

Marcatori di rimodellamento e fibrosi cardiaca

Silvia Masotti¹, Maria Franzini², Concetta Prontera¹, Claudio Passino¹, Aldo Clerico¹ a cura del Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio Biomarcatori Cardiovascolari

¹Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio e Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa

ABSTRACT

Markers of cardiac remodeling and fibrosis. Cardiac remodeling is considered the determinant of the clinical progression of heart failure. It is defined as a genome expression resulting in molecular, cellular and interstitial changes, clinically manifested as changes in size, shape and function of the heart. Ventricular remodeling occurs progressively in untreated patients after large myocardial infarction and in those with longstanding cardiomyopathy. Myocyte hypertrophy, cellular apoptosis and increased interstitial collagen deposition are the anatomopathological alterations leading to increased myocardial fibrosis. Myocardial hypertrophy and fibrosis increase left ventricular volume and induce perturbation in the left ventricular chamber geometry, leading to cardiac dysfunction. As a result, the assessment of cardiac fibrosis holds important clinical value in patients with heart failure. Accordingly, there is an increasing interest in the development of new markers for cardiac fibrosis and a number of laboratory tests have been recently proposed. The aim of the present article is to discuss analytical performances and clinical relevance of these markers.

INTRODUZIONE

Lo scompenso cardiaco rappresenta la prima causa di morte e di ospedalizzazione nei Paesi occidentali, con una prevalenza nella popolazione generale di ~2%, che però aumenta progressivamente con l'avanzare dell'età, superando il 10% nei soggetti con età >75 anni (1, 2). Il rimodellamento cardiaco è generalmente considerato il più importante meccanismo fisiopatologico, che determina il progressivo sviluppo di scompenso cardiaco in pazienti con un infarto esteso del miocardio ventricolare o una miocardiopatia di lunga durata (3). Nel 2000, una conferenza di consenso ha definito il rimodellamento cardiaco come il risultato di modificazioni dell'espressione del genoma cellulare del tessuto miocardico, che induce modificazioni a livello molecolare della struttura cellulare e della matrice interstiziale che producono cambiamenti nel peso, forma e funzione del cuore (3). Queste alterazioni anatomopatologiche sono causate da sovraccarico emodinamico e/o danno cardiaco e il conseguente progressivo rimodellamento cardiaco è a sua volta influenzato da alterazioni emodinamiche e attivazione del sistema neuro-immuno-ormonale.

Lo scompenso cardiaco è stato a lungo considerato

come una malattia irreversibile. Tuttavia, in questi ultimi anni questo concetto non è più considerato un dogma, poiché studi recenti hanno dimostrato che una terapia adeguata può far regredire, o almeno arrestare, il processo di rimodellamento cardiaco, allungando di molti mesi o anni la vita dei pazienti (2). Questi studi hanno anche dimostrato che la terapia risulta più efficace quanto più precoce risulta l'intervento. Per questo motivo, moltissimi marcatori sono stati proposti per evidenziare i primissimi stadi dello scompenso cardiaco (stadi A e B), in cui i pazienti sono ancora asintomatici, ma presentano i fattori di rischio (stadio A) o le prime alterazioni funzionali o anatomo-patologiche legate alla malattia cardiaca (stadio B) (Tabella 1) (4, 5). Tra questi certamente i peptidi natriuretici cardiaci e le troponine cardiache I e T sono i marcatori più utilizzati (6-8). Sebbene sia i peptidi natriuretici che le troponine cardiache siano in grado di monitorare il progressivo deterioramento della funzione cardiaca nei pazienti con scompenso cardiaco cronico, recenti studi hanno però suggerito che un differente gruppo di marcatori potrebbe essere più strettamente e direttamente associato al processo di rimodellamento cardiaco e, in particolare, ai meccanismi fisiopatologici strettamente collegati alla fibrosi cardiaca (9).

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Scuola Superiore Sant'Anna, Fondazione CNR-Regione Toscana G. Monasterio, Via Giuseppe Moruzzi 1, 56124 Pisa. Tel. 0503152133, Fax 0585493652, E-mail clerico@ftgm.it

Ricevuto: 11.01.2016

Revisionato: 18.03.2016

Accettato: 02.05.2016

Pubblicato on-line: 09.02.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.002

Tabella 1*Stadi della storia naturale dello scompenso cardiaco. Da rif. 5*

Stadio di malattia	Sintomatologia	Classe funzionale NYHA
A	Alto rischio per scompenso cardiaco, ma senza malattie in atto o sintomi di insufficienza cardiaca	0
B	Segnali di alterazioni strutturali del cuore (ipertrofia cardiaca, ischemia coronarica, alterazioni valvolari, ecc.), ma senza sintomi di scompenso cardiaco	Da 0 a I
C	Presenza di malattia strutturale cardiaca con sintomi di insufficienza cardiaca	Da I a IV
D	Presenza di scompenso cardiaco refrattario alla terapia farmacologica convenzionale e richiesta di interventi specializzati (impianto di "pace-maker", trapianto cardiaco, ecc.)	IV

NYHA, *New York Heart Association*.

Tabella 2*Classificazione dello scompenso cardiaco secondo i valori della frazione di eiezione sistolica del ventricolo sinistro*

Classificazione	Frazione di eiezione	Descrizione
Scompenso cardiaco con ridotta frazione di eiezione ("heart failure with reduced ejection fraction", HFrEF)	≤40%	Definito anche scompenso cardiaco sistolico
Scompenso cardiaco con conservata frazione di eiezione ("heart failure with preserved ejection fraction", HFpEF)	≥50%	Definito anche scompenso cardiaco diastolico
HFpEF "borderline"	41-49%	Questi pazienti costituiscono un gruppo intermedio, ma la sintomatologia, la risposta alla terapia e l'"outcome" appaiono simili a quelli dei pazienti con HFpEF
HFpEF migliorata	>40%	Indica i pazienti che prima della terapia mostravano HFrEF, ma dopo trattamento hanno migliorato la loro frazione di eiezione

I pazienti con scompenso cardiaco sono distinti a seconda che mostrino una riduzione della funzione sistolica, evidenziata da una ridotta (≤40%) frazione di eiezione del ventricolo sinistro ("heart failure with reduced ejection fraction", HFrEF), oppure una frazione di eiezione conservata (≥50%) ("heart failure with preserved ejection fraction", HFpEF), generalmente valutata per mezzo dell'esame ecocardiografico (Tabella 2) (5, 10). L'epidemiologia, l'eziologia, i meccanismi fisiopatologici, il quadro anatomico-patologico e la progressione clinica della malattia che presentano questi due gruppi di pazienti sono sostanzialmente differenti. I pazienti con HFpEF sono in genere più anziani, prevalentemente di sesso femminile, presentano con maggiore frequenza comorbidità (ipertensione, obesità, diabete mellito, aterosclerosi, fibrillazione atriale) e una disfunzione diastolica all'esame ecocardiografico (5, 11). I pazienti con HFpEF ospedalizzati sono aumentati in questi ultimi anni, raggiungendo il numero dei pazienti con HFrEF (11), per cui si stima che la prevalenza delle due differenti condizioni cliniche nella popolazione generale sia simile (5). La diagnosi e il trattamento risultano più difficili nei pazienti con HFpEF, per cui la prognosi è più severa (5, 11).

La fibrosi cardiaca sembra essere presente con maggior frequenza nei pazienti con HFpEF rispetto a quelli con HFrEF, rappresentando la causa più importante della disfunzione diastolica (5). Questa evidenza ha stimolato in questi ultimi anni la ricerca e la

validazione clinica di marcatori della fibrosi cardiaca da utilizzare nella diagnosi, nella stratificazione del rischio e nel "follow-up" dei pazienti con HFpEF. Considerando i risultati ottenuti in questi studi, le più recenti linee guida dell'"American College Cardiology Foundation" e dell'"American Heart Association" hanno per la prima volta inserito i marcatori di fibrosi cardiaca, e in particolare la galectina-3 e il recettore solubile dell'interleuchina (IL) 33, denominato sST2, tra i marcatori da prendere in considerazione per la stratificazione del rischio nei pazienti con scompenso cardiaco (5).

Lo scopo di questa rassegna è quello di discutere le caratteristiche analitiche dei metodi immunometrici che sono utilizzati per la misura di questi marcatori. Saranno anche discusse l'interpretazione fisiopatologica e la rilevanza clinica dell'utilizzo di questi marcatori di fibrosi miocardica nei pazienti con scompenso cardiaco.

RIMODELLAMENTO E FIBROSI CARDIACA

Lo scompenso cardiaco è la via finale comune di tutte le malattie cardiovascolari (anche se l'ischemia coronarica è la causa di più della metà dei casi) e perciò ne sono affetti pazienti con un'ampia varietà di condizioni cliniche, che per questo motivo mostrano una differente propensione a sviluppare rimodellamento e fibrosi ventricolare (12).

Nonostante i miglioramenti ottenuti nel trattamento dello scompenso cardiaco, la maggior parte dei pazienti mostra ancora un peggioramento progressivo della funzione ventricolare con un aggravamento della sintomatologia e un aumento del rischio di presentare aritmie cardiache potenzialmente fatali (3). In particolare, i pazienti che non rispondono più al trattamento standard (stadio D dello scompenso cardiaco), presentano una mortalità simile a quelle dei tumori più aggressivi, come quelli del pancreas e del polmone (2). Per contro, i pazienti asintomatici (stadio B) e perfino quelli che presentano i sintomi dello scompenso cardiaco, ma che rispondono alla terapia (stadio C), hanno un'attesa di vita di molti anni dall'inizio del declino della funzione ventricolare, poiché i meccanismi di compenso riescono a mantenere una funzione cardiaca adeguata alle attività della vita quotidiana. Tuttavia, questi meccanismi inducono complesse modificazioni strutturali e anche funzionali, sia nei miocardiociti, che nelle altre cellule cardiache, che contribuiscono a produrre una disfunzione dei ventricoli ("adverse remodeling"). Il rimodellamento cardiaco può essere pensato come un ritorno alla modalità di espressione genica tipica del periodo fetale, caratterizzata da una riattivazione di geni non espressi nella vita adulta, repressione di geni non espressi durante la vita fetale e attivazione di cellule staminali (13). Sebbene questi meccanismi fenotipici debbano per la maggior parte essere considerati di compenso, alcuni, come la fibrosi, risultano al contrario non adattivi e contribuiscono alla progressione della disfunzione ventricolare (13). In particolare, questi meccanismi generano ipertrofia cardiaca e un'estensiva produzione di matrice extracellulare (14-16). La riespressione genica fetale è promossa non solo dalla *noxa* originale (ischemia, necrosi, virus, agenti cardiotossici, infiammazione), ma anche dalla stimolazione di meccano-recettori al livello dei miocardiociti e nella matrice extracellulare, attivati dal sovraccarico emodinamico, dall'ischemia, dalla disfunzione endoteliale e dall'attivazione prolungata del sistema neuro-immuno-ormonale, del sistema renina-angiotensina-aldosterone e del sistema delle citochine pro-infiammatorie (13, 17-21).

Da un punto di vista clinico, diventa cruciale identificare nel sottogruppo di pazienti ancora asintomatici (stadio A e B) coloro che sono a rischio più elevato di procedere rapidamente verso lo scompenso cardiaco conclamato. Questi pazienti richiedono un controllo clinico più stretto e una terapia adeguata, soprattutto quelli con miocardiopatia dilatativa, che a differenza di quelli con miocardiopatia ischemica, presentano scarsi e anche poco caratterizzati predittori di progressione della disfunzione miocardica (9). Analogamente, anche la miocardiopatia ipertrofica e quella restrittiva presentano un rimodellamento cellulare e interstiziale, che induce la progressione della malattia. Tuttavia, queste due ultime condizioni sono caratterizzate da quadri anatomopatologici e clinici assai differenti (22, 23). E' ipotizzabile che i meccanismi biochimici e fisiopatologici che inducono il rimodellamento cardiaco in questi quadri (ad es., miocardiopatia ischemica,

dilatativa, ipertrofica-ostruttiva e restrittiva) possano essere anch'essi diversi e/o regolati in maniera differente. Evidentemente, una migliore conoscenza dei meccanismi biochimici e fisiopatologici che sono alla base delle differenti miocardiopatie garantirà una migliore classificazione delle differenti condizioni morbose e una più accurata stratificazione dei pazienti, come anche metterà in luce nuovi possibili bersagli terapeutici (22, 23).

Il rimodellamento del miocardio nelle miocardiopatie ischemiche e non-ischemiche coinvolge non solo i miocardiociti, ma anche le altre cellule del tessuto miocardico (soprattutto i fibroblasti e le cellule endoteliali), come pure la matrice extracellulare (24). Quest'ultima costituisce ~6% del tessuto cardiaco e include fluidi, collagene, glicoproteine, proteoglicani e glicosaminoglicani (25). In particolare, il collagene è secreto dai fibroblasti come procollagene nella matrice extracellulare, dove le proteasi rimuovono il propeptide amminoacidico carbossi-terminale, che successivamente è degradato dalle metalloproteasi della matrice (MMP), che a loro volta sono regolate dall'inibitore tissutale delle metalloproteasi (TIMP) (26). In condizioni patologiche, l'interstizio cardiaco può aumentare a causa della deposizione diffusa di fibre collagene, per un edema (ad. es., secondario a un processo infiammatorio) oppure per deposizione patologica di proteine che fisiologicamente non sono presenti nella matrice extracellulare cardiaca (come l'amiloide). Recenti studi hanno dimostrato che l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone all'interno del tessuto cardiaco gioca un ruolo centrale nell'attivazione dei fibroblasti e nella deposizione di collagene (24, 26).

Per fibrosi cardiaca si intende generalmente la proliferazione dei fibroblasti con un aumento della deposizione di fibre di collagene del muscolo cardiaco oppure (più raramente) un ispessimento fibrotico delle valvole cardiache (24). La fibrosi rende il muscolo cardiaco più rigido e meno elastico, riducendo la capacità dei ventricoli di dilatarsi (disfunzione ventricolare diastolica). Inoltre, la fibrosi può colpire le valvole cardiache portando a una disfunzione valvolare (stenosi e/o insufficienza).

La fibrosi miocardica può originare attraverso due distinti processi fisiopatologici, che danno luogo a due differenti fenotipi (24):

1. la fibrosi susseguente a una perdita di tessuto (ad es., per un infarto del miocardio esteso), che si deve considerare come una vera e propria cicatrice (fibrosi riparativa o sostitutiva);
2. la fibrosi interstiziale di tipo reattivo, che si origina dalle aree che circondano i capillari sanguigni e che da lì poi s'irradia attraverso tutto il tessuto miocardico (fibrosi interstiziale).

La sostituzione del miocardio normale con tessuto fibrotico causa importanti alterazioni della funzione cardiaca (24). Un'aumentata sintesi di matrice extracellulare e/o una diminuzione della sua degradazione induce un aumento della rigidità delle pareti ventricolari, che è la più importante causa di

disfunzione diastolica del ventricolo. Inoltre, la deposizione di matrice extracellulare tra i miocardiociti può alterare la propagazione degli impulsi elettrici attraverso il miocardio, causando sia anomalie della contrazione, che aritmie. Infine, l'edema infiammatorio e la deposizione del tessuto fibrotico intorno alle aree perivascolari, rallentando il flusso di ossigeno e nutrienti ai miocardiociti, innescano il circolo vizioso che sostiene la progressione del rimodellamento miocardico.

IL RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE NELLA FIBROSI CARDIACA

L'infiammazione deve esser considerata una componente fondamentale dei meccanismi fisiologici che sono deputati alla riparazione delle ferite (27-30). Sebbene la deposizione di collagene sia un indispensabile e, in genere, reversibile componente del processo che porta alla riparazione delle ferite, qualche volta il processo di riparazione fisiologico evolve verso una progressiva e irreversibile risposta fibrotica. Questo tipicamente accade quando il danno tissutale, provocato dalla *noxa* patogena, non può essere riparato in un breve lasso di tempo, perché il danno è severo, ripetitivo o i meccanismi stessi, che devono provvedere alla riparazione, sono disturbati o mal regolati (27). In questi casi, si stabilisce nel tessuto danneggiato un processo infiammatorio cronico che porta a un accumulo anormale e permanente di tessuto fibrotico. Il risultato finale sarà l'impossibilità del tessuto danneggiato di invertire il processo patologico e di recuperare integralmente la normale funzione (27).

La fibrosi può infiltrare qualsiasi organo, inclusi polmone, cute, rene, fegato e anche cuore. E' stimato che ~45% delle morti nei paesi occidentali possono essere attribuiti a malattie in cui la fibrosi gioca un ruolo fisiopatologico di primo piano (27). In particolare, il quadro anatomopatologico dello scompenso cardiaco è caratterizzato da una risposta infiammatoria sistemica che contribuisce alla progressione della malattia. Molti mediatori dell'infiammazione sono stati evidenziati in circolo e nel cuore dei pazienti con scompenso cardiaco, come ad esempio le citochine proinfiammatorie e i loro specifici recettori e altre molecole secrete o rilasciate dai macrofagi [ad es., galectina-3 e pentrossina-3 (PTX3)] (9, 29). I livelli tissutali e quelli circolanti di questi marcatori di infiammazione correlano con la severità e la progressione clinica dello scompenso cardiaco (9, 29-31).

Levine et al. (31) hanno per primi riportato che i pazienti con scompenso cardiaco presentano concentrazioni circolanti di "tumor necrosis factor" (TNF) più elevate rispetto ai controlli (mediamente di oltre 10 volte). In questi ultimi anni, un numero rilevante di studi, come discusso in dettaglio in alcune recenti rassegne (30, 32), ha approfondito queste osservazioni dimostrando che i livelli circolanti delle citochine proinfiammatorie (IL-1, IL-6, IL-8, TNF) e dei loro recettori, come anche quelli delle molecole di adesione ["vascular adhesion molecules" (VCAM), "intercellular

adhesion molecules" (ICAM)] e altre chemochine ["macrophage inflammatory protein-1 α " (MCP-1), "monocyte chemoattractant protein-1" (MCP-1)], sono significativamente aumentati nei pazienti con ridotta frazione di eiezione ventricolare. Altri studi hanno evidenziato come il processo infiammatorio gioca un ruolo di primo piano anche nella progressione della disfunzione diastolica nei pazienti con scompenso cardiaco, ma con funzione sistolica conservata (HFpEF) (33). Infatti, il più importante meccanismo fisiopatologico che causa la condizione clinica di HFpEF è la fibrosi miocardica, che riducendo la "compliance" ventricolare (riduzione della capacità e velocità di dilatazione per diminuita elasticità della parete) porta allo sviluppo della disfunzione diastolica (23).

Da un punto di vista fisiopatologico, l'ipertensione arteriosa cronica è considerata il fattore di rischio maggiore, essendo presente in ~60-80% dei pazienti con HFpEF (5, 11, 33). Il carico pressorio cronicamente aumentato è il *primus movens* che può innescare di per sé l'attivazione dei fibromioblasti della matrice extracellulare del tessuto cardiaco (34). I fibromioblasti attivati aumentano la produzione delle molecole di adesione VCAM/ICAM e anche delle citochine e chemochine proinfiammatorie (27-30, 33). Infatti, è ben noto che sia i fibromioblasti che i miocardiociti possiedono dei meccano-sensori accoppiati con i canali ionici di membrana, che sono stimolati dallo stiramento meccanico (33, 35). Inoltre, i pazienti con HFpEF presentano spesso obesità, dislipidemia, diabete mellito, aterosclerosi sistemica e coronarica, per cui sono interessati da un processo infiammatorio sistemico (33, 34). Recenti studi in modelli animali suggeriscono che l'ipertensione e la sindrome metabolica possano indurre un fenotipo infiammatorio con attivazione dei linfociti T helper 1 (Th 1), caratterizzato da aumentate concentrazioni di TNF, interferone, IL-18, "profibrotic cytokine transforming growth factor" (TGF) e MCP-1, che possono contribuire alla progressione della fibrosi miocardica (36-38). Gli aumentati livelli di citochine e chemochine proinfiammatorie reclutano cellule infiammatorie, specialmente monociti, dal circolo, che, a loro volta differenziatisi in macrofagi, producono sostanze in grado di stimolare la fibrosi miocardica, come galectina-3, MCP-1, TNF, TGF e PTX3 (29, 36-41). Anche un'unica misura delle concentrazioni circolanti di TNF- α , IL-6 o proteina C reattiva (PCR) sembrava in grado di predire lo sviluppo di scompenso cardiaco cronico nella popolazione generale ancora asintomatica, ma con età avanzata (età media 78 anni, 67% donne), reclutata nella coorte di Framingham (42). I soggetti che avevano tutti e tre i marcatori elevati presentavano un rischio maggiore, indicando che la capacità prognostica legata ai differenti marcatori potrebbe essere additiva (42). In particolare, le concentrazioni circolanti di TNF- α , IL-6, sTNFR1 e/o sTNFR2 sono stati riportati essere associati con un aumento della mortalità in pazienti con scompenso cardiaco cronico (43, 44). Pochi studi hanno cercato di valutare la rilevanza prognostica specificatamente in pazienti con HFpEF. Uno studio

prospettico di coorte ha riportato che i livelli di TNF- α sono risultati associati a un aumento della mortalità in un gruppo di 486 soggetti non ospedalizzati reclutati nella popolazione generale e seguiti con un "follow-up" di un anno, che presentavano scompenso cardiaco cronico accertato con frazione di eiezione $\geq 50\%$ (45).

Prendendo in considerazione i pazienti con scompenso acuto o con riacutizzazione di uno scompenso cronico, le concentrazioni circolanti di PCR, sST2, galectina-3 e/o IL-6 hanno mostrato una significativa associazione con la mortalità (46-52). Comunque, i marcatori di infiammazione e fibrosi hanno generalmente mostrato un'accuratezza diagnostica minore rispetto a quella dei peptidi natriuretici cardiaci nella diagnosi differenziale dei pazienti che si sono presentati al pronto soccorso con dispnea (29, 50).

Il maggior limite per l'utilizzo clinico dei marcatori di infiammazione, come la maggior parte delle citochine e delle chemochine, è che non esistono metodiche standardizzate automatizzate, ma sono disponibili solo metodiche ELISA o RIA. Inoltre, sono disponibili pochi dati in letteratura sui valori di riferimento e sulla variabilità biologica.

MARCATORI DI SINTESI E DEGRADAZIONE DEL COLLAGENE

Il rimodellamento della matrice extracellulare nel cuore è un processo attivo e assai complesso, orchestrato dalle MMP, che degradano la matrice, e dai loro inibitori TIMP (26). Le MMP costituiscono una complessa famiglia di enzimi del gruppo delle proteasi, di cui sono stati identificati almeno 28 membri (indicati con numeri progressivi da MMP-1 a MMP-28), classificate in base alla natura dei più importanti gruppi funzionali nel loro sito catalitico, che richiede la presenza di ioni metallici come cofattori (zincio o cobalto) (53, 54). Sono stati inoltre identificati 4 membri della famiglia degli inibitori delle MMP (da TIMP-1 a TIMP-4) (55).

Un'eccessiva deposizione di collagene, come si osserva dopo un esteso infarto miocardico o nella miocardiopatia ipertensiva e dilatativa, può essere la conseguenza di uno squilibrio tra l'azione dei processi che portano alla deposizione di nuovo collagene e quelli che sono deputati alla sua rimozione (24-27, 56). È importante sottolineare che uno squilibrio favorente la deposizione di collagene in eccesso con fibrosi miocardica è stato anche osservato in atleti veterani che praticavano attività sportiva di "elite" e con funzione sistolica e diastolica nei limiti fisiologici (57).

Il collagene fibrillare presente nel cuore è prevalentemente di tipo I (85%) e di tipo III (11%); quest'ultimo è quello che fornisce al miocardio elasticità, mentre il primo contribuisce maggiormente alla forza e alla resistenza del miocardio allo stress di parete e alla deformazione (58, 59). Il collagene è soggetto a ricambio ("turnover") a opera di fibroblasti e miofibroblasti, che rispondono a stress meccanici e a fattori autocrini e paracrini (quali angiotensina II, aldosterone, citochine, fattori di crescita), in parte secreti da monociti e macrofagi

(24, 25). Un incremento nella deposizione del collagene è la conseguenza di un'aumentata proliferazione dei fibroblasti/miofibroblasti e della loro velocità di sintesi e di secrezione del collagene (24, 25). Il collagene fibrillare è sintetizzato come pre-procollagene nel reticolo endoplasmico dei fibroblasti e trasformato in procollagene con struttura a tripla elica. Il procollagene, secreto nella matrice extracellulare, viene poi tagliato da proteasi per formare le fibrille di collagene di tipo I e III, che contribuiscono alla struttura della matrice extracellulare e alle caratteristiche meccaniche del miocardio (24, 25). Sebbene la biopsia del tessuto cardiaco sia considerata il "gold standard" per la diagnosi, alcuni marcatori del "turnover" del collagene sono stati proposti per una stima non invasiva della fibrosi miocardica (56, 60). I marcatori su cui si hanno più dati sono il "procollagen type I C-terminal propeptide" (PICP), il "procollagen type III N-terminal propeptide" (PIIINP) e il "collagen type 1 C-terminal telopeptide" (ICTP).

Considerando tutti i marcatori del "turnover" della matrice extracellulare come un gruppo unico, questi sono stati misurati nel sangue di pazienti con insufficienza cardiaca in molti studi (soprattutto di tipo caso-controllo), anche se le difficoltà analitiche ne hanno finora limitato l'uso nella pratica clinica (56). Sono riportati in letteratura i risultati di molti studi clinici mirati a dimostrare una differenza nelle concentrazioni circolanti di marcatori del "turnover" del collagene in pazienti con insufficienza cardiaca rispetto a soggetti sani, come recentemente analizzato in dettaglio in alcune rassegne sistematiche (56, 60) e anche in una meta-analisi (61). I risultati di questi studi sono difficilmente confrontabili perché differiscono per il numero e tipologia dei marcatori analizzati, per il disegno dello studio sperimentale (caso controllo vs. studio di coorte, prospettico o retrospettivo), come anche per numero e caratteristiche demografiche (soprattutto età e sesso) e cliniche dei pazienti arruolati (56, 60, 61). Anche i metodi analitici utilizzati per misurare lo stesso marcatore nei diversi studi presentano caratteristiche assai differenti. Generalmente sono stati utilizzati metodi RIA o ELISA, ma in molti studi le principali caratteristiche analitiche (sensibilità, riproducibilità, specificità degli anticorpi utilizzati) dei metodi utilizzati non sono specificate, per cui risulta impossibile fare un confronto dei dati ottenuti in studi differenti, anche considerando lo stesso marcatore.

Considerando i risultati, la grande maggioranza degli studi riporta concentrazioni dei vari marcatori più elevate nei pazienti rispetto ai controlli sani (56, 61, 62). Alcuni autori suggeriscono che il rapporto PICP/ICTP potrebbe, meglio di un singolo marcatore, fornire una stima del "turnover" del collagene di tipo I (56, 60). Occorre però notare che le differenze assolute tra soggetti sani e pazienti con scompenso cardiaco sono in genere inferiori a quelle dei peptidi natriuretici, che presentano differenze tra il valore mediano riscontrato in una popolazione di pazienti con scompenso cardiaco e quello di una popolazione di soggetti sani dell'ordine di più di 10 volte (19, 63, 64). Evidentemente, questo ridotto differenziale riscontrato tra il valore dei casi e quello dei controlli riduce

il "potere risolutivo" della misura del marcatore, specialmente nell'individuare i pazienti con le forme iniziali della malattia. Questo dato spiega perché questi biomarcatori risultino possedere mediamente una potenza diagnostica e prognostica molto inferiore rispetto al peptide natriuretico di tipo B (BNP) e al NT-proBNP (56, 61).

Considerando il possibile utilizzo dei marcatori di "turnover" del collagene come marcatori prognostici, discuteremo più in dettaglio solo i risultati di alcuni studi più significativi (studi prospettici o retrospettivi di coorte).

I risultati dello studio RALES ("Randomized aldactone evaluation study"), condotto su 261 pazienti con età media di 69 anni (28,5% donne) indicano che i pazienti con concentrazioni basali di PIIINP superiori alla mediana avevano un rischio significativamente superiore di morte, come anche di morte più ospedalizzazione, rispetto ai pazienti con concentrazioni più basse (65). A 6 mesi, PIIINP si riduceva nel gruppo trattato con spironolattone, ma non in quello con placebo. Inoltre, il trattamento con spironolattone migliorava gli esiti clinici (mortalità e eventi cumulativi di mortalità più ospedalizzazione) rispetto al placebo, solo nei pazienti con PIIINP basale superiore alla mediana. Questi dati, ottenuti in pazienti con scompenso cardiaco cronico di grado severo, hanno suggerito un ruolo del PIIINP come "target" terapeutico dello spironolattone, di cui è noto l'effetto anti-fibrotico. Questi risultati non sono stati però confermati dallo studio AREA IN-CHF, in cui 382 pazienti (188 in trattamento con canrenoato, età media 62,4 anni, 16,5% donne; 194 in placebo, media 62,0 anni, 15,0% donne) con insufficienza cardiaca di grado lieve-moderato, non hanno mostrato alcuna variazione di PIIINP, misurato con un metodo RIA, dopo 6 mesi di trattamento con un altro antagonista dell'aldosterone, il canrenoato, rispetto al gruppo placebo (66). In questo studio, il canrenoato migliorava la frazione di eiezione e riduceva l'ipertrofia del ventricolo sinistro e nello stesso tempo, in modo coerente, riduceva significativamente le concentrazioni di BNP.

Frantz et al. (67) hanno arruolato 249 pazienti con scompenso cardiaco (età media 65,3 anni, 31% donne) con ridotta frazione di eiezione ($\leq 40\%$), che poi hanno seguito per un "follow-up" medio di 2,5 anni. In questo studio è stato anche utilizzato un gruppo di controllo costituito da 74 soggetti sani. Le concentrazioni circolanti di TIMP-1, ma non quelle di MMP-9, sono risultate significativamente più elevate nei pazienti rispetto ai controlli. Nel "follow-up" TIMP-1 (ma non l'enzima MMP-9) è risultato anche un predittore indipendente di tutte le cause di morte (66 decessi durante i 2,5 anni di "follow-up", corrispondenti al 27% dei casi). Inoltre, il valore prognostico di TIMP-1 è risultato incrementale rispetto a quello del NT-proBNP, per cui i pazienti che presentavano i due marcatori entrambi elevati hanno mostrato una mortalità superiore a quelli che ne avevano uno solo elevato.

Nello studio multicentrico prospettico REVE-2, BNP e rapporto tra PIIINP e ICTP sono stati misurati un mese dopo un infarto del miocardio anteriore in 218 pazienti

(età media 57 anni, 19% donne), che poi sono stati seguiti per 12 mesi dopo la dimissione ospedaliera (68). Un rapporto ≤ 1 tra PIIINP e ICTP è risultato essere indipendentemente associato allo sviluppo di scompenso cardiaco, mortalità per eventi cardiovascolari e riospedalizzazione nei 12 mesi del "follow-up" (68).

Più recentemente, lo studio retrospettivo di coorte denominato "Cardiovascular health study" ha valutato l'associazione tra le concentrazioni circolanti dei marcatori "transforming growth factor- β " (TGF- β) e PIIINP e gli eventi cardiovascolari maggiori (infarto del miocardio, scompenso cardiaco e ictus), sviluppati in 2568 soggetti (età media 78 anni, 59% donne) seguiti per un "follow-up" di 15 anni (69). Nell'analisi multivariata [che includeva anche la misura del NT-proBNP e della troponina cardiaca T (cTnT)], PIIINP (ma non TGF- β) è risultato essere associato con eventi cardiovascolari maggiori e anche con lo sviluppo di scompenso cardiaco, ma non di ictus e infarto del miocardio.

Evidentemente riveste una notevole rilevanza clinica la possibilità di usare uno o più marcatori del "turnover" del collagene per differenziare tra loro i gruppi di pazienti con le due tipologie di scompenso cardiaco, HFpEF e HFrEF. Due studi dello stesso gruppo di ricercatori hanno valutato se vari marcatori di "turnover" del collagene (PINP, PIIINP, ICTP, MMP-1, MMP-2, MMP-9 e TIMP-1) possano essere utili nel differenziare HFpEF da HFrEF (62, 70). I risultati, benché ottenuti in un numero relativamente scarso di pazienti, suggeriscono che tra i vari biomarcatori di "turnover" del collagene, MMP-2 potrebbe essere utile nell'identificazione dei pazienti con HFpEF (70).

Naito et al. (71) hanno studiato 110 pazienti ospedalizzati con scompenso cardiaco cardiaco riacutizzato, di cui 68 con HFpEF (età media 71 anni, 35% donne) e 42 con HFrEF (74 anni, 48% donne). 10 soggetti apparentemente sani sono stati utilizzati come gruppo di controllo (età media 70 anni, 40% donne). Sono state misurate le concentrazioni circolanti di MMP-1 e MMP-2, sia all'ammissione che alla dimissione dal reparto ospedaliero, con un metodo immunoenzimatico. Le concentrazioni di MMP-1 erano più elevate all'ammissione in entrambi i gruppi di pazienti rispetto ai controlli; tuttavia, erano più elevate nei pazienti con disfunzione sistolica rispetto alla diastolica e non cambiavano alla dimissione in entrambi i gruppi (71). Anche le concentrazioni di MMP-2 erano più elevate all'ammissione in entrambi i gruppi di pazienti rispetto ai controlli, ma poi si riducevano alla dimissione. Confrontando i valori riscontrati all'ammissione con quelli alla dimissione, i cambiamenti della frazione di eiezione ventricolare (che aumentava) e dei valori di BNP (che diminuivano) correlavano con il comportamento di quelli del MMP-2, ma non con quelli di MMP-1, nei pazienti con disfunzione sistolica, ma non in quelli con disfunzione diastolica (71). Pertanto questo studio indica che il comportamento dei marcatori di "turnover" del collagene, anche se appartenenti alla stessa famiglia delle metalloproteinasi (come MMP-1 e MMP-2), possa mostrare comportamenti significativamente differenti nei

due gruppi di pazienti con HF_rEF e HF_pEF.

In conclusione, sebbene siano reperibili in letteratura molti studi riguardanti le concentrazioni circolanti dei marcatori di "turnover" del collagene e della matrice extracellulare, non vi sono al momento evidenze che questi marcatori apportino informazioni aggiuntive, utili per la diagnosi o il trattamento dei pazienti con scompenso cardiaco rispetto a quelle fornite dai peptidi natriuretici, dai test funzionali o dall'"imaging" cardiaco. Pertanto, al momento le linee guida internazionali non raccomandano il loro impiego nella pratica clinica (5, 10).

MARCATORI DI FIBROSI MIOCARDICA

I cosiddetti marcatori di fibrosi cardiaca, soprattutto galectina-3 e sST2, sono stati molto studiati in questi ultimi 10 anni. Si sono accumulate evidenze, anche se non definitive, sul loro possibile utilizzo come marcatori prognostici in pazienti con scompenso cardiaco, tanto che le ultime linee guida dell'"American College of Cardiology Foundation" e dell'"American Heart Association" li hanno inseriti, anche se con una forza di evidenza intermedia (IIbA), come possibili marcatori di prognosi nei pazienti con scompenso cardiaco acuto (5).

Galectina-3

La galectina-3 è una lectina che lega la β -galattosidasi coinvolta in vari processi come la risposta infiammatoria, i tumori e la fibrosi (39, 72, 73). Molti studi sperimentali dimostrano che la galectina-3 è coinvolta nei più importanti processi biologici a livello cellulare, come adesione, attivazione, attrazione chemiotattica,

crescita, differenziamento e apoptosi (39, 72, 73). Un aumento dell'espressione della galectina-3 induce la proliferazione dei fibroblasti e la produzione di collagene, contribuendo così all'aumento della fibrosi cardiaca e al conseguente rimodellamento (Figura 1) (39, 72, 73).

Nell'ultimo decennio sono stati pubblicati numerosi studi su questo marcatore, favoriti dalla disponibilità di metodi immunometrici che utilizzano piattaforme automatizzate, che mostrano ottime prestazioni analitiche (9, 74-76). La galectina-3 è stata studiata inizialmente come mediatore della crescita e progressione di diversi tipi di tumori; solo in un secondo tempo è stata notata la sua forte associazione con le condizioni cliniche caratterizzate da infiammazione cronica con quadro interstiziale. La galectina-3 è infatti presente nel citoplasma di differenti tipi cellulari ed è particolarmente abbondante nei macrofagi (39, 72).

Il razionale per candidare la galectina-3 come marcatore nell'insufficienza cardiaca deriva da studi in modelli animali, che hanno dimostrato come la sua inibizione farmacologica o genetica è in grado di regolare la risposta ipertrofica e il danno cardiaco funzionale conseguente a somministrazione di angiotensina II oppure a costrizione dell'aorta (40, 77). La galectina-3 è stata proposta non solo come marcatore di stratificazione del rischio nei pazienti con insufficienza cardiaca, ma anche come possibile bersaglio terapeutico degli antagonisti recettoriali dell'aldosterone, poiché è stato riportato nell'animale da esperimento che la galectina-3 è uno dei mediatori della fibrosi vascolare indotta da aldosterone (73). I risultati di questi studi sperimentali hanno aperto la strada a molti studi clinici che hanno cercato di valutare se la galectina-3 possa giocare un

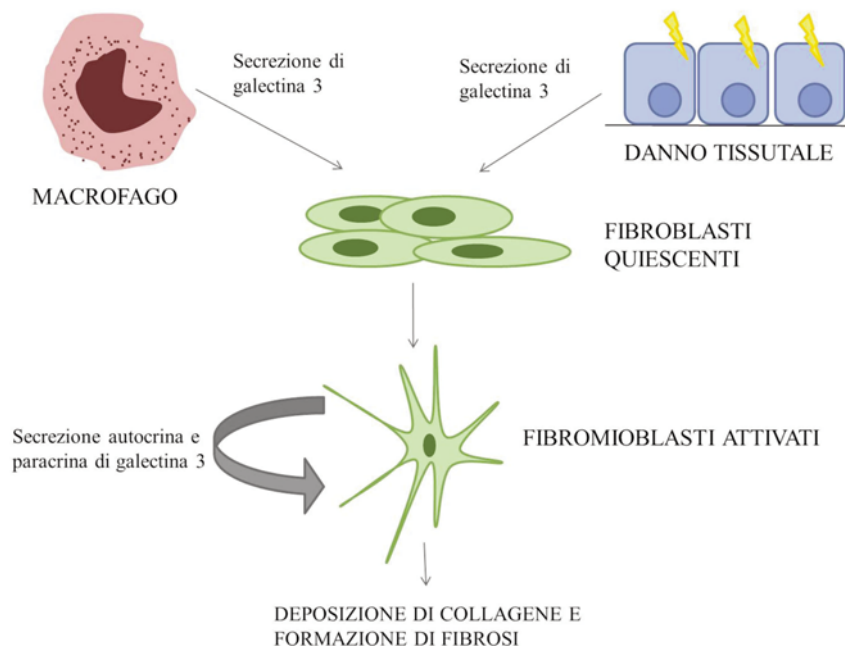


Figura 1

Rappresentazione schematica dei processi fisiopatologici che portano alla secrezione di galectina-3 e poi alla deposizione di collagene e alla formazione della fibrosi cardiaca, quando si ha un danno del tessuto miocardico. Modificata da rif. 39.

ruolo nella risposta maladattativa a diversi tipi di insulto al miocardio come mediatore/marcatore di fibrosi, infiammazione e rimodellamento cardiaco in pazienti con scompenso cardiaco (78-80).

Come già evidenziato in precedenza per i marcatori di infiammazione e di "turnover" del collagene e della matrice extracellulare, anche per la galectina-3 molti studi clinici, che hanno cercato di valutare la sua accuratezza diagnostica o prognostica, presentano una forza statistica insufficiente per lo scarso numero di pazienti arruolati, che non consente un'analisi multivariata adeguata. Inoltre, come precedentemente dimostrato (76), la differenza tra i livelli di galectina-3 in soggetti apparentemente sani e con scompenso cardiaco cronico o riacutizzato, sebbene significativa, non è molto marcata (76). Se si confrontano questi dati con quelli del BNP (o NT-proBNP), nei pazienti con scompenso cardiaco questi ultimi risultano aumentati anche fino a 100 volte rispetto a quelli riscontrati in soggetti apparentemente sani, riuscendo a stratificare i pazienti secondo il grado di severità dello scompenso (7, 19, 21, 64), cosa che invece non sembra possibile con i valori di galectina-3. Infine, molti studi clinici sui marcatori di fibrosi sono caso-controllo, mentre pochi sono di coorte prospettici o retrospettivi con "follow-up" ≥ 12 mesi.

D'altra parte, la variabilità biologica sia intra-individuale (~5-8%) che tra soggetti (~27%) risulta inferiore per la galectina-3 rispetto a quella dei peptidi natriuretici o delle troponine, come riportato in un recentissimo studio (81). La relativamente bassa variabilità biologica accoppiata con l'ottima prestazione analitica dei metodi di dosaggio automatizzati, rende l'informazione analitica derivata dalla misura della galectina-3 estremamente robusta.

Numerosi studi hanno riportato un'associazione significativa tra livelli elevati di galectina-3 e insufficienza cardiaca di nuova diagnosi (82, 83), come anche con la gravità e la prognosi dell'insufficienza cardiaca, in pazienti sia con frazione di eiezione ridotta che conservata (84-87). Due studi hanno anche suggerito che la galectina-3 possa essere un marcatore in grado di identificare sottogruppi di pazienti responsivi a trattamento farmacologico con statine (rosuvastatina) o sartani (valsartan) (88, 89). E' comunque importante sottolineare come questi dati siano il frutto di analisi *post hoc* e quindi richiedano la conferma con studi *ad hoc*. Sulla base di queste evidenze cliniche, la "Food and Drug Administration" (FDA) americana ha approvato il dosaggio di galectina-3 in associazione con la valutazione clinica per meglio definire la prognosi di pazienti con una diagnosi di insufficienza cardiaca cronica (novembre 2010).

Considerando più in dettaglio il ruolo predittivo della galectina-3 in pazienti con scompenso cardiaco acuto, lo studio PRIDE ha riportato che la galectina-3 si è dimostrata essere il miglior predittore di mortalità a 60 giorni e di ri-ospedalizzazione in un gruppo di 599 pazienti che si sono presentati al pronto soccorso con dispnea, di cui 209 pazienti (età media 72,8 anni, 49% donne) con scompenso cardiaco acuto (48). Questa

associazione è stata confermata anche da un successivo "follow-up" di 4 anni dello stesso studio (52). De Boer et al. (84) hanno riportato che elevati valori di galectina-3 in 592 pazienti (35% donne), di cui 485 avevano una frazione di eiezione sistolica ventricolare ridotta ($\leq 40\%$), erano associati a un aumentato rischio di mortalità e riospedalizzazione dopo un "follow-up" di 18 mesi in un modello multi-variabile che includeva anche età, sesso, BNP, funzionalità renale e diabete mellito. In un altro studio condotto su 419 pazienti con scompenso cardiaco acuto e frazione di eiezione conservata ($>45\%$) (età media 76,2 anni, 61% donne), la galectina-3 si è confermata essere un marcatore in grado di predire mortalità e riospedalizzazione a un anno (90). E' importante sottolineare che in questo studio il numero degli eventi combinati (219, 52% del totale) e dei decessi (129, 31% dei casi) è stato abbastanza elevato, nonostante il "follow-up" fosse di un solo anno, indicando che i pazienti erano ad alto rischio per la presenza di numerose e severe comorbidità (diabete mellito 48,7%, ipertensione arteriosa 84,2%, insufficienza renale 54,4%, pregresso ictus 11%, broncopneumopatia cronica ostruttiva 54,7%, vasculopatia periferica 36%). Questi risultati sono stati confermati da una recente meta-analisi che ha preso in considerazione i dati di 3 differenti studi (91). Questa meta-analisi ha evidenziato che elevati valori di galectina-3 sono associati a una prognosi peggiore a breve termine e a una maggiore riospedalizzazione per scompenso cardiaco.

Diversi studi si sono focalizzati sulla valutazione della galectina-3 come marcatore prognostico nei pazienti con scompenso cardiaco cronico (87-89, 92-95), inclusa una recente meta-analisi (80). In generale, emerge l'associazione tra valori elevati di galectina-3 e rischio di mortalità e di riospedalizzazione per scompenso cardiaco; tuttavia, in alcuni studi questa associazione non viene poi confermata quando sono presi in considerazione dal modello statistico multivariabile altri noti e potenti predittori di mortalità, come per esempio i peptidi natriuretici, la funzionalità renale e/o i test di funzionalità cardiaca o polmonare (79).

Considerando le comorbidità che più frequentemente si osservano nei pazienti con scompenso cardiaco cronico, una particolare attenzione deve essere posta sull'associazione delle concentrazioni circolanti di galectina-3 con la ridotta funzionalità renale. Infatti, la presenza di insufficienza renale potrebbe essere una variabile confondente dell'analisi statistica, poiché sia le concentrazioni di galectina-3 che il peggioramento della funzione renale sono forti predittori di eventi avversi in pazienti con scompenso cardiaco. Tuttavia, la malattia renale cronica potrebbe essere anche una concausa di elevate concentrazioni di galectina-3, perché nell'insufficienza renale cronica vi è estesa fibrosi renale (quadro anatomopatologico del "rene grinzoso"), che può quindi esser associata alla fibrosi cardiaca nei pazienti che presentano sia insufficienza renale che cardiaca cronica (96). In accordo con questa ipotesi, alcuni autori hanno suggerito che la galectina-3 potrebbe dimostrarsi un marcatore in grado di identificare i pazienti a rischio di

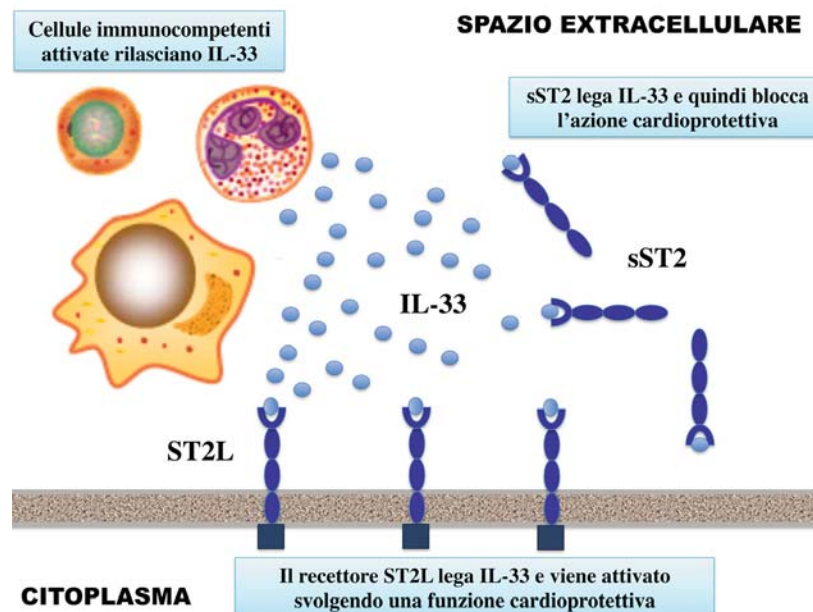


Figura 2

Rappresentazione schematica del meccanismo di competizione tra il recettore solubile sST2 e il recettore di membrana ST2L nei confronti del loro specifico ligando interleuchina 33 (IL-33).

sviluppare una sindrome cardio-renale nelle fasi iniziali (97).

Per quanto riguarda il possibile ruolo del dosaggio della galectina-3 nel “follow-up” dei pazienti con scompenso cardiaco, non vi è ancora alcuna evidenza che dimostri l'utilità di seguire nel tempo le concentrazioni circolanti di questo marcatore.

In conclusione, la galectina-3 ha appena iniziato il suo percorso per una sua completa validazione secondo i principi della “evidence-based laboratory medicine” (98). Rispetto ad altri marcatori di infiammazione e di rimodellamento cardiaco (inclusa sST2), la galectina-3 presenta l'indubbio vantaggio di poter essere misurata con metodiche automatizzate con ottime prestazioni analitiche. Non è però ancora chiaro se la galectina-3 sia in grado di distinguere tra i pazienti con scompenso cardiaco coloro che effettivamente presentano fibrosi cardiaca e/o quelli con funzione sistolica conservata, ma con significativa disfunzione diastolica. Inoltre, non ci sono studi che abbiano dimostrato l'effettivo valore della galectina-3 come marcatore di rischio indipendente rispetto ai peptidi natriuretici cardiaci e anche rispetto agli altri marcatori di infiammazione e rimodellamento del miocardio (inclusa sST2) (99, 100). Infine, mancano studi *ad hoc* che abbiano valutato il rapporto costo/beneficio dell'utilizzo di questo marcatore nei pazienti con scompenso cardiaco acuto e cronico.

sST2

La proteina ST2 appartiene alla famiglia dei recettori dell'interleuchina-1 (IL-1 RL-1) ed esiste in due isoforme, una transmembrana (ST2L) e una solubile (sST2). Il ligando specifico del recettore STL2 è IL-33, che svolge

a livello del miocardio un ruolo anti-infiammatorio, anti-ipertrofico e anti-fibrotico (101). sST2 non è altro che il recettore ST2L, che, attraverso l'azione di specifiche proteasi, ha subito un taglio a livello dei domini transmembrana e citoplasmatico e che quindi è stato liberato nel liquido extracellulare (Figura 2) (101). Nel liquido extracellulare e nel plasma la proteina sST2 è ancora in grado di legare il suo ligando specifico IL-33 con alta affinità, sequestrandolo e quindi non rendendolo più disponibile per il legame al suo recettore di membrana (101). In questo modo sST2 blocca l'effetto favorevole della citochina IL-33 sul miocardio comportandosi come un “decoy-receptor” (Figura 2). Elevate concentrazioni circolanti di sST2, come si possono riscontrare nei pazienti con scompenso cardiaco, favoriscono i meccanismi proinfiammatori che portano al rimodellamento del miocardio, alla fibrosi cardiaca e alla disfunzione ventricolare diastolica (102). In accordo con questo meccanismo di azione, molti studi hanno dimostrato che elevate concentrazioni circolanti di sST2 sono effettivamente riscontrabili in pazienti con scompenso cardiaco, sia acuto che cronico (102-104).

Considerando i pazienti con scompenso cardiaco acuto, uno dei primi studi a valutare l'accuratezza prognostica del recettore sST2 è stato lo studio PRIDE (50). Questo studio ha esaminato 599 pazienti ammessi al dipartimento di emergenza con dispnea; di questi pazienti però solo 209 (35%) avevano effettivamente uno scompenso cardiaco acuto (età media 72,8 anni, 49% donne), mentre i restanti (età media 56,9 anni, 49% donne) non avevano un'insufficienza cardiaca. Questi pazienti sono stati poi seguiti con un “follow-up” di un anno. Le concentrazioni circolanti di sST2 erano

mediamente più elevate nei pazienti con scompenso cardiaco acuto rispetto a coloro in cui un'insufficienza cardiaca non è era diagnosticata durante il ricovero (0,50 µg/L vs. 0,15 µg/L). Inoltre, le concentrazioni di sST2 erano associate a un aumento di mortalità a un anno in maniera indipendente e additiva rispetto anche ai valori di NT-proBNP, suggerendo che i due marcatori aggiungono informazioni legate a differenti meccanismi fisiopatologici. Il "follow-up" dello studio PRIDE è stato successivamente prolungato fino a 4 anni raggiungendo un numero di eventi pari a 186 (36% dei decessi sulla coorte totale), confermando che il valore predittivo di sST2 si manteneva anche nel lungo periodo in modo indipendente e additivo rispetto a quello del NT-proBNP (105).

Rehman et al. (51) hanno studiato 346 pazienti con scompenso cardiaco acuto, inclusi nella coorte studiata nello studio PRIDE. Anche in questo studio, sST2 ha confermato il suo valore prognostico indipendente e additivo rispetto al BNP per la mortalità a un anno, poiché i pazienti con valori elevati del marcatore hanno mostrato un rischio di mortalità di circa il doppio rispetto ai pazienti con valori non elevati. I risultati di questi 3 studi, basati sulla stessa coorte di pazienti con scompenso acuto ammessi ai dipartimenti di emergenza di Boston e Linz (50, 51, 105), dimostrano che concentrazioni elevate di sST2 e NT-proBNP o BNP presentano un valore prognostico indipendente e additivo, per cui i pazienti con entrambi i marcatori elevati hanno un rischio molto più elevato (>40%) di quelli che presentano un solo marcatore elevato o nessuno (<10%). In altri studi di confronto tra differenti marcatori, sST2 ha confermato il suo ruolo prognostico additivo rispetto ai peptidi natriuretici e le troponine in pazienti con scompenso cardiaco acuto (106, 107). Uno studio multicentrico, che però ha preso in considerazione anche pazienti già valutati in precedenti studi, ha cercato di verificare se sST2 potesse discriminare tra pazienti con HFpEF e HFrEF (108). A questo scopo sono stati valutati 477 pazienti con scompenso cardiaco acuto (197 con frazione di eiezione ≥50% e 250 <50%). I risultati indicano che il dosaggio di sST2 sembra mantenere la sua capacità prognostica sia nei pazienti con HFpEF sia in quelli con HFrEF (108).

Due studi suggeriscono che eseguire prelievi seriati (piuttosto che un singolo prelievo) può migliorare il valore prognostico del marcatore. Boisot et al. (109) suggeriscono di utilizzare la percentuale di variazione tra il valore all'ammissione rispetto a quello della dimissione come stima prognostica sulla mortalità dei pazienti con scompenso acuto. I pazienti con una diminuzione ≥15,5% mostrano un rischio di mortalità del 7% rispetto a un rischio del 33% dei pazienti in cui i valori non diminuiscono. Manzano-Fernández et al. (110) hanno misurato le concentrazioni di sST2 all'ammissione e al 4° giorno di ospedalizzazione in 72 pazienti con insufficienza cardiaca acuta. Questi autori suggeriscono l'utilizzo di due cut-off, uno di 62 µg/L all'ammissione e uno di 44 µg/L alla dimissione. I pazienti che mostrano valori di sST2 all'ammissione e/o alla dimissione inferiori

del cut-off mostrano un rischio di mortalità molto inferiore. Sebbene i risultati di questi due studi (109, 110) sembrano suggerire che l'utilizzo di prelievi seriati possa migliorare il valore prognostico della proteina sST2 e perfino fornire una guida al trattamento (103), occorrono tuttavia altri dati per raccomandare l'utilizzo sistematico di questo marcatore in pazienti con scompenso acuto *de novo* o riacutizzato, in quanto non è chiaro se bisogna utilizzare dei valori di cut-off oppure una variazione percentuale e soprattutto non è stato valutato il rapporto costo/beneficio dell'utilizzo di questo marcatore nella pratica clinica.

Molti studi hanno riportato che la misura della sST2 possiede un significativo valore prognostico anche nei pazienti affetti da scompenso cardiaco cronico (51, 111-118). In particolare, Ky et al. (111) hanno arruolato in uno studio multicentrico di coorte 1141 pazienti ambulatoriali (età media 56,3 anni, 33% donne) con scompenso cardiaco con un "follow-up" mediano di 2,8 anni, in cui si sono osservati 267 eventi (nel 23% dei casi complessivi) di morte o trapianto cardiaco. In un modello multivariato, i pazienti con le concentrazioni di sST2 nel terzile più elevato (≥36,3 µg/L) mostravano una marcata associazione con eventi avversi rispetto al terzile con valori del marcatore meno elevati (≤22,3 µg/L) e inoltre un valore discriminante, valutato mediante la curva ROC, non statisticamente differente da quello del NT-proBNP (area sotto la curva, 0,75 vs. 0,77) (111). Bayes-Genis et al. (112) hanno arruolato 891 pazienti (età media 70,2 anni, 28,4% donne) con scompenso cardiaco cronico seguiti in ambulatorio con un "follow-up" mediano di 33,4 mesi, in cui sono stati misurati sia sST2 che NT-proBNP allo scopo di valutare un miglioramento della stratificazione del rischio di mortalità rispetto ai classici indici demografici e clinici. I risultati di questo studio indicano che sST2 possiede una capacità indipendente e incrementale di predire il rischio di mortalità e di riclassificare i pazienti rispetto al NT-proBNP (112). Successivamente, altri studi di coorte hanno confermato che esiste un'associazione statisticamente significativa tra alte concentrazioni di sST2 e capacità funzionale, mortalità, riospedalizzazione o effettuazione di trapianto cardiaco in pazienti con scompenso cardiaco cronico (113-117). Infine, uno studio, condotto su una coorte di 876 pazienti con scompenso cardiaco cronico (età media 70,2 anni, 28,4% donne) con HFrEF, ha confrontato l'accuratezza prognostica dei due marcatori sST2 e galectina-3 (118). Questo studio ha riportato che entrambi i marcatori possedevano un ottimo valore prognostico (per mortalità da tutte le cause, mortalità cardiovascolare e riospedalizzazione); tuttavia, all'analisi multivariata, solo la proteina sST2 manteneva la sua associazione con la mortalità cardiovascolare. Questi dati suggeriscono che sST2 e galectina-3 possano fornire informazioni fisiopatologiche e cliniche simili, per cui la misura contemporanea di entrambi i marcatori risulta ridondante e quindi potrebbe essere consigliabile nella pratica clinica sceglierne uno solo dei due.

Abbiamo già parlato della grande importanza clinica

che riveste la valutazione della presenza di una sindrome cardio-renale nei pazienti con scompenso cardiaco, sia acuto, che cronico (119, 120). Alcuni studi hanno valutato il valore prognostico di sST2 in pazienti con scompenso cardiaco con insufficienza renale suggerendo che le concentrazioni circolanti di sST2 sono meno influenzate dall'insufficienza renale di quelle di galectina-3 e dei peptidi natriuretici (121-123). In particolare, lo studio di Zhang et al. (121) ha confrontato il valore prognostico per la mortalità generale dei marcatori sST2 e galectina-3 in 1161 pazienti ospedalizzati con scompenso cardiaco (*de novo* o riacutizzato) (età media 58 anni, 29,4 % donne), seguiti con un "follow-up" di un anno. Il valore prognostico della sST2 si è dimostrato indipendente sia dai valori del filtrato glomerulare stimato (eGFR) che del NT-proBNP, mentre la galectina-3 è stata scartata dal modello statistico quando è stato inserito NT-proBNP per il sottogruppo dei pazienti con eGFR <60 mL/min/1,73 m² (121). Lo studio di Bayes-Denis et al. (122) ha cercato di valutare il ruolo di diversi marcatori (NT-proBNP, cTnT, cistatina C e sST2) in una coorte di 879 pazienti ambulatoriali con scompenso cardiaco (età media 70,4 anni, 28,2% donne), seguita con un "follow-up" medio di 3,5 anni, con o senza insufficienza renale. Questi pazienti sono stati suddivisi in 3 sottogruppi a seconda della funzione renale (eGFR ≥60 mL/min/1,73 m², n=337; eGFR=30-59 mL/min/1,73 m², n=352; eGFR <30 mL/min/1,73 m², n=190). Il modello multivariato per la stima della mortalità per tutte le cause (312 gli eventi registrati, corrispondenti al 35% di decessi rispetto alla totalità della coorte), che includeva anche sST2, ha mostrato una migliore prestazione nei test di calibrazione e di riclassificazione nei pazienti con insufficienza renale rispetto al resto della coorte (122). Un recente studio ha valutato sia sST2 che galectina-3 in una coorte di 119 pazienti con scompenso cardiaco con ridotta funzione sistolica ventricolare (età media 66 anni, 26% donne) (124). I risultati di questo studio suggeriscono che la proteina sST2 possa essere un valido predittore di rischio di morte nei pazienti con i valori più bassi di eGRF (<34 mL/min/1,73 m²), mentre la galectina-3 sia meglio nei pazienti con eGFR ≥73 mL/min/1,73 m², suggerendo che la condizione clinica dei pazienti (in particolare la funzione renale), e quindi la loro selezione nello studio, giochino un rilevante ruolo nel determinare i risultati che si ottengono.

Confronto tra marcatori di fibrosi: sintesi delle evidenze e nuove prospettive

Considerando nel loro insieme le evidenze riportate in letteratura, la proteina sST2 sembra ottenere mediamente migliori prestazioni prognostiche nei pazienti con scompenso cardiaco acuto e cronico rispetto alla galectina-3 e agli altri marcatori di rimodellamento cardiaco (125). Tuttavia, nonostante che gli studi su questo marcatore siano numerosi, questi provengono quasi tutti da un ristretto numero di centri qualificati, che hanno valutato con studi *post hoc* quasi

sempre le medesime coorti di pazienti. Questa limitazione nel numero dei centri può essere dovuta al fatto che il metodo di dosaggio della sST2 è un metodo ELISA, che, sebbene sia stato approvato dalla FDA e abbia ottenuto il marchio CE, risulta difficilmente reperibile sul mercato e, almeno al momento, non può essere implementato sulle più diffuse piattaforme automatizzate che utilizzano metodiche immunometriche, per cui è utilizzato solamente in pochi centri altamente qualificati (102, 126). Le caratteristiche analitiche di questo metodo sono state valutate in alcuni studi, che hanno riportato una buona riproducibilità (CV ≤20%) (126-128). Il metodo ELISA per la sST2 può essere anche implementato su alcune piattaforme automatizzate (127). Sono stati anche riportati gli intervalli di riferimento per questo metodo (126-128). Un metodo "point of care testing" (POCT) per il dosaggio della proteina sST2 è stato da poco immesso sul mercato e quindi la disponibilità di questo metodo potrebbe favorire una più larga diffusione del dosaggio di sST2 nella pratica clinica (129).

Per contro, la galectina-3 può essere misurata con due metodiche immunometriche utilizzabili su piattaforme automatizzate largamente diffuse nei paesi industrializzati (9, 74-76), per cui questo marcatore è potenzialmente alla portata di tutti i laboratori clinici. Questa possibilità ha favorito una più larga diffusione del metodo di dosaggio della galectina-3, che a sua volta ha prodotto molti più studi su questo marcatore, rispetto ad altri marcatori di fibrosi e rimodellamento cardiaco. Considerando questa fioritura di studi sulla galectina-3, inclusi alcuni multicentrici, è stato recentemente possibile valutare il valore prognostico della galectina-3 anche mediante una meta-analisi, che ha incluso 11 studi di coorte con 8419 pazienti arruolati in "follow-up" che variavano da 1 a 8,7 anni (80). Questa meta-analisi, nonostante la larga eterogeneità riscontrata tra gli studi, ha potuto dimostrare che ogni aumento di 1% delle concentrazioni plasmatiche di galectina-3 è associato a un aumento del 59% del rischio di mortalità (80).

Un altro aspetto assai importante dal punto di vista sia fisiopatologico che clinico, è la possibilità di poter distinguere per mezzo della misura dei marcatori nei pazienti con sintomi di scompenso cardiaco cronico quelli con fibrosi cardiaca e con disfunzione cardiaca prevalentemente diastolica (HFpEF). La diagnosi e il trattamento risultano più difficoltosi nei pazienti con HFpEF, per cui la prognosi è più severa. Sarebbe quindi importante identificare nei primissimi stadi della malattia il sottogruppo di pazienti con HFpEF per intervenire con un trattamento adeguato per arrestare il rimodellamento avverso (5, 11). Attualmente, il "gold standard" per la diagnosi di fibrosi cardiaca è la biopsia endomiocardica, che, evidentemente, non può essere considerato un esame di screening, essendo una procedura invasiva (130, 131). Recentemente, sono state sviluppate delle tecniche di "imaging" per valutare la presenza di fibrosi cardiaca (132). L'ecocardiografia è utilizzata soprattutto per valutare le conseguenze funzionali della fibrosi, in particolare la presenza di una disfunzione diastolica

(130, 132). Per contro, la risonanza magnetica cardiaca (RMC) permette un'accurata caratterizzazione tissutale; in particolare, la tecnica così detta del "late gadolinium enhancement" (LGE) è utilizzata per quantificare la fibrosi miocardica (130-133). Le più recenti tecniche di RMC permettono di valutare la presenza e l'estensione anche della fibrosi interstiziale microscopica (134). La RMC con LGE, essendo una tecnica sviluppata da poco e che richiede strumentazione e personale dedicato, è attualmente utilizzata in pochi centri. Per questo motivo, solo pochi studi hanno confrontato i risultati ottenuti con questa tecnica di "imaging" e le concentrazioni circolanti dei marcatori di fibrosi miocardica, come sST2 e galectina-3. Quick et al. (133) hanno valutato la presenza di fibrosi miocardica mediante la tecnica RCM-LGE in 90 pazienti con malattia coronarica cronica, 22 con miocardite e 44 soggetti senza cardiopatia, utilizzati come gruppo di controllo. Le concentrazioni di sST2 in questi soggetti correlavano con la classe funzionale NYHA ("New York Heart Association"), ma non con i risultati della RCM-LGE per quanto riguarda la presenza di fibrosi e la funzione ventricolare; per contro, le concentrazioni circolanti di NT-proBNP correlavano sia con i valori della classe funzionale NYHA, con la presenza di fibrosi valutata con RCM-LGE e con la funzione di eiezione ventricolare sinistra (134). Vergaro et al. (135) hanno arruolato 150 pazienti consecutivi (età media 58 anni, 27% donne) con diagnosi di cardiomiopatia dilatativa non-ischemica, che presentavano per la maggior parte una sintomatologia non severa (87% in classe NYHA I-II e 13% in classe NYHA III-IV), ma con una frazione di eiezione mediamente ridotta (35%). Utilizzando la tecnica RCM-LGE, 106 di questi pazienti hanno evidenziato la presenza di fibrosi miocardica. Considerando un modello di analisi statistica multivariata, i valori di galectina-3 (ma non quelli dei peptidi natriuretici e troponina I) sono risultati indipendentemente associati alla presenza di fibrosi cardiaca, valutata con RCM-LGE (134). I risultati di questo studio sembrano supportare i dati riportati in studi precedenti che hanno suggerito che la galectina-3 potesse essere utile nel riconoscere i pazienti con HFpEF, che più frequentemente presentano disfunzione diastolica dovuta alla presenza di fibrosi cardiaca interstiziale, rispetto a quelli con HFrEF (84, 136, 137). Da un punto di vista strettamente fisiopatologico, la più stretta associazione tra presenza di fibrosi miocardica e galectina-3 rispetto alla sST2 è anche supportata da molti studi sperimentali, che indicano che galectina-3 è strettamente connessa con la presenza di fibrosi (39, 40, 72, 73, 77-79), mentre sST2 sembra piuttosto essere un marcatore aspecifico di infiammazione, sia acuta che cronica (101, 138). Bisogna ancora una volta sottolineare che galectina-3 e sST2 non sono marcatori organo-specifici, e quindi nemmeno cardio-specifici, come invece lo sono i peptidi natriuretici cardiaci e le troponine cardiache. Nell'interpretazione fisiopatologica e clinica di elevate concentrazioni di questi marcatori si deve quindi prendere in considerazione l'eventuale presenza nel

paziente di processi infiammatori in differenti organi e tessuti.

CONCLUSIONI

Come anche riportato dalle più recenti linee guida internazionali (5), ulteriori studi sono necessari per dimostrare l'utilità clinica del dosaggio delle proteine sST2 e galectina-3 nei pazienti con scompenso cardiaco. Questi studi dovrebbero rispondere ad alcuni importanti quesiti fisiopatologici e clinici, quali:

- se galectina-3 e sST2 sono marcatori di gravità e prognosi oppure solo fattori predisponenti o aggravanti;
- quale sia il valore aggiunto della misura di galectina-3 e sST2 rispetto ai marcatori tradizionali di insufficienza cardiaca, come peptidi natriuretici e troponine;
- se questi marcatori sono in grado di distinguere tra le due forme di insufficienza cardiaca, cioè HFrEF e HFpEF;
- quanto l'insufficienza renale, spesso associata all'insufficienza cardiaca, può modificare le concentrazioni circolanti di questi marcatori e quindi anche la loro accuratezza diagnostica e prognostica.

Tuttavia, il quesito più importante a cui i nuovi studi dovrebbero rispondere è se l'utilizzo di questi marcatori migliora il trattamento e/o la qualità di vita dei pazienti con scompenso cardiaco.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: 50 years of progress. *Circulation* 2000;102(20 suppl 4):IV14-23.
2. Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet* 2015;385:812-24.
3. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N; on behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. Cardiac remodeling - Concepts and clinical implications: a consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.
4. Emdin M, Vittorini S, Passino C, et al. Old and new biomarkers of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009;11:331-5.
5. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:e147-239.
6. Franzini M, Masotti S, Prontera C, et al. Rilevanza clinica e interpretazione dei marcatori biochimici nello scompenso cardiaco. *Biochim Clin* 2015;39:241-55.
7. Clerico A, Vittorini S, Passino C, et al. New biomarkers of heart failure. *Crit Rev Cl Lab Sci* 2009;46:107-28.
8. Giannoni A, Giovannini S, Clerico A. Measurement of circulating concentrations of cardiac troponin I and T in healthy subjects: a tool for monitoring myocardial tissue renewal? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1167-77.
9. Passino C, Barison A, Vergaro G, et al. Markers of fibrosis,

- inflammation, and remodeling pathways in heart failure. *Clin Chim Acta* 2015;443:29-38.
10. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. 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 Heart J* 2012;33:1787-847.
 11. Steinberg BA, Zhao X, Heidenreich PA, et al. Trends in patients hospitalized with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: prevalence, therapies, and outcomes. *Circulation* 2012;126:65-75.
 12. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000;342:1077-84.
 13. Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol* 2006;209:2320-7.
 14. Unverferth DV, Baker PB, Swift SE, et al. Extent of myocardial fibrosis and cellular hypertrophy in dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1986;57:816-20.
 15. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991;83:1849-65.
 16. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, et al. The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:291-305.
 17. Neglia D, Michelassi C, Trivieri MG, et al. Prognostic role of myocardial blood flow impairment in idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002;105:186-93.
 18. Lionetti V, Guiducci L, Simionuc A, et al. Mismatch between uniform increase in cardiac glucose uptake and regional contractile dysfunction in pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2747-56.
 19. Emdin M, Passino C, Prontera C, et al. Cardiac natriuretic hormones, neuro-hormones, thyroid hormones and cytokines in normal subjects and patients with heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:627-36.
 20. Passino C, Poletti R, Bramanti F, et al. Neuro-hormonal activation predicts ventilatory response to exercise and functional capacity in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006;8:46-53.
 21. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, et al. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H12-20.
 22. Wexler RK, Elton T, Pleister A, et al. Cardiomyopathy: an overview. *Am Fam Physician* 2009;79:778-84.
 23. Sisakian H. Cardiomyopathies: evolution of pathogenesis concepts and potential for new therapies. *World J Cardiol* 2014;6:478-94.
 24. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 2010;255:631-7.
 25. Rienks M, Papageorgiou AP, Frangogiannis NG, et al. Myocardial extracellular matrix. An ever-changing and diverse entity. *Circ Res* 2014;114:860-71.
 26. Fan D, Akawale A, Lee J, et al. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5:15.
 27. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012;18:1028-40.
 28. Borthwick LA, Wynn TA, Fisher AJ. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:1049-60.
 29. Hartupée J, Mann DL. Positioning of inflammatory biomarkers in the heart landscape. *J Cardiovasc Trans Res* 2013;6:485-92.
 30. Bozkurt B, Mann D L, Deswal A. Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Fail Rev* 2010;15:331-41.
 31. Levine B, Kalman J, Mayer L, et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *New Engl J Med* 1990;223:236-41.
 32. Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, et al. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology* 2012;122:23-35.
 33. Glezeva N, Baugh JA. Role of inflammation in the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction and its potential as a therapeutic target. *Heart Fail Rev* 2014;19:681-94.
 34. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, et al. Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation? *Hypertension* 2004;43:739-45.
 35. Reed A, Kohl P, Peyronnet R. Molecular candidates for cardiac stretch-activated ion channels. *Glob Cardiol Sci Pract* 2014;2014:9-25.
 36. Zibadi S, Vazquez R, Larson DF, et al. T lymphocyte regulation of lysyl oxidase in diet-induced cardiac fibrosis. *Cardiovasc Toxicol* 2010;10:190-8.
 37. Yu Q, Horak K, Larson DF. Role of T lymphocytes in hypertension-induced cardiac extracellular matrix remodeling. *Hypertension* 2006;48:98-104.
 38. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, et al. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. *Hypertens Res* 2005;28:483-90.
 39. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009;230:160-71.
 40. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004;110:3121-8.
 41. Inoue K, Kodama T, Daida H. Pentraxin 3: a novel biomarker for inflammatory cardiovascular disease. *Int J Vasc Med* 2012;2012:657025.
 42. Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, et al. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003;107:1486-91.
 43. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000;102:3060-7.
 44. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, et al. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trial (VEST). *Circulation* 2001;103:2055-9.
 45. Dunlay SM, Weston SA, Redfield MM, et al. Tumor necrosis factor-alpha and mortality in heart failure: A community study. *Circulation* 2008;118:625-31.
 46. Chin BS, Conway DS, Chung NA, et al. Interleukin-6, tissue factor and von Willebrand factor in acute decompensated heart failure: relationship to treatment and prognosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:515-21.
 47. Mueller C, Laule-Kilian K, Christ A, et al. Inflammation and long-term mortality in acute congestive heart failure. *Am Heart J* 2006;151:845-50.
 48. van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Ellinor PT, et al. Utility of aminoterminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1217-24.
 49. Villacorta H, Masetto AC, Mesquita ET. C reactive protein: an inflammatory marker with prognostic value in patients

- with decompensated heart failure. *Arq Bras Cardiol* 2007;88:585-9.
50. Januzzi JL Jr, Peacock WF, Maisel AS, et al. Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:607-13.
 51. Rehman SU, Mueller T, Januzzi JL Jr. Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1458-65.
 52. Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, et al. Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail* 2010;12:826-32.
 53. Verma R, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007;15:2223-68.
 54. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, et al. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem* 2001;276:10134-44.
 55. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 2011;12:233.
 56. López B, González A, Ravassa S, et al. Circulating biomarkers of myocardial fibrosis: the need for a reappraisal. *J Am Coll Cardiol* 2015;65:2449-56.
 57. Lindsay MM, Dunn FG. Biochemical evidence of myocardial fibrosis in veteran endurance athletes. *Br J Sports Med* 2007;41:447-52.
 58. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:1637-52.
 59. De Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology* 2002;3:325-35.
 60. López B, González A, Díez J. Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. *Circulation* 2010;121:1645-54.
 61. Cheng JM, Akkerhuis KM, Battes LC, et al. Biomarkers of heart failure with normal ejection fraction: a systematic review. *Eur J Heart Fail* 2013;15:1350-62.
 62. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation* 2007;115:888-95.
 63. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, et al. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003;108:1455-60.
 64. Emdin M, Passino C, Prontera C, et al. Comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal ProBNP for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem* 2007;53:1289-97.
 65. Zannad F, Alla F, Dousset B, et al. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). *Rales Investigators. Circulation* 2000;102:2700-6.
 66. Boccanelli A, Mureddu GF, Cacciatore G, et al.; AREA IN-CHF Investigators. Anti-remodelling effect of canrenone in patients with mild chronic heart failure (AREA IN-CHF study): final results. *Eur J Heart Fail* 2009;11:68-76.
 67. Frantz S, Stork S, Michels K, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases levels in patients with chronic heart failure: an independent predictor of mortality. *Eur J Heart Fail* 2008;10:388-95.
 68. Eschalier R, Fertin M, Fay R, et al. Extracellular matrix turnover biomarkers predict long-term left ventricular remodeling after myocardial infarction. Insights from the REVE-2 study. *Circ Heart Fail* 2013;6:1199-205.
 69. Agarwal I, Glazer NL, Barash E, et al. Fibrosis-related biomarkers and incident cardiovascular disease in older adults. The Cardiovascular Health Study *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2014;7:583-9.
 70. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, et al. Diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: improved accuracy with the use of markers of collagen turnover. *Eur J Heart Fail* 2009;11:191-7.
 71. Naito Y, Tsujino T, Lee-Kawabata M, et al. Matrix metalloproteinase-1 and -2 levels are differently regulated in acute exacerbation of heart failure in patients with and without left ventricular systolic dysfunction. *Heart Vessels* 2009;24:181-6.
 72. Liu F, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1183:158-82.
 73. Calvier L, Miana M, Reboul P, et al. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:67-75.
 74. La'ulu SL, Apple FS, Murakami MM, et al. Performance characteristics of the Architect galectin-3 assay. *Clin Biochem* 2013;46:119-22.
 75. Gaze DC, Prante C, Dreier J, et al. Analytical evaluation of the automated galectin-3 assay on the Abbott Architect immunoassay instruments. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:919-26.
 76. Masotti S, Prontera C, Passino C. Analytical and clinical evaluation of the chemiluminescent microparticle immunoassay for galectin-3 determination. *Biochim Clin* 2016;40:307-15.
 77. Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, et al. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circ Heart Fail* 2013;6:107-17.
 78. Hrynchyshyn N, Jourdain P, Desnos M, et al. Galectin-3: A new biomarker for the diagnosis, analysis and prognosis of acute and chronic heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* 2013;106:541-6.
 79. Coburn E, Frishman W. Comprehensive review of the prognostic value of galectin-3 in heart failure. *Cardiol Rev* 2014;22:171-5.
 80. Chen A, Hou W, Zhang Y, et al. Prognostic value of serum galectin-3 in patients with heart failure: a meta-analysis. *Int J Cardiol* 2015;182:168-70.
 81. Schindler EI, Szymanski JJ, Hock KG, et al. Short- and long-term biologic variability of galectin-3 and other cardiac biomarkers in patients with stable heart failure and healthy adults. *Clin Chem* 2016;62:360-6.
 82. Ho JE, Liu C, Lyass A, et al. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1249-56.
 83. Grandin EW, Jarolim P, Murphy SA, et al. Galectin-3 and the development of heart failure after acute coronary syndrome: pilot experience from PROVE IT-TIMI 22. *Clin Chem* 2012;58:267-73.
 84. de Boer RA, Lok DJ, Jaarsma T, et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Ann Med* 2011;43:60-8.
 85. Filipe MD, Meijers WC, van der Velde RA, et al. Galectin-3 and heart failure: prognosis, prediction and clinical utility. *Clin Chim Acta* 2015 30;443:48-56.
 86. Ahmad T, Fiuzat M, Neely B, et al. Biomarkers of myocardial stress and fibrosis as predictors of mode of death in patients with chronic heart failure. *JACC Heart Fail* 2014;2:260-8.
 87. Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, et al. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-

- ACTION study. *Circ Heart Fail* 2012;5:72-8.
88. Gullestad L, Ueland T, Kjekshus J, et al.; CORONA Study Group. Galectin-3 predicts response to statin therapy in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA). *Eur Heart J* 2012;33:2290-6.
 89. Anand IS, Rector TS, Kuskowski M, et al. Baseline and serial measurements of galectin-3 in patients with heart failure: relationship to prognosis and effect of treatment with valsartan in the Val-HeFT. *Eur J Heart Fail* 2013;15:511-8.
 90. Carrasco-Sanchez FJ, Aramburu-Bodas O, Salamanca-Bautista P, et al. Predictive value of serum galectin-3 levels in patients with acute heart failure with preserved ejection fraction. *Int J Cardiol* 2013;169:177-82.
 91. Meijers WC, Januzzi JL, de Filippi C, et al. Elevated plasma galectin-3 is associated with near-term rehospitalization in heart failure: a pooled analysis of 3 clinical trials. *Am Heart J* 2014;167:853-60.
 92. Lok DJA, Van Der Meer P, Bruggink-André de la Porte P, et al. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol* 2010;99:323-8.
 93. Lopez-Andrés N, Rossignol P, Iraqi W, et al. Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial. *Eur J Heart Fail* 2012;14:74-81.
 94. Ueland T, Aukrust P, Broch K, et al. Galectin-3 in heart failure: high levels are associated with all-cause mortality. *Int J Cardiol* 2011;150:361-4.
 95. Tang WH, Shrestha K, Shao Z, et al. Usefulness of plasma galectin-3 levels in systolic heart failure to predict renal insufficiency and survival. *Am J Cardiol* 2011;108:385-90.
 96. O'Seaghda CM, Hwang SJ, Ho JE, et al. Elevated galectin-3 precedes the development of CKD. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1470-7.
 97. Iacoviello M, Aspromonte N, Leone M, et al. Galectin-3 serum levels are independently associated with microalbuminuria in chronic heart failure outpatients. *Res Cardiovasc Med* 2015;5:e28952.
 98. Price PC, Christenson RH. Evidence-based laboratory medicine: principles, practice, and outcome, 2nd ed. Washington DC: AACC Press, 2007.
 99. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, et al. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2009;119:2408-16.
 100. Wang TJ. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation* 2011;123:551-65.
 101. Miller M. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflammation* 2011;8:22.
 102. Dieplinger B, Mueller T. Soluble ST2 in heart failure. *Clin Chim Acta* 2015;443:57-70.
 103. Januzzi JL, Pascual-Figal D, Danilec LB. ST2 testing for chronic heart failure therapy monitoring: the international ST2 consensus panel. *Am J Cardiol* 2015;115(suppl):70B-5B.
 104. Januzzi JL, Mebazaa A, Di Somma S. ST2 and prognosis in acutely decompensated heart failure: the international ST2 consensus panel. *Am J Cardiol* 2015;115(suppl):26B-31B.
 105. Januzzi JL Jr, Rehman S, Mueller T, et al. Importance of biomarkers for long-term mortality prediction in acutely dyspneic patients. *Clin Chem* 2010;56:1814-21.
 106. Lassus J, Gayat E, Mueller C, et al. Incremental value of biomarkers to clinical variables for mortality prediction in acutely decompensated heart failure: the Multinational Observational Cohort on Acute Heart Failure (MOCA) study. *Int J Cardiol* 2013;168:2186-9.
 107. Pascual-Figal DA, Manzano-Fernández S, Boronat M, et al. Soluble ST2, high-sensitivity troponin T- and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: complementary role for risk stratification in acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail* 2011;13:718-25.
 108. Manzano-Fernández S, Mueller T, Pascual-Figal D, et al. Usefulness of soluble concentrations of interleukin family member ST2 as predictor of mortality in patients with acutely decompensated heart failure relative to left ventricular ejection fraction. *Am J Cardiol* 2011;107:259-67.
 109. Boisot S, Beede J, Isakson S, et al. Serial sampling of ST2 predicts 90-day mortality following destabilized heart failure. *J Card Fail* 2008;14:732-8.
 110. Manzano-Fernández S, Januzzi JL, Pastor-Pérez FJ, et al. Serial monitoring of soluble interleukin family member ST2 in patients with acutely decompensated heart failure. *Cardiology* 2012;122:158-66.
 111. Ky B, French B, McCloskey K, et al. High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2011;4:180-7.
 112. Bayes-Genis A, de Antonio M, Galán A, et al. Combined use of high-sensitivity ST2 and NTproBNP to improve the prediction of death in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012;14:32-8.
 113. Anand IS, Rector TS, Kuskowski M, et al. Prognostic value of soluble ST2 in the Valsartan Heart Failure Trial. *Circ Heart Fail* 2014;7:418-26.
 114. Felker GM, Fiuzat M, Thompson V, et al. Soluble ST2 in ambulatory patients with heart failure: Association with functional capacity and long-term outcomes. *Circ Heart Fail* 2013;6:1172-9.
 115. Broch K, Ueland T, Nymo SH, et al. Soluble ST2 is associated with adverse outcome in patients with heart failure of ischaemic aetiology. *Eur J Heart Fail* 2012;14:268-77.
 116. Pascual-Figal DA, Ordoñez-Llanos J, Tornel PL, et al; MUSIC Investigators. Soluble ST2 for predicting sudden cardiac death in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2174-9.
 117. Januzzi JL, Horne BD, Moore SA, et al. Interleukin receptor family member ST2 concentrations in patients following heart transplantation. *Biomarkers* 2013;18:250-6.
 118. Bayes-Genis A, de Antonio M, Vila J, et al. Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:158-66.
 119. Ronco C, Haapio M, House AA, et al. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1527-39.
 120. Ronco C, McCullough P, Anker SD, et al. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative. *Eur Heart J* 2010;31:703-11.
 121. Zhang R, Zhang Y, An T, et al. Prognostic value of sST2 and galectin-3 for death relative to renal function in patients hospitalized for heart failure. *Biomark Med* 2015;9:433-41.
 122. Bayes-Genis A, Zamora E, de Antonio M, et al. Soluble ST2 serum concentration and renal function in heart failure. *J Card Fail* 2013;19:768-75.
 123. Kim MS, Jeaong TD, Han SB, et al. Role of soluble ST2 as a prognostic marker in patients with acute heart failure and renal insufficiency. *J Korean Med Sci* 2015;30:569-75.
 124. Gruson D, Ferracin B, Ahn SA, et al. Comparison of fibroblast growth factor 23, soluble ST2 and Galectin-3 for

- prognostication of cardiovascular death in heart failure patients. *Int J Cardiol* 2015;189:185-7.
125. Zhou H, Ni J, Yuan Y, et al. Soluble ST2 may possess special superiority as a risk predictor in heart failure patients. *Int J Cardiol* 2015;186:146-7.
126. Mueller T, Dieplinger B. The Presage ST2 assay: analytical considerations and clinical applications for a high-sensitivity assay for measurement of soluble ST2. *Expert Rev Mol Diagn* 2013;13:13-30.
127. Dieplinger B, Januzzi Jr JL, Steinmair M, et al. Analytical and clinical evaluation of a novel high-sensitivity assay for measurement of soluble ST2 in human plasma the Presage ST2 assay. *Clin Chim Acta* 2009;409:33-40.
128. Lu J, Snider JV, Grenache DG. Establishment of reference intervals for soluble ST2 from a United States population. *Clin Chim Acta* 2010;411:1825-6.
129. Dieplinger B, Egger M, Gegenhuber A, et al. Analytical and clinical evaluation of a rapid quantitative lateral flow immunoassay for measurement of soluble ST2 in human plasma. *Clin Chim Acta* 2015;451:310-5.
130. Zannad F. What is measured by cardiac fibrosis biomarkers and imaging? *Circ Heart Fail* 2014;7:239-42.
131. Moon JC, Treibel TA, Schelbert EB. T1 mapping for diffuse myocardial fibrosis: a key biomarker in cardiac disease? *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1288-9.
132. Jellis C, Martin J, Narula J, et al. Assessment of nonischemic myocardial fibrosis. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:89-97.
133. Quick S, Waessing NK, Kandler N, et al. Soluble ST2 and myocardial fibrosis in 3T cardiac magnetic resonance. *Scand Cardiovasc J* 2015;49:361-6.
134. Barison A, Masei PG, Aquaro GD. Diagnostica per immagini della fibrosi miocardica con risonanza magnetica. *Ligand Assay* 2014;19:40-55.
135. Vergaro G, Del Franco A, Giannoni A, et al. Galectin-3 and myocardial fibrosis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2015;184:96-100.
136. de Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT, et al. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med* 2012;272:55-64.
137. Edelmann F, Holzendorf V, Wachter R, et al. Galectin-3 in patients with heart failure with preserved ejection fraction: results from the Aldo-DHF trial. *Eur J Heart Fail* 2015;17:214-23.
138. Martin MU. Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Sem Immunol* 2013;25:449-57.