

A copeptin és a fikolin-3 prognosztikai szerepének elemzése szívelégtelenségben: öt éves prospektív kohorsz vizsgálat.

Doktori tézisek

Dr. Pozsonyi Zoltán Imre

Semmelweis Egyetem

Elméleti orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Farsang Csaba, MTA doktora, főorvos

Dr. Sármán Beatrix, Ph.D, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Péntes István, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. László Zoltán Ph.D, főorvos

Dr. Kiss Orsolya, Ph.D, egyetemi adjunktus

Dr. Tislér András, Ph.D, egyetemi docens

Budapest, 2015

Bevezetés

A szívelégtelenség prevalenciája, patofiziológiája

A krónikus szívelégtelenség (SZE) gyakori betegség, mely az életminőséget jelentősen rontja, a halálozást növeli, valamint óriási terhet tesz a társadalom vállára. Előfordulása a 1-2%, míg 70 éves kor felett eléri a 10 százalékot. Dolgozatomban a krónikus, csökkent bal kamrai ejekciós frakcióval járó szívelégtelenséggel foglalkozom, melyet mai terminológia szerint csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenségnek, angol nomenklatúrával "heart failure with reduced ejection fraction"-ként (HFREF) nevezünk meg. Hátterben leggyakrabban iszkémiás szívbetegség, dilatatív kardiomiopátia, alkoholfogyasztás, lezajlott vírusinfekció, kemoterápiás gyógyszerek alkalmazása, genetikai ok áll, de gyakran idiopátiás.

A SZE elsődleges oka a szívizomsejtek diszfunkciója, sérülése, pusztulása. Adaptív mechanizmusok aktiválódnak, melyek fő közvetítői a hormonális, neurohormonális rendszerek. Aktiválódik a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer, az endothelin rendszer és a szimpatikus idegrendszer. Nő a vazopresszin elválasztás. Ezek a mechanizmusok azonban hosszú távon már káros következményekkel járnak, és tovább rontják a tüneteket, a többi szerv funkcióját, ödémához, fokozott aritmia hajlamhoz vezetnek. Az extrakardiális változásokat érintik a veséket, csontvelőt, májat, agyat, emésztőrendszert tüdőt is. A pangáson, hypoxián, fokozott apoptózison, malnutrición, veseelégtelenségen, étvágy csökkenésén, neuroendokrin és gyulladásos aktiváción keresztül vezetnek a klinikailag észlelt elváltozásokhoz, az anémiához, cachexiához, májelégtelenséghez, folyadékretencióhoz.

A szívelégtelenség prognózisa, prognosztikai markerek

A betegségek prognózisának ismeret fontos, hisz így lehet a várható lefolyásra felkészülni, és a terápiás lehetőségek között választani. A SZE öt éves mortalitása jelenleg is nagy, eléri az 50-65%-t. A leginkább ismert klinikai prognosztikai jellemzők a beteg életkora, a betegség súlyossága, a terhelhetőség foka, bal kamrai ejekciós frakció, társbetegségek jelenléte. Mára a napi klinikai rutin részévé vált a B-típusú natriuretikus peptid (BNP) meghatározása. A falfeszülés hatására elsősorban a bal kamrai izomzatban termelődő

hormonnak prognosztikai és diagnosztikai jelentősége egyaránt van. SZE-be számos patofiziológiai folyamat aktiválódik melyek a betegség más-más aspektusát jellemzik. A betegséget különböző oldalairól jellemző paramétereket együtt is vizsgálhatjuk a betegség prognózisának meghatározásához. Ez az úgynevezett "multimarker stratégia". Ilyen a napi használatban is elterjedt, számos paraméter figyelembe vételén alapuló prognosztikai rendszer a metabolikus, hemodinamikai és funkcionális (MHF) osztályozás, a Heart Failure Survival Score (HFSS) rendszer, valamint a 2006 óta használt Seattle Heart Failure Model.

Vazopresszin

A vazopresszin (AVP) antidiuretikus és vazokonstriktor hatású, 9 aminosavból álló hormon, mely a hipotalamusz supraoptikus és paraventriculáris magvaiban termelődik. A neurohipofízisből kerül a keringésbe. A vazopresszin hasítással keletkezik, az előanyagból ekvimoláris mennyiségben képződik az AVP, a neurophysin II és a copeptin. A copeptin az AVP elő anyagának, a proAVP-nek a C-terminális vége, 39 aminosavból álló glycopeptin. Az AVP kiválasztását normál körülmények között leginkább az emelkedő szérumszint növeli. A másik serkentő impulzus a csökkenő vértérfogat. Az elválasztás növekedése a vesében a víz visszaszívását fokozza, az oszmolaritást csökkenti, a vér térfogatot emeli, az értónust növeli, a sejt proliferációt fokozza. A hatások specifikus receptorokon keresztül érvényesülnek. A vesében a V2 receptor az aquaporin-2 csatornák aktiválásán keresztül fokozza a gyűjtő tubulusokba a víz visszaszívását, antidiuretikus hatású. Az AVP gyors bomlásából és kis méretéből adódóan sem alkalmas arra, hogy szendvics immunoassay technikával mérjük szérumszintjét. Ez vezette Morgenthalert és munkacsoportját, hogy az AVP-vel ekvimoláris mennyiségben termelődő copeptin szérumszintjének mérésére metodikát dolgozzanak ki. Módszerüket 2006-ban írták le.

A vazopresszin szívelégtelenségben

SZE-ben az AVP szint, illetve az AVP aktivitását tükröző copeptin szint megemelkedik. Ez a fiziológias szabályozás jelentős változására utal, hisz ilyenkor gyakran hyponatraemia, hyposzmolaritás van jelen, az AVP szint mégis magas. Az AVP emelkedést így az úgynevezett non-ozmotikus stimulusok működésével lehet magyarázni, melyk közül a széleskörűen elfogadott nézet szerint a hypotonia a legfontosabb. Lehet, hogy SZE-ben az

AVP hatása rövid távon hasznos, hosszabb távon azonban a szisztémás vazokonstriktáció, a fokozott vízviasszívással járó ödéma, és szekunder hyponatraemia biztosan káros következményekkel jár.

Az AVP SZE-ben betöltött szerepéről a kezdeti információk ellentmondásosak voltak, azonban ennek minden bizonnyal az AVP mérés bizonytalansága miatt metodikai oka volt. A copeptin prognosztikai szerepét többen vizsgálták SZE-ben, elsőként 2006-ban írták le súlyos betegek körében, majd több kohorszban igazolódott prognosztikai szerepe. Ezek a vizsgálatok döntően néhány hónapos, illetve egy-két éves utánkövetéssel történtek. A rutin klinikai adatok, laboratóriumi leletek, és BNP melletti, additív prognosztikai szerepére vonatkozó eredmények nem egyértelműek. Mivel a copeptin egy egészen más kórélettani és neurohormonális kisiklást jelez mint a BNP, logikus volna, hogy ezek egymástól függetlenül bírnának prognosztikai jelentőséggel.

A szívelégtelenség inflammációs megközelítése

Az elmúlt évtizedek vizsgálatai a szívelégtelenség és inflammáció nagyon összetett, komplex kapcsolatrendszerként tártak fel. Már 25 éve leírták a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) emelkedett szintjét SZE-ben. Az interleukin-6-ról (IL-6), majd IL-18-ról, szolubilis TNF receptorokról, szolubilis IL-6 receptorról, CRP-ről is kiderült, szintjük megemelkedik SZE-ben. Igazolni lehetett prognosztikai jelentőségüket is. Kutatócsoportunk szintén számos, az inflammációs folyamatokban résztvevő molekuláról, többek között az extracelluláris hő shock protein 70-ről (HSP70), a komplement anaphylatoxin C3a-ról, az E szelektinről igazolta hogy összefüggenek a betegséggel, illetve prognosztikai jelentőségük van. A gyulladási folyamatok és SZE közötti kapcsolatok módjáról, lehetséges formáiról több elképzelés létezik, ezek nem feltételeznek kizárólagosságot. Az endotoxin hipotézis szerint a pangásos bélben keresztül keringésbe kerülő lipopoliszaharidok váltanak ki immunválaszt. Ismert, hogy a gyulladási cytokinek direkt kardiotoxikus hatással is bírnak, míg a neurohormonális aktiváció közvetlenül az inflammációs folyamatok aktivációját okozza. Számos humán, illetve állatkísérletes adat bizonyítja, hogy fiziológiai körülmények között a az IL-6 fokozza a vazopresszin elválasztást. Szintén ismert, hogy a myocardium károsodás aktiválja az immunrendszer. Ezen aktiváció kezdeti lépése lehet a természetes immunválasz, melynek alapja a "toll-like" receptor (TLR), illetve komplement rendszer aktivációja.

A komplementrendszer és szerepe szívelégtelenségben

A természetes immunválasz ősi rendszere a komplementrendszer. A komplementrendszer több mint 40 plazma- és rugulátor fehérjéből, sejtfelszíni komplement receptorból áll. Többségük inaktív fehérje, melyek kaszkád-szerűen, proteolízis útján aktivizálódnak és fejtik ki hatásukat, azaz: fagocitózis serkentése, sejtek és patogének lízise, opsonizáció, gyulladási folyamatok és az adaptív immunrendszer irányítása, B sejt stimuláció. A komplementrendszer aktiválása a patogének felszínén, sérült saját sejteken, idegen felszínen történhet. Három útja van. A klasszikus utat IgG vagy IgM antitestek indíthatják be, az alternatív út az közvetlenül felszínhez kötve elindulhat. A patogének felszínén, valamint a sérült, apoptotikus sejteken kialakult mintázatok jelenléte aktiválja a lektin utat. A lektin út fehérjéi, a mannose binding lectin (MBL), a kollektin (CL-K1) és fikolinok kötődnek a felszínhez, ezzel aktiválva a komplementrendszert. A lektin út indulásához szintén nincs szükség immunkomplexekre. Végül mindhárom aktivációs út a C3 és C5 aktiválásához, majd a terminális C5b-9 komplement komplex (TCC) termelődéséhez vezet. Ez membránhoz kötve (MAC) a sejt vagy baktérium líziséhez vezet, míg alacsony koncentrációban a sejt gyulladási mediátor termelődését fokozza. Bár a komplement rendszer a homeosztázist fenntartó, illetve szövetsérülést gyógyító rendszer, kontrollálatlan, kóros aktiválódása számos betegségben, így például szepszisben, autoimmun betegségekben kóros szereppel bír.

A krónikus szívelégtelenség és a komplementrendszer kapcsolata kevéssé ismert. Az első klinikai közlemények 2001-ből valók, néhány tucat beteg vizsgáltával. A TCC magasabb koncentrációját írták le szívelégtelenségben, mely összefüggést mutatott a betegség súlyosságával, és előre jelezte az adverz eseményeket. A TCC mellett a klasszikus út aktivációját jelző C1rs-C1inhibitor komplexnek a szintjét, az alternatív út ativációját jelző C3bBbP-nek a szintjét, valamint a közös út aktivációját mutató C3bc szintjét is emelkedettnek találták krónikus SZE-ben. A komplement aktivációt a szívhez volt köthető, mert a fehérjéknek a koncentrációja magasabb volt a sinus coronariusban mint a tüdővénában, míg a TCC koncentrációja a sinus coronariusban alacsonyabb volt. A komplementrendszer prognosztikai, és a betegség súlyosságát jelző szerepét erősítette meg munkacsoprtunk is, amikor elsőként mutattuk ki, hogy a komplementrendszerben központi szerepet játszó C3 aktiváltságát jelző C3a szintje összefügg a SZE súlyosságával és

prognózisával. A komplementrendszer lektin útjának szerepét, aktivitását azonban krónikus szívelégtelenségben eddig nem vizsgálták.

Szívelégtelenség és vesefunkció

Krónikus SZE-hez gyakran társul veseelégtelenség (VE), mely a prognózist jelentősen rontja. A VE a krónikus SZE mortalitásának független prediktora. SZE-ben a glomerulus filtrációs ráta (GFR) csökkenés háttérben álló lehetséges mechanizmusok közül kiemelendők: a csökkenő renális perfúzió, a szimpatikus aktivitás növekedése miatt fellépő, és így csökkenő filtrációs areához vezető mezangialis kontrakció; a hipovolémia, hipotónia és RAAS gátlók okozta csökkenő hidrosztatikai nyomás a glomeruláris kapillárisokban; a posztkapillárisan illetve a Bowman tokban az emelkedő centrális vénás nyomás következtében emelkedő hidrosztatikai nyomás; az emelkedő hasúri nyomás; a már eleve meglévő, a GFR csökkenéséhez vezető krónikus vesebetegségek. Míg hagyományosan mind a kreatinint, mind a karbamid nitrogént (CN) vesefunkciót jellemző paramétereknek gondoljuk, több vizsgálatban a CN akár önmagában, akár a CN/kreatinin hányados formájában jobb prognosztikai markernek bizonyult, mint a kreatinin és a GFR. Ennek a megfigyelésnek a háttérében a CN és a kreatinin vesén át történő ürítésének mechanizmusában, szabályozásában lévő különbség állhat. A kreatinin a glomerulusban filtrálódik, és a azt követően a nefronban disztálisan nem szívódik vissza, míg a CN a glomeruláris filtrációt követően részlegesen visszaszívódik. Visszaszívása részben koncentráció dependens, részben specifikus transzporter mediálta folyamat. Az urea transzporter fehérjék expresszióját az AVP és kortikoszteroidok szabályozzák. Ez elméleti magyarázatot szolgálhat a CN halálozást előrejelző szerepére SZE-ben. A vazopresszin CN visszaszívásban betöltött szerepe, és így a CN szintjével való összefüggése alapján már több szerző felvetette a lehetőségét, hogy a CN, illetve CN/kreatinin hányados az AVP rendszer aktivitását tükröző marker volna, azonban ennek az összefüggésnek a bizonyítása szívelégtelenségben nem történt meg.

Célkitűzések

Egy majdnem 200 fős, csökkent bal kamrai ejekciós frakcióval járó SZE-ben szenvedő kohorsz öt éves követéses vizsgálatával az alábbi kérdésekre kerestük a választ, illetve alábbi hipotéziseket állítottuk fel:

1, Vizsgálni kívántuk a copeptin hosszú távú prognosztikai szerepét csökkent bal kamrai ejekciós frakcióval járó SZE-ben. Feltételeztük, hogy az ismert klinikai prediktorok és a BNP mellett additív értéke van a prognózis meghatározásában.

2, Választ kerestünk arra kérdésre, hogy szívelégtelenségben az AVP aktivitása összefüggést mutat-e az inflammációs paraméterekkel, az IL-6 szinttel, a vesefunkciót jellemző kreatinin szinttel, a GFR-rel és az ismert élettani mechanizmuson keresztül a CN-nel. Többváltozós analízissel kívántuk vizsgálni, hogy a fenti változók között kimutatható-e független kapcsolat, és hogy az adott változóknak milyen a relatív hozzájárulása a copeptin szint változásának kialakításához.

3, Feltételeztük, hogy a fikolinok és a MBL szintje krónikus SZE-ben konzumpciós alapon csökken, és ez összefüggést mutat a betegség súlyosságával, a neurohormonális és a hemodinamikai jellemzőkkel, és a prognózissal.

Módszerek

Betegek

A Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinikáján konzekutív módon vontunk be fekvő-, illetve járóbetegeket a prospektív vizsgálatba. Beválogatási feltétel a 45% alatti bal kamrai ejekciós frakció, krónikus SZE fennállása és aláírt beleegyező nyilatkozat volt. A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának etikai engedélyének birtokában végeztük. Kizárási kritérium volt az aktuális daganatos betegség, lázas állapot, aktuális infekció klinikai jeleinek fennállása, valamint, ha a kezelőorvos a beteget általános, vagy mentális állapota miatt a vizsgálatra alkalmatlannak ítélte meg. 2005 februárja és 2007 márciusa között összesen 196 beteg került bevonásra.

A bevonáskor az aktuális NYHA stádiumot és a vizsgált klinikai jeleket tapasztalt szakorvos értékelte. A betegek anamnézisének, fizikális státuszát rögzítettük. A követés során az első vizitet egy évre terveztük, melynek megvalósult medián időpontja 14,8 hónap lett. Az öt éves követés lehetőség szerint személyesen valósult meg, de minden betegünkről legalább a túlélés, vagy a halálozás tényéről és időpontjáról információt szereztünk a kórházi

információs rendszer, vagy telefonos vizit alapján. Az öt éves követés cenzorálási ideje napra pontosan a bevonást követő öt év letelte volt.

A komplementrendszer vizsgálatokor a kontroll csoport 100 (54 nő) egészséges tagjait kötelező munkaegészségügyi szűrés kapcsán válogattuk be. Átlagéletkoruk $36 \pm 8,9$ év volt.

Laboratóriumi módszerek

A vérvételre legalább 6 órás éhezést követően délelőtt került sor. Rutin laboratóriumi vizsgálatokra natív, EDTA-t, illetve citrátot tartalmazó vérvételi csövekbe vettünk vért. Szintén egy-egy natív, EDTA-s és citráttal alvadásgátolt vérvételi csőből szérum és plazma aliquotokat készítettünk, melyeket a további feldolgozásig -70 °C tároltunk.

Copeptin és komplementrendszer laboratóriumi vizsgálata

A copeptin mérése a BRAHMS Kft. (Hennigsdorf, Németország) által kidolgozott, szendvics immun-luminometrián alapuló eljárással Németországban, a mérési rendszert kifejlesztő intézetben került sor. A módszer során két poliklonális antitestet használnak, melyek a copeptin C-terminális végéhez kapcsolódnak. Az egyik antitestet egy poliszitirén csőhöz kötik, míg a másik antitestet acridium-észterrel jelölik, a kemilumineszcencia méréséhez. A kimutathatósági küszöb $1,7$ pM és az intra-assay variációs koefficiens a kalibrációs görbe tartományában (egészen 405 pM-ig) kevesebb, mint 20 százalék.

A MBL, fikolin-2 és fikolin-3 koncentrációjának meghatározása szendvics immunassay technikával történt. A teszt során bikarbonát pufferban oldott monoklonális anti-MBL (HYB-131-01), monoklonális anti-fikolin2 (FCN216) és monoklonális anti-fikolin3 (FCN334) antitestekkel fedtük (egy éjszakán át, 4 fokon) a 96 lyukú ELISA lemezeket. A mintákat mosott lemezekre töltve inkubáltuk. Ezt követően biotinnal jelzett monoklonális antitestekkel inkubáltunk. Ezt követően a mosott lemezeket 1 órán keresztül, 37 fokon, torna peroxidázzal konjugált streptavidin komplexszel inkubáltuk, majd az előhívtuk. Az optikai denzitást 490 nm-en mértük. Standardként poolozott szérumban hígított ismert koncentrációjú rekombináns MBL, fikolin2 és fikolin3 hígítási sorát használtuk. A detekciós küszöb az MBL esetében 20 ng/ml, a fikolin2 esetében 5 ng/ml, míg a fikolin3 mérésénél 1 ng/ml volt. Az

intra/inter-assay variabilitás értéke <8%-nak mutatkozott. A mérések Peter Garred munkacsoportjában Koppenhágában történtek.

NT-proBNP , TNF- α és IL-6 citokin és rutin laboratóriumi mérések

A szérum NT-proBNP szintjét szendvics immunoassay (ELISA) technikával, gyári kit (Biomedica Gruppe, Cat.No.: BI-20852) segítségével határoztuk meg. A TNF- α és az IL-6 szérumszintjét ELISA technikán alapuló Quantikine High Sensitivity Kittel határoztuk meg (R&D Systems Minneapolis, Minnesota, USA). A rutin laboratóriumi paramétereket vagy a Roch Integra 800, vagy a Cell-Dyn 3500 hematológiai analizátorral mértük. A GFR-t a Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) vizsgálat képletével számoltuk.

Statisztikai analízis

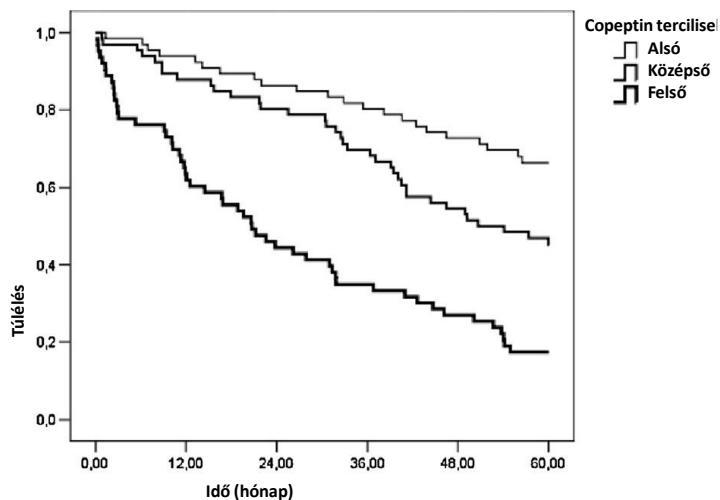
Mivel a legtöbb változó nem-normál eloszlást mutatott, a változókat azok mediánjával, az interquartilis tartománnyal, illetve százalékos értékkel jellemeztük. Csoportok közötti változók összehasonlítására nem-paraméteres tesztekkel használtunk. Folytonos változók és két csoport esetén Mann-Whitney U tesztet, míg több csoport esetén ANOVA (Kruskall-Wallis) tesztet használtunk. Kategorikus változók esetén Pearson féle χ^2 tesztet használtunk. A korrelációs analízishez Pearson féle tesztet alkalmaztunk, melyhez logaritmikusan transzformáltuk a változókat. Többváltozós regressziós modellt építettünk folytonos változók összefüggéseinek vizsgálatához, az automatikus előrehaladó modellépítési stratégiát alkalmaztunk. Kaplan-Meier túlélési analízist használtunk a különböző csoportok halálozási adatainak elemzéséhez, log-rank tesztet végeztünk az egyes csoportok közötti különbségek vizsgálatához. A túlélési idő a vizsgálatba való belépéstől a bármely okból bekövetkező halál idejéig, vagy a cenzorálásig eltelt időt jelentette. A különféle változók standardizált (SD) értékét egy- és többváltozós Cox-proporcionális kockázat modellbe illesztettük, hogy megállapítsuk a halálozással vagy eseménymentes túléléssel mutatott kapcsolatukat. Az életkort idő-függő kovariánsként vizsgáltuk. Egyes változók értékének csoportba sorolásakor ROC analízist végeztünk az optimális vágópont megállapítására.

A statisztikai analízist az alábbi két szoftver segítségével végeztük: STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), SPSS 13.01 (Apache Software Foundation, USA), a $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak a vizsgálat során.

Eredmények

A copeptinre vonatkozó eredmények

A betegek életkorának mediánja 69,5 (59,3-77,3) volt. A bevont 196 beteg közül 195-nél (ff 74%) volt lehetséges a copeptin szint meghatározása. A követés alatt 110 (56%) beteg halt meg. Az elhunytak és élők egyváltozós analízissel vizsgálva számos klinikai, echocardiográfiás és laboratóriumi paraméterben különböztek egymástól. A copeptin szint alapján tercilisekbe sorolt betegek egyváltozós Kaplan-Meier túlélési görbéjét az 1. ábra mutatja. Alacsony copeptin szint esetén (<10,2 pmol/l) az öt éves túlélés aránya 0,828, közepes copeptin szint esetén 0,531, míg a felső tercilisbe eső copeptin szint (>22,6 pmol/l) esetén 0,328 volt ($p < 0,001$, log rank teszt).



1. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék a copeptin szint tercilisei alapján képzett csoportokban. Log rank teszt $p < 0,001$. Copeptin tercilis határok: 33%: 10,2, 66%: 22,6 pmol/L.

A mortalitást jelző egyváltozós modellben a copeptin (HR 2.168; 95% CI 1.740-2.700) mellett számos klinikai paraméter összefüggést mutatott a mortalitással ezért többváltozós túlélési modelleket is készítettünk.

1. táblázat. A halálozás többváltozós Cox modellje, automatikus előrehaladó modellépítési stratégia

Változók	HR	95%-os konfidencia intervallum alsó és felső értéke		P
NYHA I (referencia)	1.000			
NYHA II	2.506	1.097	5.727	0.029
NYHA III	3.312	1.454	7.546	0.004
NYHA IV	3.295	1.221	8.892	0.019
Korábbi szívinfarktus	1.495	1.013	2.205	0.043
Karbamid nitrogén	1.268	1.013	1.589	0.038
GFR (1-SD csökkenéssel)	1.421	1.151	1.752	0.001
RDW (1-SD növekedéssel)	1.381	1.148	1.661	0.001
NT-proBNP (1-SD növekedéssel)	1.368	1.157	1.618	<0.001
Copeptin (1-SD növekedéssel)	1.597	1.189	2.146	0.002
Szívelégtelenség miatti kórházi kezelés a megelőző két évben	1.545	1.047	2.279	0.028

Rövidítések: lásd a szövegben.

A végső, többváltozós Cox modell a halálozás számos független prediktorát igazolta. Ezek a súlyosabb NYHA osztály, a korábbi szívinfarktus, a bevasztást megelőző két évben szívelégtelenség miatti kórházi kezelés, magasabb karbamid nitrogén, emelkedett RDW, magasabb NT-proBNP és copeptin, csökkent GFR értékek voltak (1. táblázat).

Másik modellt alkotva, ha a klinikai paraméterek (NYHA osztály, korábbi AMI, szívelégtelenség miatti kórházi kezelés a megelőző két évben, GFR, RDW, CN) mellé az NT-proBNP-t illesztettük be, az a modell prediktív értékét szignifikánsan javította ($\chi^2=12,639$, $p<0,0001$). Ehhez a modellhez képest további szignifikáns javulást eredményezett a copeptin modellbe illesztése ($\chi^2=7,027$, $p <0,008$). Ez azt jelenti, hogy vizsgálatunkban a copeptin és az NT-proBNP egymástól független, szignifikáns prediktorai a hosszú távú mortalitásnak, és a copeptinnek további hozzáadott értéke lehet ebben a klinikai kérdésben.

Copeptin szint összefüggése a klinikai, laboratóriumi és echokardiográfias paraméterekkel

A copeptin szint alapján tercilisekbe osztott betegek vizsgálatakor a magasabb copeptin értékekhez magasabb életkor, NT-proBNP érték, kreatinin és CN, magasabb IL-6, TNF- α és CRP érték, valamint tágabb IVC tartozott, míg alacsonyabb volt a hemoglobin, albumin, koleszterin és GFR. Annak vizsgálatára, hogy a copeptin szintet milyen mértékben magyarázzák a fenti változók, többváltozós lineáris regressziós vizsgálatot végeztem (2.

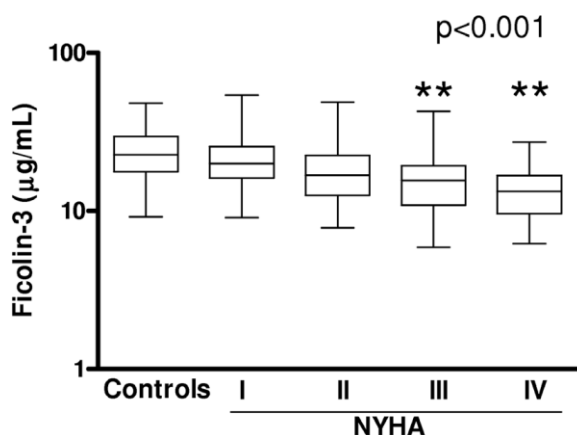
táblázat). A modellbe a copeptin szinttel összefüggést mutató paraméterek (életkor, NT-proBNP, GFR, karbamid, hemoglobin, albumin, koleszterin, IVC, IL-6, TNF-alfa, CRP) kerültek. E szerint a fenti paraméterek közül a karbamid és az IL-6 az, mely a copeptin szintjével leginkább összefügg.

2. táblázat. Többváltozós lineáris regresszió a copeptin és egyéb klinikai, laboratóriumi paraméterek vizsgálatára. A copeptin szinttel szignifikáns összefüggést mutató paramétereket tettük be a modellbe, automatikus előrehaladó modellépítési stratégiával.

Változó	b	Standard hiba	T	p érték
	0,216729	0,464524	0,46656	0,641613
karbamid	0,748603	0,139620	5,36172	<0,000001
IL-6	0,213317	0,082924	2,57243	0,011249
GFR	-0,298423	0,156360	-1,90856	0,058575
CRP	0,082080	0,052273	1,57022	0,118852
IVC	0,266996	0,255518	1,04492	0,298044
NT-proBNP	0,054652	0,052812	1,03484	0,302710

A komplementrendszer lektin út komponensek szerepének vizsgálata a szívelégtelenség pathomechanizmusában

A kohorsz 190 tagjánál tudtuk a komplementrendszer lektin útjának komponenseit mérni. A MBL, illetve fikolin-2 szintekben nem találtunk különbséget a kontroll csoport és a NYHA státusz szerint csoportosított betegek között. Azonban a fikolin-3 szintje jelentősen csökkent volt szívelégtelenség között az egészségesekhez viszonyítva (2. ábra). A fikolin-3 szintje a SZE súlyosságával fordított arányban állt. A Dunnet féle post hoc analízis alapján NYHA III, illetve IV stádiumban a fikolin-3 szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint NYHA I stádiumú szívelégtelenségben.



2. ábra. A MBL, fikolin-2 és fikolin-3 szint összefüggése a szívelégtelenség súlyosságával. A P értékek a nem-parametriás Kruskal-Wallis tesztet jelölik a NYHA I-IV stádiumok között, míg a csillagok a Dunnett féle post hoc tesztet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a NYHA I-hez hasonlítva). A mediánt, 25 és 75-ös percentilist és a tartományt mutatja a horizontális vonal, a téglalap és az antennák

A csökkent fikolin-3 szinttel kapcsolatot mutató változók azonosítása

Receiver operating characteristic (ROC) analízist végeztünk a fikolin-3 szint 5 éves túlélést jelző legjobb vágópontjának meghatározásához. Az alacsony és magas értékek tekintetében a legjobb vágópontnak a 15,0 µg érték bizonyult. Az alacsony fikolin-3 szint összefüggött az alacsony testtömeg index- szel ($p < 0,001$), az alacsony koleszterin szinttel ($p < 0,001$) és a megemelkedett NT-proBNP szinttel ($p < 0,001$). Az életkor és a nem valamint a fikolin-3 szintje között nem volt összefüggés. A C3 szintje szignifikáns korrelációt mutatott a fikolin-3 szintjével ($r = 0,417$, $p < 0,001$). A C3 aktivációt jelző C3a fordítottan korrelált a fikolin-3 szintjével ($r = -0,198$, $p = 0,008$). A fikolin-3 valamint a C3 és az NT-proBNP közötti összefüggések többszörös regressziós analízis eredményei szerint is független, szignifikáns kapcsolatot mutattak (3. táblázat).

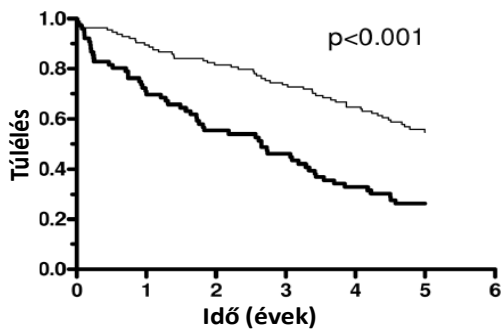
3. táblázat. Többszörös lineáris regressziós analízis a fikolin-3 és a klinikai, laboratóriumi jellemzők között. Automatikus, előrehaladó stratégiával épített modell.

Változók	Regressziós koefficiens	Standard hiba	T	p
NT-proBNP	-0.186	0.025	-7.337	0.000
Koleszterin	0.215	0.099	2.174	0.031
Hipertónia	0.068	0.023	2.946	0.004
Komplement C3a	-0.119	0.037	-3.232	0.001
Komplement C3	0.326	0.141	2.309	0.022

A fikolin-3 szint és az 5 éves mortalitás közötti kapcsolat vizsgálata szívelégtelenségben

Az öt év alatt 107 beteg halt meg a 190-ből (56%). A ROC analízissel meghatározott 15,0 µg/ml-es vágópont alkalmazásával két csoportba osztott betegek halálozása Kaplan-

Meier túlélési analízis eredménye szerint egymástól szignifikánsan különbözött (log rank teszt, $p < 0,001$), az alacsony fikolin-3 szint magasabb mortalitást jelzett (3.ábra).



3. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbe a kiindulási fikolin-3 alapján csoportosított betegeknél. A vastag vonal a 15,0 µg/ml alatti, a vékony a 15,0 µg/ml feletti fikolin-3 szinttel rendelkező betegek csoportját jelzi. A p érték a long-rank tesztet jelzi.

A fikolin-3 a halálozás szignifikáns prediktorának bizonyult az egyváltozós Cox regressziós analízisben is (HR 1,709 per a fikolin-3 egy SD csökkenése). Többváltozós Cox modellben a fikolin-3 alacsony szintje független halálozási prediktornak bizonyult a korhoz és nemhez, majd az NT-proBNP-hez való adjusztálás után is. A modell további adjusztálása során a legfontosabb klinikai kovariánsok modellbe illesztése után is azonos, szignifikáns predikciós értéket figyeltünk meg a fikolin-3 esetében (4. táblázat).

4. táblázat. Többváltozós Cox regressziós analízis a fikolin-3 szint és az ötéves halálozás kapcsolatának vizsgálatára. A hazard rate a fikolin-3 normalizált (1-SD) értékének egységnyi változásával kapcsolatot mutató halálozási rizikót jelzi.

	HR*	95% CI	Wald χ^2 **	p
Fikolin-3, egyváltozós	1,709	1,317-2,212		<0,001
Fikolin-3, nemhez és korhoz illesztett modell	1,669	1,283-2,169	17,55	<0,001
Fikolin-3, korhoz, nemhez és NT-proBNP-hez illesztett modell	1,368	1,052	6,210	0,013
Fikolin-3, korhoz, nemhez, NT-proBNP-hez és BMI-hez illesztett modell	1,346	1,033-1,751	5,438	0,020
Fikolin-3, korhoz, nemhez, NT-proBNP-hez és diabetes mellitushoz illesztett modell	1,389	1,060-1,818	6,467	0,011
Fikolin-3, korhoz, nemhez, NT-proBNP-hez és kreatininhez illesztett modell	1,486	1,124-1,953	8,938	0,003
Fikolin-3, korhoz, nemhez, NT-proBNP-hez és hemoglobinhoz illesztett modell	1,351	1,037-1,761	5,560	0,018

Következtetések

A copeptin prognosztikai szerepe

Vizsgálatunkban a copeptin hosszú távú, öt éves prognosztikai szerepét tudtuk igazolni csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenségben. Többváltozós Cox modellben a klinikai paramétereken, valamint az NT-proBNP-n túl a halálozás független, szignifikáns prediktorának bizonyult. Korábban több, mienkél rövidebb követési idejű vizsgálatban a halálozás tekintetében a copeptin nem bizonyult BNP-től független prognosztikai markernek, más vizsgálatban pedig csak a rehospitalizációt és halálozást közös végpontként értékelve volt független prediktor a copeptin. A GISSI vizsgálat egy alvizsgálatában a copeptin prediktív értéke szintén gyengébb volt. Saját eredményeink és a GISSI alvizsgálatának eredménye közötti különbség egyik magyarázata az lehet, hogy saját betegeink súlyosabbak lehettek. Erre utal, hogy a tertilizsek határai magasabak voltak (10,2 vs. 9,61 illetve 22,6 vs. 19,1 pmol/L). Az pedig ismert, hogy a copeptin szint növekedése nem arányos a szívelégtelenség súlyosbodásával: előrehaladottabb helyzetben a copeptin emelkedés nagyobb, míg kevésbé súlyos betegekben az emelkedés csak kis mértékű.

A copeptin BNP-től független prognosztikai szerepe azonban kórélettani szempontból jól magyarázható: a copeptin és a BNP a SZE egészen különböző aspektusát jelzik. A BNP a szívizomban, a kamrák falában termelődik a falfeszülés hatására, míg a copeptin a központi idegrendszerben képződik, SZE-ben elsősorban az úgynevezett "nem-ozmotikus" triggerrek hatására. A tény hogy más kórélettani eltérést jeleznek, megmagyarázhatja egymástól független prognosztikai szerepüket. A copeptin és NT-pro BNP szint között megfigyelt gyenge korreláció ($r=0,32$, $p<0,0001$) is a két hormon aktivációjának különböző hétértékét jelzi. Mindez alátámasztja a multimarker stratégia létjogosultságát.

Copeptin szinttel összefüggésben álló paraméterek

Mivel célunk volt a copeptin szintet esetlegesen befolyásoló hemodinamikai jellemzőket is feltérképezni, a bal kamrai ejekciós frakció mellett a szisztolés- és diasztolés vérnyomást; a jobb pitvari nyomást és a szisztémás vénás nyomást leíró vena cava inferiort-t, valamint a bal pitvari töltőnyomással korreláló mitrális E, A hullámot és az E hullám

decelerációs idejét is vizsgáltuk. **A többváltozós lineáris regressziós modell segítségével igazoltuk, hogy az IL-6, illetve CN az a két paraméter, mely a copeptin szinttel leginkább összefügg, nem pedig a betegek hemodinamikai jellemzői, a szisztémás vénás-, illetve bal pitvari nyomást leíró változók.**

Copeptin és a karbamid nitrogén

Vizsgálatunkban a karbamid nitrogén az a paraméter, mely a többváltozós modellben a copeptin szinttel legjobban összefüggött. Míg a kreatinin a glomeruláris vesefunkciót jelöli, addig a CN szintjét annak glomeruláris filtrációját követő tubulusokban történő reabszorpciója is befolyásolja. A reabszorpció transzporter mediálta folyamataért az UT-A és UT-B membrán fehérjék a felelősek, aktivitásuk AVP hatására nő. Számos közlemény látott napvilágot az elmúlt időben melyek azon a feltételezésen alapultak, hogy a CN szintje az AVP aktivitást tükrözi. Így például három nagy retrospektív vizsgálat analízisében a CN/kreatinin hányadost úgy értékelték, mint a vesefunkciótól független, vazopresszin aktivitást jelző paramétert. Azt találták, hogy a veseelégtelenség csak magas CN/kreatinin érték esetén rontotta érdemben az életkilátásokat, melyből azt a következtetést vonták le, hogy a veseelégtelenség ténye önmagában nem rontja a prognózist szívelégtelenségben, csak ha azt szívelégtelenség okozza. Más vizsgálatokban a SZE-ben alkalmazott vazopresszin antagonistáknak a pozitív hatásait azokban látták érvényesülni azoknál, akiknek magas CN, vagy CN/kreatinin szintje alapján feltételezték, hogy az AVP aktivitás magas volt. Korábban azonban nem írták le, hogy SZE-ben a CN és az AVP, vagy annak aktivitását jelző copeptin szintje valóban szorosán összefügg.

A copeptin szérumszintjét befolyásoló non-ozmotikus stimulusok, és az IL-6

SZE-ben az AVP elválasztás nem az ozmotikus stimulusok hatására nő, hisz a jelen levő hypozmolaritás fiziológiásan az AVP elválasztást éppen csökkenti. Klasszikussá vált kísérletekben igazolták korábban, hogy a keringés vénás, illetve artériás oldalán lévő baroreceptorok a nyomásesés hatására az AVP elválasztást fokozzák. Széleskörűen elfogadott vélemény alapján szívelégtelenségben ez a hatás érvényesül, az alacsony intravaszkuláris nyomás, a hypotonia hatása baroreceptorokon keresztül érvényesül, és növeli az AVP

elválasztást. Eredményeink alapján is megkérdőjelezhető azonban, hogy az inravaszkuláris nyomás, illetve volumen esése okozná az AVP, illetve a copeptin szint jelentős emelkedését SZE-ben, hisz a vénás oldali nyomás ilyenkor magasabb, a szisztémány vérnyomás és copeptin szint között pedig nem találtunk összefüggést.

Vizsgálatunkban a copeptin szintje korrelált a gyulladást jelző különböző laboratóriumi paraméterekkel. A SZE és inflammáció egyik lehetséges kapcsolata az IL-6 regulációs hatása az AVP elválasztásában. Ezt a kapcsolatot SZE-ben eddig nem -, de fizioiógias és különböző kóros állapotokban már széleskörűen vizsgálták. Ismert, hogy endotoxin hatására nő az IL-1 és IL-6 β a CRH elválasztás, és így aktiválódik a hipotalmusz-hipofízis-mellékvese tengely. Endotoxin hatására nemcsak az anterior -, hanem a poszterior hipofízis hormonjainak (AVP, oxitocin) elválasztása is nő. Patkányban a cerebroszpinális folyadékba adott IL-6, illetve emberben a vénásan adott IL-6 is növelte az AVP elválasztást. Patkányban az agy neutralizáló anti IL-6 előkezelése meggátolta a lipopoliszaharid (LPS) okozta antidiuretikus hatást. Igazolták, hogy az IL-6 átjut a vér-agy gáton.

Saját eredményeink arra engednek következtetni, hogy fenti megfigyelések szívelégtelenség esetén is érvényesek. Mindenki számára napi klinikai tapasztalat, hogy az egyensúlyban lévő szívelégtelen betegek dekompenzálódását gyakran infekció váltja ki, és a tüdőgyulladás, bronchitis kezelésével párhuzamosan javul a beteg kardiális állapota is. Ezt a klinikai tapasztalatot plauzibilis módon legalább részben magyarázná a megemelkedő IL-6 okozta fokozódó vazopresszin elváltozás, és következtében létrejött fokozott vízvisszaszívás, ödéma, hiponatrémia, csökkenő vizeletmennyiség.

A komplementrendszer lektin útja és a krónikus szívelégtelenség

Kimutattuk, hogy szívelégtelenség súlyosságával arányos a fikolin-3 szintje: magasabb NYHA stádiumban, illetve növekvő NT-proBNP mellett csökkenő értékeket találtunk. Másrészt az alacsony fikolin-3 szintek mellett magas C3a szintet és csökkenő C3 koncentrációt mértünk, ami az alacsony fikolin-3 koncentráció mellett komplement-aktivációra, illetve a fikolin-3 konzumpciós eredetű csökkenésére utal. Igazoltuk, hogy krónikus, csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenségben a fikolin-3 szintje összefügg az öt éves halálozással.

A jelen disszertáció alapjául szolgáló, a komplement rendszer fikolin útját szívelégtelenségben vizsgáló közlemény egy norvég kutatócsoporttal való kooperáció eredménye. A norvég kutatócsoport a saját betegeink vizsgálatához hasonló elrendezésben 183, csökkent ejekcós frakcióval rendelkező, norvég szívelégtelen beteg fikolin-3, fikolin-2 és MBL szintjét is megmérte. Ezek, a sajátunktól független kohorszban mért eredmények saját megfigyeléseinket alátámasztják, megerősítik, és ezáltal az értékét növelik.

A komplementrendszer lektin útjának elsődleges molekulái a MBL, fikolin-2 és fikolin-3. Ezekről korábban mind leírták, hogy az apoptotikus sejtek, sejtmarradványok fagocitózisának folyamatában fontos induktor szereppel bírnak. A lektin út ezen tagjai a DAMP-hoz (damage associated molecular patterns), a megváltozott, károsodott, döntően acetilált, fehérje természetű molekulákhoz kötődnek, aktiválják a komplementrendszert és beindítják a fagocitózist. Ismert, hogy SZE-ben a szívizomsejtek apoptózis, necrózis, autofágia és iszkémiás sejthalál útján pusztulnak. Korábban már leírták, hogy SZE-ben nő a szívizomban a MAC koncentrációja. A sinus coronariusban a komplement rendszer aktivált fehérjéinek koncentrációja magasabb, míg a MAC szintje alacsonyabb mint a szérumban. Mindez egybeesik saját megfigyelésünkkel, hogy a fikolin-3 csökkenő koncentrációja együtt jár a C3 csökkenésével és C3a növekedésével, és a fikolin-3 konzumpciós eredetű csökkenését valószínűsíti. Kérdés, hogy a komplementrendszer aktiválódása SZE-ben a betegségnek markere, a miokardiális sejtpusztulás velejárója, avagy a SZE kialakulásában, progressziójában, a miokardiális sejtkárosodás kiváltásában és kiterjedésében oki szereppel bír, a sejtelhalásért is felelős mechanizmus. Esetleg a két folyamat együtt van jelen. Ennek a kérdésnek a jelentősége nem csak elméleti, hiszen a rendszer blokkolásán keresztül így a szívelégtelenséget tudnánk gyógyítani. A C5 hasítását blokkoló pexelizumabbal korábban már történtek humán vizsgálatok, azonban az eredmények ellentmondásosak voltak. Véleményem szerint további vizsgálatok és kísérletek végzése indokolt, hisz így remény van arra, hogy az igen rossz prognózisú szívelégtelenségben újabb hatásmódú gyógyszerekhez jussunk.

Publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Pozsonyi Z, Forhecz Z, Gombos T, Karadi I, Janoskuti L, Prohaszka Z : Copeptin (c-terminal pro arginine-vasopressin) is an independent long-term prognostic marker in heart failure with reduced ejection fraction. (2015). Heart Lung Circ Apr;24(4):359-67 IF: 1.172

Prohaszka Zoltan, Munthe-Fog Lea, Ueland Thor, Gombos Timea, Yndestad Arne, Foerhecz Zsolt, Skjoedt Mikkel-Ole, Pozsonyi Zoltan, Gustavsen Alice, Janoskuti Livia, Karadi Istvan, Gullestad Lars, Dahl Christen P, Askevold Erik T, Fust George, Aukrust Pal, Mollnes Tom E, Garred Peter (2013): Association of ficolin-3 with severity and outcome of chronic heart failure. Plos One 8:(4) Paper E60976. 9 P. IF: 3.534

A disszertációtól független közlemények

Jenei Zsigmond M, Gombos Timea, Foerhecz Zsolt, Pozsonyi Zoltan, Karadi Istvan, Janoskuti Livia, Prohaszka Zoltan (2013): Elevated extracellular hsp70 (hspa1a) level as an independent prognostic marker of mortality in patients with heart failure. Cell Stress Chaperones 18:(6) Pp. 809-813. IF: 2.537

Gombos Timea, Foerhecz Zsolt, Pozsonyi Zoltan, Szeplaki Gabor, Kunde Jan, Fust George, Janoskuti Livia, Karadi Istvan, Prohaszka Zoltan (2012): Complement anaphylatoxin C3a as a novel independent prognostic marker in heart failure. Clin Res Cardiol 101:(8) Pp. 607-615. IF: 3.667

Czucz J, Cervenak L, Foerhecz Z, Gombos T, Pozsonyi Z, Kunde J, Karadi I, Janoskuti L, Prohaszka Z (2011): Serum soluble e-selektin and nt-probnp levels additively predict mortality in diabetic patients with chronic heart failure. Clin Res Cardiol 100:(7) Pp. 587-594 IF: 2.961

Pozsonyi Z, Lengyel M (2011): Successful thrombolysis of late, non-obstructive mitral bioprosthetic valve thrombosis: case report and review of the literature. J Heart Valve Dis 20:(5) Pp. 526-530. IF: 0.811

Pozsonyi Z, Toth A, Vago H, Adam Z, Apor A, Alotti N, Sarman P, Merkely B, Karadi I (2011): Severe mitral regurgitation and heart failure due to caseous calcification of the mitral annulus. Cardiology 118:(2) Pp. 79-82. IF: 1.705

Pozsonyi Z, Szelid Zs (2010): Új képalkotó módszerek a kardiológiában - szív MR, coronaria CT. Magyar Családorvosok Lapja 2010:(4) Pp. 12-18.

Varkonyi J, Lueff S, Szucs N, Pozsonyi Z, Toth A, Karadi I, Pietrangelo A (2010): Hemochromatosis and hemojuvelin g320v homozygosity in a hungarian woman. Acta Haematol 123:(3) Pp. 191-193. IF: 1.316

FörhécZ Z, Gombos T, Borgulya G, Pozsonyi Z, Prohászka Z, Janoskúti L (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:(4) Pp. 659-666. IF: 4.357

Gombos T, Mako V, Cervenak L, Papassotiriou J, Kunde J, Harsfalvi J, ForhécZ Z, Pozsonyi Z, Borgulya G, Janoskúti L, Prohászka Z (2009): Levels of von willebrand factor antigen and von willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. Thromb Haemost 102:(3) Pp. 573-580. IF: 4.451

Gombos T, ForhécZ Z, Pozsonyi Z, Wallentin S, Papassotiriou J, Kunde J, Morgenthaler Ng, Janoskúti L, Prohászka Z (2009): Adrenomedullin and endothelin-1 are related to inflammation in chronic heart failure. Inflamm Res 58:(6) Pp. 298-305. IF: 1.586

Gombos T, FörhécZ Z, Pozsonyi Z, Jánoskúti L, Prohászka Z (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:(2) Pp. 199-206. IF: 2.238

Kutyifa V, Merkely B, Pozsonyi Z, Hosszu K, Szilagyi S, Balazs G, Toth A, Sarman P, Geller L (2008): Intracardialis echokardiográfia-vezérelt cardialis tumormassza-biopszia: [Intracardiac Echocardiography-Guided Cardiac Tumor Mass Biopsy]. Orv Hetil 149:(39) Pp. 1857-1859.

Pozsonyi Z, FörhécZ Z, Keltai K, Prohászka Z, Lengyel M, Jánoskúti L (2007): Alkalmas-e az NT-proBNP a pitvarfibrilláció sikeres kardioverziója után a tartós sinusritmus fennmaradásának előrejelzésére? Magyar Belorvosi Archivum 60:(6) Pp. 523-529.

Pozsonyi Z: (2004): Diétás lehetőségek a magas vérnyomás betegség kezelésében: A DASH diéta. Családorvosi Fórum 9: Pp. 53-55.