

Prognosztikai markerek vizsgálata kardiovaszkuláris kórképekben

Doktori értekezés

Dr. Jenei Zsigmond Máté

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Zima Endre, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Babik Barna, Ph.D, egyetemi docens
Dr. Fekete Andrea, Ph.D, egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ondrejka Pál, Ph.D, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Kalina Ákos, Ph.D, főorvos
Dr. Vásárhelyi Barna, MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
2.1. Általános bevezető.....	6
2.2. A szívleállást követő állapot.....	6
2.3. HSP70	7
2.4. A HSP70 központi idegrendszeri iszkémiás állapotokban	8
2.5. Komplementrendszer.....	8
2.6. A komplementrendszer aktivációja iszkémia-reperfúziós károsodásban.....	10
2.7. Prognózis becslésre használható módszerek újraélesztett betegek esetén.....	10
2.8. Szívelégtelenség	11
2.9. A HSP70 szerepe szívelégtelenségben	12
2.10. Az RDW és a szívelégtelenség kapcsolata	12
2.11. Az RDW mint biomarker kardiovaszkuláris kórképekben.....	13
2.12. Prognosztikai markerek	13
2.13. Prognosztikai modellek és azok statisztikai értékelése	14
3. CÉLKITŰZÉSEK	21
3.1. Korai prognosztikai markerek keresése újraélesztett betegek esetén.....	21
3.2. A hosszú távú túlélés becslése szívelégtelen betegekben.....	22
3.3. Prognosztikai markerek valódi klinikai hasznosságának felmérése.....	22
4. MÓDSZEREK	23
4.1. A betegek vizsgálatba való bevonása és utánkövetése	23
4.1.1. Újraélesztett betegek vizsgálata.....	23
4.1.2. Újraélesztett betegek kontrollcsoportja	24
4.1.3. Szívelégtelen betegek vizsgálata	24
4.2. Mintavételezés	25
4.3. Laboratóriumi vizsgálati módszerek.....	25
4.4. Statisztikai módszerek	26
5. EREDMÉNYEK	28
5.1. Az újraélesztett betegcsoport jellemzése.....	28
5.1.1. Klinikai jellemzők	28
5.1.2. Normalizálás a hemodilúció hatásának kiküszöbölésére.....	30

5.1.3. A HSP70 és további biomarkerek újraélesztett betegekben	30
5.1.4. Gyulladásos folyamatok és endotélsejt aktiváció újraélesztett betegekben .	32
5.1.5. A HSP70 kapcsolata a gyulladásos folyamatokkal, az endotélsejt aktivációval és a klinikai súlyossági markerekkel	33
5.2. Újraélesztett betegek túlélésének elemzése.....	34
5.2.1. A HSP70 kapcsolata a túléléssel	34
5.2.2. A komplement aktiváció kapcsolata a túléléssel	36
5.3. Szívelégtelen betegek prognosztikai markerei.....	41
5.3.1. Szívelégtelen betegek prognosztikai markere a HSP70	41
5.3.2. Az RDW szerepe a szívelégtelenség hosszú távú prognózisában	46
5.4. Szívelégtelen betegek prognosztikai modelljének statisztikai újraértékelése	48
5.4.1. Az RDW, mint a túlélési modellbe újonnan beépített prognosztikai faktor szerepe	48
5.4.1.1. A modell általános jellemzése (RDW)	48
5.4.1.2. A diszkrimináció és a kalibráció értékelése újabb statisztikai módszerek segítségével (RDW).....	48
5.4.2. A HSP70, mint a túlélési modellbe újonnan beépített prognosztikai faktor szerepe	49
5.4.2.1. A modell általános jellemzése (HSP70)	49
5.4.2.2. A diszkrimináció és a kalibráció értékelése újabb statisztikai módszerek segítségével (HSP70).....	50
5.4.2. A két biomarker (RDW és HSP70) összehasonlítása.....	50
6. MEGBESZÉLÉS	61
6.1. A prognosztikai markerek vizsgálatai	61
6.2. A komplement aktiváció újraélesztett betegek esetén	62
6.3. A HSP70 újraélesztett betegek esetén	63
6.4. Az RDW szívelégtelen betegek esetén	64
6.5. A HSP70 szívelégtelen betegek esetén	65
6.6. Az új biomarkerek statisztikai értékelése	66
6.7. A vizsgálat korlátai és kitekintés	68
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	69

8. ÖSSZEFOGLALÁS	71
9. SUMMARY	72
10. IRODALOMJEGYZÉK	73
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	85
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk	85
11.2. A disszertációtól független publikációk	85
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ALS	advanced life support
APACHE II	acute physiology and chronic health evaluation II score
AUC	area under curve
BLS	basic life support
BNP	B-type natriuretic peptide
BMI	body mass index
CI	confidence interval
CPC	cerebral performance categories scale
CPR	cardiopulmonary resuscitation
CRP	C-reactive protein
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay
ET	big endothelin-1
GFR	glomerular filtration rate
HR	hazard ratio
HRP	horseradish peroxidase
HSP70	heat-shock protein 70
IDI	integrated discrimination improvement
IHCA	in-hospital cardiac arrest
MASP	MBL-associated serine protease
MAP-1	MBL-associated protein-1
MBL	mannose-binding lectin
MCV	mean corpuscular volume
NRI	net reclassification improvement
NT-proBNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
OHCA	out-of-hospital cardiac arrest

RDW	red cell distribution width
ROC	receiver operating characteristic
ROSC	return of spontaneous circulation
S100B	S 100 protein B
SAPS II	simplified acute physiology II score
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule 1
TNF α	tumor necrosis factor-alpha
vWF	Von Willebrand factor

2. Bevezetés

2.1. Általános bevezető

A prognózis előre jelzése a legtöbb klinikai szituációban különösen bonyolult, gyakran nehezen megválaszolható kérdés. A gyakorló orvos a mindennapokban azonban sokszor szembesül ezzel a problémával a beteg túlélésére vonatkozóan. Különböző kórképekben a kimenetel megjósolásának jelentősége más és más.

Dolgozatomban két tipikus helyzetet elemeztem, melyekben a túlélés becslése elengedhetetlen: korai, gyors döntéshozatal nagy időfaktorú betegségben, ilyen például az általunk vizsgált újraélesztett betegek rövid távú túlélése, amikor a kórházba érkezést követő első huszonnégy óra során a biológiai folyamatok és ezzel párhuzamosan az ellátás és az ehhez kapcsolódó döntési helyzetek is jelentős mértékben felgyorsulnak. A második ezzel szemben a hosszú távú túlélés becslése, krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegek esetén. E két jól definiált betegcsoportban kerestünk új prognosztikai markereket és ezekkel végeztünk túlélési elemzéseket.

A dolgozat első részében a két modell bemutatását a bennük felfedezett prognosztikai markerek vizsgálata követi. A második részben e mutatók klinikai felhasználását segítő újabb statisztikai elemzések szerepelnek (reklassifikációs módszerek: IDI [integrated discrimination improvement], NRI [net reclassification improvement]). Ezekben azt vizsgáltuk, hogy egy újonnan felfedezett biomarker esetén mennyi a valós klinikai haszon a korábban használt prognózist becselő módszerekhez képest.

2.2. A szívmegállást követő állapot

A szívmegállás következményeként generalizált iszkémia ill. hipoxia jön létre, valamint az ezt követő kardiopulmonális újraélesztés (cardiopulmonary resuscitation, CPR) reperfüziós károsodásokat is okoz. Ezek az események komplex folyamatokat indítanak be, melyek részletei még nem teljesen ismertek. Ezt az állapotot az angolszász irodalomban összefoglalóan „post cardiac arrest syndrome”-ként jelölik, magyar megfelelőjeként a „keringésmegállás utáni szindróma” kezd elterjedni. Habár a hipoxia következtében minden szerv sérül, az agyi károsodás jelenik meg legkorábban, mivel az agyban a legkisebb az iszkémiával szembeni tolerancia és a metabolikus tartalék. Ebből

kifolyólag az agy működése alapvetően függ a keringés meglététől. Az iszkémiás és reperfüziós károsodás heves stresszválaszt vált ki az agyban, a következő mechanizmusokkal: oxidatív stressz, mikrovaskuláris károsodás, excitotoxicitás, vér-agy gát diszfunkció, valamint neuron-, glia- és endotélsejtek nekrotikus vagy apoptotikus pusztulása, melyek posztiszkémiás gyulladást okoznak. Az iszkémiás és reperfüziós károsodás megfelelő biomarkere az S100B (S100 protein B) és a NSE (neuron-specifikus enoláz). Ezen molekulák szoros korrelációt mutatnak a szívleállást átvészelt betegek prognózisával (1).

2.3. HSP70

A hősokkfehérje (Hsp) családon belül a HSP70, azaz a 70 kDa-os hősokkfehérje [a 2009-ben bevezetett nevezéktan szerint HSPA1A (2)] az evolúció során strukturálisan és funkcióit tekintve is jól megőrzött molekula. Ez a molekula minden sejtben jelen van, kezdve az ősi baktériumoktól, a növényeken keresztül, egészen az emberig (3). A HSP70 többszörös szerepet játszik a sejtszintű homeosztázis fenntartásában. A HSP70 intracelluláris szintje különböző stresszhatásokra nagyon gyorsan emelkedik, ezáltal kivédi egy közel letális iszkémiás vagy hipoxiás esemény következményeit (4). Ezen túl fontos szerepet játszik a fehérjék feltekeredésében, az ún. „folding” mechanizmusában, a fehérjék sejtkompartmentek közti transzportjában és az irreverzibilisen károsodott fehérjemolekulák lebomlásában. Korábban az emberi hősokkfehérjékre úgy tekintettek, mint kizárólag intracellulárisan jelen lévő molekulákra, melyek a sejt túlélése szempontjából kiemelten fontos, ún. dajkafehérjék vagy chaperone-ok csoportjába tartoznak. A fehérjeanalitikai módszerek fejlődésének köszönhetően az utóbbi időben azonban kiderült, hogy a HSP70 extracellulárisan is jelen van a keringésben és jelenlétét egészséges egyéneknél is sikerült kimutatni (5). A HSP70 kétféle mechanizmussal juthat ki a sejtekből: passzív kiáramlás során a nekrotikus sejtekből, valamint aktív szekréció során, mely eltér a klasszikus szekréciós útvonaltól. Ennek részletes mechanizmusát Asea és mtsai foglalták össze nemrég (6). Az extracelluláris HSP70-ról ma már tudjuk, hogy fontos regulátor az intracelluláris gyulladásos jelátviteli folyamatban (7). Ezen kívül részt vesz az antigén prezentációban és az immunválaszban. Az emelkedett HSP70 a szérumban vagy a szövetekben az iszkémia vagy hipoxiás károsodás nem specifikus indikátora. Ennek megfelelően az

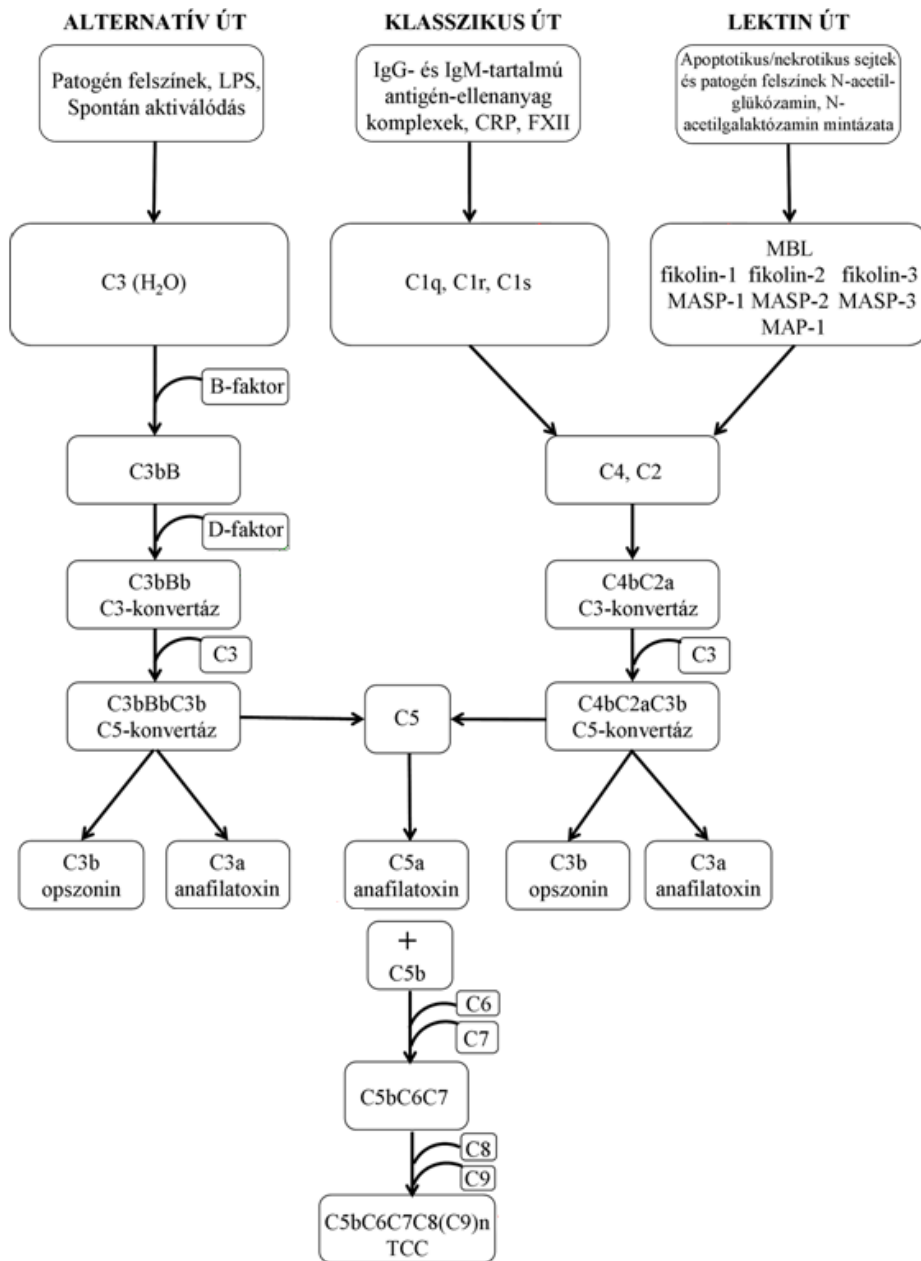
extracelluláris HSP70 központi idegrendszeri (agyi és gerincvelői) modelleken nagyon korán jelzi a sejtszintű iszkémiát (4). Munkacsoportunk korábban krónikus szívelégtelen betegek követéses vizsgálatában bemutatta, hogy a szérumban HSP70 szintje szoros kapcsolatban van a szívelégtelenség súlyosságával, azonban nem korrelál a gyulladásos markerekkel (CRP [C-reaktív protein], TNF α [tumor nekrosis faktor alfa], IL-6 [interleukin-6]) (8).

2.4. A HSP70 központi idegrendszeri iszkémiás állapotokban

Hecker és mtsai nemrég megjelent közleményükben bemutatták a HSP70 biomarker szerepét az agyi és gerincvelői iszkémia korai fázisában (4). Ezen kívül ismert, hogy súlyos koponyasérült betegekben az emelkedett HSP70 már a korai időszakban (első 20 óra) rossz prognózist jelent (9). Újraélesztett betegek esetén az extracelluláris HSP70-et idáig nem vizsgálták.

2.5. Komplementrendszer

A komplementrendszer a humorális immunrendszer fontos része. Alapvető szerepet játszik a kórokozó mikroorganizmusok elpusztításában, az immunkomplexek eliminálásában, valamint a szervezet saját elpusztult sejtjeinek eltakarításában. A komplementrendszer három útvonalon aktiválódhat (1. ábra): az antitest-függő klasszikus útvonalon, az alternatív útvonalon, valamint a legújabban felfedezett fikolin- vagy mannóz kötő lektin (mannose-binding lectin = MBL) útvonalon (10). A komplement aktiváció vezet az opszoninok (C3b), az anafilatoxinok (C3a and C5a) és a citolitikus membránkárosító komplex (C5b9) kialakulásához (11).



1. ábra

A komplement kaszkád klasszikus, alternatív és lektin-indukált útvonalai. Az aktivátor jellegétől függően a komplementrendszer aktivációja három különböző útvonalon mehet végbe, a klasszikus, az alternatív és a lektin-indukált útvonalon keresztül, amelyek mindegyike a C3 limitált proteolíziséhez vezet. Sarma és mtsai ábrája alapján, Csuka Dorottya által módosítva (12).

2.6. A komplementrendszer aktivációja iszkémia-reperfúziós károsodásban

A komplement aktiváció fontos szerepet játszik a sejtek és szövetek hipoxiás ill. reperfúziós károsodásának folyamatában (13). 2002-ben jelent meg az első közlemény, amely újraélesztett betegekben történő komplement aktivációval foglalkozott (14). Nemrég Bisschops és mtsai megerősítették, hogy komplement aktiváció tapasztalható olyan újraélesztett betegekben, akiket az European Resuscitation Council 2005-ös ajánlásnak megfelelően (15) terápiás hipotermiában részesítettek (16). Több tanulmányban bizonyították a komplement aktiváció jelenlétét iszkémiás stroke-on átesett betegekben (17-19). Ezen kívül akut stroke esetén a MBL mutációt hordozók jobb túlélést mutattak a géndefektust nem hordozó betegekhez képest (20). Ezek alapján úgy tűnik, a komplement aktiváció lektin útja fontos szerepet játszik a hirtelen kialakuló agyi iszkémia patofiziológiájában.

2.7. Prognózis becslésre használható módszerek újraélesztett betegek esetén

A neurológiai vizsgálatok közül a cornea- és pupillareflex hiánya igen specifikus, ám kevésbé szenzitív módszer az idegrendszeri károsodás felmérésére (21), azonban a neurológiai vizsgálatok értékelését nehezítik az alkalmazott szedatívumok elhúzódozó hatása és a terápiás hipotermia is.

Újraélesztett betegek prognózis becslése során több képalkotó és elektrofiziológiai vizsgálatról is bebizonyosodott, hogy alkalmas prognózis becslésre, azonban az eszköz-, szakember- és transzportigény miatt a korai időszakban ritkán hozzáférhetőek, és kivitelezésük gyakran nehézségekbe ütközik. E betegek szállítása különösen a terápiás hipotermia alkalmazása alatt igen nehézkes, mivel egyrészt intenzív ellátást igényelnek, másrészt a külső hűtőrendszert a lélegeztetett beteggel együtt kell mozgatni. A koponya CT (komputer tomográfia) és az MR (mágneses rezonancia vizsgálat) prognózis becslésre való alkalmazására még kevés a meggyőző klinikai adat, ezért -evidenciák hiányában - rutinszerű alkalmazásuk az ajánlás nem javasolja (22). Az MR vizsgálat több cikk szerint alkalmazható a prognózis becslésben, azonban a legtöbb vizsgálatot 24 órával az újraélesztés után vagy később végezték. Ez jelentősen korlátozza alkalmazhatóságát, illetve beszűkíti az indikációs területet, mivel a korai prognózis becslésben kevésbé jól használható. Az elektrofiziológiai tesztek

közül a szomatoszenzoros kiváltott válasznak (SSEP) és az elektroenkefalográfiának (EEG) van a legnagyobb szerepe (23), de a mindennapi gyakorlatban nincs signifikáns jelentősége. Többféle módszer is rendelkezésre áll tehát a prognózis becslésre, a pontosabb becslés érdekében érdemes ezeket kombinációban alkalmazni (24, 25). Precíz túlélési modellek fejlesztéséhez azonban alapvető szükség van további prognosztikai markerekre is (26).

2.8. Szívelégtelenség

Az elmúlt évek során többféleképpen határozták meg a szívelégtelenség definícióját. Ezek a definíciók e komplex kórforma egy vagy több jellegzetességét emelték ki, mint pl. a hemodinamikai paraméterek, az oxigén-felhasználás vagy a terhelhetőség megváltozását. A legtöbb közelmúltban kidolgozott meghatározás a szívelégtelenségre jellemző panaszok és a folyadékretenció fizikális vizsgálati leleteinek együttes fennállása esetén mondja ki a diagnózist (27-29). A szívelégtelenség az a klinikai szindróma, amikor a betegnek szívelégtelenségre jellemző klinikai panaszai (nyugalomban vagy terhelés következtében kialakuló nehézlégzés, és/vagy fáradtságérzés), valamint folyadékretencióra utaló fizikális vizsgálati jelei (pulmonalis pangás vagy alszárduzzanat) vannak és a szív szerkezeti vagy funkcionális károsodása nyugalomban objektíven kimutatható (30). Napjainkban a szívelégtelenség globális közegészségügyi problémát jelent a betegség gyakori előfordulása és a magas halálozási ráta miatt. Az Amerikai Egyesült Államokban a lakosság fokozatos elöregedésével párhuzamosan a szívelégtelenség prevalenciája is folyamatosan emelkedik (31). Hasonló trendek figyelhetők meg világszerte, így hazánkban is. Az Országos Egészségbiztosítási Pénztár adatai szerint Magyarországon a szívelégtelenség prevalenciája az elmúlt évek adatai alapján a teljes populációban 1.6%, míg ez a szám a 80 év felettiekben 15-20% (32). Tőlünk nyugatra a szívelégtelenség általános prevalenciája hasonló, 1-2%, míg az incidencia megközelítően 5-10/ 1000 fő/év. A 85 év feletti korosztályban a prevalencia az itthonihoz hasonló, 10% vagy magasabb (33). A szívelégtelenségre nemrég még úgy tekintettünk, mintha a betegség patofiziológiájában kizárólag a miokardium betegsége és a megváltozott hemodinamika játszana szerepet. Mára azonban nyilvánvalóvá vált, hogy e betegségben megváltozik a

neuroendokrin szabályozás és a gyulladásos citokin expresszió egyensúlya, és ezen folyamatok központi szerepet játszanak a szívelégtelenség kórélettanában (34).

2.9. A HSP70 szerepe szívelégtelenségben

Amint fentebb részletesen bemutattuk, a HSP70 fontos szerepet játszik a különböző stresszválaszokban, a sejt szintű homeosztázis fenntartásában, és ismert az is, hogy a szöveti hipoxia nem specifikus indikátora (4). Az utóbbi években számos meggyőző cikket írtak az extracelluláris HSP70 szerepéről és hasznosságáról különböző klinikai szituációkban, így szívelégtelenségben is. Genth-Zotz és mtsai mutatták ki először, hogy a szérumban HSP70 a szívelégtelen betegekben magasabb, mint az egészséges kontroll személyekben. Megfigyelték, hogy a HSP70 koncentrációja szorosan összefüggött a betegség súlyosságával, azonban nem találtak összefüggést a betegség kimenetelével (35).

Munkacsoportunk nemrég megerősítette ezen eredmények egy részét, melyek szerint a szérumban HSP70 összefüggést mutatott a betegség súlyosságával (korrelált az NT-proBNP-vel [N-terminális-proBNP] és az ejekciós frakcióval is) (8). Idiopátiás balkamra elégtelen betegek esetén (36) és különböző típusú kardiomiopátiákban (37) megfigyelték, hogy a szérumban HSP70 szint emelkedett a kontrollokhoz képest. Szintén gyors HSP70 kiáramlást észleltek akut szívinfarktus károsodás esetén. Ezek alapján a szerzők a HSP70-ről, mint a szívinfarktus károsodás lehetséges új biomarkeréről beszélnek (38, 39). Megfigyelték azt is, hogy az emelkedett HSP70 szint magasabb koronária esemény rátával jár együtt, valamint magasabb HSP70 esetén a betegség súlyosabb lefolyást mutat (40). Mindezekon kívül ismert, hogy a vizsgált fehérje a vaszkuláris kalcifikáció mértékével is összefüggést mutat, a HSP70 szintje korrelált az ateroszklerózis súlyosságával (41).

2.10. Az RDW és a szívelégtelenség kapcsolata

Az elmúlt tíz évben a krónikus szívelégtelenség és az anémia kapcsolata a kutatások forrongó területévé vált. Kimutatták, hogy a szívelégtelen betegek körében az alacsony hemoglobin szint nagyon gyakori, és hogy az alacsony hemoglobin érték rossz

kimenetellel jár együtt (42, 43). Szívelégtelenségben az anémia patofiziológiai háttere multifaktoriális, azonban a leggyakoribb ok a vashiány (44).

A vörösvértest átmérő eloszlás szélessége (RDW) a vörösvértestek (RBC) méretbeli heterogenitásának mérőszáma, a laboratóriumi vérképpautomaták által számított érték, melynek használata az anémiák differenciál diagnosztikájában terjedt el (45, 46). Az RDW legtöbbször százalékban kifejezett származtatott mérőszám, úgy számolható, hogy a vörösvértestek térfogatának (MCV) standard deviációját elosztjuk a vörösvértestek átlagos térfogatával, és százszal szorozzuk. (47). A magasabb RDW érték a vörösvértestek méretének nagyfokú heterogenitására utal, melyet anizocitózisnak nevezünk. Az RDW referencia tartománya általánosan a kontroll minta 95-ös percentilis tartományaként van meghatározva (felső határa 14%) (47).

2.11. Az RDW mint biomarker kardiovaszkuláris kórképekben

Az RDW-ről mára egyre többen úgy gondolkodnak, mint új globális halálozási prognosztikai markerről a kardiovaszkuláris kórképekben. Szoros összefüggést találtak az RDW érték és a mortalitás között koronária betegekben, akut és krónikus szívelégtelenségben, több más kardiovaszkuláris kórképben és meglepő módon még az általános populáció szintjén is (48). Ezen kívül az RDW időbeli változása is figyelemre méltó, ugyanis felismerték, hogy az RDW emelkedése (pl. egyéves követés során) független prognosztikai tényező krónikus szívelégtelen betegek halálozására vonatkozóan (49, 50). A magas RDW érték együtt jár az ismert kardiovaszkuláris biomarkerek (NT-proBNP és bal kamrai ejekciós frakció) emelkedésével (51), valamint, ahogy azt munkacsoportunk korábban bemutatta, a krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegek egyéves mortalitásának emelkedésével (52).

2.12. Prognosztikai markerek

Napjaink klinikai kutatásainak egyik fő iránya a megbetegedések hátterében álló rizikófaktorok azonosítása. Ennek megfelelően dolgozatomban kutatásunk azon eredményeit foglalom össze, melyek a rövid és hosszú távú prognózis becslésre alkalmas biomarkerek azonosításával foglalkoztak. Közlemények száza számolnak be

„szignifikáns” és „független” prognosztikai faktorokról különböző humán megbetegedésekben, ám a közlemények egy részében nem, vagy nem megfelelően vizsgálták, hogy az új prognosztikai faktor javította-e, és ha igen, milyen mértékben az addig ismert prognosztikai modellt. A legújabb statisztikai módszertani ajánlások szerint az ún. reklassifikációs analízis az az eljárás, amellyel a fenti kérdést érdemben vizsgálni lehet. A reklassifikációs analízis kivitelezésére több módszer is van, dolgozatom második részében ezek alkalmazását saját vizsgálataink példáján mutatom be.

2.13. Prognosztikai modellek és azok statisztikai értékelése

A rizikófaktor fogalma ötven évvel ezelőtt, a Framingham Study eredményeinek publikálásakor kapott először nagyobb figyelmet (53). Ezt követően dolgozták ki a kardiovaszkuláris betegségek kifejlődésének előjelzésére az első többváltozós prognosztikai modellt (54). A prognosztikai modell olyan eszköz, melynek a klinikai döntéshozatalban van szerepe. A prognosztikai modell alapján egyszerűen használható táblázatokat vagy kalkulátorokat lehet létrehozni, melyek segítségével egyes események (pl. betegség kialakulása, halálozás) kellő pontossággal előre jelezhetők. Mára a klinikai gyakorlatban a több prognosztikai faktor kombinálásával kialakított ún. ”multimarker” prognosztikai modellek terjedtek el, melyekkel pontosabb becslés érhető el, mint bármelyik marker önálló alkalmazásával. Ilyen például az intenzív betegellátásban használt APACHE II (acute physiology and chronic health evaluation II) pontozásos skála (55), mely a túlélésről ad információt a klinikai adatok alapján, vagy a CHA2DS2-VASc pontozásos skála (56), mely pitvarfibrilláló betegek stroke rizikójára ad valószínűségi becslést, ill. az Euroscore II, melyet szívműtétek preoperatív rizikófelmérésére készítettek (57).

Szívelégtelenségben a várható eseményekkel kapcsolatban több prognosztikai modell is ismert. Transzplantációra jelölt szívelégtelen betegek szelektálására készítették a Heart Failure Survival pontozásos skálát, mely az etiológiát, a hemodinamikai állapotot, a neurohormonális aktivációt, a miokardiális fibrózist és a funkcionális kapacitást veszi figyelembe (58). A Seattle Heart Failure Model olyan több változós prognosztikai modell, melyet több mint ezer beteg adatai alapján alkottak meg,

és a validálást több mint tízezer fős betegcsoporton végezték (59). A modell az alap klinikai adatokon kívül (nem, életkor, testsúly, ejekciós frakció, NYHA [New York Heart Association] stádium, szisztolés vérnyomás, iszkémiás etiológia) figyelembe veszi a gyógyszeres terápiát, a QRS szélességet, a ritmusszabályzó készülékeket, a hemoglobint és limfocita számot, a húgysavat, a teljes koleszterint és a szérumban nátrium értéket. Segítségével az is megbecsülhető, hogy különböző terápiás módosítások hogyan befolyásolhatják a túlélést. Nemrégiben a modellt továbbfejlesztették, a BNP (B-típusú nátriuretikus peptid) értékkel kibővítve még pontosabbá vált (60). Ezzel szemben kifejezetten újraélesztett betegek számára készített többváltozós prognosztikai modell még nem létezik.

A prognosztikai modellekkel kapcsolatos kutatások azóta is folyamatosan foglalkoznak az újabb rizikófaktorok meghatározásával és e faktorok megfelelő rizikóbecslő modellekbe történő beépítésével. Míg gyakran az elsők között azonosított („erős”) rizikótényezők klinikai hasznossága a döntéshozatalban megkérdőjelezhetetlen (pl. magas szérumban koleszterin szint és kardiovaszkuláris halálozás) (61), addig az új és még újabb rizikófaktorok vagy rizikó markerek (pl. CRP és kardiovaszkuláris halálozás) (62, 63) klinikai értéke nem azonnal nyilvánvaló. Valójában a rengeteg potenciálisan jó, az adott betegségben zajló patogenetikai eseményekre rámutató marker közül nagyon kevés az, melynek valódi klinikai haszna igazolható (64). Minél több tényezőt vizsgálunk, annál több szignifikáns prognosztikai markert találhatunk, és ez különösen a „nagy áteresztő képességű” genomikai és proteomikai kutatások esetén igaz (65).

A gyógyítás szempontjából nagy jelentősége van az események bekövetkeztének megjelölésének. Ebben az értelemben az esemény lehet diagnózis vagy túlélési adat (kimenetel). Rizikófaktor az a tényező, mely okilag, követhető patofiziológiai láncolatot keresztül hozzájárul egy betegség kifejlődéséhez (pl. dohányzás és tüdőrák, koraszülöttség és krónikus tüdőbetegség). A már kialakult betegség további kimeneteléről adnak információt a prognosztikai és a prediktív markerek. Definíció szerint prognosztikai marker az, amely a beteg túlélésével, a betegség kimenetelével mutat kapcsolatot, függetlenül az alkalmazott terápiától (pl. általános állapot, metasztázisok, tumorstádium, stb.). A prediktív marker ezzel szemben a tervezett terápia hatékonyságáról ad információt (pl. ösztrogén- és progeszteron receptor

expresszió mértéke emlőrákban) (66). Ezen definíciók azonban még a mai nemzetközi irodalomban is gyakran helytelenül, felcserélve kerülnek alkalmazásra.

Az utóbbi években többféle statisztikai eljárást dolgoztak ki és alkalmaztak a rizikófaktorok azonosítására és hatásuk tesztelésére, ezek közül napjainkban az orvosi vizsgálatokban a többváltozós Cox regressziós eljárás az egyik legelterjedtebb módszer (67). A Cox regressziós elemzés a túlélési vizsgálatok csoportjába tartozik, és azt teszteli, hogy a vizsgált tényező összefüggést mutat-e a túléléssel. Többváltozós (adjusztált) modellről abban az esetben beszélünk, amikor ismert túlélést befolyásoló tényezőkkel együtt (pl. életkor, nem) elemezzük a vizsgált faktor hatását a túlélésre. Mára azonban körvonalazódott, hogy ez a módszer valójában korlátozott értékű az új markerek valódi klinikai hasznosságának megítélésében (68). Az elterjedten alkalmazott C-statisztika módszeréről, mely a ROC (receiver operating characteristic) görbe alatti terület növekedését (azaz a modell diszkriminatív képességét) teszteli, kiderült, hogy a klinikailag fontos rizikófaktorok hatását tévesen alulbecsli (69, 70). Mivel a Cox regresszió és a C-statisztika nem kellően alkalmas módszerek, az új potenciális biomarkerek klinikai hasznosságának tesztelésére az elmúlt években új, reklassifikáción alapuló statisztikai módszereket vezettek be, melyek fokozatos elterjedésének lehetünk szemtanúi (71, 72).

Egy prognosztikai modellel szemben támasztott alapkövetelmény az, hogy megbízhatóan elkülönítse, diszkriminálja azokat a betegeket, akikben az esemény bekövetkezik, azoktól, akikben nem. Ha egy új prognosztikai modell a korábbihoz képest precízebben diszkriminál, pontosabb predikciót ad, akkor kisebb a hiba, vagyis az eltérés az előjelzett- vagy kalkulált rizikó (predicted risk) és a valóság (observed risk) között. Az eltérés jellemzésére használhatjuk a fals pozitív rátát (elsőfajú hiba, azaz $1 -$ mínusz specificitás) és a fals negatív rátát (másodfajú hiba, azaz $1 -$ mínusz szenzitivitás). Azt a folyamatot, amikor a modell besorolja a beteget egy előre meghatározott rizikó kategóriába a kalkulált rizikó (predicted risk) alapján, klasszifikációnak nevezzük. Ha a besorolást az új prognosztikai modell segítségével újra elvégezzük, reklassifikációt végzünk. A reklassifikáción alapuló módszerek azt mutatják meg, hogy az új modell a régihez képest a betegek mekkora hányadát sorolja be jobban, helyesebben a meghatározott kategóriákba, vagyis mennyivel több a jól klasszifikált beteg. Az új reklassifikációs módszerek, nevezetesen az NRI (net

reclassification improvement) és az IDI (integrated discrimination improvement) segítségével a korábbi módszerekhez képest jobban megítélhető, hogy az új tényező (rizikófaktor vagy prognosztikai marker) modellbe építése hogyan befolyásolja a prognosztikai modell diszkriminatív erejét, vagyis mennyire hasznos az új tényező, és az új modell mennyivel jobb, mint a korábbi. Az NRI értéke egyenlő két hányados összegével, ahol a hányadosok azt fejezik ki, hogy mennyi a jobban klasszifikált beteg aránya az új módszerrel. A két hányados számolása során az elsőben megadják, hogy a kimenetel szempontjából abban a csoportban, ahol az esemény (events) bekövetkezik, az új teszt a régihez képest hány beteget sorol a magasabb rizikó kategóriába (reclassified higher). A második hányadosban ezzel szemben azt számolják ki, hogy a kimenetel szempontjából abban a csoportban, ahol az esemény nem következik be (nonevents), az új teszt a régihez képest hány beteget sorol az alacsonyabb rizikó kategóriába (reclassified lower). Magyar nyelven ennek az egyenlete nehezen írható le röviden, ezért az angol közismert formulát adjuk meg.

NRI = sum of:

$$\frac{\text{events reclassified higher} - \text{events reclassified lower}}{\text{events}}$$

and

$$\frac{\text{nonevents reclassified lower} - \text{nonevents reclassified higher}}{\text{nonevents}}$$

Ebből következik, hogy bináris változó esetén az NRI a régi és az új teszt szenzitivitás, és specificitás összegének különbsége lesz:

$$\text{NRI} = (\text{szenzitivitás} + \text{specificitás})_{\text{új teszt}} - (\text{szenzitivitás} + \text{specificitás})_{\text{régi teszt}} .$$

Az NRI számolásának magyarázatához egy hipotetikus elemzés példája látható a 2. ábrán, ahol az 1. teszt a régi módszerrel történő klasszifikációt mutatja, a 2. teszt pedig az új módszerrel történő reklassifikációt. A kóros és normál jelzők a teszt alapján prediktált kimenetelt jelentik, a megfigyelt valódi kimenetel pedig a túlélő/nem túlélő kategóriákban található. Tehát az első cellában lévő 18/2 érték azt jelenti, hogy 20 esetben mind az első, mind a második teszt rossz kimenetelt jósolt, a valódi kimenetel azonban 2 esetben jó volt (túlélő) és 18 esetben rossz (nem túlélő). A második cellában lévő 4/4 azt jelenti, hogy 8 esetben az első teszt jó kimenetelt jósolt, a második azonban ugyanebben a 8 esetben rosszat, a valódi kimenetel azonban 4 esetben jó volt és 4 esetben rossz. A 2. teszt besorolása, azaz a reklassifikáció során 4 esetben pontosabb lett a becslés, mint az 1. teszt esetében volt. Az NRI számolás szempontjából tehát az az érdekes, amikor a két teszt különböző eredményt ad, a számoláshoz így azon cellák értékeivel kell dolgoznunk, melyek esetén az első teszt normál a második pedig kóros és viszont (ezekben a cellákban lévő számokat kiemelttem). Definíció szerint az $NRI = (4 - 2)/30 + (\underline{8} - \underline{4})/70 = 0.1238$.

Nem túlélő / Túlélő		1. teszt		összesen
		kóros	normál	
2. teszt	kóros	18 / 2	4 / <u>4</u>	22 / 6
	normál	2 / <u>8</u>	6 / 56	8 / 64
összesen		20 / 10	10 / 60	30 / 70

2. ábra

Az NRI számolás alapját bemutató komplex kontingencia tábla egy hipotetikus eset alapján készült.

Az ábra a http://en.citizendium.org/wiki/File:Reclassification_table_example.gif weboldalon található példa alapján, módosítva.

Az NRI vagy "Categorical NRI" elemzés lényege tehát egy a 2. ábrán szemléletesen bemutatott komplex kontingencia tábla, vagy más néven reklassifikációs tábla, melyben a korábbi modell alapján (előzetesen meghatározott vágópont / cutoff szerint) rizikó kategóriákba besorolt betegeket az új modell segítségével újra osztályozzuk, és a két modell közti eltéréseket teszteljük. Az NRI módszere a reklassifikációs tábla alapján számszerűsíti, hogy a betegek mekkora hányada lesz az új módszerrel jobban besorolva (67).

Az NRI -1 és +1 között vehet fel értékeket. Amennyiben az új modell jobban diszkriminál, az NRI pozitív értéket vesz fel, fordított esetben negatívát. Ha nincs különbség, $NRI = 0$. A reklassifikációs táblán alapuló számolásoknak azonban megvan az a hátránya, hogy az eredmény jelentősen függ az előzetesen kiválasztott kategóriáktól (a vágópont értékektől) (73). Ezért a fenti gondolatmenetet és elemzést továbbfejlesztették, és létrehozták az NRI két általánosított, vágópontok alkalmazásától független formáját, az IDI-t és a folytonos (Continuous) NRI-t. Az IDI elemzés során előzetesen meghatározott vágópont nélkül számolunk, vagyis az eljárás nem igényel önkényes kategória besorolást. Az IDI értéke becsülhető Yates szerint a referencia és az új modellben kalkulált "Discrimination slope"-ok különbsége alapján (74). Az ehhez szükséges "Discrimination slope" számolása egyszerű matematikai művelet. Az előjelzett rizikó átlagértékét kell meghatározni abban a két csoportban, ahol az esemény bekövetkezett, illetve ahol nem, és ezen átlagok különbsége adja az adott modellel jellemző "Discrimination slope"-ot. Az IDI szintén -1 és +1 között vehet fel értékeket. Amennyiben az új modell jobban diszkriminál, az IDI pozitív értéket vesz fel, fordított esetben negatívát. Ha nincs különbség, $IDI = 0$. Ehhez módszerhez nagyon hasonló a vágópont nélküli NRI is, melyet az irodalomban "Continuous NRI" néven találunk, és ez utóbbi alkalmazása javasolt szemben a "Categorical NRI" -vel, mert kiküszöböli a vágópont okozta torzítást (75).

Nem tanácsos azonban kizárólag a reklassifikációs tesztekre hagyatkozni, mivel ezek nem megfelelő alkalmazása gyakran vezet túlzottan optimista eredményekhez. Ennek elkerülése szempontjából nagyon fontos, hogy a kalibrációt minden modell elemzése során ellenőrizzük.

Míg a modell általános jellemzésére a Nagelkerke féle R^2 és a Brier pontszám használata általánosan elfogadott, addig a kalibrációra a Hosmer-Lemeshow teszt, a

diszkriminációra pedig a C-statisztika alkalmas (72). A kalibráció mutatja meg, hogy a predikció és a valódi kimenetel hogyan függnek össze (76). Ha a Hosmer-Lemeshow teszt szignifikáns, az azt jelzi, hogy a modell nem alkalmas prognózis becslésre. Grafikusan ábrázolva a kalibrációt, tökéletes predikció esetén a pontok az origón átmenő 45 fokos egyenesre esnek (72). Definíció szerint a Brier pontszám 0 az ideális modellben és 0,25 a teljesen "non-informatív" modellben. Ezzel szemben a Nagelkerke féle R^2 0 és 1 között vesz fel értékeket, ahol az 1 jelenti a legjobb modellt.

Az új rizikófaktorok kritikus értékeléséhez Hlatky és munkatársai készítettek nemrég ajánlást (71). A dolgozatban a reklasszifikáción alapuló további statisztikai elemzésnek célja az volt, hogy ezen módszereket saját vizsgálataink példáján bemutassuk és rávilágítsunk a lehetséges buktatókra. Az elemzések során munkacsoportunk korábban, a szívelégtelenséggel kapcsolatban publikált eredményeit értékeltük újra a fenti statisztikai módszerek segítségével.

3. Célkitűzések

3.1. Korai prognosztikai markerek keresése újraélesztett betegek esetén

A HSP70 prognosztikai szerepe

A bevezetőben részletesen bemutatott irodalmi adatok alapján hipotézisünk az volt, hogy a HSP70 nem csupán a központi idegrendszeri károsodás markere, hanem fontos szerepet játszik az endotélsejt aktivációban, ill. pusztulásban, valamint az újraélesztett betegek gyulladásos válaszreakciójában. Továbbá feltételeztük, hogy a HSP70 mint a szervezetet ért globális stressz markere, független prognosztikai mutató lehet újraélesztett betegekben. Ennek megfelelően a vizsgálat célja az volt, hogy jellemezzük az extracelluláris HSP70 patofiziológiai jelentőségét terápiás hipotermiában részesült újraélesztett betegekben és tisztázzuk a HSP70 túléléssel, endotél sejt aktivációval, akut fázis reakcióval, valamint a gyulladásos folyamatokkal való kapcsolatát.

A komplement aktiváció prognosztikai szerepe

Munkacsoportunk korábban bemutatta, hogy a komplement aktiváció mértéke negatív korrelációt mutat a kimenetellel iszkémiás stroke-on átesett betegekben (77), és krónikus szívelégtelen betegekben (78). A fikolin-3 fontos szerepet játszik a komplement aktiváció fikolin-lektin útvonalának iniciálásában (79). Kutatócsoportunk korábban bemutatta, hogy az alacsony fikolin-3 szint súlyosabb tünetekkel és rosszabb kimenetellel jár együtt stroke-on átesett betegek (80) és krónikus szívelégtelen betegek esetén (81).

Ezek alapján feltételeztük, hogy a komplement aktiváció, mint a sejtkárosodás globális, nem specifikus markere, független prognosztikai faktor lehet újraélesztett betegek esetében. Ennek megfelelően a vizsgálat célja az volt, hogy megfigyeljük újraélesztett betegekben szívmegállás után a komplement fehérjék és aktivációs termékek szintjeinek változását, valamint ezek kapcsolatát a túléléssel.

3.2. A hosszú távú túlélés becslése szívelégtelen betegekben

Az RDW prognosztikai szerepe

Az RDW tükrözi a szervezetben zajló gyulladást, az ineffektív eritropoézist, az alultápláltságot és a károsodott vesefunkciót. Ezek, valamint az egyéves követés adatai alapján arra következtettünk, hogy az RDW a szívelégtelen betegek hosszú távú követésében is megfelelő prognosztikai marker lenne. Kevés olyan tanulmány jelent meg idáig, amelyben a szívelégtelen betegek hosszú távú követésében az RDW szerepét vizsgálták volna (82-84). Célunk az volt, hogy az RDW prognosztikai szerepét vizsgáljuk szívelégtelen betegek hosszú távú követése során.

A HSP70 prognosztikai szerepe

Mivel a HSP70 szérumszintje a szervezetet érő különböző stresszhatásokra jelentősen emelkedik, valamint a szívelégtelenség súlyosságával összefügg, azt feltételeztük, hogy ez a biomarker a mortalitás független prediktora lehet szívelégtelen betegek esetén.

3.3. Prognosztikai markerek valódi klinikai hasznosságának felmérése

Megismerve az új, ún. reklasszifikáción alapuló statisztikai elemzéseket, célul tűztük ki, hogy ezek felhasználásával a vizsgálatok során ígéretesnek (szignifikánsnak) talált biomarkereket tovább teszteljük, és klinikai értéküket egymással is összehasonlítsuk. Ehhez újra elővettük korábbi (adott esetben már publikált) vizsgálataink eredményeit, statisztikai modelljeit, és a reklasszifikáció módszereivel elemeztük a biomarkerek klinikai hasznosságát.

4. Módszerek

4.1. A betegek vizsgálatba való bevonása és utánkövetése

4.1.1. Újraélesztett betegek vizsgálata

Prospektív, megfigyeléses vizsgálatot végeztünk negyvenhat, kórházon kívül, ill. kórházon belül szív-megállást szenvedett, sikeresen újraélesztett betegen, akik a reanimációt követően eszméletlen állapotban voltak. A vizsgálat minden tekintetben megfelelt a Helsinki Deklarációnak és a vizsgálati protokollt a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKEB) engedélyezte (47/2009). Minden esetben írásos beleegyező nyilatkozatot adtak a közeli hozzátartozók. A betegek bevonása és ellátása a Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikáján történt 2009 és 2011 között.

Minden 18 évnél idősebb beteg bevonásra került, amennyiben a spontán keringés helyreállítását követően eszméletlen maradt (Glasgow Coma Scale pontszám ≤ 6). Minden beteg koronarográfiás vizsgálaton esett át az intenzív osztályra történő felvétel előtt, s ha indokolt volt, megtörtént a perkután koronária intervenció (PCI) a culprit lézió (keringésleállást okozó koronária elzáródás vagy jelentős szűkület). A terhes nőbetegeket, a trombolízis terápiában részesült betegeket, valamint a kettős vazopresszor keringéstámogatást igénylő, súlyos, terápiarefrakter szívelégtelen betegeket kizártuk a vizsgálatból. Az intenzív osztályra történő felvételt követően, a standard intenzív ellátáson túl, minden beteg testhőmérsékletét 32-34 °C –ra csökkentettük. A hipotermia iniciációjához 30 mL/ttkg 4 °C-os Ringer-laktát oldatot alkalmaztunk, ezt követően a hűtést a testfelszínre helyezett külső hűtőtakaróval folytattuk (Blanketroll III, Cincinnati Subzero Medical Division, Cincinnati, Ohio, US). A hűtés hatásfokát a maghőmérséklet mérésével ellenőriztük, a nyelvcsőbe helyezett hőmérő alkalmazásával (401CSZ: esophageal thermoprobe, Cincinnati Subzero; Medical Division, Cincinnati, Ohio, US). A 32 – 34° C-os hűtést 24 órán keresztül tartottuk fenn, majd óvatos passzív, kontrollált felmelegítés következett 0.25 - 0.33 °C óránkénti rátával a normotermia (maghőmérséklet ≥ 37 °C) eléréséig.

Az intenzív osztályra történő felvételnél (0 óra), valamint 6 és 24 óra múlva vérmintákat vettünk le artériás katéteren keresztül. Minden beteg antitrombotikus és

antikoaguláns terápiában részesült, valamint a koronarográfia során kontraszt anyagot kapott (Omnipaque vagy Visipaque).

Demográfiai, prehospitális és felvételtől kezdve folyamatos klinikai adatgyűjtés történt. Az APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) (55), és SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) (85) súlyossági pontozásos skála értékeit retrospektíven számoltuk ki, az első 24 óra klinikai adatai alapján. Az agyi funkciók felmérésére az intenzív osztályról történő elbocsátás előtt a CPC skálát használtuk (Cerebral Performance Categories scale). A túlélési adatokat a felvételt követő 30. napon rögzítettük.

4.1.2. Az újraélesztett betegek kontroll csoportja

Kontroll betegcsoportnak 46 korban (+/-2 év) és nemben illesztett, stabil kardiovaszkuláris betegségben szenvedő (pitvarfibrilláló) beteget választottunk. A kontrollbetegek beválasztása és mintavételei szintén a Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikáján történtek. A kontrollcsoportban lévő betegek nem estek át keringésleálláson és nem részesültek hipotermiás kezelésben.

4.1.3. Szívelégtelen betegek vizsgálata

Az elemzést 195 krónikus szívelégtelen betegen végeztük, akik 2005. február és 2007. április között kerültek bevonásra a Semmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinikáján, konszekutív módon. A beválasztási kritériumok között szerepelt a manifeszt balkamrai szisztolés szívelégtelenség tüneteinek megléte és a 45%-nál kisebb balkamrai ejekciós frakció. Kizárási kritériumok a malignus alapbetegség és az infekció voltak. Munkacsoportunk korábban a vizsgálat protokollját és az 1 éves túlélési eredményeket részletesen bemutatta (Dr. Gombos Tímea disszertációja 2010), ezért azt itt csak röviden foglalom össze. Jelen munka a már bemutatott betegcsoport 5 éves követéses vizsgálatának elemzésével foglalkozik.

A betegek utánkövetése a vizsgálatba való belépéstől számítva 60 hónapon át tartott (a követés medián értéke 60 hónap, interkvartilis tartománya 56-60 hónap). Az utánkövetés során kizárólag a halálozás tényét rögzítettük, a halál okától függetlenül. A vizsgálati protokoll szerint a bevonás során minden beteg fizikális és transztorakális echokardiográfiás vizsgálaton esett át. A vérvételek reggel, 12 óras éhezés után, az antekubitális véna punkciójával történtek.

4.2. Mintavételezés

A vérminták levétele minden esetben EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav) tartalmazó és natív csövekbe történt. Két órán belül centrifugálás történt, 15 percen keresztül 25°C-on

2000 g alkalmazása mellett. A mintákat aliquotokban, -80°C-on tároltuk felhasználásig.

4.3. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

A HSP70 szintjét a DuoSet IC ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays, enzimkött immunassay) rendszerrel határoztuk meg (Development System assay, R&D Systems, Minneapolis, MN, US, Cat. No. DYC1663E) szérumból. A TNF α ¹, sICAM-1¹ (soluble intercellular adhesion molecule 1), S100B² és big endothelin-1³ meghatározására kereskedelemben kapható ELISA rendszereket használtunk szérumból (R&D Systems Minneapolis, MN, US ⁽¹⁾, Biovendor Modřice, Czech Republic ⁽²⁾ és Biomedica Wien, Austria ⁽³⁾). A mérések a gyártók előírásának megfelelően történtek. A vWF (von Willebrand faktor) méréséhez munkacsoportunk által beállított ELISA módszert használtunk, nyúl anti-vWF antitest (jelöletlen és HRP (tormaperoxidáz) -jelölt, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) alkalmazásával, EDTA plazmából. A CRP, C3 és összfehérje méréshez szérumból és Roche Integra 800-as készüléket használtunk. A komplement aktivációs termékek (C3a, C4d, SC5b9 és Bb) méréséhez kereskedelemben kapható ELISA rendszereket használtunk a gyártó előírásainak megfelelően (Quidel, San Diego, CA, UA), a mérés EDTA plazmából történt. A C4 mérés radiális immunodiffúziós módszerrel szérumból történt, poliklonális nyúl anti-humán C4c (Dako, Denmark), és humán szérumból protein kalibrátor (Dako, Denmark) alkalmazásával, Kohler és Mtsai módszere szerint (86).

A rutin laboratóriumi meghatározások a Semmelweis Egyetem, Kótvölgyi Klinikai Tömb Központi Laboratóriumában, Roche Integra 8000 és Cell-Dyn 3500 automaták segítségével készültek a Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán pedig Roche Integra 400 valamint Sysmex XS - 1000i készülékeket használtunk. GFR becslés mindkét laborban az MDRD formula alkalmazásával történt.

4.4. Statisztikai módszerek

Statisztikai számításokhoz egyrészt az R nyílt forráskódú programot (R version 2.15.0, 2012-03-30) használtuk a PredictABEL (87) és pROC (88) statisztikai programcsomagok alkalmazásával, másrészt az SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, US, 13 verzió) ill. Prism for Windows 5 (GraphPad Software, San Diego, California, US, 4.02 verzió) és a STATISTICA (StatSoft Inc. Tulsa OK, US, 8.0 verzió) programokkal végeztük. A leíró statisztika során a mediánt és 25-75 percentiliseket mutattuk be a ferdült (nem normál) eloszlás miatt. A boxplot ábrázolás során ezeken kívül a tartományt ábrázoltuk. Az időbeli változásokat egy- és kétszemponos ismétléses ANOVA, valamint Dunn's post hoc teszt ill. Bonferroni post-hoc teszt alkalmazásával értékeltük. A kétszemponos ismétléses ANOVA esetén log10 normalizált adatokkal dolgoztunk, a normalitást QQ-plot ábrázolás során teszteltük. A varianciák homogenitását a reziduálisok megoszlása alapján értékeltük, az ANOVA előfeltételei minden esetben teljesültek. Különböző fehérjék szérumszintjének korrelációját Spearman féle rang korreláció módszerével elemeztük. Folyamatos változók összehasonlítását, független csoportok esetén, Mann-Whitney's U teszt, kategóriaváltozók esetén Pearson's χ^2 teszt segítségével végeztünk. A túlélést Kaplan-Meier módszerrel ábrázoltuk és a csoportok túlélése közti különbséget Log-rank teszt segítségével értékeltük. Egy és többváltozós Cox regressziós elemzést végeztünk, hogy a kiválasztott prognosztikai marker túlélésre gyakorolt hatását elemezzük. A proporcionális hazard előfeltételének ellenőrzése a Schoenfeld reziduálisok alapján történt. A Cox modellben a folyamatos változókat a z-score alapján standardizáltuk. A többváltozós Cox modellekben mindig a feltüntetett változókra adjusztáltunk. A Cox regressziós modell eredményét a standardizált prediktor emelkedésre (1-SD) vonatkoztatva, vagy a medián vágópont mentén létrehozott két csoport alapján adtuk meg a 95%-os konfidencia intervallum, a Wald χ^2 , és a likelihood ratio teszt p-értékével. A túlélési modell általános jellemzésére Nagelkerke féle R^2 -et és Brier pontszámot használtunk, míg a diszkriminációs képességet a ROC görbe alatti terület (C-statisztika) és a diszkriminációs meredekség (slope) alapján számoltuk, valamint ábrázoltuk a diszkriminációs képességet ROC görbén és boxploton is, a legújabb ajánlásnak megfelelően (72). A kalibrációt a Hosmer-Lemeshow teszt ("goodness-of-fit" teszt) (89) segítségével elemeztük és grafikusán is bemutattuk kalibrációs ploton. Az

alapmodellhez tartozó és a HSP70-nel kibővített modellhez tartozó ROC görbéket DeLong's tesztel hasonlítottuk össze (90). A diszkriminációra vonatkozóan az új reklasszifikáción alapuló statisztikai elemzéseket alkalmaztuk: a vágópont nélküli NRI-t (Continuous NRI) és IDI-t számoltuk ki (72, 75), megadtuk a 95%-os konfidencia intervallumot (CI, confidence interval), valamint a hozzá tartozó p-értéket. Optimális vágópont meghatározásához ROC analízist végeztünk. Minden statisztikai tesztet kétoldalasán végeztünk, a próbák eredményét $p < 0.05$ értékek esetén tekintettük szignifikánsnak. A szövegben megadott értékeknél a medián (interkvartilis tartomány) került feltüntetésre, az ettől eltérő eseteket külön jeleztem.

5. Eredmények

5.1. Az újraélesztett betegcsoport jellemzése

5.1.1. Klinikai jellemzők

Összesen 46 beteget vizsgáltunk szívleállást követően. Közülük 22-en az első 30 napon belül elhunytak, 24-en pedig életben voltak a 30. napon. Első lépésben a túlélő és nem-túlélő betegek demográfiai és klinikai adatait hasonlítottam össze, ennek eredménye látható az 1. táblázatban. Az életkor medián értéke és interkvartilis tartománya a túlélők körében alacsonyabb volt, 57 év (47 - 66), ill. 66 év (61 - 69) $p = 0.0141$. Mindkét csoportban (túlélők, nem-túlélők) a férfiak voltak többségben a nőkkel szemben (83% és 82%, $p = 1.00$) és a kórházon kívüli újraélesztés dominált a kórházon belüli újraélesztéssel szemben (71% és 86%, $p = 0.28$). A klinikai kép és koronarográfiás vizsgálatok 39 esetben (85%) mutattak akut koronária elzáródást, míg 7 esetben (15%) nem, ezekben az esetekben dilatatív kardiomiopátiához társuló malignus ritmuszavar állt a keringésleállás hátterében. A keringésleállás okainak megoszlása nem különbözött a túlélők ($N=20$ koronária elzáródás és $N=4$ dilatatív kardiomiopátia) és nem-túlélők ($N=19$ koronária elzáródás és $N=3$ dilatatív kardiomiopátia) között. A hűtés mindkét csoportban és minden beteg esetén effektív volt, hiszen a célhőmérsékletet (32-34 °C) sikerült elérni és 24 órán keresztül fenntartani. A medián hőmérséklet nem különbözött a túlélő és nem-túlélő betegek között egyik időpontban sem (0, 6 és 24 óra). Mind az APACHE II, mind a SAPS II pontozásos skála értéke szignifikánsan magasabb volt a nem-túlélő csoportban, a túlélőkhöz képest (1. táblázat). A komplikáció ráta szignifikánsan magasabb volt a nem-túlélőkben, mint a túlélő betegekben, így a vérzéses szövődemény 36.4% vs. 8.3% volt, a mezenterialis ill. végtagi iszkémia 27.3% vs. 0%-nak adódott. Az infekciórata hasonló volt a két csoportban 41% vs. 54% ($p = 0.3945$). Szepszis a túlélők körében 3 betegnél, míg a nem-túlélők körében 6 esetben fordult elő ($p = 0.2757$).

A két csoport karakterisztikája a többi vizsgált paraméter szempontjából meglehetősen hasonló volt. Nem volt statisztikailag lényeges különbség a testtömeg index, az újraélesztés időtartamai, a szisztolés balkamra funkció (EF), a 24 órás vizelet mennyisége és a katekolamin igény között a túlélő és a nem-túlélő csoportban (1. táblázat).

1. táblázat

A vizsgálatba bevont 46 újraélesztett beteg demográfiai adatai és klinikai jellemzői, valamint a túlélő és nem-túlélő alcsoportok összehasonlítása.

	Összes beteg	Túlélő	Nem-túlélő	p-érték***
A betegek száma	46*	24	22	
Életkor (év)	64 (56-69)**	57 (47-66)	66 (61-69)	0.0141
Férfi/Nő száma	38/8	20/4	18/4	1.0000
OHCA/IHCA	36/10	17/7	19/3	0.2894
BMI (kg/m ²)	27.8 (24.6-31.0)	27.8 (26.0-29.4)	25.9 (24.2-31.1)	0.7193
SAPS II pontszám	61 (55-69)	56 (51-70)	64 (60-68)	0.0293
APACHE II pontszám	29 (25-32)	27 (25-29)	32 (28-34)	0.0115
Az eltelt idő az összeeséstől az ALS/BLS-ig (perc)	1 (0-6)	1 (0-5)	1 (0-9)	0.6268
Az eltelt idő az összeeséstől a ROSC-ig (perc)	21 (15-30)	20 (15-30)	28 (18-30)	0.2548
CPR teljes időtartama (perc)	20 (12-28)	19 (12-22)	21 (13-30)	0.4926
Ejekciós frakció (%)	35 (28-45)	36 (31-47)	31 (25-40)	0.1632
24 órás vizelet (mL)	3410 (2450-4130)	3510 (3185-4610)	2950 (1900-4070)	0.0513
Maghőmérséklet kiinduláskor (°C)	36.4 (35.8-36.6)	36.5 (36.1-36.6)	36.3 (35.3-36.6)	0.4697
Maghőmérséklet 6 óra múlva (°C)	32.7 (32.0-33.0)	32.8 (32.5-33.0)	32.0 (32.0-33.9)	0.1093
Maghőmérséklet 24 óra múlva (°C)	32.5 (32.1-33.0)	32.7 (32.4-33.0)	32.3 (32.1-32.8)	0.1143
A katekolamin terápiát igénylő betegek száma	29	10	19	0.0972
A kombinált katekolamin terápiát igénylő betegek száma	16	5	11	0.1159
Szeptikus szövődmény száma	9	3	6	0.2757
Infekciós szövődmény száma	22	13	9	0.3945
Vérzéses szövődmény száma	10	2	8	0.0323
Iszkémiás szövődmény száma	6	0	6	0.0080

* esetek száma

** Medián és a 25-75 interkvartilis tartomány

*** (Mann-Whitney teszt (folyamatos változó esetén) vagy Pearson's χ^2 teszt (kategóriaváltozó) eredményeként kapott p érték a túlélő és nem-túlélő betegek összehasonlításakor

A táblázatban szereplő rövidítések a dolgozat 3. és 4. oldalán találhatók.

Kontroll betegcsoportnak 46 korban (+/-2 év) és nemben illesztett, pitvarfibrilláció miatt kezelt, stabil kardiovaszkuláris betegségben szenvedő beteget választottunk. A kontrollcsoportban lévő betegek nem estek át keringésleálláson és nem részesültek hipotermiás kezelésben. Az életkor medián értéke és interkvartilis tartománya 63 (54 - 68) év volt. A kontroll betegcsoport szisztolés balkamra funkciója megtartott volt (EF) 58.5 (44.3 - 65.0).

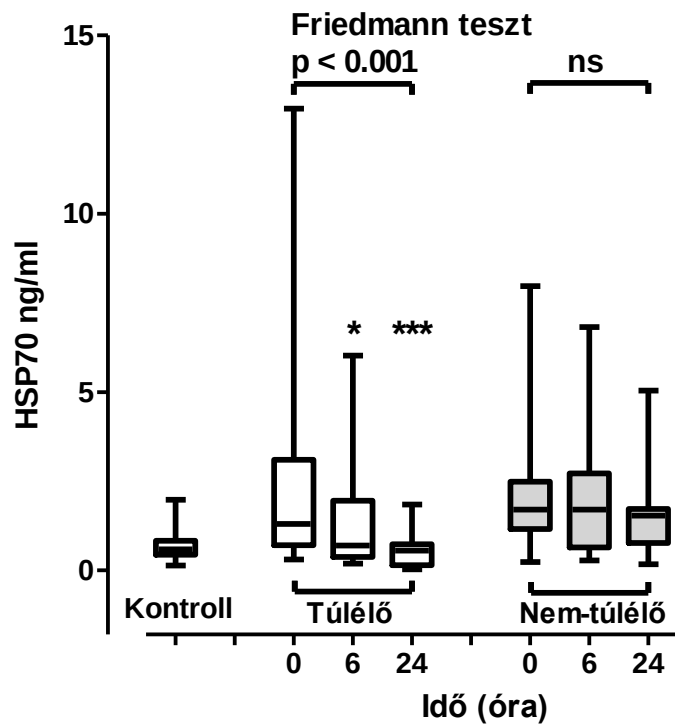
5.1.2. Normalizálás a hemodilúció hatásának kiküszöbölésére

Az összfehérje szint az újraélesztett betegekben az első 24 órában fokozatosan, szignifikáns mértékben csökkent ($p < 0.001$ egyszempontos ismétléses ANOVA) a nagy volumenű hűtőinfúzió adásának köszönhetően. Az összfehérje medián és interkvartilis tartománya a három mért időpontban: 60.3 (53.6 – 63.5) kiinduláskor, 55.3 (49.7 – 60.9) 6 óra múlva és 54.5 (48.3 – 58.2) g/L 24 óra múlva. Emiatt, az összfehérje szint változásának mértékével korrigáltuk az összes mért biomarker 6 és 24 órás időpontban mért értékét, hogy a volumen terápia hemodilúciós torzító hatását kiküszöböljük. A korrekciót tehát minden beteg esetében a saját összfehérjeszintben mért csökkenésnek megfelelő szorzófaktorral egyénileg korrigáltuk. Fontos megjegyezni, hogy a C3a/C3 hányados esetén ezen korrekció már definíciószerűen nem jelenik meg, hiszen a hányados mindkét tagjában ugyanaz a szorzófaktor szerepel, mely az osztás művelete során eltűnik. Az összfehérje szint egyik időpontban sem különbözött a túlélő és nem-túlélő csoportban.

5.1.3. A HSP70 és további biomarkerek újraélesztett betegekben

Felvételkor a HSP70 szérumszintje szignifikánsan magasabb volt mind a túlélőkben (1.31 [0.76 – 2.73] ng/mL), mind a nem-túlélőkben (1.70 [1.20- 2.37] ng/mL) szemben a kontrollbetegekkel (0.59 [0.44 - 0.83] ng/mL, $p < 0.001$, 3. ábra). Azonban a felvételnél észlelt HSP70 szintek nem különböztek a két csoportban (túlélő és nem-túlélő) $p > 0.05$. A HSP70 időbeli változását Friedman's ANOVA teszt és Dunn's post hoc teszt segítségével értékeltük. Azt figyeltük meg, hogy a HSP70 a túlélő csoportban a kiindulási értékről fokozatosan szignifikáns mértékben lecsökkent (0.70 ([0.38 - 1.78] ng/mL 6 órakor, 0.56 [0.16 - 0.71] ng/mL 24 órakor). A 24. órára a túlélő betegek HSP70 szintje már a kontrollbetegeknek megfelelő szintre csökkent. Ezzel

szemben a nem-túlélő betegek esetén magas maradt (1.70 [0.65 - 2.70] ng/mL 6 órákor, 1.54 [0.79 - 1.72] ng/mL 24 órákor, 3. ábra).



3. ábra

A HSP70 szérumszintje a 46 kontrollbetegben (Kontroll) és a HSP70 változása az újraélesztett betegekben az intenzív osztályra kerülést követő első 24 órában.

A fehér boxok a 24 túlélő betegre, míg a szürke boxok a 22 nem-túlélő betegre vonatkoznak. Az ábrán a medián (vonal), a 25-75-ös percentilisek (box), a minimum és maximum értékek (kapocs) vannak feltüntetve. A p-érték a Friedman's ANOVA-ra és a Dunn's post hoc tesztre vonatkozik (* = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, vs. 0 óra).

5.1.4. Gyulladásos folyamatok és endotélsejt aktiváció újraélesztett betegekben

A továbbiakban az alábbi biomarkerek mérését végeztük el: gyulladásos markerek (CRP, TNF α), endotél aktiváció markerei (big endothelin-1, sICAM-1, von Willebrand faktor) és a neuronális károsodást jelző S100B. A túlélők és nem-túlélők közti különbségeket legmarkánsabban 24 óránál láttuk (2. táblázat). A big endothelin-1 majdnem kétszer, a CRP és TNF α közel másfélszer volt magasabb a nem-túlélőkben, mint a túlélőkben. A von Willebrand faktor szintén kissé magasabb volt a nem-túlélők között. Ezzel szemben a sICAM-1 és S100B nem különböztek a két csoportban (2. táblázat).

2. táblázat

Biomarkerek szintje újraélesztett betegekben az intenzív osztályra kerülést követő 24. órában.

	Összes beteg (N=46)	Túlélő (N=24)	Nem-túlélő (N=22)	p-érték*
HSP70 (ng/mL)	0.74 (0.33-1.66)	0.56 (0.16-0.71)	1.54 (0.79-1.72)	<0.001
ET (fmol/mL)	1.58 (1.16-2.63)	1.23 (0.99-1.67)	2.35 (1.49-3.07)	0.0011
vWF (μ g/mL)	664.6 (477.7-859.3)	624.3 (433.4-804.6)	768.0 (557.7-1159.7)	0.0411
sICAM-1 (ng/mL)	311.8 (221.1-368.1)	292.5 (211.3-332.7)	368.1 (227.6-444.8)	0.1511
CRP (μ g/mL)	87.0 (49.7-129.4)	77.0 (36.9-87.0)	126.0 (95.9-141.9)	0.0018
TNF α (pg/mL)	4.73 (2.11-7.62)	3.80 (1.50-5.23)	5.93 (4.66-7.62)	0.0205
S100B (pg/mL)	3.7 (1.1-216.5)	2.7 (1.1-75.5)	8.5 (1.1-420.1)	0.1441

* Mann-Whitney teszt (túlélők vs. nem-túlélők).

A táblázatban szereplő rövidítések a dolgozat 3. és 4. oldalán találhatók.

5.1.5. A HSP70 kapcsolata a gyulladásos folyamatokkal, az endotélsejt aktivációval és a klinikai súlyossági markerekkel

Mivel a túlélők és nem-túlélők közti különbségeket legmarkánsabban 24 óránál láttuk (2. táblázat) ezért a korrelációs számításokat minden esetben a 24 órás értékek alapján végeztük. Gyenge, szignifikáns, pozitív korrelációt észleltünk a HSP70 és az itt felsorolt biomarkerek között a 46 újraélesztett beteg esetén: ET [big endothelin-1], vWF, sICAM-1, CRP, TNF-alfa (3. táblázat). A HSP70 és a súlyossági pontszámok között nem találtunk kapcsolatot: HSP70 és APACHE II pontszám ($r = 0.2734$, $p = 0.0660$), SAPS II pontszám ($r = 0.2061$, $p = 0.1694$).

3. táblázat

A HSP70 kapcsolata a gyulladásos folyamatokkal, az endotélsejt aktivációval és a klinikai súlyossági markerekkel újraélesztett betegekben.

	Spearman féle rang korreláció*	
	r	p-érték
ET	0.333	0.0237
vWF	0.3887	0.0076
sICAM-1	0.2942	0.0472
CRP	0.2923	0.0487
TNF-alfa	0.3722	0.0109
S100B	0.2881	0.0522

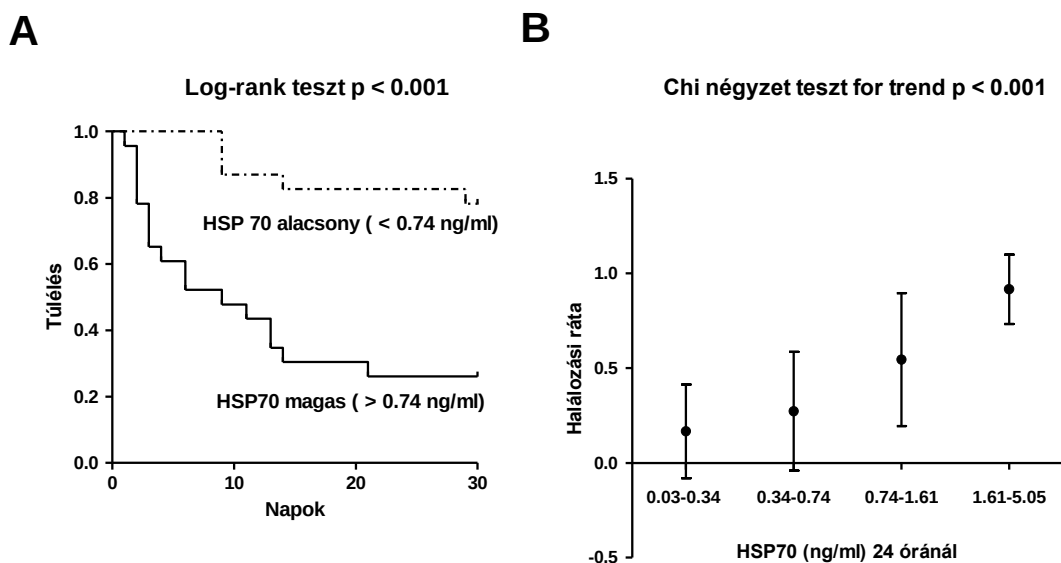
*Spearman féle rang korrelációs koefficiens (r) a hozzátartozó p-értékkel.

5.2. Újraélesztett betegek túlélésének elemzése

5.2.1. A HSP70 kapcsolata a túléléssel

A 30 napos követés során 52.2%-os túlélési arányt találtunk a vizsgált betegcsoportban (N=46). Elbocsátáskor (átlagosan 8.2 nappal a felvételt követően) a betegek 41.3%-ánál (N=19) figyeltünk meg jó neurológiai kimenetelt (Cerebral Performance Categoric pontszám I vagy II), és közülük 17 beteg a 30. követési napon is életben volt.

A HSP70 mediánjánál meghatározott vágópont (0.74 ng/mL, 4. ábra A panel) alkalmazásával a betegeket 2 alcsoportba soroltuk, és Kaplan-Meier túlélési analízist végeztünk. Azt találtuk, hogy a magasabb HSP70 szint magasabb 30 napos halálozási rátával jár együtt (Log-rank test, $p < 0.001$, 4. ábra A panel). Ezen kívül lineáris trendet észleltünk a HSP70 és a mortalitási ráta között. Amint ez a 4. ábra B panelén látható, a mortalitási ráta folyamatosan emelkedik a HSP70 kvartilis értékek alapján létrehozott alcsoportokban (χ^2 test for trend, $p < 0.001$).



4. ábra

A panel: Újraélesztett betegek esetén a magas HSP70 szérumszint rosszabb kimenetellel jár együtt.

B panel: Újraélesztett betegek esetén a mortalitási ráta közel lineáris emelkedése a HSP70 kvartilisek alapján.

Vizsgálatunkban a HSP70 mellett az életkor, a súlyossági pontszám (1. táblázat) és több biomarker (ET, vWF, CRP, TNF α , 2. táblázat) mutatott kapcsolatot a 30 napos halálozással. Ezért többváltozós Cox regressziós elemzés segítségével vizsgáltuk a HSP70 prognosztikai értékét és függetlenségét.

Az egyváltozós modellben (1. Modell, 4. táblázat) a HSP70 (pontosabban a HSP70 24 órás értéke, mint folyamatos 1-SD-re standardizált változó) emelkedése szignifikánsan előre jelezte a 30 napos mortalitást (az 1-SD emelkedésre jutó hazard ratio 1.926, 95%-os konfidencia intervallum 1.405 - 2.638; 4. táblázat). A többváltozós Cox regressziós modellt az életkorra, nemre (2. Modell, 4. táblázat) és a súlyossági pontszámra adjusztáltuk (APACHE II, 3. Modell, 4. táblázat). A HSP70 az adjusztálás után is minden modellben szignifikáns, független prediktor maradt. Hasonló eredményeket kaptunk, mikor elvégeztük e modellek adjusztálását a többi mért biomarkerre is (ET, vWF, CRP, TNF-alfa, S100B és sICAM-1), ezek részletes bemutatásától jelen dolgozatban eltekintünk.

4. táblázat

Az újraélesztett betegek 30 napos halálozásának előre jelzése a 24 órás HSP70 szintek alapján.

Modell*	HR	95% CI	χ^2	p-érték
1. Modell	1.926**	1.405 – 2.638	12.796	<0.001
2. Modell	2.153**	1.520 – 3.050	15.067	<0.001
3. Modell	1.978**	1.419 – 2.759	12.413	<0.001
4. Modell	6.996 ***	2.254 – 21.717	14.238	<0.001

*1. Modell: A HSP70 egyváltozós Cox regressziós analízise; 2. Modell: A HSP70 életkorra, nemre adjusztált többváltozós Cox regressziós analízise, 3. Modell: A HSP70 APACHE II pontszámra adjusztált többváltozós Cox regressziós analízise. 4. Modell: A HSP70 életkorra, nemre, APACHE II pontszámra adjusztált többváltozós Cox regressziós analízise.

******HR = A Cox regressziós modell hazard ratio-ját a standardizált prediktor emelkedésre (1-SD) vonatkoztatva adtam meg a 95%-os konfidencia intervallum (CI), a Wald χ^2 , és a likelihood ratio teszt p-értékével (SD = 1.16).

******* A HSP70 mediánértéke, mint vágópont szerepel és a HR-et a magas vs. alacsony HSP70-re vonatkoztatva adtam meg.

5.2.2. A komplement aktiváció kapcsolata a túléléssel

Első lépésben a komplement komponensek és aktivációs markerek szintjeit hasonlítottuk össze a vizsgált időpontokban (felvételnélkor /0 óra/ ill. 6 és 24 óra múlva) és a két csoportban (túlélők vs. nem-túlélők) ismétléses ANOVA segítségével (5. táblázat). Megfigyeltük, hogy a Bb, az sC5b9, valamint a C3a/C3 hányados (C3 aktiváció markere) szignifikánsan csökkent a hipotermia során, a megfigyelés első 24 órájában (5. táblázat „Idő” oszlopa). Ezen kívül látható, hogy a C3a/C3 hányados jelentősen különbözött a két csoportban (túlélők vs. nem-túlélők), ami arra utal, hogy a C3a/C3 hányados kapcsolatban lehet a túléléssel (5. táblázat „Csoport” oszlopa). A C3a/C3 hányados minden megfigyelt időpontban magasabb volt a nem-túlélő csoportban, mint a túlélőkben. A legnagyobb különbséget a felvételhez képest a 24 órás értékek esetén észleltük. Ennek megfelelően a további számolások során, melyekben a C3a/C3 hányados túléléssel való összefüggését vizsgáltuk, a 24 órás értékekkel dolgoztunk. A többi mért komplement komponens és aktivációs termék esetén nem láttunk a C3a/C3-hoz hasonló összefüggést a kimenetellel (5. táblázat).

Következő lépésben közelebbről vizsgáltuk meg, hogy miként függ össze a C3 szintjén bekövetkező komplement aktiváció és a túlélés. A 46 vizsgálatba bevont, újraélesztett beteget 2 csoportba soroltuk a C3a/C3 24 órás értékek mediánja alapján. A két csoport túlélését Kaplan-Meier analízis segítségével hasonlítottuk össze (5. ábra). Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a magasabb 24 órás C3a/C3 hányados magasabb 30 napos mortalitással jár együtt (Log-rank teszt, $p = 0.0043$, 5. ábra).

A C3a/C3 hányadoson kívül, amint azt az előzőekben bemutattuk, az életkor, valamint a súlyossági pontszámok (APACHE II, SAPS II) szintén kapcsolatot mutattak a túléléssel. Ezért többváltozós Cox regressziós elemzést végeztünk, hogy tisztázzuk a

C3a/C3 hányados prognosztikai értékét és függetlenségét a többi, túléléssel kapcsolatos mutató változótól. Először egyváltozós modellben vizsgáltuk a C3a/C3 hányados prognosztikai értékét. Azt találtuk, hogy a C3a/C3 hányados (1-SD-re standardizálva) szignifikáns prognosztikai marker a 30 napos halálozás tekintetében (hazard ratio 1.747, 95%-os konfidencia intervallum 1.218 - 2.505; 6. táblázat).

A többváltozós Cox regressziós modellben az életkorra, nemre, APACHE II pontszámra való adjusztálás után azt találtuk, hogy a C3a/C3 hányados szignifikáns, független prognosztikai markere a 30 napos halálozásnak (hazard ratio 1.692, 95%-os konfidencia intervallum 1.105 - 2.590; 6. táblázat).

5. táblázat

Komplement szintek az újraélesztett betegekben és az ismétléses ANOVA elemzés eredményei. A betegeket a 30 napos halálozás szerint 2 csoportba soroltuk (túlélő vs. nem-túlélő).

					Az ismétléses ANOVA p-értéke		
	Idő (ó)	Összes beteg (N=46)	Túlélő (N=24)	Nem-túlélő (N=22)	Csoport	Idő	Interakció
C3a (ng/ml)	0	124.8 (97.1 - 239.3) ^a	120.9 (97.6 - 189.2)	148.4 (90.1 - 274.3)	0.104 ^b	0.001	0.993
	6	103.2 (80.3 - 156.4)	96.3 (80.7 - 112.6)	119.4 (73.1 - 162.2)			
	24	116.4 (79.4 - 176.3)	114.5 (80.4 - 122.9)	174.3 (76.3 - 196.3)			
C3 (mg/ml)	0	1.06 (0.88 - 1.21)	1.11 (1.00 - 1.22)	1.01 (0.80 - 1.20)	0.063	0.007	0.014
	6	1.08 (0.86 - 1.20)	1.11 (1.01 - 1.23)	0.94 (0.80 - 1.12)			
	24	1.15 (0.94 - 1.27)	1.16 (1.08 - 1.27)	1.02 (0.86 - 1.23)			
C3a/C3	0	125.5 (86.8 - 215.6)	115.6 (85.4 - 196.1)	143.9 (106.4 - 281.0)	0.014	0.002	0.785
	6	105.8 (74.0 - 157.8)	87.5 (72.6 - 124.2)	150.2 (91.2 - 173.7)			
	24	101.3 (77.4 - 172.5)	95.5 (73.2 - 116.7)	172.5 (82.3 - 207.2)			
C4d (µg/ml)	0	1.7 (1.3 - 2.4)	1.8 (1.4 - 2.7)	1.5 (1.3 - 2.4)	0.834	0.146	0.643
	6	2.0 (1.4 - 2.4)	2.1 (1.6 - 2.6)	1.9 (1.3 - 2.3)			
	24	1.8 (1.3 - 2.2)	1.8 (1.3 - 2.2)	2.0 (1.3 - 2.4)			
C4 (mg/ml)	0	0.40 (0.31 - 0.49)	0.38 (0.30 - 0.50)	0.42 (0.33 - 0.48)	0.843	0.421	0.013
	6	0.43 (0.28 - 0.48)	0.41 (0.28 - 0.46)	0.44 (0.27 - 0.49)			
	24	0.42 (0.31 - 0.48)	0.42 (0.34 - 0.50)	0.40 (0.28 - 0.43)			
C4d/C4	0	4.4 (3.2 - 6.4)	5.6 (3.5 - 6.6)	4.1 (3.2 - 5.9)	0.938	0.084	0.204
	6	4.9 (3.8 - 6.7)	5.2 (3.7 - 7.9)	4.7 (4.0 - 5.9)			
	24	4.4 (3.2 - 5.8)	4.1 (3.2 - 4.6)	4.8 (3.9 - 6.3)			
Bb (µg/ml)	0	4.0 (2.1 - 8.5)	3.5 (2.1 - 7.0)	4.8 (2.3 - 9.4)	0.174	< 0.001	0.676
	6	2.1 (1.4 - 3.8)	1.8 (1.4 - 2.8)	2.7 (1.2 - 4.0)			
	24	1.2 (0.8 - 2.0)	1.2 (0.8 - 1.7)	1.9 (1.0 - 2.3)			
sC5b9 (ng/ml)	0	342.9 (243.8 - 476.9)	363.6 (200.5 - 468.4)	312.3 (251.8 - 503.6)	0.582	< 0.001	0.722
	6	193.6 (142.8 - 269.5)	185.3 (151.1 - 260.3)	193.8 (141.3 - 269.5)			
	24	225.1 (156.4 - 285.4)	225.1 (162.3 - 285.4)	225.3 (153.8 - 263.1)			

^a Medián értékek és az interkvartilis tartományok, valamint ^b az ismétléses ANOVA p-értékei szerepelnek a táblázatban.

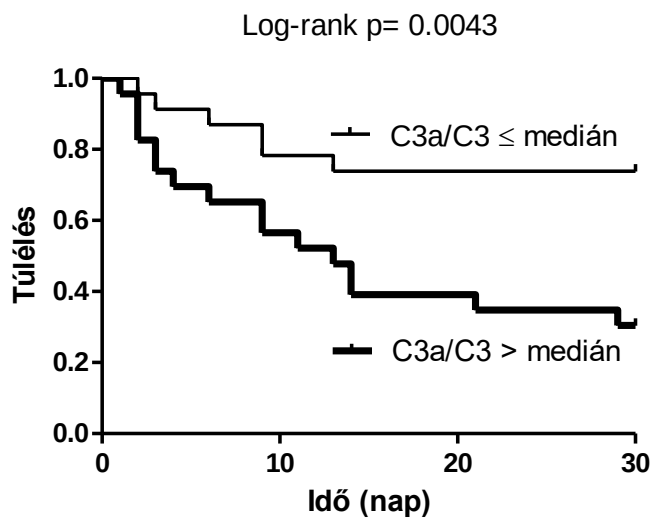
6. táblázat

A kórházi felvételt követő 24. órában mért C3a/C3 hányados prognosztikai értéke újraélesztett betegek esetén a 30 napos halálozás tekintetében.

Modellek	HR	95% CI	χ^2	p-érték
C3a/C3 egyváltozós Cox modell	1.747*	1.218 – 2.505	7.504	0.006
C3a/C3 többváltozós Cox modell, életkorra, nemre, APACHE II pontszámra adjusztálva	1.692*	1.105 – 2.590	5.249	0.022
C3a/C3 többváltozós Cox modell, életkorra, nemre, APACHE II pontszámra adjusztálva	2.960**	1.095 – 7.998	5.038	0.025

*HR = Hazard ratio; HR standardizált hazard ratio-ként van számolva (1-SD-re történő standardizálás után, ahol az SD = 87.02); CI = konfidencia intervallum; Wald χ^2 és a likelihood-ratio teszt p-értéke szerepel a táblázatban).

** A C3a/C3 hányados mediánértéke, mint vágópont szerepel és a HR-et a magas vs. alacsony C3a/C3 hányadosra vonatkoztatva adtam meg.



5. ábra

Újraélesztett betegek esetén a magas C3a/C3 hányados rosszabb kimenetellel jár együtt, ahogy ez az alábbi Kaplan-Meier túlélési görbén megfigyelhető. Az alacsony és magas C3a/C3 hányadosú betegcsoportokat a C3a/C3 hányados medián értékei alapján képeztük, ahol a medián 101.3 volt. A két túlélési görbét Log-rank teszt segítségével hasonlítottuk össze és statisztikailag jelentős különbséget találtunk ($p = 0.0043$).

5.3. Szívelégtelen betegek prognosztikai markerei

5.3.1. Szívelégtelen betegek prognosztikai markere a HSP70

A szívelégtelen betegcsoport vizsgálatába összesen 195 csökkent balkamra funkciójú beteget (<45% EF) vontunk be. A páciensek felvételnél észlelt klinikai jellemzőinek bemutatása munkacsoportunk korábbi közleményeiben megtalálható (8, 52), az 5 éves követés alapján a túlélő és nem-túlélő betegcsoportok összehasonlítása a demográfiai adatok, a klinikai jellemzők vonatkozásában a 7. táblázatban található. Jelen munka kizárólag a már korábban bemutatott szívelégtelen betegcsoport 5 éves követéses vizsgálatának elemzésével foglalkozik. A követési idő végére a betegek 43.6%-a életben volt, míg 56.4%-a elhunyt.

Prognosztikai markereket keresve először azt vizsgáltuk, hogy a szérumban HSP70 szintje összefügg-e a halálozással. Azt találtuk, hogy a vizsgálat kezdetén mért HSP70 szint jelentősen magasabb azokban a szívelégtelen betegekben, akik az 5 éves követést nem érték meg ($p = 0.0101$, 7. táblázat). Ezen kívül megfigyeltük, hogy a magasabb életkor, az emelkedett NT-proBNP és kreatinin szint, valamint az alacsonyabb testtömeg index (BMI) és balkamrai ejekciós frakció (EF) hasonlóan kapcsolatot mutatott a halálozással (7. táblázat). Ezt követően a betegeket 2 csoportba soroltuk a HSP70 medián értéke (0.33 ng/ml) szerint. A két csoport túlélését Kaplan-Meier módszerrel elemeztük (6. ábra), és Log-rank teszt segítségével hasonlítottuk össze. Megfigyeltük, hogy a felvételnél mért magasabb HSP70 szint magasabb 5 éves mortalitással jár együtt (Log-rank teszt, $p = 0.0047$, 6. ábra).

Ezek után egyváltozós Cox regressziós elemzést végeztünk a HSP70-re (a HSP70-et kategória változóként vettük a modellbe, a medián értéknél két csoportra bontva), és azt találtuk, hogy szignifikáns prediktora volt a halálozásnak (hazard ratio = 1.712, 95%-os konfidencia intervallum 1.174-2.496, Wald $\chi^2 = 7.877$, $p = 0.005$, 8. táblázat). A további egyváltozós Cox regressziós elemzések azt mutatták, hogy az életkor, a BMI (body mass index), a balkamrai ejekciós frakció, az NT-proBNP, valamint a szérumban kreatinin szint szintén prediktorok az 5 éves halálozásra vonatkozóan (ezek részletes bemutatásától eltekintünk). Ezért a többváltozós Cox modellbe ezekre a változókra adjusztáltunk (életkor, nem, BMI, szérumban kreatinin, és NT-proBNP), és megfigyeltük, hogy a HSP70 szignifikáns és az előbb felsorolt változóktól független

prediktora az 5 éves mortalitásnak, szívelégtelen betegekben (hazard ratio = 1.556, 95%-os konfidencia intervallum 1.042-2.325 Wald $\chi^2 = 4.654$, $p = 0.031$, 8. táblázat). A többváltozós Cox modellt megismételtük úgy is, hogy a modellben a szívelégtelenség súlyosságát jelző változók közül az NT-proBNP-t kicseréltük az ejekciós frakcióval, és így módon is hasonló eredményt kaptunk (hazard ratio = 1.590, 95%-os konfidencia intervallum 1.046-2.417, Wald $\chi^2 = 4.720$, $p = 0.030$, 8. táblázat).

7. táblázat

A szívelégtelen betegek demográfiai adatai és klinikai jellemzői, a túlélő és a nem-túlélő alcsoportok összehasonlítása.

	Túlélő N=85	Nem-túlélő N=110	p-érték ^a
Demográfiai és klinikai adatok			
Életkor (év)	67.1 (58.7-75.9) ^b	71.5 (61.3-78.5)	0.025
Nem (férfi)	61 (72 %) ^c	84 (76 %)	0.465
BMI (kg/m ²)	28.4 (25.2-31.5)	25.7 (23.8-30.4)	0.011
Szívfrekvencia (1/perc)	80 (68-93)	78 (70-88)	0.713
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	125 (120-140)	120 (110-133)	0.072
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	80 (70-80)	70 (65-80)	0.011
Balkamrai ejekciós frakció (%)	37 (30-41)	32 (24-40)	0.003
NYHA I osztály	31 (36.5%)	7 (6.4%)	< 0.001
NYHA II osztály	31 (36.5%)	34 (30.9%)	
NYHA III osztály	21 (24.7%)	48 (43.6%)	
NYHA IV osztály	2 (2.4%)	21 (19.1%)	
Etiológia (isztkémiás szívbetege)	43 (50.6%)	70 (63.6 %)	0.067
Szívelégtelenség fennállása (év)	2.6 (0.3-6.4)	2.8 (1.0-6.1)	0.773
Biokémiai paraméterek			
Szérum HSP70 (ng/ml)	0.30 (0.24-0.43)	0.39 (0.27-0.59)	0.01
NT-proBNP (fmol/mL)	423 (269-869)	1,134 (571-2,153)	<0.001
Szérum nátrium (mmol/L)	141 (139-143)	140 (136-142)	0.005
Szérum kreatinin (μmol/L)	90 (75-106)	107 (87-156)	<0.001
GFR (ml/1.73m ² per min)	76 (57-92)	62 (39-77)	< 0.001
Albumin (g/L)	41 (40-44)	40 (37-43)	0.003
Összfehérje (g/L)	73 (67-76)	71 (66-77)	0.499
CRP (mg/L)	5.2 (2.2-10.0)	7.9 (3.4-15.4)	0.025
Összbilirubin (μmol/L)	12.9 (7.6-19.0)	14.0 (9.5-21.9)	0.168
Összkoleszterin (mmol/L)	4.3 (3.7-5.3)	4.1 (3.4-4.7)	0.047
Szérum vas (mmol/L)	14.0 (10.1-19.4)	11.6 (7.9-16.0)	0.014
Ferritin (μg/L)	121 (78-212)	133 (68-229)	0.528
Transzferrin (g/L)	2.8 (2.5-3.1)	2.7 (2.3-3.0)	0.258
Transzferrin szaturáció (%)	20 (14-27)	18 (12-24)	0.111
Szolubilis transzferrin receptor (nmol/L)	3.7 (3.0-5.0)	5.0 (3.8-6.5)	< 0.001
Hematológiai paraméterek			
Fehérvérsejt szám (G/L)	6.7 (5.8-8.2)	7.5 (6.6-8.8)	0.016
Vérlemezke szám (G/L)	201 (167-232)	188 (156-230)	0.184
Hematokrit (%)	0.42 (0.40-0.44)	0.42 (0.38-0.45)	0.81
Hemoglobin (g/L)	143 (132-154)	140 (126-152)	0.305
MCV (fL)	91 (88-96)	94 (89-96)	0.19
RDW (%)	14.0 (13.4-14.7)	14.9 (14.1-16.4)	< 0.001

^a Folyamatos változó esetén Mann-Whitney teszt, kategória változó esetén Pearson χ^2 teszt, míg ordinális kategória változó esetén χ^2 trend teszt.

^b Medián és interkvartilis tartomány.

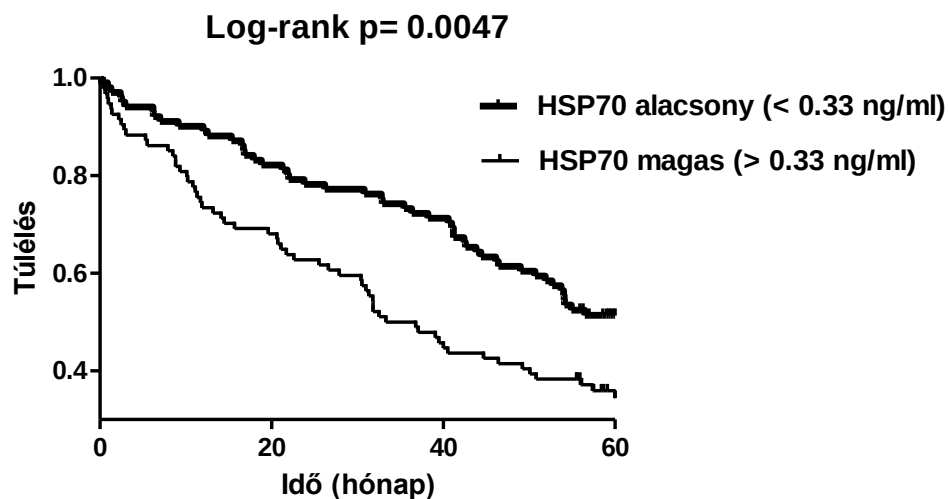
^c Elemszám és százalékték.

8. táblázat

A HSP70 prognosztikai értéke a szívelégtelen betegek 5 éves halálozásának tekintetében (Cox regresszió).

Modell	HR*	95% CI	χ^2	p-érték
Egyváltozós Cox modell a HSP70-re (magas vs. alacsony)	1.712	1.174 – 2.496	7.877	0.005
Többváltozós Cox modell a HSP70-re (magas vs. alacsony) életkorra, nemre, BMI-re, szérum kreatininre és NT-proBNP-re adjusztálva	1.556	1.042 – 2.325	4.654	0.031
Többváltozós Cox modell a HSP70-re (magas vs. alacsony) életkorra, nemre, BMI-re, szérum kreatininre és balkamrai ejekciós frakcióra adjusztálva	1.590	1.046 – 2.417	4.720	0.030

*HR = Hazard ratio; HSP70 mint kategória változó, a medián érték szerint besorolva magas és alacsony HSP70 csoportba (HR a magas vs. alacsony HSP70 szint összehasonlítására vonatkozik). A táblázatban feltüntettük a 95%-os konfidencia intervallumot (CI) és a Wald χ^2 -et, valamint a likelihood-ratio teszt p-értékét.



6. ábra

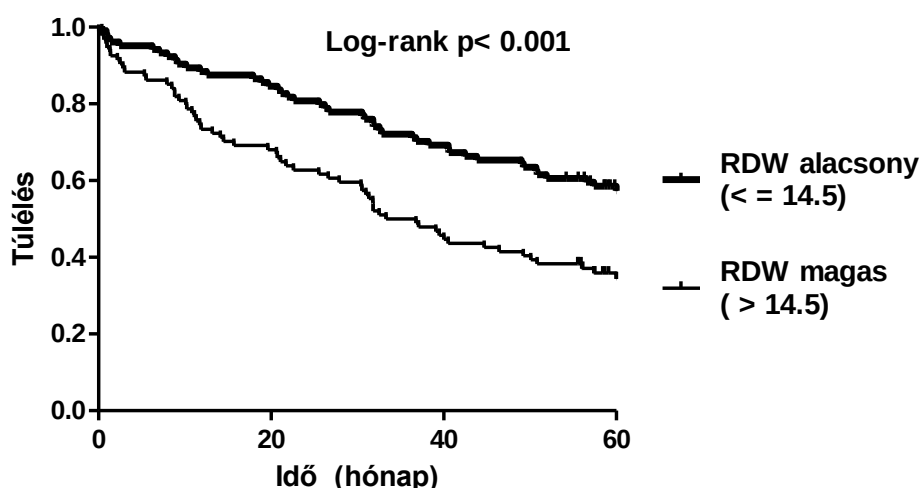
A magas HSP70 rosszabb kimenetellel jár együtt a szívelégtelen betegek 5 éves követése során. Az alacsony és magas HSP70 szintű betegcsoportokat a medián értékei alapján képeztük, ahol a medián 0.33ng/ml volt. A két túlélési görbét Log-rank teszt segítségével hasonlítottuk össze és statisztikailag jelentős különbséget találtunk ($p = 0.0047$).

5.3.2. Az RDW szerepe a szívelégtelenség hosszú távú prognózisában

A szívelégtelen betegek körében munkacsoportunk korábban leírta az egyéves túléléssel való szoros kapcsolatot (52), munkám során az ötéves túlélési adatok ismeretében újraértékeltem az RDW szerepét a hosszú távú prognózis becslésében.

Vizsgálatunk során azt kaptuk, hogy az RDW az ötéves túléléssel is szoros összefüggést mutatott. Az RDW értéke túlélők körében alacsonyabb volt 14.0% (13.4-14.7%), mint a nem-túlélők csoportjában 14.9% (14.1-16.4%), ($p < 0.001$; 7. táblázat). Az egyéves követéses vizsgálatból (52) kiderült a magas életkor, a beszűkült vesefunkció, az alacsony testtömeg index, az emelkedett diasztolés vérnyomás, az alacsony szérum nátrium és hemoglobin, valamint az emelkedett NT-proBNP szintek a rosszabb kimenetellel párosultak. Ezek a változók az ötéves követés során is szignifikánsan jelezték a mortalitást az egyváltozós Cox modellek eredményei alapján. Mivel ezen összefüggések a korábbi vizsgálatok alapján már ismertek, részletes bemutatásától itt eltekintünk.

Az RDW medián értékét (14.5%) használva vágópontként a 195 beteget két csoportba soroltuk. Kaplan-Meier túlélési görbén ábrázoltuk a túlélést, és Log-rank teszt segítségével hasonlítottuk össze (7. ábra). A magasabb RDW érték magasabb 5 éves mortalitással járt együtt (Log-rank teszt, $p < 0.001$, 7. ábra). Ezt követően az RDW prognosztikai értékét egy és többváltozós Cox regressziós elemzéssel vizsgáltuk. Az egyváltozós Cox regresszió elemzésben az RDW (1-SD-re standardizálva) az 5 éves mortalitás szignifikáns előjelzőjének mutatkozott (hazard ratio 1.574, 95%-os konfidencia intervallum 1.353-1.832, Wald $\chi^2 = 24.574$, $p < 0.001$, 9. táblázat). Ezt követően többváltozós Cox regressziós elemzést végeztünk, mely során az életkorra, vesefunkcióra (GFR, glomerulus filtrációs ráta), hemoglobinra, BMI-re, diasztolés vérnyomásra, szérum nátriumra, valamint NT-proBNP-re adjusztáltunk. Az RDW (1-SD-re standardizálva) az adjusztálást követően is szignifikáns és független prognosztikai faktor maradt (hazard ratio 1.455, 95%-os konfidencia intervallum 1.221-1.733, Wald $\chi^2 = 13.733$, $p < 0.001$, 9. táblázat).



7. ábra

A magas RDW rosszabb kimenetellel jár együtt szívelégtelen betegek esetében, ahogy ez az alábbi Kaplan-Meier túlélési görbén megfigyelhető az 5 éves utánkövetés alapján. A két csoportot az RDWmedián értékei alapján képeztük, ahol a medián 14.5% volt. A két túlélési görbét Log-rank teszt segítségével hasonlítottuk össze és statisztikailag jelentős különbséget találtunk ($p < 0.001$).

9. táblázat

Az RDW prognosztikai értéke a szívelégtelen betegek 5 éves halálozásának tekintetében (Cox regresszió).

Modell	HR*	95% CI	χ^2	p-érték
Egyváltozós Cox modell az RDW-re	1.574*	1.353 – 1.832	24.574	< 0.001
Többváltozós Cox modell az RDW-re, melyet az életkorra, GFR-re, hemoglobinnra, BMI-re, diasztolés vérnyomásra, szérum nátriumra és NT-proBNP-re adjusztáltunk	1.455*	1.221 – 1.733	13.733	< 0.001
Többváltozós Cox modell az RDW-re, melyet az életkorra, GFR-re, hemoglobinnra, BMI-re, diasztolés vérnyomásra, szérum nátriumra és NT-proBNP-re adjusztáltunk	1.639**	1.074 – 2.499	6.102	0.047

*HR = Hazard ratio; A Cox regressziós modell eredményét a standardizált prediktor (RDW) emelkedésre (1-SD) vonatkoztatva adtam meg (SD = 1.97) a 95%-os konfidencia intervallum (CI), a Wald χ^2 , és a likelihood ratio teszt p-értékével.

****** Az RDW mediánértéke, mint vágópont szerepel és a HR-et a magas vs. alacsony RDW-re vonatkoztatva adtam meg.

5.4. Szívelégtelen betegek prognosztikai modelljeinek statisztikai újraértékelése

A szívelégtelenség vizsgálatban az új prognosztikai faktorokat (RDW és HSP70) újraértékeltek a reklasszifikáció módszereivel és elvégeztük a modellek részletes jellemzését, melynek eredménye az 10. táblázatban látható.

5.4.1. Az RDW, mint a túlélési modellbe újonnan beépített prognosztikai faktor szerepe

5.4.1.1. A modell általános jellemzése (RDW)

A továbbiakban teszteltük az alap és az RDW-vel kibővített prognosztikai modelleket, azok általános jellemzésével, valamint a diszkrimináció és kalibráció tesztelésével, melyekhez a legújabb statisztikai megközelítéseket is alkalmaztuk. A modell általános jellemzésére Nagelkerke féle R^2 és Brier pontszámok számolását végeztük. Megfigyeltük, hogy a Nagelkerke féle R^2 0.256-ról 0.289-re emelkedett, míg - ennek megfelelően - a Brier pontszám 0.199-ről 0.193-ra csökkent az RDW-vel kibővített modellben az alapmodellhez képest (10. táblázat). Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a kibővített modell javult a referenciához képest. Mindkét modell esetében a diszkriminációs képességét teszteltük C-statisztika és a diszkriminációs slope-ok segítségével boxploton (8. ábra). A két ROC görbe alatti terület (AUC, area under curve) nem különbözött jelentősen a két modell esetén (9. ábra A panel), DeLong teszt $p > 0.05$.

5.4.1.2. A diszkrimináció és a kalibráció értékelése újabb statisztikai módszerek segítségével (RDW)

Az RDW prognosztikai szerepét reklasszifikációs analízis (IDI, NRI) segítségével vizsgáltuk tovább. Szignifikáns javulást észleltünk az IDI (IDI = 0.025, $p = 0.027$, 10. táblázat) és az ún. "continuous" vagy folyamatos, vágópont nélküli NRI esetén (NRI = 0.383, $p = 0.008$, 10. táblázat), amikor az RDW-vel kibővített modellt az

alapmodellhez hasonlítottuk. Továbbá azt láttuk, hogy a kalibráció mindkét modell esetén megfelelő volt (10. ábra). A kalibráció utal arra, hogy a megjósolt és a bekövetkezett események mennyire jól korrelálnak, tehát a modell mennyire pontosan becsli meg a vizsgált esemény bekövetkeztét. Ideális esetben a kalibrációs egyenes 45 fokos szöget zár be a tengelyekkel (76). A két modell kalibrációs egyenesei mindkét esetben közel a 45 fokos egyenesen voltak (10. ábra). A kalibrációkat precízebben a Hosmer-Lemeshow teszt segítségével hasonlítottuk össze. A Hosmer-Lemeshow teszt során csökkenést észleltünk a χ^2 esetén (12.5-ről 8.0-ra), valamint nagyobb p-értéket találtunk a kibővített prognosztikai modell esetében ($p = 0.436$), mint a referencia modellben ($p = 0.129$) (10. táblázat). Mindezek azt mutatják, hogy a kalibráció szintén javult, amikor az RDW-vel kibővítettük a prognosztikai rendszert, és alapvetően mindkét modell megfelelően volt kalibrálva (mindkét p-érték > 0.05 a Hosmer-Lemeshow teszt alapján).

5.4.2. A HSP70, mint a túlélési modellbe újonnan beépített prognosztikai faktor szerepe

Az RDW-hez hasonlóan, az ott részletezett módon, a HSP70 esetén is elvégeztük a standard és a reklasszifikációs teszteket is.

5.4.2.1. A modell általános jellemzése (HSP70)

A modell általános jellemzésére ebben az esetben is Nagelkerke féle R^2 és Brier pontszámok számolását végeztük. Megfigyeltük, hogy a Nagelkerke féle R^2 0.251-ről 0.269-re emelkedett, míg - ennek megfelelően - a Brier pontszám 0.199-ről 0.194-re csökkent a HSP70-nel kibővített modellben a referenciamodellhez képest (10. táblázat). Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a kibővített modell javult a referenciához képest. Mindkét esetben a diszkriminációs képességet teszteltük C-statisztikai és a diszkriminációs slope-ok segítségével boxplot-on (8. ábra). A két ROC görbe alatti terület (AUC) nem különbözött jelentősen a két esetben (9. ábra B panel), DeLong teszt $p > 0.05$.

5.4.2.2. A diszkrimináció és kalibráció értékelése újabb statisztikai módszerek segítségével (HSP70)

A HSP70 prognosztikai szerepét szintén a reklassifikációs analízisek (IDI, NRI) segítségével vizsgáltuk tovább. Az IDI esetén nem szignifikáns javulást észleltünk (IDI = 0.016, $p = 0.074$, 10. táblázat), míg a folyamatos NRI esetén szignifikáns javulást (NRI = 0.314, $p = 0.029$, 10. táblázat) tapasztaltunk, amikor a HSP70-nel kibővített modellt a referenciához hasonlítottuk. Megállapítottuk, hogy a kalibráció az alapmodell esetén megfelelő volt, azonban a HSP70-nel kibővített modellnél már nagyobb szóródást észleltünk (10. ábra C és D panel). A Hosmer-Lemeshow teszt során pedig emelkedést észleltünk a χ^2 esetén (8.3-ról 19.4-re) valamint kisebb p -értéket találtunk a kibővített prognosztikai modell esetében ($p = 0.013$), mint a referencia modellben ($p = 0.400$) (10. táblázat). Mindezek azt mutatják, hogy a kalibráció jelentősen romlott, amikor a HSP70-nel kibővítettük a prognosztikai modellt.

5.4.3. A két biomarker (RDW és HSP70) összehasonlítása

A Cox regresszió szignifikáns, független prediktornak jelezte mind az RDW-t, mind a HSP70-et ($p < 0.001$ és $p = 0.032$, 10. táblázat). A ROC görbe alatti terület mindkét esetben nőtt, azonban egyik esetben sem szignifikáns mértékben (0.752-ről 0.772-re ill. 0.754-ről 0.769-re változott), amikor az RDW-vel ill. a HSP70-nel egészítettük ki a referencia modellt (a DeLong teszt nem volt szignifikáns, 10. táblázat). A 9. ábrán a két elemzéshez tartozó ROC görbék kerültek bemutatásra. Mindkét esetben növekedett a Nagelkerke féle R^2 , és ezzel párhuzamosan csökkent a Brier pontszám, valamint az NRI számolás során szignifikáns javulást észleltünk, amikor új prognosztikai markerrel egészítettük ki a referencia modellt (10. táblázat). Habár az IDI értéke is mindkét vizsgálatban pozitív volt, csak az RDW-t vizsgáló elemzésben találtunk statisztikailag igazolható növekedést ($p = 0.027$, 10. táblázat).

Az IDI értékét a "Discrimination slope" –ok különbsége adja. Ez a 8. ábrán vizuálisan is megítélhető. Látható a 8. ábra A és B panelén, hogy míg a referencia modell RDW-vel való kibővítése után a túlélőket és nem-túlélőket jobban elkülöníti egymástól (a két átlagérték közti különbség megnő), azaz jobban diszkriminál, addig a HSP70 esetén a grafikus ábrázolás közel azonos mértékű diszkriminációt mutat, tehát a

HSP70 esetén a diszkrimináció nem javul (8. ábra, C és D panel). A kalibráció vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy az RDW-t vizsgáló elemzésben a kibővített modell jól kalibráltnak bizonyult, mivel a Hosmer-Lemeshow teszt egyik esetben sem szignifikáns (a 10. táblázatban) és a grafikus ábrázolás is a 45 fokos kalibrációs egyeneshez közeli elrendeződést mutat (10. ábra, A és B panel). Ezzel szemben a HSP70-et vizsgáló elemzésben a Hosmer-Lemeshow teszt már szignifikáns a kibővített modellben ($p = 0.013$) és az ideális kalibrációs egyenestől jelentős eltéréseket látunk a grafikus ábrázolás során (10. ábra, D panel). Az eredményeket összesítve láthatjuk, hogy ezen statisztikai elemzések alkalmasak arra, hogy a biomarkerek közötti, eddig nem kellőképpen ismert különbségeket kimutassuk. A reklasszifikáción alapuló tesztek és a kalibráció vizsgálatával megállapíthatjuk, hogy míg az RDW alkalmazásának egyértelműen jelentős lehet a klinikai haszna szívelégtelen betegek hosszú távú prognózisának becslésében, addig a HSP70-nek, mint szignifikáns rizikómarkernek, klinikai hasznossága kérdéses, és további vizsgálatokra van szükség ennek végleges értékeléséhez.

Mivel az alapmodellek különbözőek az RDW és a HSP70 esetén, felmerülhet a lehetősége annak, hogy ezen különbségek befolyásolhatták a reklasszifikációnál kapott eredményeket. Az alapmodellek kiválasztásának "történelmi" okai voltak, nevezetesen a dolgozat alapjául szolgáló cikkekben is ezeket használtuk. Első közleményünkben (91), ahol a HSP70 prognosztikai szerepét vizsgáltuk szívelégtelen betegekben, az alapmodellt az 5 éves követési adatok alapján határoztuk meg. Az 5 éves követés alapján a túlélő és a nem-túlélő csoport összehasonlításakor adódó legerősebben eltérő változókat jelöltük ki az alapmodellhez, valamint a nemet is belevettük a modellbe, mert így éreztük komplettnek, habár a nemek aránya valójában nem különbözött a két csoportban. A második közleményben (92), ahol az RDW prognosztikai szerepét vizsgáltuk szívelégtelen betegekben, az alapmodellt már az 1 éves követéses vizsgálatot figyelembe véve kellett megalkotni, ezért az ott leírt szignifikáns változókat vettük át az 5 éves elemzésbe. Tulajdonképpen mindkét kiválasztás önkényes. Hogy az alapmodell különbségéből adódó torzítást kiküszöböljük, még egyszer elvégeztük a reklasszifikációs elemzést, az alapmodellek felcserélésével (11. táblázat).

A 11. táblázatban látható, hogy a kis mértékben különböző alapmodellek alkalmazása nem befolyásolta az eredményeket, tehát az modellek jellemzői, az

alapmodelltől függetlenül, lényegében változatlanok. Az alapmodelltől függetlenül az AUC mindkét marker esetében nem szignifikáns módon emelkedett, a Nagelkerke féle R^2 mindkét esetben emelkedett, a Brier pontszám csökkent, a Cox regresszió értékei pedig érdemben nem változtak meg. Az NRI értékek az alapmodelltől függetlenül mindkét marker esetében szignifikáns javulást jeleztek, míg az IDI a HSP70 esetében továbbra sem volt szignifikáns az alapmodell csere ellenére sem. Egyetlen különbség, hogy a kalibráció az alapmodellek cseréje után már mindkét esetben megfelelő volt, ellentétben a korábbiakkal. Ezek alapján tehát azt látjuk, hogy az alapmodellek különbsége nem befolyásolta lényegesen az eredményeket. Az az alapmodell pedig, melyet kezdetben az RDW prognosztikai elemzése során használtunk (életkor, GFR, hemoglobin, BMI, diasztolés vérnyomás, szérum nátrium, NT-proBNP), a kalibráció szempontjából előnyösebbnek tűnik, ezért a továbbiakban már végig ezt az alapmodellt használtuk.

Az RDW és HSP70 szerepének szemléletesebb bemutatásához elvégeztünk olyan reklasszifikációs elemzéseket, ahol a szívelégtelenségben széles körben elfogadott és alkalmazott prognosztikai markerhez, az NT-proBNP-hez hasonlítottuk az új markereket. A számolások során az NT-proBNP-re vonatkozó értékeket 100%-nak vettük. Az alapmodellbe az életkort, a GFR-t, a hemoglobint, a BMI-t, a diasztolés vérnyomást és a szérum nátriumot vettük be. Az alapmodellhez ezt követően az NT-proBNP-t, az RDW-t és a HSP70-et adtuk hozzá. Mindegyik esetben elvégeztük a fent részletezett reklasszifikációs elemzéseket (12. táblázat).

A kapott eredményeket ezt követően az alapmodell + NT-proBNP modellhez képest viszonyítva mutatjuk be az új biomarkerek esetében. Az NRI értékei azt mutatták (12. táblázat), hogy az NT-proBNP esetén észlelhető a legnagyobb mértékű javulás ($NRI=0.566$). Az RDW esetén ez az érték 0.461, ami az NT-proBNP-hez képest 81.4%-os ($0.461/0.566$). Ezzel szemben a HSP70 esetén ez az érték 0.333, azaz csupán 58.8%-os ($0.333/0.566$) az NT-proBNP-hez képest. Az IDI elemzések során azt figyeltük meg, hogy az NT-proBNP-hez képest az RDW esetén a diszkriminációs index 77.9%-os ($0.053/0.068$), míg a HSP70 esetén csupán 36.8%-os ($0.025/0.068$). Az AUC növekedés az NT-proBNP esetén volt a legnagyobb: 0.053 (100%), az RDW esetén 0.047 (88.7%), míg a HSP70 esetén 0.015 (28.3%) volt.

Ezt követően a 12. táblázatban leírt modellekre, valamint két további kombinált modellre kiszámoltuk a szenzitivitást, a specificitást, a pozitív prediktív és negatív prediktív értékeket. Ehhez a modell által megadott előjelzett rizikó értékeket és a valóságban megfigyelt kimeneteleket vetettük össze (13. táblázat). Az előjelzett rizikó esetén a vágópontot 0.5-nek vettük. Az alapmodellben észlelt szenzitivitás 73,6% volt, a specificitás 45,9%. Ehhez képest az összes vizsgált esetben a biomarker hozzáadása – különböző mértékben – javította az előjelzés pontosságát. A modellek kibővítése során azt észleltük, hogy a szenzitivitás kisebb mértékben növekedett, a specificitás azonban lényegesen javult. Az alapmodellhez hozzáadott NT-proBNP esetén a specificitás 61.2%, RDW esetén 57.6%, míg a HSP70 esetén 51.8% volt. Az NT-proBNP és az RDW együttes alkalmazásával a specificitás már 63.5%, és ha mind a három biomarkert beépítjük a modellbe, 64.7%-os értéket érhattünk el. Kíváncsiak voltunk, vajon jobb vágópontot használva, mint a 0.5-ös érték, milyen szenzitivitás, specificitás és prediktív érték érhető el. Az optimális vágópont meghatározásához a különböző modellek által generált prediktív rizikó értékeket ROC analízissel elemeztük, és azt tekintettük optimális vágópontnak, ahol a specificitás és szenzitivitás összege maximális volt. Ezen optimális vágópontok, valamint a hozzájuk tartozó szenzitivitás, specificitás és prediktív értékek a 14. táblázatban szerepelnek. A 0.5-ös vágóponttal végzett elemzésekhez képest a ROC analízissel meghatározott „optimális” vágópontok esetén kis mértékben módosultak csupán az eredmények.

A legjobb túlélést becselő modellek a kombinált prognosztikai modellek lettek, ugyanis ez esetben volt a legmagasabb a szenzitivitás, a specificitás és a prediktív értékek összege. Jelentős különbséget azonban nem láttunk akkor, ha a kombinált prognosztikai modell az életkoron, GFR-en, hemoglobinton, BMI-n, diasztolés vérnyomáson, szérum nátriumon, RDW-n és NT-proBNP-n túl még a HSP70-et is tartalmazta. Ezen sejtés igazolására reklasszifikációs teszteket alkalmaztuk, és azt kaptuk, hogy a HSP70 hozzáadása - a komplex RDW-t és NT-proBNP-t is tartalmazó - alapmodellhez képest már nem javítja érdemben a túlélést becselő modellt ($NRI = 0.2599$ [CI -0.0191 - 0.5388] $p = 0.067$; $IDI = 0.0108$ [-0.0024 - 0.0241] ; $p = 0.10767$).

10. táblázat

A referencia modell (alapmodell) és a kibővített modell (alapmodell + RDW, alapmodell + HSP70) fő statisztikai jellemzői láthatóak a táblázatban a szívelégtelen betegek vizsgálata alapján.

	RDW		HSP70	
	alapmodell	alapmodell + RDW	alapmodell	alapmodell + HSP70
Cox regresszió χ^2	77.5	90.4	74.9	78.5
Cox regresszió p	< 0.001		0.032	
Hosmer-Lemeshow teszt χ^2	12.5	8.0	8.3	19.4
p (Hosmer-Lemeshow teszt)	0.129	0.436	0.400	0.013
Nagelkerke féle R^2	0.256	0.289	0.251	0.269
Brier pontszám	0.199	0.193	0.199	0.194
C-statisztika (AUC)	0.752	0.772	0.754	0.769
95 % CI (AUC)	0.685 - 0.820	0.707 - 0.837	0.687 - 0.822	0.703 - 0.834
p (DeLong teszt)	0.238		0.297	
NRI (continuous)	0.383		0.314	
95 % CI (NRI)	0.100 - 0.666		0.031 - 0.598	
p (NRI)	0.008		0.029	
IDI	0.025		0.016	
95 % CI (IDI)	0.003 - 0.048		-0.002 - 0.033	
p (IDI)	0.027		0.074	

Alapmodell az RDW esetén: életkor, GFR, hemoglobin, BMI, diasztolés vérnyomás, szérum nátrium, NT-proBNP.

Alapmodell a HSP70 esetén: életkor, nem, BMI, szérum kreatinin és NT-proBNP.

11. táblázat

A referencia modell (alapmodell) és a kibővített modell (alapmodell + RDW, alapmodell + HSP70) fő statisztikai jellemzői láthatóak a táblázatban a szívelégtelen betegek vizsgálata alapján, ahol az alapmodelleket felcseréltük.

	<i>RDW</i>		<i>HSP70</i>	
	alapmodell	alapmodell + RDW	alapmodell	alapmodell + HSP70
Cox regresszió χ^2	74.9	92.1	77.5	80.5
Cox regresszió p	< 0.001		0.037	
Hosmer-Lemeshow teszt χ^2	8.3	6.6	12.5	5.6
p (Hosmer-Lemeshow teszt)	0.400	0.577	0.129	0.690
Nagelkerke féle R^2	0.251	0.289	0.256	0.272
Brier pontszám	0.199	0.192	0.199	0.195
C-statisztika (AUC)	0.754	0.776	0.752	0.763
95 % CI (AUC)	0.687 – 0.822	0.710 – 0.841	0.685 - 0.820	0.697 - 0.829
p (DeLong teszt)	0.242		0.378	
NRI (continuous)	0.577		0.296	
95 % CI (NRI)	0.321 - 0.832		0.018 - 0.575	
p (NRI)	< 0.001		0.037	
IDI	0.030		0.014	
95 % CI (IDI)	0.006 - 0.054		-0.002 - 0.031	
p (IDI)	0.015		0.087	

Alapmodell az RDW esetén: életkor, nem, BMI, szérum kreatinin és NT-proBNP.

Alapmodell a HSP70 esetén: életkor, GFR, hemoglobin, BMI, diasztolés vérnyomás, szérum nátrium, NT-proBNP.

12. táblázat

A prognosztikai modellek (alapmodell, alapmodell + NT-proBNP, alapmodell + RDW, alapmodell + HSP70) fő statisztikai jellemzőinek összehasonlítása látható a táblázatban a szívelégtelen betegek vizsgálata alapján.

	alapmodell	alapmodell + NT-proBNP	alapmodell + RDW	alapmodell + HSP70
Cox regresszió χ^2	34.7	77.5	54.4	43.3
Cox regresszió p		< 0.001	< 0.001	0.003
Hosmer-Lemeshow teszt χ^2	14.3	12.5	5.9	14.4
p (Hosmer-Lemeshow teszt)	0.073	0.129	0.657	0.072
Nagelkerke féle R^2	0.163	0.256	0.230	0.196
Brier pontszám	0.217	0.199	0.203	0.212
C-statisztika (AUC)	0.699	0.752	0.746	0.714
95 % CI (AUC)	0.627 - 0.770	0.685 - 0.820	0.677 - 0.814	0.644 - 0.785
p (DeLong teszt)		0.031	0.043	0.382
NRI (continuous)		0.5658	0.461	0.333
95 % CI (NRI)		0.306 - 0.825	0.191 - 0.731	0.054 - 0.611
p (NRI)		< 0.001	< 0.001	0.019
IDI		0.068	0.053	0.025
95 % CI (IDI)		0.035 - 0.102	0.023 - 0.083	0.002 - 0.047
p (IDI)		< 0.001	< 0.001	0.031

Alapmodell minden esetben: életkor, GFR, hemoglobin, BMI, diasztolés vérnyomás, szérum nátrium.

13. táblázat

A referencia modell (alapmodell) és a kibővített modellek szenzitivitás, specificitás és prediktív értékei láthatóak a táblázatban a szívelégtelen betegek vizsgálata alapján, ahol az előjelzett rizikó esetén a vágópontot 0.5-nek vettük.

	Szenzitivitás	Specificitás	Pozitív prediktív érték	Negatív prediktív érték
alapmodell	73.6	45.9	63.8	57.4
alapmodell + NT-proBNP	75.5	61.2	71.6	65.8
alapmodell + RDW	75.5	57.6	69.7	64.5
alapmodell + HSP70	72.7	51.8	66.1	59.5
alapmodell + NT-proBNP+ RDW	75.5	63.5	72.8	66.7
alapmodell + NT-proBNP + RDW + HSP70	75.5	64.7	73.5	67.1

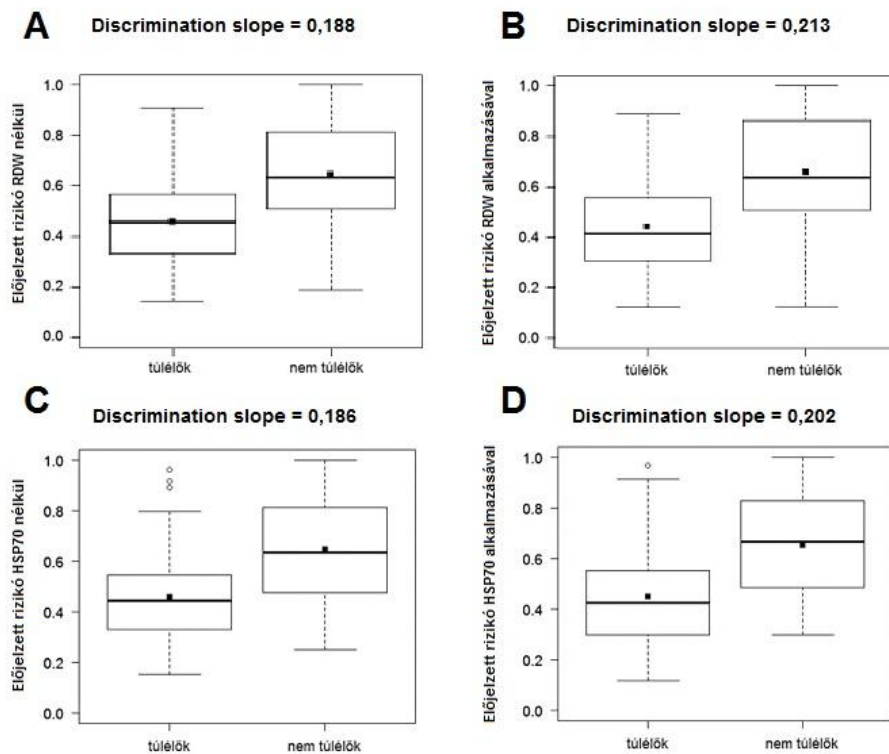
Alapmodell minden esetben: életkor, GFR, hemoglobin, BMI, diasztolés vérnyomás, szérum nátrium.

14. táblázat

A referencia modell (alapmodell) és a kibővített modellek szenzitivitás, specificitás és prediktív értékei láthatóak a táblázatban a szívelégtelen betegek vizsgálata alapján. Az optimális vágópontokat ROC analízissel határoztuk meg.

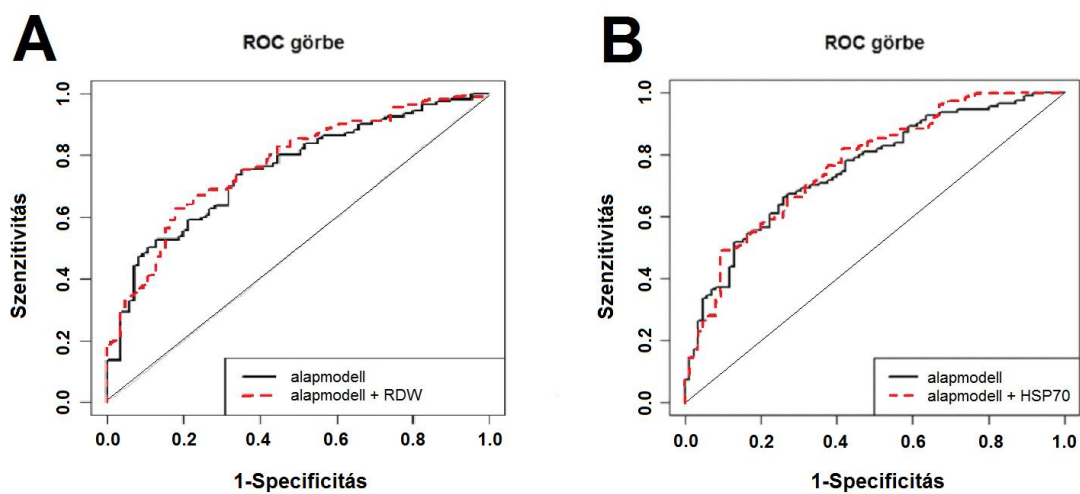
	Vágópont	Szenzitivitás	Specificitás	Pozitív prediktív érték	Negatív prediktív érték
alapmodell	0.616	54.5	70.7	77.9	45.1
alapmodell + NT-proBNP	0.509	75.5	64.7	73.5	67.1
alapmodell + RDW	0.587	64.5	76.5	78.0	62.5
alapmodell + HSP70	0.675	48.2	87.1	82.8	56.5
alapmodell + NT-proBNP + RDW	0.578	62.7	82.4	82.1	63.1
alapmodell + NT-proBNP + RDW + HSP70	0.614	60.9	83.5	82.7	62.3

Alapmodell minden esetben: életkor, GFR, hemoglobin, BMI, diasztolés vérnyomás, szérum nátrium.



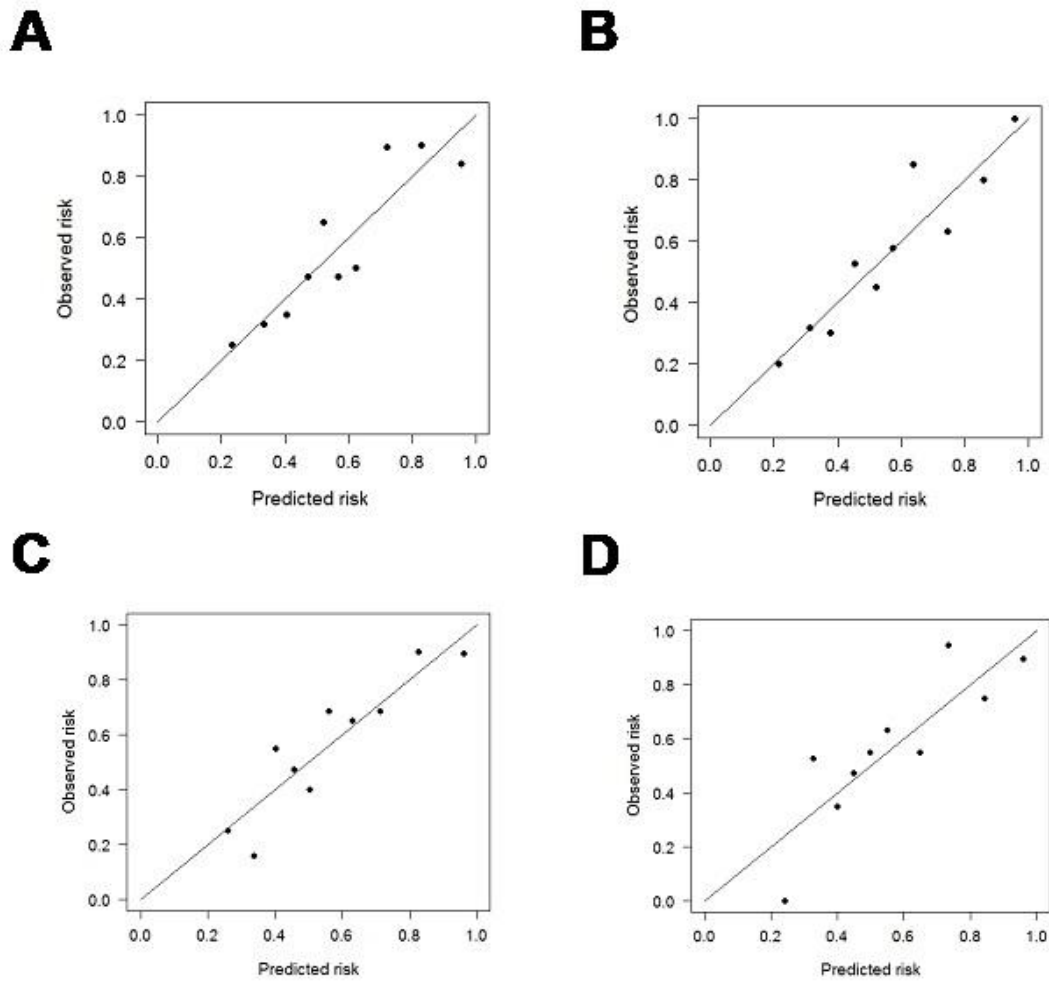
8. ábra

A szívelégtelen betegek alap prognosztikai modelleihez (A, C) és a kibővített prognosztikai modellekhez (B, D) tartozó előjelzett rizikó (predicted risk) boxplot ábrázolásban látható az ábrán. Az A és B panelen az RDW elemzéséhez, a C és D panelen a HSP70 elemzéséhez tartozó diszkriminációs jellemzők kerültek bemutatásra, box = 25 – 75 percentilis (felső – alsó kvartilis, azaz interkvartilis tartomány, (IQR = interquartile range)), pont a boxban = átlag, vonal a boxban = medián, kapocs = minimum – maximum érték, karika = kilógó érték (1,5 IQR – nél nagyobb eltérés a kvartilisektől). Az ábra fölött az elemzéshez tartozó ”Discrimination slope” –értékeket tüntettük fel. A ”Discrimination slope” az előjelzett rizikó medián értékeinek különbsége abban a két csoportban, ahol az esemény (halálozás) bekövetkezett (nem-túlélő), illetve ahol nem következett be (túlélő). A ”Discrimination slope” –ok különbsége adja az IDI értékét (72).



9. ábra

Az ábrán a szívelégtelen betegek alap prognosztikai modelleéhez (alapmodell) és a kibővített modellekhez (alapmodell + RDW, alapmodell + HSP70) tartozó ROC görbék láthatóak, az A panelen az RDW, a B panelen a HSP70 analízishez tartozó görbék kerültek bemutatásra.



10. ábra

Kalibrációs egyenesek a referencia modellek és a kibővített modellek esetén.

Az **A** és **B** panelen a szívelégtelen betegek RDW elemzéséhez, a **C** és **D** panelen pedig a HSP70 elemzéséhez tartozó kalibrációs egyenesek kerültek bemutatásra, ahol az alap prognosztikai modellek kalibrációját az **A** és **C** panelen, míg a kibővített prognosztikai modellek kalibrációját a **B** és **D** panelen ábrázoltuk. Az x - tengelyen az előjelzett vagy kalkulált rizikó (predicted risk), míg az y - tengelyen a megfigyelt rizikó (observed risk) szerepel.

6. Megbeszélés

6.1. A prognosztikai markerek vizsgálata

Az irodalomban mára már rengeteg élettani paraméterről és molekuláról kimutatták, hogy összefüggésben áll a szívelégtelenség kimenetelével (30). A szívelégtelen betegek prognózis becslése különösen fontos kérdés a klinikai gyakorlatban, például sebészeti beavatkozások tervezésében (szívtranszplantáció, kardioverter defibrillátor (ICD) beültetés) valamint az élet végi döntési helyzetekben (30). Hasonlóan fontos, s talán még kiélezettebb ez a kérdés, az eszméletlen újraélesztett betegek esetén a korai döntési helyzetekben, ill. a korai állapotfelmérésekkor. A pontos prognózis becslés sajnos még ma sem biztosított ilyen helyzetekben, így az új prognosztikai markerek és rizikótényezők vizsgálata továbbra is forrongó kutatási téma.

Számos vizsgálat során írtak le „szignifikáns” és „független” prognosztikai faktorokat különböző humán megbetegedésekben, azonban azt már csak kevés esetben vizsgálták, hogy az új prognosztikai faktor milyen mértékben javítja a prognózis becslést a standard prognosztikai markerekhez képest. Az új prognosztikai markerek klinikai értékelésére, hasznosságuk felmérésére Hlatky és mtsai nemrég közöltek egy ajánlást (71). Több statisztikai teszt is rendelkezésre áll a prognosztikai modell vizsgálatára. A szokásos megközelítések (R^2 statisztika, Brier pontszám) azt vizsgálják, hogy a prediktált és a valós aktuális kimenetel mennyire állnak közel egymáshoz (93). A modell további tesztelésére alkalmas a kalibráció vizsgálata is például a Hosmer-Lemeshow „goodness-of-fit” teszt alkalmazásával (89), valamint a diszkrimináció vizsgálata. A diszkrimináció a szenzitivitással, specificitással, valamint a ROC görbe alatti terület (AUC) tesztelésével (C-statisztika) vizsgálható (94, 95). Az AUC (C-statisztika) a mi vizsgálatunkban nem különbözött egyik esetben sem szignifikáns mértékben a referencia és a kibővített modell összehasonlításakor (DeLong teszt $p > 0.05$). Azonban az is ismert már, hogy a C-statisztika bizonyos esetekben nem kellően szenzitív módszer (69, 70).

Ezen megfigyelések vezettek az elmúlt években számos új, reklassifikáción alapuló módszer kidolgozásához. Ezek, többek között a C-statisztika variánsai (96), reklassifikációs táblázatok (97), az NRI (net reclassification improvement) és az IDI (integrated discrimination improvement) (67) tulajdonképpen a diszkriminációt tesztelő

újabb módszerek. Az IDI és az NRI segítségével az új prognosztikai markerek összehasonlíthatóvá váltak egymással és a standard, kipróbált markerekkel. Pozitív előjelű IDI és NRI esetén az új marker javítja a diszkriminációt, míg negatív előjel esetén az ellenkezője igaz. Elemzésünkben az IDI az RDW esetén 0.025-nek adódott, ami azt jelenti, hogy az RDW segítségével a korábbi módszerhez képest az összes beteg 2.5%-ának megfelelő számú betegnél pontosabb lett a prognózis becslés. Ez első ránézésre nem tűnik drámai különbségnek, azonban nem szabad elfelejteni, hogy itt az alapmodell, melyhez képest a prognózis becslés javulását mértük, már tartalmazta az alábbi változókat: életkor, GFR, hemoglobin, BMI, diasztolés vérnyomás, szérum nátrium, NT-proBNP. Tehát mindezen prognosztikai markereken túl az RDW alkalmazásával a prognózis becslés javítható. Jelenleg az IDI és NRI elemzések fokozatos elterjedésének lehetünk szemtanúi, és mára a prognózis becslésben az igényes statisztikai elemzés részét képezik (64, 72).

6.2. A komplement aktiváció újraélesztett betegek esetén

Az újraélesztett betegekben megfigyeltük a komplementrendszer aktiválódását, és megvizsgáltuk az aktiváció kimenetellel való kapcsolatát. Azt találtuk, hogy a komplement aktivációt jelző C3a/C3 hányados a 30 napos mortalitásra vonatkozóan szignifikáns prediktor, mely független az életkortól, a nemtől és az APACHE II súlyossági pontszámtól. Újraélesztett betegek esetén a komplement aktiváció a korábbi tanulmányokból már ismert tény (14, 16). Ezekhez a vizsgálatokhoz hasonlóan mi is jelentős komplement aktivációt találtunk. A C3a/C3 hányados, valamint a Bb és az sC5b9 szintek jelentősen csökkentek a felvételt követően, ebben feltételezhetően a terápiás hipotermia is szerepet játszott. A mért markerek közül egyedül a C3a/C3 hányados mutatott kapcsolatot a túléléssel, mivel ez különbözött statisztikailag jelentős mértékben a túlélő, ill. a nem-túlélő csoport között. A C3a/C3 hányadosnak centrális szerepe van a komplement aktiváció során, szemben a Bb-vel vagy az sC5b9-cel, melyek az aktiváció egyes útjait (alternatív útvonalat, ill. terminális útvonalat) mutatják. Ennek megfelelően, eredményeink azt mutatják, hogy a komplement aktiváció ill. annak lecsengése az első 24 óra során különböző a túlélőkben, mint a nem-túlélőkben, és ennek prognosztikai szerepe van.

Többváltozós Cox regressziós elemzés során azt találtuk, hogy a C3a/C3 hányados a felvételt követő 24. óránál mérve független és szignifikáns prognosztikai marker a 30 napos halálozásra vonatkozóan. A megfigyelt komplement aktiváció hátterében szöveti nekrozis vagy apoptotikus sejtpusztulás állhat. Ezen túl a súlyos hipoxia, iszkémia, valamint a következményes reperfüziós károsodás és az ezt követő gyulladásos folyamatok szintén szerepet játszhatnak a komplement aktiváció létrejöttében. Ezen hipotézist alátámasztja, hogy több vizsgálat is igazolta a komplement aktivációt agyi iszkémiában ill. stroke során (17-20, 77, 80).

6.3. A HSP70 újraélesztett betegek esetén

Azon biokémiai markerek, melyek egyszerűen, vérmintából meghatározhatóak, ígéretesnek tűnnek az újraélesztett betegek prognózis becslésében, és előretörésük várható a képalkotó ill. az elektrofiziológiai vizsgálatokkal szemben (1).

A szérumban HSP70 a különböző stresszhatásokra rapidan megemelkedik, melynek a szervezet szempontjából védő szerepe van az iszkémiás-hipoxiás károsodások kivédése szempontjából. Először Hecker és McGarvey írta le a szérumban HSP70-et biomarkerként központi idegrendszeri és gerincvelői iszkémiás betegek vizsgálatában (4). Megfigyelték, hogy a HSP70 a szérumban az iszkémiát követően igen korán emelkedni kezd. Vizsgálatunkban ezzel párhuzamosan azt találtuk, hogy a kórházi felvételkor az újraélesztett betegek HSP70 szintje a kontrollcsoportéhoz képest jelentősen magasabb volt (3. ábra). A HSP70 kiáramlás hátterében leginkább a hipoxia-iszkémia, valamint a reperfüzió okozta nekrotikus sejtpusztulás állhat, és a szervezet szintjén ún. „danger signal” funkciója lehet (98). A szívleállást követő állapotban, melyet az irodalomban post-cardiac arrest syndromának neveznek, komplex gyulladásos és stresszválasz zajlik, melyet alátámaszt a HSP70 akut fázis fehérjékkel, gyulladásos markerekkel és endotélsejt aktivációs markerekkel észlelt korrelációja is (ET, vWF, sICAM-1, CRP, TNF-alfa, 3. táblázat). Meglepő módon nem találtunk kapcsolatot a HSP70 és a klinikai súlyosságot jelző pontszámok (APACHE II és SAPS II) között, melynek pontos magyarázatát nem ismerjük. Feltételezhetően ez annak köszönhető, hogy míg a HSP70 meghatározás jól definiált időpontban történt, jelen esetben a felvételt követő 24. órában, addig a súlyossági pontszám meghatározás definíciószerűen az első 24 óra klinikai értékei alapján történt és nem a 24. óra értékei szerint. Korábbi

vizsgálatokkal egybehangzóan az emelkedett CRP és S100B a nem-túlélő csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a túlélőkben (99), melyet a kiterjedtebb sejtszruptulással ill. a szervezet részéről a károsodásra adott fokozott válasszal magyarázhatunk. A HSP70 szintje a túlélőkben 24 órával a felvételt követően lecsökkent a kontroll szintre, míg a nem-túlélők esetén a kezdetben észlelt magas szinten perzisztált. A HSP70 24 órás értékét többváltozós Cox regresszió vizsgálatban elemeztük. Azt találtuk, hogy a HSP70 életkortól, nemtől és a súlyosságot jelző APACHE II pontszámtól független szignifikáns prognosztikai markere a 30 napos halálzásnak.

6.4. Az RDW szívelégtelen betegek esetén

Amióta az első közlemény (83) megjelent az RDW és a krónikus szívelégtelenség kapcsolatáról, legalább öt tanulmány (köztük munkacsoportunk korábbi, egyéves utánkötéses vizsgálata) igazolta a kapcsolatot különböző időtartamú utánkötések alapján (52, 82, 84, 100, 101). Számos vizsgálat igazolta az RDW prognosztikai szerepét koronária betegségben, akut és krónikus szívelégtelenségben, valamint a teljes populáció szintjén is (48). Három tanulmány kimutatta, hogy az RDW a szívelégtelenség hosszú távú kimenetelének felmérésére is alkalmas (82-84). Ezekben a vizsgálatokban a követési idő átlagosan 4 év volt. Vizsgálatunkban megerősítettük az RDW szerepét a hosszú távú prognózis becslésben. Az ötéves utánkötés eredménye alapján az RDW-t szignifikáns és független (életkortól, vesefunkciótól, hemoglobintól, diasztolés vérnyomástól, szérum nátriumtól és az NT-proBNP-től független) prediktornak találtuk a szívelégtelen betegek esetén. A szívelégtelen betegek körében a jelen vizsgálatban is láthattuk a BMI és túlélés kapcsán észlelt látszólagos ellentmondást, mely az irodalomból jól ismert obezitás paradoxon néven. E szerint a kissé túlsúlyos betegek túlélése jobb. A szérum nátrium szintek arra utalnak, hogy jelentős dilúció nem volt a szívelégtelen betegpopulációban, amely megfelel a NYHA stádiumeloszlásnak is. A szívfrekvencia normál tartományban volt mind a túlélő, mind a nem túlélő csoportban, mely a bétablokkolóval történő kezelésnek köszönhető.

6.5. A HSP70 szívelégtelen betegek esetén

Amint a bevezetőben említettük, több tanulmány is igazolta, hogy a HSP70 emelkedése kimutatható a keringésben a szervezetet ért különböző stresszhatások következtében (37-39). Genth-Zotz és mtsai kimutatták, hogy a HSP70 szoros kapcsolatban van a betegség súlyosságával, ennek ellenére a túléléssel való összefüggését eddig nem sikerült igazolni (35). Ennek több oka is lehetett: pl. alacsony esetszám, valamint a nem megfelelő kimutatási technika (Genth-Zotz és mtsai a HSP70-et analitikai okokból a szívelégtelen betegek csupán 41%-ában tudták megmérni).

Munkacsoportunk ezt követően szintén kimutatta, hogy a HSP70 kapcsolatban van a szívelégtelenség súlyosságával (8), s vizsgálatunk során a megfelelően szenzitív immunassay alkalmazásával a HSP70 minden beteg minden mintájában mérhető volt. Jelen munkánk során sikerült bizonyítani, hogy a HSP70 szint szignifikáns prognosztikai marker az 5 éves túlélésre vonatkozóan. Összességében elmondható, hogy vizsgálatunkban a magas (medián fölötti) HSP70 szint szignifikáns prognosztikai markere az 5 éves halálozásnak, függetlenül az életkortól, nemtől, BMI-től, kreatinin szintektől és a betegség súlyosságától is (az NT-proBNP-től vagy a balkamrai EF-től).

Az emelkedett HSP70 szint kapcsolatban állhat a szívelégtelenségben jelen lévő, hipoxia okozta sejtszintű károsodásokkal. A hipoxia többek között oxidatív stresszt, gyulladást, valamint hőshock választ és remodellációt indít el. A HSP70, mint a komplex stresszválasz markere, szoros kapcsolatban áll a szívelégtelenség súlyosságával, nevezetesen a balkamrai ejekciós frakcióval és az NT-proBNP-vel (8). További magyarázat lehet, hogy a neurohormonális rendszer aktiválódik, valamint a katekolamin szintek emelkednek szívelégtelenségben, és ezek potenciálisan indukálják a hőshock (stressz) választ, melyet a HSP70 emelkedése jelez (102, 103).

A HSP70-nel kibővített prognosztikai modell statisztikai elemzése során azt találtuk, hogy a modell kalibráció nem volt megfelelő a HSP70-nel kibővített modellben, habár a modell jellemzői javultak és az NRI is szignifikáns javulást mutatott. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a HSP70 nem egyértelműen alkalmas biomarker a szívelégtelenség hosszú távú prognózis becslésére, ezért további független vizsgálatokra van szükség.

6.6. Az új biomarkerek statisztikai értékelése

Vizsgálatunk eredménye felhívja a figyelmet arra, hogy a klinikai kutatások során feltárt új prognosztikai faktorokat gondosan meg kell vizsgálni és kritikusan kell kezelni mindaddig, míg bizonyításra nem kerül, mekkora a valódi klinikai haszon, amelyet az adott marker a gyakorlati felhasználásban jelenthet.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a szívelégtelenség vizsgálatban javult a modell, amikor új markerrel (RDW, HSP70) egészítettük ki a referencia modellt, hiszen növekedett a Nagelkerke féle R^2 , és ezzel párhuzamosan csökkent a Brier pontszám (11. táblázat). A bemutatott elemzés megerősítette azt, hogy az RDW valóban fontos a szívelégtelen betegek prognózis becslésében. Az NRI és az IDI szignifikáns értékei alapján állíthatjuk, hogy az RDW mérésével a szívelégtelen betegek túlélését jobban előre lehet jelezni. A HSP70 példáján bemutattuk azt is, hogy hiába szignifikáns egy adott prognosztikai marker az adjusztált Cox regresszió elemzésben, az még nem jelenti, hogy ebből valós klinikai előny, pontosabb rizikóbecslés is származik. Az észlelt NRI növekedés azt jelzi, hogy a HSP70-nel kibővített modell jobban diszkriminál. Ezt azonban cáfolja az IDI elemzés, melyben a növekedés nem volt szignifikáns. Láthatjuk tehát, hogy bizonyos esetekben előfordulhat, hogy a különböző tesztek ellentmondásosak, ilyenkor mindenképpen körültekintően meg kell vizsgálni az összes aspektust és csak így nyilatkozhatunk a markerről. Megnyugtató eredményre akkor jutunk, ha további független validáló vizsgálatokat is végzünk. Ez a helyzet a 70 kDa-os hősokkfehérje esetén is. Független vizsgálatok alapján egyértelműen eldönthető lesz majd a klinikai jelentősége a szívelégtelenség prognózisában.

Eredményeink megerősítik továbbá azt a megfigyelést (69, 70), hogy a ROC elemzés során számított görbe alatti terület (AUC) növekedése kevésbé érzékeny módszer, hiszen a DeLong teszt, mely az AUC növekedést teszteli, egyik elemzésben sem volt szignifikáns, míg az NRI mindkét esetben szignifikáns javulást jelzett a modell diszkriminatív képességét tekintve. Másrészt viszont, kizárólag az NRI alapján túlzottan optimista következtetéseket vonhatnánk le, ahogy ezt a HSP70 példáján láttuk, ill. ahogy ezt már Hilden és mtsai is megfigyelték (104).

Figyelemre méltó azonban, hogy vizsgálatunkban a szívelégtelen betegeknél az RDW hozzáadása a ROC görbe alatti területét 0.02-vel növelte meg, amely érték

pontosan ugyanannyi, mint az NT-proBNP okozta javulás a Seattle Heart Failure modellben ötéves utánkövetés esetén (60). Ezt különösen azért fontos látni, mivel vizsgálatunkban az alapmodell már tartalmazta az NT-proBNP-t is. Vizsgálatunkban a két alapmodell különbségéből adódó torzítást kiküszöböltük azáltal, hogy az alapmodellek felcserélésével is elvégeztük a reklassifikációs elemzéseket, és lényegében azonos eredményeket kaptunk (11. táblázat). Az alapmodelltől függetlenül az AUC mindkét marker esetében nem szignifikáns módon emelkedett, a Nagelkerke féle R^2 emelkedett, a Brier pontszám csökkent, a Cox regresszió értékei pedig nem változtak meg érdemben. Az NRI értékek az alapmodelltől függetlenül mindkét marker esetében szignifikáns javulást jeleztek, míg az IDI a HSP70 esetében továbbra sem volt szignifikáns, az alapmodell csere ellenére sem. Egyetlen különbség, hogy a kalibráció az alapmodellek cseréje után már mindkét esetben megfelelő volt. Ezek alapján tehát azt látjuk, hogy az általunk használt alapmodellek különbsége lényegesen nem befolyásolja az eredményeket.

Az RDW és HSP70 klinikai értékét az NT-proBNP-hez viszonyítva is megadtuk (12. táblázat) és kiszámoltuk a szenzitivitást, a specificitást, a pozitív prediktív és negatív prediktív értékeket különböző vágópontok mellett (13. és 14. táblázat). Azt láttuk, hogy a legjobb modell az, mely az RDW-t és az NT-proBNP-t tartalmazza, itt a szenzitivitás 62.7%, a specificitás 82.4%. Ehhez képest a HSP70 hozzáadása már nem javítja érdemben a túlélést becselő modellt. Ezek az eredmények az RDW-t illetően igen biztatóak, tekintve, hogy az RDW egy könnyen, gyorsan, széles körben, olcsón elérhető laborparaméter.

Az új prognosztikai faktorokat kritikusan kell kezelni mindaddig, míg bizonyításra nem kerül, mekkora a valódi klinikai haszon, amely az adott marker vizsgálatából származhat. A hasznosságot a prognosztikai modellen történő javítás során tesztelhetjük a reklassifikáció módszereivel, azonban érdemes több tesztet végezni és azokat együttesen értékelni. Mindezekén túl a független megerősítő és validáló klinikai vizsgálatok szerepe igen fontos.

6.7. A vizsgálat korlátai és kitekintés

Vizsgálatunk kétségtelen korlátja, hogy egy centrumból kerültek ki a betegek, illetve néhány vonatkozásban az esetszám nem volt elegendően magas a további érdekes analízisekhez, bizonyos alcsoportok önálló vizsgálatához. Az alacsony elemszám ellenére megállapíthatjuk, hogy a Kaplan-Meier tesztnél a statisztikai erő minden esetben megfelelőnek adódott (3 elemzésben a $\text{power} \leq 0.9$, $\alpha = 0.05$ mellett, a komplement aktiváció újraélesztett betegek esetén: $\text{power} = 0.8$, $\alpha = 0.05$ mellett). Az alacsony elemszám az újraélesztett betegek vizsgálatában nem tette lehetővé a modell kalibráció és diszkrimináció megfelelő értékelését, így az új prognosztikai markerek klinikai jelentőségét nem lehetett a szívelégtelen betegek vizsgálatához hasonlóan elemezni. Az újraélesztett betegekkel kapcsolatos prospektív nagy elemszámú elemzéseket, a beválogatás nehézségei miatt, csak multicentrikus vizsgálatok keretében lehetne elérni.

A kis esetszám és az azonos kezelési centrum viszont biztosította a diagnózisok, a kezelési módok és a szubjektív tünetek homológ megítélését, a mintakezelés egységességét. Eredményeinket gondolatébresztőnek és figyelemfelhívónak tartjuk, amelyek segíthetnek a további kutatási irányvonalak meghatározásában, és a prognosztikai markerek kritikus értékelésében.

A kapott új eredmények validálásához a továbbiakban multicentrikus, független megerősítő és validáló vizsgálatokra valamint költséghatékonyság becslésre lesz szükség.

7. Következtetések

1. Korai prognosztikai markerek keresése az újraélesztett betegek esetén

A HSP70 prognosztikai szerepe

Vizsgálataink alapján az újraélesztett betegek első 24 órás ellátása során észlelt tartósan magas HSP70 értéke független prognosztikai markernek bizonyult a 30 napos túlélés szempontjából. A HSP70 feltehetőleg egy komplex, szervezet szintű stresszválasz része, mivel kapcsolatot mutatott az akut fázis reakció, a gyulladás és az endotélsejt aktiváció biomarkereivel.

A komplement aktiváció prognosztikai szerepe

Az irodalmi adatoknak megfelelően az általunk végzett vizsgálatban is megfigyelhető volt a komplement aktiváció az újraélesztett betegekben. A komplement aktivációt jelző C3a/C3 hányadost szignifikáns, életkortól, nemtől és a súlyosságot jelző APACHE II pontszámtól független prognosztikai markernek találtuk az újraélesztett betegek rövid távú (30 napos) halálozásának vonatkozásában.

2. A hosszú távú túlélés becslése szívelégtelen betegekben

Az RDW prognosztikai szerepe

Eredményeink alapján elmondható, hogy az RDW a szívelégtelen betegek hosszú távú prognózis becslésére alkalmas új biomarker, melynek emelkedett szintje az életkortól, vesefunkciótól, hemoglobintól, diasztolés vérnyomástól, szérum nátriumtól és az NT-proBNP-től függetlenül jelzi a rossz kimenetelt, és ezen kívül alkalmazásával a korábbi modellekhez képest szignifikánsan jobb prognosztikai becslés érhető el, melyet a reklasszifikációs módszerekkel egzakt módon igazoltunk.

A HSP70 prognosztikai szerepe

Vizsgálatunkban a magas (medián fölötti) HSP70 szint szignifikáns prognosztikai markerének bizonyult a szívelégtelen betegek 5 éves halálozására vonatkozóan. A vizsgált hősokkfehérje prognosztikai értéke független az életkortól, a

nemtől, a BMI-től, a kreatinin szintektől és a betegség súlyosságától is (NT-proBNP vagy balkamrai EF). Reklassifikációs módszer alkalmazásával nem volt egyértelműen igazolható szívelégtelenségben a HSP70 klinikai prognosztikai értéke.

3. Prognosztikai markerek valódi klinikai hasznosságának felmérése

A prognosztikai modell további statisztikai értékelése az újraélesztett betegek csoportjában az alacsony esetszám miatt nem volt értékelhető. A szívelégtelen betegek esetén megfigyeltük, hogy javult a prognosztikai modell, amikor új markerrel (RDW, HSP70) egészítettük ki a referencia modellt, hiszen növekedett a Nagelkerke féle R^2 , és ezzel párhuzamosan csökkent a Brier pontszám, amely definíció szerint jobb „modell performance” –t jelent. Az NRI és az IDI szignifikáns értéke alapján állíthatjuk, hogy az RDW mérésével a szívelégtelen betegek túlélését jobban előre lehet jelezni. A HSP70 példáján bemutattuk azt is, hogy hiába szignifikáns egy adott prognosztikai marker az adjusztált Cox regresszió elemzésben, az még nem jelenti azt, hogy ebből valós klinikai előny, pontosabb rizikóbecslés is származik. Példánkban a HSP70-nel kibővített prognosztikai modell statisztikai elemzése során azt találtuk, hogy a modell kalibráció nem volt megfelelő a HSP70-nel kibővített modellben, az IDI nem mutatott szignifikáns növekedést, habár a modell jellemzői javultak és az NRI is szignifikáns eredményt mutatott. Az új prognosztikai faktorokat kritikusan kell kezelni mindaddig, míg bizonyításra nem kerül, mekkora a valódi klinikai haszon, amely az adott marker használatából származhat.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: Napjaink klinikai kutatásainak egyik fő iránya a megbetegedések hátterében álló rizikófaktorok azonosítása. Közlemények százai számolnak be „szignifikáns” és „független” prognosztikai faktorokról különböző humán megbetegedésekben, azonban a közlemények egy részében nem, vagy nem megfelelően vizsgálták, hogy az új prognosztikai faktor javította-e, és ha igen, milyen mértékben az addig ismert prognosztikai modellt. A legújabb statisztikai módszertani ajánlások szerint az ún. reklassifikációs analízis az az eljárás, amellyel a fenti kérdést érdemben vizsgálni lehet. Vizsgálatunk egyik célja prognosztikai markerek keresése volt újraélesztett betegek, valamint szívelégtelen betegek esetén. A dolgozat másik célja bemutatni azon újabb statisztikai megközelítéseket, melyek segítségével lehetséges az ígéretesnek tűnő prognosztikai markerek további értékelése, valamint ezen statisztikai módszerekkel értékelni az általunk vizsgált prognosztikai faktorokat.

Módszerek: Újraélesztett és krónikus szívelégtelen betegek esetén végzett két prospektív kardiovaszkuláris klinikai vizsgálat elemzése során kerestünk lehetséges prognosztikai markereket. Az első esetben újraélesztett betegek körében az extracelluláris 70kDa-os hősokkfehérjét (HSP70) és a komplement aktivációt (C3a/C3) vizsgáltuk. A második esetben két marker, a vörösvértest átmérő eloszlás szélessége (RDW) és a szérum HSP70 prognosztikai szerepét vizsgáltuk krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegek körében.

Eredmények: A többváltozós Cox regressziós vizsgálatok alapján mindegyik felsorolt marker szignifikáns, független prognosztikai markernek bizonyult. A szívelégtelen betegek esetén a nagy elemszám lehetővé tette, hogy újraértékeljük a markerek szerepét reklassifikációs tesztekkel. A szívelégtelen betegek prognosztikai modelljének diszkriminatív képessége lényegesen javult a korábbi modellhez képest, ha az RDW -vel egészítettük ki a modellt, míg a HSP70 esetén ez a javulás nem egyértelmű.

Következtetés: Az új prognosztikai faktorokat kritikusan kell kezelni mindaddig, míg alkalmas vizsgálatokkal elemzésre és bizonyításra nem kerül, mekkora a valós klinikai haszon, amely a marker a már ismert prognosztikai modellhez való hozzáadásából származik. A hasznosságot a prognosztikai modell javulása során tesztelhetjük a reklassifikáció módszereivel.

9. SUMMARY

Introduction: Identification of risk factors is one of the most frequent questions in current medical research. Hundreds of reports show data about “significant” and “independent” prognostic factors in a variety of human diseases. However, these factors were not properly tested whether the novel prognostic factor indeed enhanced - if so then to what extent - the then known prognostic model. According to the suggestions of the most recent statistical approaches the so-called reclassification analysis is the procedure which can truly be applied with regard to the above issue. One of the aims of our work was to find prognostic markers in resuscitated patients and in chronic heart failure patients. The second aim of the present paper was to present these novel statistical approaches with the help of which the further evaluation of significant prognostic factors is enabled; as well as to use these statistical methods to assess the prognostic factors observed by us.

Methods: We analysed the prognostic role of biomarkers in two prospective cardiovascular studies: in a successfully resuscitated and in a chronic heart failure cohort. In the case of post cardiac arrest study heat shock protein 70 (HSP70) and complement activation (C3a/C3), whereas in patients with chronic heart failure red cell distribution width (RDW) and HSP70 were tested.

Results: Using multivariate Cox regression analyses we have found that all of the mentioned markers were significant and independent predictors. In the chronic heart failure study the great number of patients made it possible for us to re-analyse the role of RDW and HSP70 by means of reclassification tests. We found a significant improvement in the discrimination ability of the prognostic model in patients with chronic heart failure - when we incorporated RDW into the reference model. On the other hand, the reclassification analysis provided ambiguous results at HSP70.

Conclusion: Interpretation of results on new prognostic factors has to be done carefully, until appropriate analysis and proving have confirmed the clinical usefulness of the marker, its degree that results from being added to the known model. The usefulness can be tested by the methods of reclassification, during the improvement of the prognostic model.

10. Irodalomjegyzék

1. Shinozaki, K., S. Oda, T. Sadahiro, M. Nakamura, Y. Hirayama, R. Abe, Y. Tateishi, N. Hattori, T. Shimada, and H. Hirasawa. (2009) S-100B and neuron-specific enolase as predictors of neurological outcome in patients after cardiac arrest and return of spontaneous circulation: a systematic review. *Crit Care*, 13: R121.
2. Kampinga, H. H., J. Hageman, M. J. Vos, H. Kubota, R. M. Tanguay, E. A. Bruford, M. E. Cheetham, B. Chen, and L. E. Hightower. (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, 14: 105-111.
3. Daugaard, M., M. Rohde, and M. Jaattela. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*, 581: 3702-3710.
4. Hecker, J. G., and M. McGarvey. (2011) Heat shock proteins as biomarkers for the rapid detection of brain and spinal cord ischemia: a review and comparison to other methods of detection in thoracic aneurysm repair. *Cell Stress Chaperones*, 16: 119-131.
5. Pockley, A. G., J. Shepherd, and J. M. Corton. (1998) Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest*, 27: 367-377.
6. Asea, A. (2007) Mechanisms of HSP72 release. *J Biosci*, 32: 579-584.
7. Henderson, B., and A. G. Pockley. (2010) Molecular chaperones and protein-folding catalysts as intercellular signaling regulators in immunity and inflammation. *J Leukoc Biol*, 88: 445-462.
8. Gombos, T., Z. Forhecz, Z. Pozsonyi, L. Janoskuti, and Z. Prohaszka. (2008) Interaction of serum 70-kDa heat shock protein levels and HspA1B (+1267) gene polymorphism with disease severity in patients with chronic heart failure. *Cell Stress Chaperones*, 13: 199-206.
9. da Rocha, A. B., C. Zanoni, G. R. de Freitas, C. Andre, S. Himelfarb, R. F. Schneider, I. Grivicich, L. Borges, G. Schwartzmann, M. Kaufmann, and A. Regner. (2005) Serum Hsp70 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. *J Neurotrauma*, 22: 966-977.

10. Turner, M. W. (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*, 17: 532-540.
11. Dunkelberger, J. R., and W. C. Song. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20: 34-50.
12. Sarma, J. V., and P. A. Ward. (2011) The complement system. *Cell Tissue Res*, 343: 227-235.
13. Gorsuch, W. B., E. Chrysanthou, W. J. Schwaeble, and G. L. Stahl. (2012) The complement system in ischemia-reperfusion injuries. *Immunobiology*, 217: 1026-1033.
14. Bottiger, B. W., J. Motsch, V. Braun, E. Martin, and M. Kirschfink. (2002) Marked activation of complement and leukocytes and an increase in the concentrations of soluble endothelial adhesion molecules during cardiopulmonary resuscitation and early reperfusion after cardiac arrest in humans. *Crit Care Med*, 30: 2473-2480.
15. Nolan, J. P., C. D. Deakin, J. Soar, B. W. Bottiger, and G. Smith. (2005) European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation*, 67 Suppl 1: S39-86.
16. Bisschops, L. L., C. W. Hoedemaekers, T. E. Mollnes, and J. G. van der Hoeven. (2012) Rewarming after hypothermia after cardiac arrest shifts the inflammatory balance. *Crit Care Med*, 40: 1136-1142.
17. Lindsberg, P. J., J. Ohman, T. Lehto, M. L. Karjalainen-Lindsberg, A. Paetau, T. Wuorimaa, O. Carpen, M. Kaste, and S. Meri. (1996) Complement activation in the central nervous system following blood-brain barrier damage in man. *Ann Neurol*, 40: 587-596.
18. Pedersen, E. D., U. Waje-Andreassen, C. A. Vedeler, G. Aamodt, and T. E. Mollnes. (2004) Systemic complement activation following human acute ischaemic stroke. *Clin Exp Immunol*, 137: 117-122.
19. Mocco, J., D. A. Wilson, R. J. Komotar, M. E. Sughrue, K. Coates, R. L. Sacco, M. S. Elkind, and E. S. Connolly, Jr. (2006) Alterations in plasma complement levels after human ischemic stroke. *Neurosurgery*, 59: 28-33; discussion 28-33.
20. Cervera, A., A. M. Planas, C. Justicia, X. Urrea, J. C. Jensenius, F. Torres, F. Lozano, and A. Chamorro. (2010) Genetically-defined deficiency of mannose-

binding lectin is associated with protection after experimental stroke in mice and outcome in human stroke. *PLoS One*, 5: e8433.

21. Golan, E., K. Barrett, A. S. Alali, A. Duggal, D. Jichici, R. Pinto, L. Morrison, and D. C. Scales. (2014) Predicting Neurologic Outcome After Targeted Temperature Management for Cardiac Arrest: Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med*, 42(8):1919-30.
22. Deakin, C. D., J. P. Nolan, J. Soar, K. Sunde, R. W. Koster, G. B. Smith, and G. D. Perkins. (2010) European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation*, 81: 1305-1352.
23. Greer, D. M., E. S. Rosenthal, and O. Wu. (2014) Neuroprognostication of hypoxic-ischaemic coma in the therapeutic hypothermia era. *Nat Rev Neurol*, 10: 190-203.
24. Oddo, M., and A. O. Rossetti. (2011) Predicting neurological outcome after cardiac arrest. *Curr Opin Crit Care*, 17: 254-259.
25. Friberg, H., M. Rundgren, E. Westhall, N. Nielsen, and T. Cronberg. (2013) Continuous evaluation of neurological prognosis after cardiac arrest. *Acta Anaesthesiol Scand*, 57: 6-15.
26. Wojtczak-Soska, K., and M. Lelonek. (2010) S-100B protein: An early prognostic marker after cardiac arrest. *Cardiol J*, 17: 532-536.
27. Swedberg, K., J. Cleland, H. Dargie, H. Drexler, F. Follath, M. Komajda, L. Tavazzi, O. A. Smiseth, A. Gavazzi, A. Haverich, A. Hoes, T. Jaarsma, J. Korewicki, S. Levy, C. Linde, J. L. Lopez-Sendon, M. S. Nieminen, L. Pierard, and W. J. Remme. (2005) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26: 1115-1140.
28. Hunt, S. A., W. T. Abraham, M. H. Chin, A. M. Feldman, G. S. Francis, T. G. Ganiats, M. Jessup, M. A. Konstam, D. M. Mancini, K. Michl, J. A. Oates, P. S. Rahko, M. A. Silver, L. W. Stevenson, C. W. Yancy, E. M. Antman, S. C. Smith, Jr., C. D. Adams, J. L. Anderson, D. P. Faxon, V. Fuster, J. L. Halperin, L. F. Hiratzka, A. K. Jacobs, R. Nishimura, J. P. Ornato, R. L. Page, and B. Riegel. (2005) ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and

- Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*, 112: e154-235.
29. Adams, KF, Lindenfeld J, Arnold JMO, Baker DW, Barnard DH, Baughman KL, Boehmer JP, Deedwania P, Dunbar SB, Elkayam U, Gheorghiade M, Howlett JG, Konstam MA, Kronenberg MW, Massie BM, Mehra MR, Miller AB, Moser DK, Patterson JH, Rodeheffer RJ, Sackner-Bernstein J, Silver MA, Starling RC, Stevenson LW, Wagoner LE. (2006) Executive summary: HFSA 2006 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J Card Fail*, 12: 10-38.
 30. McMurray, J. J., S. Adamopoulos, S. D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M. A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Kober, G. Y. Lip, A. P. Maggioni, A. Parkhomenko, B. M. Pieske, B. A. Popescu, P. K. Ronnevik, F. H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P. T. Trindade, A. A. Voors, F. Zannad, A. Zeiher, J. J. Bax, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, Z. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, L. A. Bonet, P. Avraamides, H. A. Ben Lamin, M. Brignole, A. Coca, P. Cowburn, H. Dargie, P. Elliott, F. A. Flachskampf, G. F. Guida, S. Hardman, B. Iung, B. Merkely, C. Mueller, J. N. Nanas, O. W. Nielsen, S. Orn, J. T. Parissis, and P. Ponikowski. (2012) ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*, 14: 803-869.
 31. Deedwania, P. C., and E. Carbajal. (2012) Evidence-based therapy for heart failure. *Med Clin North Am*, 96: 915-931.

32. Nagy, V. (2013) Epidemiology and treatment of chronic heart failure; use of bisoprolol. *Orv Hetil*, 154: 1731-1734.
33. Mosterd, A., and A. W. Hoes. (2007) Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 93: 1137-1146.
34. Pugh, P. J., R. D. Jones, T. H. Jones, and K. S. Channer. (2002) Heart failure as an inflammatory condition: potential role for androgens as immune modulators. *Eur J Heart Fail*, 4: 673-680.
35. Genth-Zotz, S., A. P. Bolger, P. R. Kalra, S. von Haehling, W. Doehner, A. J. Coats, H. D. Volk, and S. D. Anker. (2004) Heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure: relation to disease severity and survival. *Int J Cardiol*, 96: 397-401.
36. Giannessi, D., C. Colotti, M. Maltinti, S. Del Ry, C. Prontera, S. Turchi, A. Labbate, and D. Neglia. (2007) Circulating heat shock proteins and inflammatory markers in patients with idiopathic left ventricular dysfunction: their relationships with myocardial and microvascular impairment. *Cell Stress Chaperones*, 12: 265-274.
37. Wei, Y. J., Y. X. Huang, Y. Shen, C. J. Cui, X. L. Zhang, H. Zhang, and S. S. Hu. (2009) Proteomic analysis reveals significant elevation of heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*, 332: 103-111.
38. Dybdahl, B., S. A. Slordahl, A. Waage, P. Kierulf, T. Espevik, and A. Sundan. (2005) Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart*, 91: 299-304.
39. Satoh, M., Y. Shimoda, T. Akatsu, Y. Ishikawa, Y. Minami, and M. Nakamura. (2006) Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*, 8: 810-815.
40. Zhang, X., Z. Xu, L. Zhou, Y. Chen, M. He, L. Cheng, F. B. Hu, R. M. Tanguay, and T. Wu. (2010) Plasma levels of Hsp70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of acute coronary syndrome. *Cell Stress Chaperones*, 15: 675-686.

41. Krepuska, M., Z. Szeberin, P. Sotonyi, H. Sarkadi, M. Fehervari, A. Apor, E. Rimely, Z. Prohaszka, and G. Acsady. (2011) Serum level of soluble Hsp70 is associated with vascular calcification. *Cell Stress Chaperones*, 16: 257-265.
42. Kosiborod, M., G. L. Smith, M. J. Radford, J. M. Foody, and H. M. Krumholz. (2003) The prognostic importance of anemia in patients with heart failure. *Am J Med*, 114: 112-119.
43. Anker, S. D., J. Comin Colet, G. Filippatos, R. Willenheimer, K. Dickstein, H. Drexler, T. F. Luscher, B. Bart, W. Banasiak, J. Niegowska, B. A. Kirwan, C. Mori, B. von Eisenhart Rothe, S. J. Pocock, P. A. Poole-Wilson, and P. Ponikowski. (2009) Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency. *N Engl J Med*, 361: 2436-2448.
44. Nanas, J. N., C. Matsouka, D. Karageorgopoulos, A. Leonti, E. Tsolakis, S. G. Drakos, E. P. Tsagalou, G. D. Maroulidis, G. P. Alexopoulos, J. E. Kanakakis, and M. I. Anastasiou-Nana. (2006) Etiology of anemia in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 48: 2485-2489.
45. Bessman, J. D., P. R. Gilmer, Jr., and F. H. Gardner. (1983) Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol*, 80: 322-326.
46. Park, K. I., and K. Y. Kim. (1987) Clinical evaluation of red cell volume distribution width (RDW). *Yonsei Med J*, 28: 282-290.
47. Evans, T. C., and D. Jehle. (1991) The red blood cell distribution width. *J Emerg Med*, 9 Suppl 1: 71-74.
48. Montagnana, M., G. Cervellin, T. Meschi, and G. Lippi. (2012) The role of red blood cell distribution width in cardiovascular and thrombotic disorders. *Clin Chem Lab Med*, 50: 635-641.
49. Aung, N., H. Z. Ling, A. S. Cheng, S. Aggarwal, J. Flint, M. Mendonca, M. Rashid, S. Kang, S. Weissert, C. J. Coats, T. Richards, M. Thomas, S. Woldman, and D. O. Okonko. (2013) Expansion of the red cell distribution width and evolving iron deficiency as predictors of poor outcome in chronic heart failure. *Int J Cardiol*, 168: 1997-2002.
50. Cauthen, C. A., W. Tong, A. Jain, and W. H. Tang. (2012) Progressive rise in red cell distribution width is associated with disease progression in ambulatory patients with chronic heart failure. *J Card Fail*, 18: 146-152.

51. Holmstrom, A., R. Sigurjonsdottir, O. Hammarsten, D. Gustafsson, M. Petzold, and M. L. Fu. (2012) Red blood cell distribution width and its relation to cardiac function and biomarkers in a prospective hospital cohort referred for echocardiography. *Eur J Intern Med*, 23: 604-609.
52. Forhecz, Z., T. Gombos, G. Borgulya, Z. Pozsonyi, Z. Prohaszka, and L. Janoskuti. (2009) Red cell distribution width in heart failure: prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state. *Am Heart J*, 158: 659-666.
53. Kannel, W. B., T. R. Dawber, A. Kagan, N. Revotskie, and J. Stokes, 3rd. (1961) Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*, 55: 33-50.
54. Kannel, W. B., D. McGee, and T. Gordon. (1976) A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol*, 38: 46-51.
55. Knaus, W. A., E. A. Draper, D. P. Wagner, and J. E. Zimmerman. (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 13: 818-829.
56. Lip, G. Y., R. Nieuwlaat, R. Pisters, D. A. Lane, and H. J. Crijns. (2010) Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest*, 137: 263-272.
57. Nashef, S. A., F. Roques, L. D. Sharples, J. Nilsson, C. Smith, A. R. Goldstone, and U. Lockowandt. (2012) EuroSCORE II. *Eur J Cardiothorac Surg*, 41: 734-744; discussion 744-735.
58. Aaronson, K. D., J. S. Schwartz, T. M. Chen, K. L. Wong, J. E. Goin, and D. M. Mancini. (1997) Development and prospective validation of a clinical index to predict survival in ambulatory patients referred for cardiac transplant evaluation. *Circulation*, 95: 2660-2667.
59. Levy, W. C., D. Mozaffarian, D. T. Linker, S. C. Sutradhar, S. D. Anker, A. B. Cropp, I. Anand, A. Maggioni, P. Burton, M. D. Sullivan, B. Pitt, P. A. Poole-Wilson, D. L. Mann, and M. Packer. (2006) The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure. *Circulation*, 113: 1424-1433.

60. May, H. T., B. D. Horne, W. C. Levy, A. G. Kfoury, K. D. Rasmusson, D. T. Linker, D. Mozaffarian, J. L. Anderson, and D. G. Renlund. (2007) Validation of the Seattle Heart Failure Model in a community-based heart failure population and enhancement by adding B-type natriuretic peptide. *Am J Cardiol*, 100: 697-700.
61. Martin, M. J., S. B. Hulley, W. S. Browner, L. H. Kuller, and D. Wentworth. (1986) Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet*, 2: 933-936.
62. Abd, T. T., D. J. Eapen, A. Bajpai, A. Goyal, A. Dollar, and L. Sperling. (2011) The role of C-reactive protein as a risk predictor of coronary atherosclerosis: implications from the JUPITER trial. *Curr Atheroscler Rep*, 13: 154-161.
63. Rietzschel, E., and M. De Buyzere. (2012) High-sensitive C-reactive protein: universal prognostic and causative biomarker in heart disease? *Biomark Med*, 6: 19-34.
64. Sundstrom, J., L. Byberg, R. Gedeberg, K. Michaelsson, and L. Berglund. (2011) Useful tests of usefulness of new risk factors: tools for assessing reclassification and discrimination. *Scand J Public Health*, 39: 439-441.
65. Schumacher, M., H. Binder, and T. Gerds. (2007) Assessment of survival prediction models based on microarray data. *Bioinformatics*, 23: 1768-1774.
66. Oldenhuis, C. N., S. F. Oosting, J. A. Gietema, and E. G. de Vries. (2008) Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*, 44: 946-953.
67. Pencina, M. J., R. B. D'Agostino, Sr., R. B. D'Agostino, Jr., and R. S. Vasan. (2008) Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med*, 27: 157-172; discussion 207-112.
68. Uno, H., L. Tian, T. Cai, I. S. Kohane, and L. J. Wei. (2013) A unified inference procedure for a class of measures to assess improvement in risk prediction systems with survival data. *Stat Med*, 32: 2430-2442.
69. Zethelius, B., L. Berglund, J. Sundstrom, E. Ingelsson, S. Basu, A. Larsson, P. Venge, and J. Arnlov. (2008) Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*, 358: 2107-2116.

70. Pepe, M. S., H. Janes, G. Longton, W. Leisenring, and P. Newcomb. (2004) Limitations of the odds ratio in gauging the performance of a diagnostic, prognostic, or screening marker. *Am J Epidemiol*, 159: 882-890.
71. Hlatky, M. A., P. Greenland, D. K. Arnett, C. M. Ballantyne, M. H. Criqui, M. S. Elkind, A. S. Go, F. E. Harrell, Jr., Y. Hong, B. V. Howard, V. J. Howard, P. Y. Hsue, C. M. Kramer, J. P. McConnell, S. L. Normand, C. J. O'Donnell, S. C. Smith, Jr., and P. W. Wilson. (2009) Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 119: 2408-2416.
72. Steyerberg, E. W., A. J. Vickers, N. R. Cook, T. Gerds, M. Gonen, N. Obuchowski, M. J. Pencina, and M. W. Kattan. (2010) Assessing the performance of prediction models: a framework for traditional and novel measures. *Epidemiology*, 21: 128-138.
73. Cook, N. R., and P. M. Ridker. (2009) Advances in measuring the effect of individual predictors of cardiovascular risk: the role of reclassification measures. *Ann Intern Med*, 150: 795-802.
74. Yates, J. F. (1982). External correspondence: Decompositions of the mean probability score. *Organizational Behavior and Human Performance*, 30: 132-156.
75. Pencina, M. J., R. B. D'Agostino, Sr., and E. W. Steyerberg. (2011) Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Stat Med*, 30: 11-21.
76. Hilden, J., J. D. Habbema, and B. Bjerregaard. (1978) The measurement of performance in probabilistic diagnosis. II. Trustworthiness of the exact values of the diagnostic probabilities. *Methods Inf Med*, 17: 227-237.
77. Szeplaki, G., R. Szegedi, K. Hirschberg, T. Gombos, L. Varga, I. Karadi, L. Entz, Z. Szeplaki, P. Garred, Z. Prohaszka, and G. Fust. (2009) Strong complement activation after acute ischemic stroke is associated with unfavorable outcomes. *Atherosclerosis*, 204: 315-320.
78. Gombos, T., Z. Forhecz, Z. Pozsonyi, G. Szeplaki, J. Kunde, G. Fust, L. Janoskuti, I. Karadi, and Z. Prohaszka. (2012) Complement anaphylatoxin C3a

- as a novel independent prognostic marker in heart failure. *Clin Res Cardiol*, 101: 607-615.
79. Matsushita, M. (2013) Ficolins in complement activation. *Mol Immunol*, 55: 22-26.
 80. Fust, G., L. Munthe-Fog, Z. Illes, G. Szeplaki, T. Molnar, G. Pusch, K. Hirschberg, R. Szegedi, Z. Szeplaki, Z. Prohaszka, M. O. Skjoedt, and P. Garred. (2011) Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation*, 8: 185.
 81. Prohaszka, Z., L. Munthe-Fog, T. Ueland, T. Gombos, A. Yndestad, Z. Forhecz, M. O. Skjoedt, Z. Pozsonyi, A. Gustavsen, L. Janoskuti, I. Karadi, L. Gullestad, C. P. Dahl, E. T. Askevold, G. Fust, P. Aukrust, T. E. Mollnes, and P. Garred. (2013) Association of ficolin-3 with severity and outcome of chronic heart failure. *PLoS One*, 8: e60976.
 82. Jung, C., B. Fujita, A. Lauten, M. Kiehntopf, F. Kuthe, M. Ferrari, and H. R. Figulla. (2011) Red blood cell distribution width as useful tool to predict long-term mortality in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*, 152: 417-418.
 83. Felker, G. M., L. A. Allen, S. J. Pocock, L. K. Shaw, J. J. McMurray, M. A. Pfeffer, K. Swedberg, D. Wang, S. Yusuf, E. L. Michelson, and C. B. Granger. (2007) Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank. *J Am Coll Cardiol*, 50: 40-47.
 84. Al-Najjar, Y., K. M. Goode, J. Zhang, J. G. Cleland, and A. L. Clark. (2009) Red cell distribution width: an inexpensive and powerful prognostic marker in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 11: 1155-1162.
 85. Le Gall, J. R., S. Lemeshow, and F. Saulnier. (1993) A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 270: 2957-2963.
 86. Kohler, P. F., and H. J. Muller-Eberhard. (1967) Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentrations in the serum of healthy adults. *J Immunol*, 99: 1211-1216.

87. Kundu, S., Y. S. Aulchenko, C. M. van Duijn, and A. C. Janssens. (2011) PredictABEL: an R package for the assessment of risk prediction models. *Eur J Epidemiol*, 26: 261-264.
88. Robin, X., N. Turck, A. Hainard, N. Tiberti, F. Lisacek, J. C. Sanchez, and M. Muller. (2011) pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12: 77.
89. Hosmer, D. W., T. Hosmer, S. Le Cessie, and S. Lemeshow. (1997) A comparison of goodness-of-fit tests for the logistic regression model. *Stat Med*, 16: 965-980.
90. DeLong, E. R., D. M. DeLong, and D. L. Clarke-Pearson. (1988) Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*, 44: 837-845.
91. Jenei, Z. M., T. Gombos, Z. Forhecz, Z. Pozsonyi, I. Karadi, L. Janoskuti, and Z. Prohaszka. (2013) Elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic marker of mortality in patients with heart failure. *Cell Stress Chaperones*, 18: 809-813.
92. Jenei, Z. M., Z. Forhecz, T. Gombos, Z. Pozsonyi, L. Janoskuti, and Z. Prohaszka. (2014) Red cell distribution width as predictive marker in CHF: Testing of model performance by reclassification methods. *Int J Cardiol*, 174(3):783-5
93. Gerds, T. A., T. Cai, and M. Schumacher. (2008) The performance of risk prediction models. *Biom J*, 50: 457-479.
94. Harrell, F. E., Jr., K. L. Lee, and D. B. Mark. (1996) Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med*, 15: 361-387.
95. Obuchowski, N. A. (2003) Receiver operating characteristic curves and their use in radiology. *Radiology*, 229: 3-8.
96. Heagerty, P. J., and Y. Zheng. (2005) Survival model predictive accuracy and ROC curves. *Biometrics*, 61: 92-105.
97. Cook, N. R. (2007) Use and misuse of the receiver operating characteristic curve in risk prediction. *Circulation*, 115: 928-935.

98. Asea, A. (2005) Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev*, 11: 34-45.
99. Adrie, C., M. Adib-Conquy, I. Laurent, M. Monchi, C. Vinsonneau, C. Fitting, F. Fraisse, A. T. Dinh-Xuan, P. Carli, C. Spaulding, J. F. Dhainaut, and J. M. Cavaillon. (2002) Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation*, 106: 562-568.
100. Allen, L. A., G. M. Felker, M. R. Mehra, J. R. Chiong, S. H. Dunlap, J. K. Ghali, D. J. Lenihan, R. M. Oren, L. E. Wagoner, T. A. Schwartz, and K. F. Adams, Jr. (2010) Validation and potential mechanisms of red cell distribution width as a prognostic marker in heart failure. *J Card Fail*, 16: 230-238.
101. Zalawadiya, S. K., H. Zmily, J. Farah, S. Daifallah, O. Ali, and J. K. Ghali. (2011) Red cell distribution width and mortality in predominantly African-American population with decompensated heart failure. *J Card Fail*, 17: 292-298.
102. Moalic, J. M., C. Bauters, D. Himbert, J. Bercovici, C. Mouas, P. Guicheney, M. Baudoin-Legros, L. Rappaport, R. Emanoil-Ravier, V. Mezger, and et al. (1989) Phenylephrine, vasopressin and angiotensin II as determinants of proto-oncogene and heat-shock protein gene expression in adult rat heart and aorta. *J Hypertens*, 7: 195-201.
103. Meng, X., J. M. Brown, L. Ao, A. Banerjee, and A. H. Harken. (1996) Norepinephrine induces cardiac heat shock protein 70 and delayed cardioprotection in the rat through alpha 1 adrenoceptors. *Cardiovasc Res*, 32: 374-383.
104. Hilden, J., and T. A. Gerds. (2013) A note on the evaluation of novel biomarkers: do not rely on integrated discrimination improvement and net reclassification index. *Stat Med*, 33(19):3405-14.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Jenei, Z. M., E. Zima, D. Csuka, L. Munthe-Fog, E. Hein, G. Szeplaki, D. Becker, I. Karadi, Z. Prohaszka, P. Garred, and B. Merkely. (2014) Complement Activation and its Prognostic role in Post-cardiac Arrest Patients. *Scand J Immunol*, 79: 404-409.
2. Jenei, Z. M., and Z. Prohaszka. (2013) Useful tests to assess the clinical usefulness of new prognostic markers: the example of heart failure. *Orv Hetil*, 154: 1374-1380.
3. Jenei, Z. M., T. Gombos, Z. Forhecz, Z. Pozsonyi, I. Karadi, L. Janoskuti, and Z. Prohaszka. (2013) Elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic marker of mortality in patients with heart failure. *Cell Stress Chaperones*, 18: 809-813.
4. Jenei, Z. M., G. Szeplaki, B. Merkely, I. Karadi, E. Zima, and Z. Prohaszka. (2013) Persistently elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic marker in post-cardiac-arrest patients. *Cell Stress Chaperones*, 18: 447-454.

11.2. A disszertációtól független közlemények

1. Kovacs, E., Z. Jenei, A. Horvath, L. Geller, S. Szilagyi, A. Kiraly, L. Molnar, P. Sotonyi, Jr., B. Merkely, and E. Zima. (2011) Physiologic effects of hypothermia. *Orv Hetil*, 152: 171-181.

12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Prohászka Zoltán Professzor Úrnak, valamint Zima Endre Docens Úrnak, hogy munkámat irányították és maximálisan segítették. Hálával tartozom mindkettejüknek, amiért megszerettették velem a kutatói munkát, és általuk megismerhettem annak kreatív és izgalmas oldalát.

Hálás vagyok Karádi István és Merkely Béla Professzor Uraknak a lehetőségért és köszönöm Jánoskuti Livia Docens Asszonynak, Dr. Becker Dávid Docens Úrnak, Dr. Förhécz Zsoltnak, Dr. Pozsonyi Zoltánnak és minden munkatársamnak, hogy a klinikai oldalról megteremtették munkám feltételeit, aktív közreműködésükkel és segítségükkel megvalósulhattak a vizsgálatok.

Hálával gondolok Füst György Professzor Úrra, aki hasznos ötletekkel és építő kritikával sokat segített, sajnos azonban e sorok írásakor már nincs közöttünk.

Külön köszönöm Dr. Gombos Tímeának, hogy a dolgozatban bemutatott szívelégtelen betegek vizsgálatából származó adatokat felhasználhattam a további statisztikai elemzésekhez, és köszönöm a sok építő kritikát.

Nagyon köszönöm Dr. Csuka Dorottyának és Dr. Széplaki Gábornak, hogy aktívan hozzájárultak a munkám megvalósításához és sokat segítettek a közlemények lektorálásával. Köszönöm dán kollaborációs partnereiknek: Lea Munthe-Fog-nak, Estrid Hein-nek és Peter Garred-nek az értékes együttműködést. Hálásan köszönöm Szigeti Antalnének, Dóczy Andrásnének, Szendrei Zsuzsannának és Holeczky Rudolfnének a laborban nyújtott minden segítséget. Köszönet illeti Dr. Cervenak Lászlót, Dr. Doleschall Mártont, Dr. Farkas Henriettet, Dr. Szilágyi Ágneszt és Dr. Varga Liliant értékes észrevételeik és javaslataik miatt.

Szeretnék köszönetet mondani a vizsgálatokban részvevő betegeknek, hogy önzetlenül vállalták a kellemetlenségeket.

Végezetül szeretném hálásan megköszönni a családomnak és barátaimnak a sok szeretetet, türelmet, támogatást és biztatást.