasonlítottuk össze (bal oldal).

## 4.2. A D-vitamin hiány előre jelzi a kedvezőtlen klinikai választ CRT implantáción átesett szívelégtelen betegekben

### 4.2.1. A betegcsoport bevonáskor felmért klinikai jellemzői, a CRT hatása

Az elhunyt betegeknél magasabb EF-t és NT-proBNP szinteket mértünk, míg a típusos BTSZB-os és béta-blokkoló kezelésben részesülő betegek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt. A betegek kezdeti plazma D-vitamin szintje 20,9 (15,2-31,7) ng/ml volt, hat hónap CRT után nem észleltünk jelentős változást [6 hónap: 21,5 (16,2-28,3),  $p=0,43$ ]. A CRT hatására az EF javult, a bal kamrai végszisztolés- és végdiasztolés volumenek szignifikánsan csökkentek.

58 beteg (43%) hunyt el az öt éves követés során, a túlélő betegek kezdeti D-vitamin szintje szignifikánsan magasabb volt [23,07 (16,58-31,73) vs. 18,3 (13,81-23,75) ng/ml  $p=0,018$ ]. 45 beteg (33%) esetében észleltük a kedvező klinikai válasz elmaradását hat hónappal a CRT beültetést követően, a kedvező klinikai választ mutató betegek kezdeti D-vitamin szintje hasonlóképpen szignifikánsan magasabb volt [22,56 (15,6-31,87) vs. 18,12 (13,95-23,43) ng/ml,  $p=0,027$ ].

### 4.2.2. A kezdeti D-vitamin szint és a klinikai kimenetel összefüggése

ROC analízis segítségével optimális vágópontot határoztunk meg a klinikai kimenetel további analíziséhez. A 24,13 ng/ml alatti plazma D-vitamin szint megfelelő vágópontnak bizonyult az öt éves mortalitás [AUC=0,62 (0,52-0,71),  $p=0,018$ ; szenzitivitás: 78% (65-87); specificitás: 45% (34-58)], és kedvező hat hónapos klinikai válasz elmaradása [AUC=0,62 (0,52-0,71),  $p=0,027$ ; szenzitivitás: 80% (65-90); specificitás: 42% (32-53)] esetében is.

Ezt követően csoportosítottuk a betegeket a kezdeti D-vitamin szint alapján, összehasonlítottuk a 24,13 ng/ml alatti és feletti kezdeti plazma szinttel jellemezhető betegeket. A két csoport között a béta-blokkoló kezelés használatában találtunk szignifikáns különbséget, majdnem minden magasabb D-vitamin szinttel rendelkező beteg szedett béta-blokkolót (98% vs. 85%,  $p=0,015$ ). A napsütéses órák átlagos expozíciós ideje ( $p=0,56$ ) és a szérum kalcium szint ( $p=0,23$ ) sem különbözött a csoportok között.

A szívelégtelenség súlyosságát elemezve megállapítottuk, hogy kezdetben nem volt különbség a csoportok között az NT-proBNP szinteket

[2626 (1683-5214) vs. 2518 (988-4791) pg/ml,  $p=0,18$ ] és a NYHA osztályt figyelembe véve ( $p=0,61$ ). Hat hónap CRT-t követően csak az alacsonyabb D-vitamin szinttel rendelkező betegek esetében maradt változatlanul magas az NT-proBNP szint [1216 (337-2214) vs. 2116 (927-3865)pg/ml,  $p=0,019$ ]. Ezen felül a funkcionális státuszuk (NYHA osztály) sem javult ( $p=0,001$ ).

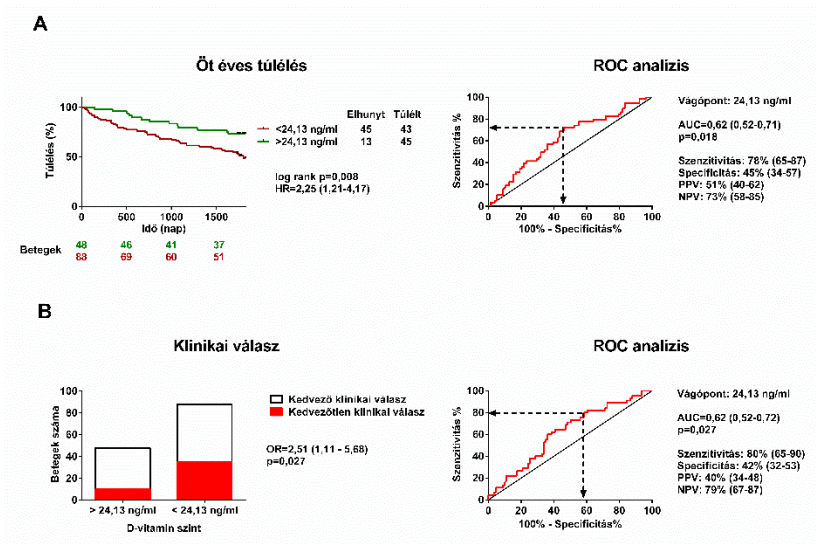
#### 4.2.3. Az öt éves halálozás és a kedvező klinikai válasz elmaradását előre jelző klinikai jellemzők

Az öt éves össz-halálozást univariáns Cox-regresszió, míg a hat hónapos klinikai választ univariáns logisztikus regresszió segítségével analizáltuk. A 24,13 ng/ml-nél alacsonyabb kezdeti D-vitamin szint szignifikáns összefüggést mutatott a hosszú távú halálozás [HR: 2,25 (1,21-4,17),  $p=0,008$ ] és a kedvező klinikai válasz elmaradásának [OR: 2,51 (1,11-5,68),  $p=0,027$ ] emelkedett rizikójával.

A korábban részletesen ismertetett eredményeink alapján a BTSZB ( $p<0,0001$ ), a béta-blokkoló kezelés ( $p=0,003$ ) hiánya és az emelkedő NT-proBNP ( $p<0,0001$ ) szintek jelezték előre az össz-mortalitást, a növekvő kor erős tendenciális összefüggést mutatott ( $p=0,07$ ). A kedvező klinikai válasz elmaradásával összefüggő releváns klinikai jellemzők a hipertónia ( $p=0,08$ ), hiperlipidémia ( $p=0,09$ ), a mineralokortikoid receptor blokkoló kezelés hiánya ( $p=0,06$ ) és az emelkedő NT-proBNP szintek ( $p=0,22$ ) voltak.

A csökkent D-vitamin szintek a halálozást függetlenül előre jelző szerepének vizsgálatához multivariáns Cox regressziós modellt hoztunk létre azon klinikai jellemzők használatával, melyek az univariáns analízis alapján relevánsnak ( $p<0,1$ ) bizonyultak. Ennek megfelelően a kor, a BTSZB, a béta-blokkoló kezelés és a kezdeti NT-proBNP szint alkotta a multivariáns modellt. A következő lépésben a D-vitamin szintet illesztettük a modellbe, a 24,13 ng/ml alatti D-vitamin szintek a multivariáns modellben is megőrizték prediktív értéküket [HR=1.92 (1.02-1.45),  $p=0.045$ ] (2. ábra).

A klinikai válasz vizsgálatokor is a fenti módszer szerint jártunk el. Első lépésben a releváns klinikai jellemzőket illesztettük a multivariáns modellbe, úgy mint: hipertónia, hiperlipidémia, MRA kezelés és emelkedő NT-proBNP szintek. A következő lépésben illesztettük a kezdeti D-vitamin szintet a modellbe. A halálozáshoz hasonlóan a csökkent D-vitamin szint a kedvező klinikai válasz elmaradásának független prediktora volt [OR=2,62 (1,01-6,25),  $p=0,03$ ] (2. ábra).



## 2. ábra A kezdeti D-vitamin szint hatása az öt éves túlélésre és a hat hónapos klinikai válaszra

Az optimális vágópontot ROC analízis használatával határoztuk meg (jobb oldal).

A: A betegek túlélésének összehasonlítása 24,13 ng/ml alatti és feletti kezdeti D-vitamin szint esetén

B: A kedvező klinikai válasz (az EF legalább 15%-os növekedése hat hónappal a CRT beültetést követően) összehasonlítása 24,13 ng/ml alatti és feletti kezdeti D-vitamin szint esetén

## 4.3. Új biomarkerek a kardiális reszinkronizációs terápiában: a hepatocytá növekedési faktor független prediktora a klinikai kimenetelnek

4.3.1. A vizsgálati betegcsoport jellemzői, a CRT hatásai az echokardiográfiai jellemzőkre és a biomarkerekre

A betegek medián életkora 67 (60-73) év volt, 80% volt férfi. A medián QRS szélesség 163 (141-184) msec volt, a betegek 82%-ában észleltünk típusos BTSZB-ot a nyugalmi EKG-n. Hat hónappal a CRT-t követően az EF szignifikánsan nőtt [28% (23-33) vs 37% (31-41),  $p<0,0001$ ], míg a bal kamrai volumenek csökkentek [LVEDV: 303 (251-351) ml vs. 259 (203-332) ml,  $p<0,0001$ ; LVESV: 303 (154-276) vs. 167 (116-242) ml,  $p<0,0001$ ].

Eleméztük a vizsgált biomarkerek változását hat hónap követés után. Szignifikánsan alacsonyabb PTX-3 [4,92 (3,29-6,84) ng/ml vs. 3,13 (2,39-4,48) ng/ml,  $p<0,0001$ ], NT-proBNP [2612 (1377- 5124) pg/ml vs. 1626 (725-3300) pg/ml,  $p<0,001$ ], HGF [1379 (1029-1863) pg/ml vs. 1083 (862-1328) pg/ml,  $p<0,001$ ] és CA-125 [22,75 (11,05-69,90) vs 18,30 (9,15-34,35) U/ml,  $p<0,001$ ] szinteket észleltünk hat hónap CRT után. A fraktalkin [0,49 (0,39-0,67) vs. 0,51 (0,44-0,68) ng/ml,  $p=0,74$ ] és MMP-9 [545 (374-689) vs. 568 (348-753) ng/ml,  $p=0,053$ ] plazma szintek nem változtak statisztikailag jelentős mértékben.

#### 4.3.2. A biomarker koncentrációk összefüggése a klinikai válasszal

Összesen 70 beteget (51%) tekintettünk responder-nek, 66 beteg (49%) volt non-responder a meghatározott kritérium alapján. Az NT-proBNP szintek szignifikánsan magasabbak voltak a non-responder betegekben a beültetés előtt ( $p=0,0002$ ) és hat hónappal azt követően is ( $p<0,0001$ ). A követés alatt csak a responder betegekben csökkent az NT-proBNP szintje ( $p=0,0001$ ). A PTX-3 és CA-125 szintek jelentősen magasabbak voltak non-responder betegekben a beültetés előtt (PTX-3:  $p=0,0005$ ; CA-125:  $p=0,001$ ) és hat hónap követés után is (PTX-3:  $p=0,02$ ; CA-125:  $p=0,002$ ). Hat hónap CRT-t követően azonban a responder (PTX-3:  $p=0,0001$ ; CA-125:  $p=0,01$ ) és non-responder (PTX-3:  $p<0,0001$ ; CA-125:  $p=0,02$ ) betegekben is szignifikánsan csökkentek a fenti biomarkerek szintjei. Azon betegeknel, akik esetében elmaradt a reverz remodeláció hat hónap CRT után szignifikánsan magasabb kezdeti HGF ( $p=0,001$ ) és fraktalkin ( $p=0,004$ ) szinteket mértünk. A HGF szintek jelentősen csökkentek CRT után mindkét csoportban (responder:  $p=0,003$ ; non-responder:  $p=0,01$ ), míg a plazma fraktalkin szintek nem változtak a követés során. A MMP-9 szintek nem különböztek a csoportok között, azonban responder betegekben szignifikánsan nőtt a plazma szint hat hónap CRT után ( $p=0,003$ ).

#### 4.3.3. A halálozás és a reverz remodeláció univariáns prediktorai

Az öt éves össz-halálozást univariáns Cox-regressziós analízissel, a hat hónapos reverz remodelációt univariáns logisztikus regressziós analízissel vizsgáltuk. Az öt éves követés során 58 beteg (43%) hunyt el. Az össz-halálozás szignifikánsan magasabb volt amennyiben a BTSZB EKG-morfológia ( $p<0,0001$ ) vagy béta-blokkoló kezelés ( $p=0,003$ ) nem volt jelen,

valamint az emelkedő NT-proBNP szintek esetén ( $p < 0,0001$ ), a növekvő életkor esetében erős tendenciális összefüggést állapítottunk meg ( $p = 0,07$ ). Az új biomarkerek közül az emelkedő fraktalkin ( $p = 0,01$ ), HGF ( $p < 0,0001$ ) és MMP-9 ( $p = 0,04$ ) szintek jelezték előre az öt éves halálozást.

70 beteg (51%) esetében állapítottunk meg reverz remodelációt hat hónap követés után az echokardiográfiás kritérium alapján. A növekvő életkor ( $p = 0,004$ ), NYHA III-IV stádiumú szívelégtelenség ( $p = 0,01$ ) és az emelkedő NT-proBNP szintek ( $p = 0,004$ ) jelezték előre a hat hónapos reverz remodeláció elmaradását. Erős tendenciális összefüggést észleltünk az iszkémiás eredetű kardiomiopátia ( $p = 0,069$ ), a MRA kezelés ( $p = 0,08$ ) és a remodeláció elmaradása között. Az emelkedő fraktalkin ( $p = 0,04$ ), PTX-3 ( $p = 0,01$ ) és HGF szintek ( $p = 0,01$ ) jelezték előre a kedvezőtlen klinikai választ.

#### 4.3.4. Multivariáns predikciós modellek a halálozás és a reverz remodeláció vizsgálatára

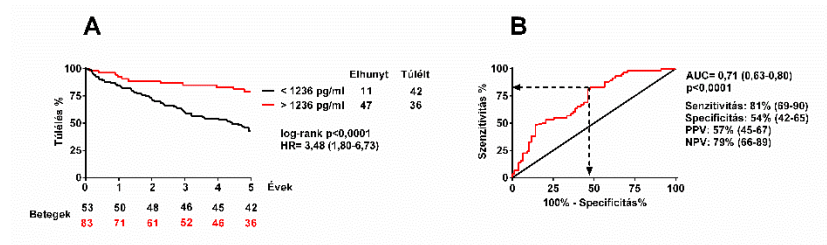
Az új biomarkerek és a halálozás kapcsolatának további vizsgálata céljából multivariáns modellt hoztunk létre, melybe minden, az univariáns analízisek alapján releváns klinikai jellemzőt beillesztettünk. A multivariáns modellben a kor, a BTSZB morfológia, a béta-blokkoló kezelés és az NT-proBNP szintek szerepeltek. A következő lépésben az új biomarkereket külön-külön illesztettük a modellbe „forward stepwise” módon. Egyedül a HGF jelezte előre a halálozást a multivariáns modellben [HR=1,35 (1,11-1,64),  $p = 0,003$ , minden 1 SD emelkedésre].

Hasonló módon elemeztük a reverz remodelációt is. Minden releváns változót a multivariáns modellbe illesztettünk, szerepelt a kor, az iszkémiás kardiomiopátia, a NYHA III-IV osztály, a MRA kezelés és az NT-proBNP szintek. Az új szívelégtelenség biomarkereket külön-külön illesztettük a modellbe „forward stepwise” módon. A halálozás előre jelzéséhez hasonlóan csak a HGF igazolódott az elmaradó reverz remodeláció független prediktorának [OR=1,83 (1,10-3,04),  $p = 0,01$ , minden 1 SD emelkedésre].

A görbe alatti területeket ROC analízis segítségével határoztuk meg, az optimális vágópontot kiválasztása céljából. A célunk olyan, klinikailag is releváns vágópont meghatározása volt, mely viszonylag magas szenzitivitás mellett a legnagyobb specifitással jellemezhető.

#### 4.3.5. A HGF addicionális szerepének vizsgálata a klinikai kimenetel előre jelzésében

Az 1236 pg/ml feletti plazma HGF szintet optimális vágópontnak értékeltük [AUC=0,71 (0,63-0,80),  $p<0,0001$ ; szenzitivitás: 81% (69-90); specificitás: 54% (45-65)]. Az 1236 pg/ml feletti HGF szintek a hosszú távú halálozás jelentősen emelkedett rizikójával jártak együtt [HR=3,48 (1,80-6,73),  $p<0,0001$ ] (3. ábra).

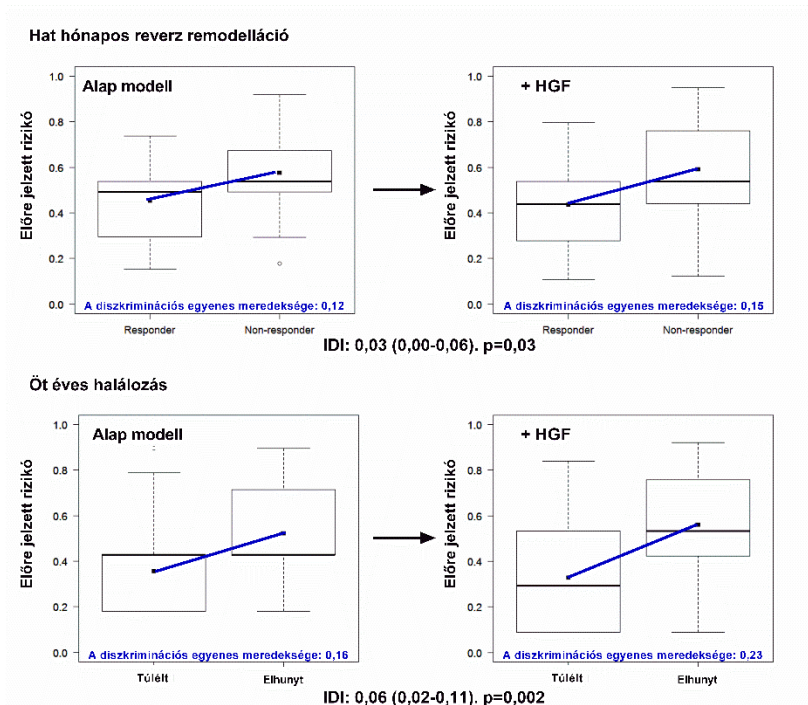


### 3. ábra A kezdeti HGF szint hatása az öt éves halálozásra

A: Az öt éves túlélés összehasonlítása 1236 pg/ml alatti és feletti kezdeti plazma HGF szint esetén. B: ROC analízis segítségével határoztuk meg az optimális vágópontot a kezdeti plazma HGF szintekhez.

A HGF-et a halálozás [NRI=0,69 (0,39-0,99),  $p<0,0001$ ; IDI=0,06 (0,02-0,11)] és reverz remodeláció [NRI=0,39 (0,07-0,71),  $p=0,01$ ; IDI=0,03 (0,00-0,06)] multivariáns predikciós modelljébe illesztve szignifikánsan javuló reklasszifikációt és diszkriminációt igazoltunk. A HGF-et az alap modellhez hozzáadva a predikciós modellek diszkriminációs egyenesének meredeksége nőtt (0,12-ről 0,15-re a reverz remodeláció, 0,16-ről 0,23-ra a halálozás esetében) (4. ábra). Az előre jelzett és megfigyelt rizikó a Hosmer-Lemeshow teszttel vizsgálva nem különbözött szignifikánsan az egész analízis-sorozat alatt, mely megfelelő kalibrációt igazolt és megerősítette az eredmények pontosságát. A Brier érték csökkenése és a Nagelkerke-féle  $R^2$  növekedése a javuló predikciós kapacitásra utalt.





#### 4. ábra A predikciós modellek javuló diszkriminációs kapacitása.

A diszkriminációs egyenes (kék vonal) a két csoport rizikójának átlagára felvett egyenes, meredeksége a rizikók közti különbséget jelzi. A HGF biomarker hozzáadása az alap modellhez növeli a predikciós modell diszkriminációs egyenes meredekségét. A diszkriminációs egyenesek meredeksége különbsége adja az IDI értékét.

#### 5. Következtetések

Klinikai vizsgálataink legfőbb erőssége a vizsgált biomarkerek klinikai jelentőségében rejlik. Az új biomarkerek alvizsgálatban olyan, a szívelégtelenség különböző kórelletani útvoalait reprezentáló biomarkereket vizsgáltunk, melyek prediktív szerepét igazolták korábbi vizsgálatok. A húgysav és a D-vitamin pedig a mindennapi orvosi gyakorlatban és diagnosztikában használt biomarkerek, melyek prognosztikus értékét a szívelégtelenségben szintén friss kutatások erősítették meg. Kutatócsoportunk elsőként vizsgálta a fenti biomarkerek

jelentőségét CRT implantáción átesett betegcsoportban. A húgysav, a D-vitamin és a HGF esetében is az összes releváns kezdeti prediktortól független prognosztikus értéket igazoltunk, míg a biomarker vizsgálatban a reklassifikációs analízis használatával a HGF additív prognosztikus szerepét is illusztráltuk. Vizsgálataink legfontosabb eredményei:

1. A kezdeti húgysav szintek szoros összefüggést mutatnak a klinikai kimenetellel CRT-t követően. A 386 mmol/l feletti szérum szintek a kedvezőtlen klinikai válasz háromszorosan és a halálozás közel 2,4-szeresen emelkedett rizikóját jelezték előre az NT-proBNP-től és az összes azonosított releváns klinikai változótól függetlenül.

2. A csökkent kezdeti D-vitamin szintek kedvezőtlen kimenetelt, csökkent funkcionális kapacitást és klinikai választ jeleznek előre CRT beültetésén átesett szívelégtelen betegekben. A hosszú távú halálozás szignifikánsan rosszabb a megfelelő kezdeti D-vitamin szinttel jellemezhető beteggel összehasonlítva. A 24,13 ng/ml alatti kezdeti D-vitamin szintek a kedvezőtlen klinikai válasz közel kétszeres, a hosszú távú mortalitás több mint 2,5-szeres rizikóját jelezték előre az összes releváns klinikai változótól függetlenül.

3. A kezdeti, emelkedő HGF szintek az elmaradó reverz remodeláció és a hosszú távú halálozás emelkedett rizikóját jelezték előre CRT után, függetlenül az NT-proBNP szintektől és az összes releváns klinikai prediktortól. A reklassifikációs analízisek alapján a HGF hozzáadása az alap modellhez javuló predikciót, teljesítményt, diszkriminációt és reklassifikációt eredményez a predikciós modellben, így addicionális prognosztikus értékkel bír. Az 1236 pg/ml feletti kezdeti HGF szintek az elmaradó reverz remodeláció közel kétszeres, a hosszú távú mortalitás közel 3,5-szeres rizikóját jelezték előre.

## **6. Saját publikációk jegyzéke**

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 9,125.

Perge P, Boros AM, Zima E, Geller L, Merkely B, Szeplaki G. (2018) Hyperuricemia predicts adverse clinical outcomes after cardiac resynchronization therapy. *Scand Cardiovasc J*, 52: 250-255.

Impakt faktor: 1,286.

Perge P, Boros AM, Gellér L, Osztheimer I, Szilágyi S, Tahin T, Apor A, Nagy KV, Zima E, Molnár L, Merkely B, Széplaki G. (2019) Vitamin D Deficiency Predicts Poor Clinical Outcomes in Heart Failure Patients Undergoing Cardiac Resynchronization Therapy. *Dis Markers*, 2019: 4145821.

Impakt faktor: 2,761.

Perge P, Boros AM, Szilágyi S, Zima E, Molnar L, Geller L, Prohaszka Z, Merkely B, Szeplaki G. (2018) Novel Biomarkers in Cardiac Resynchronization Therapy: Hepatocyte Growth Factor Is an Independent Predictor of Clinical Outcome. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 72 (1): 48-55.

Impakt faktor: 5,078.

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 37,971.

Széplaki G, Perge P, Merkely B. (2014) A terápiarezisztencia áttörése hipertóniában: a szimpatikus tónus csökkentésének eszközös lehetőségei. *Háziorvosi Továbbképző Szemle*, 19: 399-402.

Boros AM, Szeplaki G, Perge P, Jenei Z, Bagyura Z, Zima E, Molnar L, Apor A, Becker D, Geller L, Prohaszka Z, Merkely B. (2016) The ratio of the neutrophil leucocytes to the lymphocytes predicts the outcome after cardiac resynchronization therapy. *Europace*, 18: 747-754.

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*, 2016: 7304538.

Impakt faktor: 2,348.

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) The impact of cardiac resynchronization therapy on routine laboratory parameters. *Interv Med Appl Sci*, 9: 1-8.

Piros K, Herczeg S, Szegedi N, Salló Z, Osztheimer I, Széplaki G, Tahin T, Nagy K, Perge P, Bettenbuch T, Srej M, Merkely B, Gellér L. (2017) ALARA-elv alkalmazásával jelentősen csökkenthető a katéterablációs

kezelések során használt ionizáló röntgensugárzás mennyisége. *Card Hung*, 47: 179-182.

Salló Z, Szegedi N, Osztheimer I, Nagy K, Piros K, Perge P, Tahin T, Ábrahám P, Merkely B, Gellér L. (2017) Successful radiofrequency pulmonary vein isolation in a patient with left-sided pneumonectomy. *Rom J Card*, 27: 33-34.

Nagy KV, Szeplaki G, Perge P, Boros AM, Kosztin A, Apor A, Molnar L, Szilagyi S, Tahin T, Zima E, Kutyifa V, Geller L, Merkely B. (2018) Quality of life measured with EuroQol-five dimensions questionnaire predicts long-term mortality, response, and reverse remodelling in cardiac resynchronization therapy patients. *Europace*, 20: 1506-1512.

Impakt faktor: 5,047.

Piros K, Nagy K, Szegedi N, Osztheimer I, Salló Z, Perge P, Herczeg S, Merkely B, Gellér L. (2019) Atrio-ventricularis reentry tachycardia az AV-csomó kihagyásával, avagy kettős járulékos köteg fiatal, egészséges betegeknél. *Card Hung*, 49: 178-183.

Zabel M, Schlogl S, Lubinski A, Svendsen JH, Bauer A, Arbelo E, Brusich S, Conen D, Cygankiewicz I, Dommasch M, Flevari P, Galuszka J, Hansen J, Hasenfuss G, Hatala R, Huikuri HV, Kentta T, Kucejko T, Haarmann H, Harden M, Iovev S, Kaab S, Kaliska G, Katsimardos A, Kasprzak JD, Qavoq D, Luthje L, Malik M, Novotny T, Pavlovic N, Perge P, Rover C, Schmidt G, Shalганov T, Sritharan R, Svetlosak M, Sallo Z, Szavits-Nossan J, Traykov V, Vandenberg B, Velchev V, Vos MA, Willich SN, Friede T, Willems R, Merkely B, Sticherling C. (2019) Present criteria for prophylactic ICD implantation: Insights from the EU-CERT-ICD (Comparative Effectiveness Research to Assess the Use of Primary Prophylactic Implantable Cardioverter Defibrillators in Europe) project. *J Electrocardiol*, 57S: S34-S39.

Impakt faktor: 1,166.

Tokodi M, Schwertner WR, Kovacs A, Toser Z, Staub L, Sarkany A, Lakatos BK, Behon A, Boros AM, Perge P, Kutyifa V, Szeplaki G, Geller L, Merkely B, Kosztin A. (2020) Machine learning-based mortality prediction of patients undergoing cardiac resynchronization therapy: the SEMMELWEIS-CRT score. *Eur Heart J*.

Impakt faktor: 24,889.