

Biomarkers in heart failure. From well-established to promising

Biomarkery v srdcovom zlyhavaní. Od osvedčených po perspektívne

Chudý M, Lesný P, Goncalvesová E

Kardiologická klinika LFUK a NÚSCH, a. s., Bratislava, Slovenská republika

Chudy M, Lesny P, Goncalvesova E. **Biomarkers in heart failure. From well-established to promising.** Cardiology Lett. 2021;30(3–4):175–184

Abstract. The importance of biomarkers is continuously growing in all fields of medicine. Their significance does not lie in diagnosis and prognosis evaluation only: they contribute moreover to reveal novel signaling pathways which are becoming new potential therapeutic targets. Because of the complexity of heart failure syndrome, the wide spectrum of biomarkers representing several pathophysiological processes has to be studied and analysed. These biomarkers include myocardial damage, overload and remodeling markers, peripheral organs' damage biomarkers and on the genetic level also post-transcriptional regulators of gene expression – so-called microRNA. Evaluation of a broad panel of biomarkers is likely to be an essential part of heart failure phenotype determination and treatment strategy personalisation in the future. The article brings a brief summary of biomarkers used in clinical practice with focus mainly on those which may have a qualitatively different value for treatment individualization. Fig. 2. Tab. 1, Ref. 76, on-line full text (Free, PDF), www.cardiologyletters.sk

Key words: heart failure – biomarkers – mikro-RNA – microbiome – NT-proBNP

Chudý M, Lesný P, Goncalvesová E. **Biomarkery v srdcovom zlyhavaní. Od osvedčených po perspektívne.** Cardiology Lett. 2021;30(3–4):175–184

Abstrakt. Dôležitosť biomarkerov narastá v každej oblasti medicíny. Ich prínos nie je len v diagnostike a hodnotení prognózy ochorení, ale odhaľujú tiež nové signálne dráhy, ktoré sa stávajú potenciálnym terapeutickým cieľom. Vzhľadom na komplexnosť problému syndrómu srdcového zlyhávania je pravdepodobne pri diagnostike a hodnotení prognózy potrebné sledovať a analyzovať široké spektrum biomarkerov, ktoré zohľadňujú viaceré patofyziologické smery. Ide o markery, ktoré poukazujú na poškodenie, preťaženie a remodeláciu myokardu, markery poškodenia periférnych orgánov a na genetickej úrovni regulátory expresie proteínov – mikroRNA. Hodnotenie širokého panelu biomarkerov bude v budúcnosti pravdepodobne dôležitou súčasťou pre určenie fenotypu srdcového zlyhávania a personalizovanie liečebnej stratégie. V práci prinášame prehľadnú informáciu o biomarkeroch používaných v klinickej praxi, ale sústreďujeme sa najmä na tie, ktoré v perspektíve možno prinesú kvalitatívne rozdielnú informáciu použiteľnú pre individualizáciu liečby. Obr. 2, Tab. 1, Lit. 76, on-line full text (Free, PDF), www.cardiologyletters.sk

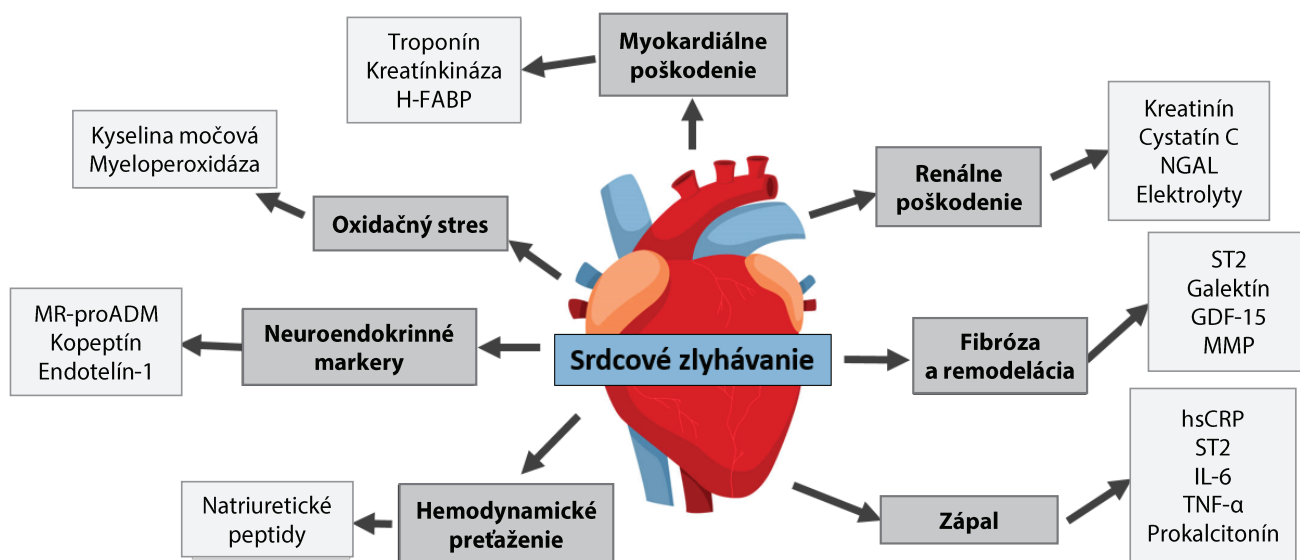
Kľúčové slová: srdcové zlyhávanie – biomarkery – mikro-RNA – NT-proBNP – mikrobióm

Prognóza pacientov so srdcovým zlyhavaním (SZ) je napriek nesporným pokrokom v liečbe nepriaznivá. Okrem vysokej mortality je významným problémom potreba opakovaných

hospitalizácií, zhoršenie kvality života, prípadne až závislosť od pomoci druhých. Hospitalizácie pre SZ sú dnes najčastejšou príčinou hospitalizácií na interných oddeleniach

Z Kardiologickej kliniky LFUK a NÚSCH, a. s., Bratislava, Slovenská republika
Do redakcie došlo dňa 14. februára 2021; prijaté dňa 12. marca 2021

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Martin Chudý, Oddelenie zlyhávania a transplantácie srdca, NÚSCH, a. s., Kardiologická klinika LFUK a NÚSCH, a. s., Pod Krásnou hôrkou 1, 833 48 Bratislava 37, Slovenská republika, e-mail: chudy.martin1@gmail.com



Obrázok 1 Patofyziologické procesy srdcového zlyhávania a markery odrážajúce aktivitu daného procesu

h-FABP – srdcový proteín viažuci masné kyseliny; hsCRP – vysokosenzitívny CRP; IL – Interleukín; MMP – matrixové metaloproteinázy; NGAL – neutrofilný s gelatinázou asociovaný lipokalin; proADM – proadrenomedulín, ST-2 – supresor of tumorigenicity; TNF – tumor nekrotizujúci faktor

a vzhľadom na očakávané zvyšovanie prevalence SZ bude ekonomický, sociálny a zdravotnícky rozmer tohto problému narastať (1).

Niekoľko desaťročí neutícha snaha nájsť a definovať spoľahlivé rizikové faktory nepriaznivej prognózy, ktoré by pomohli v rozhodovaní o efektívnejšom manažmente najohrozenejších skupín, ako aj v rozhodovaní o včasnej indikácii a realizácii náročných intervenčných či chirurgických postupov.

Srdcové zlyhávania je etiopatogeneticky zložitý syndróm a odhadnúť prognózu individuálneho pacienta pomocou jedného prediktora je ťažké. V posledných 25 rokoch sa skúmalo mnoho parametrov v univariantných a multivariantných modeloch s cieľom zlepšenia predikcie mortality (2). Stále však nemáme k dispozícii štúdie, ktoré by súčasne hodnotili všetky, alebo väčšinu potenciálnych alebo už známych prediktorov nepriaznivej prognózy a nevieme potenciálne prediktory prognózy zoradiť podľa významu a sily predikcie. Situáciu ešte komplikuje skutočnosť, že určité parametre a prediktory, efektívne použiteľné v jednej populácii či historickej perióde, nemusia byť aplikovateľné v iných populáciách chorých alebo v súčasnosti, kedy zaznamenávame rozmach nových farmakologických liečebných postupov. Navyše srdcové zlyhávania je dynamický syndróm a pri zmene klinického stavu alebo laboratórnych parametrov je potrebné prognózu prehodnotiť.

Cieľom predkladanej práce je poskytnúť prehľad aktuálneho stavu poznatkov o možnostiach využitia biomarkerov v hodnotení prognózy pacientov so SZ.

Biomarkery

Biomarkery sú objektívne merateľné charakteristiky biologických stavov alebo podmienok, ktorými sa hodnotia normálne fyziologické procesy, patologické procesy a farmakologická odpoveď na terapeutický zásah (3). Ich význam pri srdcovom zlyhavaní je nezastupiteľný v diagnostike, hodnotení prognózy a monitorovaní odpovede na liečbu. Dnes známe biomarkery umožňujú hodnotiť stupeň a závažnosť niekoľkých patofyziologických procesov sprevádzajúcich vznik a progresiu srdcového zlyhávania (4). Vzhľadom na komplexnosť patofyziológie syndrómu srdcového zlyhávania, nie je interpretácia biomarkerov jednoduchá a pre personalizované využitie biomarkerov je pravdepodobne potrebné hodnotiť široké spektrum markerov súčasne a v kontexte ostatných individuálnych charakteristík pacienta (**obrázok 1**) (5).

Markery hemodynamického preťaženia

Nátriuretické peptidy typu B (NP typu B) sa tvoria v kardiomyocytoch z prohormónu účinkom endopeptidáz a konvertáz. Jednou z kľúčových oblastí ich využitia je hodnotenie prognózy u pacientov s chronickým SZ. V súčasnosti už máme dostatok relevantných dôkazov o prínose BNP a NT-proBNP v odhade prognózy pacientov so SZ, ako aj u pacientov s asymptomatickou dysfunkciou ľavej komory. NP typu B predikujú mortalitu a riziko kardiovas-

kulárnych príhod u pacientov vo všetkých triedach NYHA. Pri hodnotení dvojročnej mortality u pacientov s pokročilým SZ bolo BNP najsilnejším prediktorom mortality v porovnaní s vrcholovou spotrebou kyslíka, močovinou, systolickým krvným tlakom a tlakom v zaklinení (6). Opätovné vyšetrenie NT-proBNP pri liečbe prináša dodatočnú prognostickú informáciu. Ak vstupná hodnota pri liečbe klesne aspoň o 30 %, môžeme očakávať lepšiu prognózu, ako keď sa takýto pokles liečbou nedosiahne (7). Iní autori u pacientov s pokročilým SZ, ktorí boli kandidátmi transplantácie srdca, uvádzajú hraničnú hodnotu predikcie zlej prognózy 4 302 pg/ml (2). Je potrebné vziať do úvahy, že riziko mortality rastie so vzostupom NT-proBNP, respektíve BNP nad fyziologické hodnoty. Napríklad pri NT-proBNP riziko rastie od hodnôt 200 pg/ml, a najmä pri hodnotách nad 1 000 pg/ml (8). Môžeme zhrnúť, že nátriuretické peptidy typu B spoľahlivo predikujú celkovú mortalitu, kardiovaskulárnu mortalitu aj kardiovaskulárne príhody u pacientov s dekompenzovaným SZ aj u pacientov so stabilným chronickým SZ.

Sľubné sú tiež výsledky o využití tzv. mid-regional pro-atrial NP (MR-proANP). U 1 237 pacientov zo štúdie GISSI-HF sa hodnotila prognostická sila stabilných fragmentov prekursorov štyroch vazoaktívnych peptidov a porovnávala sa s BNP a NT-proBNP (9). Merali sa sérové koncentrácie MR-proANP, mid-regional pro-adrenomedulínu, C-terminal pro-endotelínu-1 a C-terminal pro-vazopresínu. Všetky nové biomarkery mali prognostický význam, ale prínos MR-proANP bol najvýraznejší a nezávislý od BNP.

MR-proANP je nezávislým prognostickým ukazovateľom aj pri dekompenzovanom SZ, nezávisle od NP typu B (10) (tabuľka 1) (11).

Markery myokardiálneho poškodenia

Väčší klinický význam nadobudlo stanovenie kardiálnych troponínov T a I. Príčinou zvýšenia kardiálnych troponínov T a I (cTnT, respektíve cTnI) je zánik myocytov v dôsledku nekrózy alebo apoptózy s následnou fibrózou, ktorá prispieva ku kardiálnej dysfunkcii a remodelácii ľavej komory. cTnT a cTnI môžu byť zvýšené u pacientov s akútnym alebo dekompenzovaným chronickým SZ (12, 13). Kardiálny troponín T bol zvýšený u 6,2 % pacientov hospitalizovaných pre dekompenzované SZ a ich hospitalizačná mortalita bola vyššia ako u pacientov s normálnym cTnT (14). Aj u pacientov s chronickým SZ, ktorí boli sledovaní ambulantne sa zvýšenie cTnT spájalo s vyššou incidenciou nežiaducich príhod. Ďalším pokrokom vo využití biomarkerov v prognostickej stratifikácii bol vývin vysokosenzitívnych testov na stanovenie cTn (hs-cTn). Latini s kolegami (15) testovali stanovenie hs-cTnT u 4 000 pacientov so stabilným chronickým SZ a ukázali, že hs-cTnT sa detekovalo 92 % pacientov, kým štandardnou metódou iba u 10,4 % chorých. Pacienti s hs-cTnT hodnotami vyššími ako medián mali horšiu prognózu.

Zvýšenie cTnT počas ambulantného sledovania pacientov s chronickým SZ predpovedá zvýšené riziko nežiaducich príhod. Pri analýze dynamiky hs-cTnT v štúdiách Val-HeFT a GISSI-HF sa ukázalo, že hs-cTnT je prediktorom kardiovaskulárnych príhod (16). Nárast hs-cTnT v priebehu sledovania súvisí s vekom, diabetes mellitus, zhoršením renálnych funkcií a vzostupom NT-proBNP. Rozširujúca sa dostupnosť stanovenia troponínu vysokosenzitívnymi metódami zvyšuje počet pacientov so zvýšenými hodnotami. Potrebná je opatrnosť v interpretácii týchto hodnôt, vždy v kontexte so subjektívnymi ťažkosťami, klinickým

Tabuľka 1 Porovnanie vybraných biomarkerov využiteľných v diagnostike a hodnotení prognózy srdcového zlyhávania. Upravené podľa (11)

	Tvorba	Ukazovateľ	Využitie	Výhody	Nevýhody
NT-proBNP	Kardiomyocyty	Systolická dysfunkcia a preťaženie myokardu	Diagnostika, hodnotenie prognózy a mortality	Stratifikácia rizika u pacientov s ASZ	Menšia prognostická hodnota pri HFpEF a stabilnom HF. Nerozlišuje medzi HFpEF a HFrEF
TnT a TnI	Kardiomyocyty	Myokardiálne poškodenie	Diagnostika, hodnotenie prognózy a mortality	Užitočný pri hodnotení závažnosti HF	Nerozlišuje medzi HFpEF a HFrEF
ST2	Kardiomyocyty a fibroblasty	Fibróza, hypertrofia a remodelácia komôr	Diagnostika, hodnotenie prognózy a mortality	Lepší prognostický ukazovateľ ako rizikové faktory. Menej ovplyvnený vekom, BMI a glomerulárnou filtráciou	Nie je jasné či je viac využiteľný pri HFpEF ako pri HFrEF
Galectin-3	Zápalové bunky	Fibróza a zápalová odpoveď, hodnotenie progresie HF	Diagnostika, hodnotenie prognózy a mortality	V kombinácii s NT-proBNP odráža horšiu prognózu u suspektných a diagnostikovaných s HF	Nerozlišuje medzi HFpEF a HFrEF
GDF-15	Kardiomyocyty, fibroblasty, endotelové bunky, zápalové bunky	Fibróza, hypertrofia a remodelácia komôr	Prognóza HF a mortalita	Nezávislý prognostický marker pri HFpEF aj HFrEF	Nie je využiteľný pri krátkotrvajúcom HFpEF. Nevyužiteľný v diagnostike HF

stavom a EKG nálezom. Samotné zvýšenie troponínu a jeho následný pokles nie je neomylným indikátorom koronárnej príhody. Hodnoty hs-cTn sú bežne zvýšené pri kardiálnej dekompenzácií, ale aj u mnohých pacientov s chronickým „stabilným“ SZ.

Markery fibrózy a remodelácie myokardu

Kľúčovým mechanizmom rozvoja a progresie srdcového zlyhávania je remodelácia myokardu ako odpoveď na jeho poškodenie ischémiou, objemovým alebo tlakovým preťažením, zápalom a oxidačným stresom. Remodelácia myokardu je adaptačnou reakciou na poškodenie a ide o proces charakterizovaný molekulárnymi a štrukturálnymi zmenami, ktoré vedú k morfológickým zmenám tvaru a veľkosti srdca a tiež k zmenám jeho funkcie (17).

Presný mechanizmus remodelácie myokardu nie je doposiaľ úplne vysvetlený, ale kombinuje sa pri nej niekoľko procesov, z ktorých najdôležitejšiu úlohu má oxidačný stres, zápalová reakcia, apoptóza, zmeny v energetickom metabolizme a molekulárne zmeny kontraktilných bielkovín (17 – 19).

ST-2 (z angl. suppression of tumorigenicity 2) je receptor patriaci do receptorovej rodiny interleukínu-1. Je exprimovaný v dvoch izoformách. Prvou je membránová forma receptora, ktorá je exprimovaná v kardiomyocytoch. Druhou formou je cirkulujúci solubilný ST2 (sST2), ktorý sa tvorí pravdepodobne dominantne v artériovom systéme (20, 21). Zvýšená expresia membránovej formy ST2 je v kardiomyocytoch indukovaná mechanickým napínaním myokardu. Ligandom pre obe formy ST2 je IL-33, ktorý po nadviazaní na membránový receptor aktivuje signálnu dráhu s výsledným antifibrotickým a antihypertrofickým efektom (22). Aktivitu IL-33 negatívne ovplyvňuje cirkulujúci sST2, pretože po nadviazaní na túto izoformu sa znižuje dostupnosť IL-33 pre membránovú formu ST-2 a nedochádza k aktivácii dráhy s kardioprotektívnym účinkom (22).

V kontexte srdcového zlyhávania je ST2 marker fibrózy, remodelácie a hypertrofie ľavej komory. Vyššia koncentrácia sST2 sa v niekoľkých prácach spájala so zvýšeným rizikom vzniku srdcového zlyhávania a v populácii pacientov so srdcovým zlyhávaním s horšou prognózou (23 – 25).

V štúdií PRIDE sa vyšetrovala koncentrácia sST2 u pacientov s dyspnoe na urgentných príjmoch. Koncentrácia sST2 bola významne vyššia u pacientov so srdcovým zlyhávaním v porovnaní so skupinou pacientov bez srdcového zlyhávania, avšak diagnostická presnosť bola nižšia v porovnaní s NT-proBNP. Vzhľadom na prognózu bolo sST2 nezávislým prediktorom jednoročnej mortality aj u pacientov s dyspnoe bez ohľadu na prítomnosť srdcového zlyhávania (26).

K podobným výsledkom dospel vo svojej práci Mueller. Multivariačnou proporcionálnou Cox analýzou bola v jeho práci koncentrácia sST2 > 700 ng/l silným a nezávislým prediktorom celkovej ročnej mortality (27).

Prognostická hodnota sST2 je významnejšia u pacientov so srdcovým zlyhávaním s redukovanou ejekčnou frakciou ľavej komory ako u pacientov so zachovanou ejekčnou frakciou ľavej komory. Hodnotenie sST2 v kombinácii s NT-proBNP významne zvyšuje jeho prognostický význam u pacientov s HFrEF aj HFpEF (28).

Galektín-3 je proteín, ktorý v zvýšenej miere produkujú makrofágy zlyhávajúceho srdca. Považuje sa za marker remodelácie a fibrózy (29). Prvé klinické pozorovania ukázali, že galektín-3 môže byť užitočným biomarkerom dekompenzovaného SZ. Van Kimmenade et al. (30) publikovali prvú klinickú štúdiu, v ktorej hodnotili potenciálnu úlohu galektínu-3 u takmer 600 pacientov s akútnou dýchavicou. V presnosti diagnostiky srdcového zlyhávania ako príčiny dýchavice bol galektín-3 menej presný ako N-terminálny pro-nátriuretický peptid B (NT-proBNP). Avšak pri predikcii krátkodobej prognózy (rehospitalizácia pre SZ a celková mortalita do 60 dní) bol galektín-3 silnejším prediktorom ako NT-proBNP.

K podobným záverom dospeli aj iní autori. Galektín-3 bol nezávislým prediktorom mortality u pacientov s chronickým SZ vo funkčnej triede NYHA III počas 6,5-ročného sledovania (31). Hladiny galektínu-3 sa zvyšovali s vekom a pri renálnej insuficiencii. U pacientov s pokročilým, ale stabilným SZ bol galektín-3 zvýšený iba u polovice z nich. Zdá sa, že na rozdiel od nátriuretických peptidov nebude galektín-3 prínosom v diagnostike SZ, ale môže byť cenný ako nezávislý marker prognózy. Na rozdiel od NP typu B, hladiny galektínu-3 neklesajú pri efektívnej liečbe SZ, preto zrejme nebude použiteľný pri monitorovaní úspešnosti liečby. Pre širšie využitie tohto nádejného biomarkera v klinickej praxi sa čaká na výsledky ďalších štúdií.

Rastový diferenciačný faktor 15 (GDF-15) je proteín patriaci do rodiny TGF-beta a je produkovaný pri normálnych podmienkach v nízkych koncentráciách vo viacerých orgánoch (32, 33). V experimentálnych modeloch nebola pri fyziologických podmienkach prítomná expresia GDF-15 v myokarde, ale bola indukovaná ischémiou a tlakovým, ako aj objemovým preťažením (34). Zvýšená expresia GDF-15 je odpoveďou na ischemické poškodenie, mechanické namáhanie a oxidačný stres. GDF-15 nie je marker špecifický pre kardiovaskulárny systém, vyššie koncentrácie sú prítomné tiež pri ochoreniach obličiek a pľúc, ako aj pri viacerých onkologických ochoreniach (35, 36).

V štúdií ValHeFT bolo GDF-15 hodnotené ako nezávislý prediktor mortality, avšak išlo o demograficky homogénnu populáciu, ktorá nemala optimálne nastavenú a vyťažujúcu liečbu srdcového zlyhávania (37).

V štúdií HF-ACTION bolo GDF-15 vyšetované u pacientov s HFrEF. Pacienti s vysokými hladinami GDF-15 boli starší, mali vyššie NT-proBNP, vyššiu triedu NYHA a menej tolerovali štandardnú liečbu srdcového zlyhávania. Rovnako mali nižšiu záťažovú kapacitu (nižšie VO₂ max a menšia vzdialenosť pri šesťminútovom teste chôdzou). Vyššia hladina GDF-15 sa spájala s horšími výsledkami pri všetkých primárnych cieľových ukazovateľoch. Multivariačnou analýzou sa zistilo, že dvojnásobné zvýšenie koncentrácie GDF-15 sa spájalo so 71 % rizikom smrti, 27 % rizikom celkovej mortality a rehospitalizácii a 34 % rizikom kardiovaskulárnej smrti a rehospitalizácie pre SZ (38).

Markery kardioresnálnych vzťahov

Cystatín C je markerom renálnej funkcie, ktorý môže senzitívnejšie detekovať mierne až stredne ťažké poškodenie renálnych funkcií ako glomerulárna filtrácia a kreatinín (39). Patrí do skupiny inhibítorov proteínáz a produkujú ho jadrové bunky. Filtruje sa cez glomerulárnu membránu a kompletne katabolizuje v proximálnom tubule. Cystatín C nie je ovplyvnený vekom, pohlavím, ani muskulatúrou. Ukazuje sa, že cystatín C je nielen markerom renálnych funkcií, ale je asociovaný s kardiovaskulárnym rizikom a je komplexnejším prognostickým markerom. Lassus et al. skúmali cystatín C v porovnaní s NT-proBNP u pacientov s akútnym SZ (40). Zistili, že cystatín C predikoval mortalitu a predikcia bola presnejšia pri využití kombinovaného stanovenia s NT-proBNP. Okrem toho u pacientov s normálnou kreatinínmiou sa zvýšené hladiny cystatínu spájali so signifikantne vyššou jednoročnou mortalitou: 40 % vs. 13 %. Iní autori merali cystatín C, NT-proBNP a cTnT a zistili, že každý z biomarkerov prinášal nezávislú prognostickú informáciu. Potenciálny význam cystatínu C v predikcii kardiovaskulárneho rizika nie je v súčasnosti ešte dostatočne objasnený. Cystatín C je markerom preklinického poškodenia obličiek a spája sa s horšou prognózou, ale nie je jasné, či odráža aj iné patologické mechanizmy ako renálnu dysfunkciu, ktoré by vysvetlili jeho potenciálny prínos v predikcii kardiovaskulárneho rizika.

NGAL je glykoproteín, ktorý sa izoloval z granúl neutrofilov. NGAL sa považuje za marker včasného renálneho poškodenia a možno ho detekovať v krvi aj v moči (41). Zvýšené hladiny sérového NGAL predikovali následné renálne zhoršenie u pacientov hospitalizovaných pre akútne SZ (42). Predpokladá sa, že u pacientov s chronickým SZ je zvýšená koncentrácia NGAL v moči znakom narušených renálnych funkcií (43). Úloha NGAL ako prediktora prognózy u pacientov SZ je nejasná (44).

Adrenomedulín je peptid s vazodilatačnými účinkami pôvodne izolovaný z feochromocytómu. Syntetizuje sa v rôznych

tkanivách a orgánoch, napríklad v nadobličkách, obličkách, pľúcach, srdci, slezine, tenkom čreve, slinných žľazách a mozgu (45). Plazmatická koncentrácia adrenomedulínu je u pacienta so SZ zvýšená. Adrenomedulín je v plazme nestabilný, preto sa využíva meranie jeho prohormónu mid-regionálneho proadrenomedulínu (MR-proADM). V štúdií BACH (Biomarkers in acute heart failure) u pacientov s akútnou dýchavicou MR-proADM predikoval 90-dňovú mortalitu presnejšie ako BNP (46).

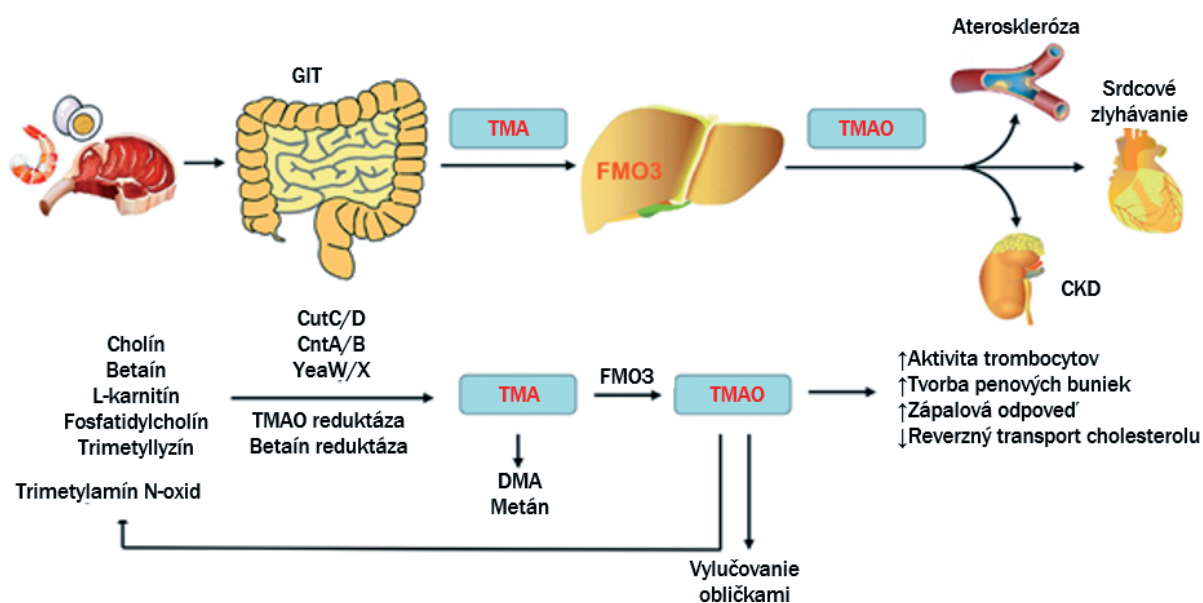
Klinicky perspektívne biomarkery

MikroRNA

MikroRNA (miRNA) sú endogénne krátke sekvencie nekódujúcej jednovláknovej RNA, ktoré na post-transkripčnej úrovni negatívne modulujú génovú expresiu inhibíciou translácie a/alebo priamo degradáciou komplementárnej mRNA (47). Podľa recentných dát obsahuje ľudský genóm 2 654 miRNA, ktoré sú schopné ovplyvňovať viac ako 60 % génov kódujúcich proteíny. Týmto spôsobom regulujú procesy bunkovej diferenciácie, proliferácie a apoptózy, metabolické procesy, angiogézu, hemotopoézu, procesy imunitnej a zápalovej reakcie a mnoho ďalších. Časť miRNA sa dostáva do extracelulárneho priestoru a možno ju detegovať v periférnej krvi. Táto miRNA sa označuje ako cirkulujúca miRNA. Cirkulujúce miRNA sú stabilné, nie sú degradované endogénnymi RNázami a sú odolné proti fyzikálnym vplyvom (48, 49).

Postavenie miRNA v kontexte srdcového zlyhávania je špecifické. Keďže miRNA regulujú takmer každý fyziologický a patologický proces, ovplyvňujú priebeh srdcového zlyhávania od asymptomatickej dysfunkcie až po terminálne štádia SZ. Regulujú procesy apoptózy a hypertrofie kardiomyocytov, fibróznej prestavby extracelulárnej matrix, ako aj poškodenie kardiomyocytov oxidačným stresom, hypoxiou a zápalom (50 – 55). Pribúda mnoho dôkazov o vplyve miRNA na vzniku a progresii srdcového zlyhávania. Dnes je známych približne 50 rôznych miRNA, ktoré ovplyvňujú expresiu génov zodpovedných za patofyziologické procesy pri srdcovom zlyhávaní.

Pomerne dobre preskúmanou miRNA je miR-21, ktorá je exprimovaná v kardiomyocytoch, fibroblastoch a endotelových bunkách a ovplyvňuje procesy proliferácie, apoptózy, fibrózy a bunkovú migráciu (56). Vzhľadom na reguláciu mnohých procesov a dráh sa miR-21 považuje za potenciálny diagnostický a terapeutický cieľ kardiovaskulárných ochorení a najmä srdcového zlyhávania. Niekoľko prác naznačuje, že cirkulujúca aj myokardiálna miR-21 súvisí so stupňom fibrózy myokardu (57). Pri srdcovom zlyhávaní so systolickou dysfunkciou ľavej komory inhibuje miR-21 apoptózu fibroblastov, čím potencuje fibróznú prestavbu myokardu. Koncentrácia miR-21 tiež pozitívne súvisí s koncentráciou markeru fibrózy myokardu galektínu-3.



Obrázok 2 Biogenéza a metabolizmus TMAO. Substráty prijaté potravou sú metabolizované v GIT na TMA pomocou TMA lyázy (napríklad CutC/D). TMA sa vstrebáva do cirkulácie a v pečeni sa pomocou enzýmu FMO3 premieňa na TMAO. Cirkulujúce TMAO zvyšuje aktivitu trombocytov, zvyšuje tvorbu penových buniek, indukuje zápalovú reakciu a ovplyvňuje metabolizmus cholesterolu. Výsledným efektom TMAO je progresia aterosklerózy, vznik alebo progresia srdcového zlyhávania a chronická obličková choroba (Upravené podľa 68)

FMO3 – Flavin monooxygenáza 3; TMA – Trimetylamín; TMAO – Trimetylamín N-oxid

Podobnú úlohu pri remodelácii myokardu majú miR-212 a miR-132, ktoré sú upregulované pri myokardiálnom strese, dominantne pri tlakovom preťažení myokardu (58). V animálnych modeloch s deléciou génov pre miR-212 a miR-132 nedochádzalo pri tlakovom preťažení k vzniku srdcového zlyhávania a naopak, overexpresia týchto génov viedla k patologickej hypertrofii, srdcovému zlyhávaniu a smrti (58). Okrem štúdií na animálnych modeloch sú dnes už dostupné prvé výsledky práce, v ktorej bol 20 pacientom s HFrEF podávaný oligonukleotid CDR132L, ktorý inhibuje funkciu miR-132. Tie naznačujú okrem bezpečnosti podávaného oligonukleotidu aj významný pokles NT-proBNP, zlepšenie ejekčnej frakcie, zúženie QRS komplexu a spomalenie progresie fibrotickej prestavby myokardu (59).

Znížená koncentrácia cirkulujúcich miRNA (miR-18-b, miR-18a, miR-223, miR-301, miR-652 a miR-423) sa zistila u pacientov hospitalizovaných pre akútne srdcové zlyhávania a spájala sa so zvýšenou 180-dňovou mortalitou (60). miR-1 klesá s vyšším stupňom NYHA triedy, miR-210 pozitívne koreluje so zvyšujúcou sa NYHA triedou, naopak negatívne koreluje s hladinou BNP (61).

Xiao et al. v štúdií na 96 pacientoch s akútnym srdcovým zlyháváním popisujú ako vhodný prognostický marker miR-30d. Koncentrácia miR-30d bola signifikantne nižšia u pacientov, ktorí do jedného roka exitovali v porovnaní s pacientmi, ktorí prežili (62).

Vzhľadom na významný zásah miRNA do vzniku a progresie srdcového zlyhávania sa očakáva vysoký pokrok v diagnostike a liečbe. Limitáciou diagnostiky je zatiaľ finančný a časový dôvod, keďže vyšetrovacou metódou pre detekciu cirkulujúcej miRNA je qRT-PCR. Využitie miRNA ako terapeutického cieľu má tiež niekoľko limitácií. Prvou je skutočnosť, že jedna miRNA reguluje transláciu často až stoviek ďalších mRNA. Na mieste je otázka, či je možné špecifikovať terapeutický zásah tak, aby boli ovplyvnené tie procesy, ktoré negatívne modulujú priebeh ochorenia a neboli potlačené fyziologické procesy. Ďalšou limitáciou je možné ovplyvnenie translácie mRNA v iných orgánoch a tým riziko vzniku nežiaducich účinkov.

Mikrobióm a TMAO

Gastrointestinálny trakt dospelého človeka obsahuje približne 100 biliónov mikroorganizmov patriacich do niekoľkých stoviek kmeňov (63). Mikrobiálna flóra gastrointestinálneho traktu ovplyvňuje vstrebávanie živín, liekov a toxínov, reguluje homeostázu intestinálneho epitelu a imunitného systému. Produkuje esenciálne látky, ako sú vitamíny a gastrointestinálne hormóny, ale aj viaceré bioaktívne metabolity, ako trimetylamín N-oxid (TMAO), mastné kyseliny s krátkym reťazcom, uremické toxíny a žľové kyseliny, ktoré môžu spúšťať patologické procesy v organizme.

Účasť intestinálneho mikrobiómu je potvrdená v patofyziológii mnohých ochorení a pribúda čoraz viac klinických a experimentálnych štúdií o vplyve mikrobiómu na rozvoj kardiovaskulárnych ochorení (64, 65).

Funkcia GIT je významne ovplyvnená zníženým krvným prietokom a dodávkou kyslíka. Recipročný vzťah pri srdcovom zlyhávaní medzi kardiovaskulárnym a gastrointestinálnym systémom vyplýva z ischemizácie slizničnej bariéry pri zníženom srdcovom výdaji a kongescii v GIT. Gastrointestinálny trakt je pri srdcovom zlyhávaní v dôsledku splanchnickej hypoperfúzie a kongescie prvý orgán, v ktorom sa prejavujú funkčné zmeny a pre pretrvávajúcu funkčnú anoxiu klkov a mikrokľkov súčasne posledný, ktorý sa po zlepšení krvného prietoku a po ústupe kongescie zregeneruje (66). Dochádza tak k narušeniu slizničnej bariéry, čo umožňuje zvýšený prestup mikrobiálnych metabolitov do cirkulácie, ktoré spúšťajú chronický nízkostupňový zápal (67).

Jedným z metabolitov, ktorý je pri narušení slizničnej bariéry vo zvýšenej miere prítomný v cirkulácii, je trimetylamin N-oxid (TMAO).

Tvorba TMAO začína v gastrointestinálnom trakte, kde sa potravou prijatý cholin, karnitín a lecitin metabolizujú vplyvom gastrointestinálnej flóry (dominantne rody *Firmicutes* a *Proteobacteria*) na trimetylamin, ktorý je po vstrebaní oxidovaný v pečeni na TMAO (**obrázok 2**) (68). Podľa doterajších skúmaní TMAO aktivuje agregáciu trombocytov, zvyšuje tvorbu penových buniek, spúšťa zápalovú aktivitu a znižuje reverzný transport cholesterolu (69 – 71). Týmto mechanizmami dochádza k akcelerácii aterosklerózy a indukcií premeny stabilných aterosklerotických plakov na nestabilné, čím sa významnou mierou podieľa na patogenéze koronárnej choroby srdca.

Podľa experimentálnych animálnych modelov má TMAO aj priamy efekt na morfológiu a prácu myokardu indukciou hypertrofie a fibrózy (72). Tieto štrukturálne zmeny vznikajú po aktivácii signálnej dráhy TGF- β 1/Smad3. Špecifickými inhibítormi tejto dráhy a tiež inhibítormi syntézy TMA došlo k spomaleniu procesu remodelácie (72). Naopak, myši, ktorým bolo podávané TMAO alebo strava bohatá na cholin, mali výraznejšiu dilatáciu ľavej komory, vyšší stupeň fibrózy myokardu a vyššie BNP v porovnaní s kontrolnou skupinou (73).

Podľa ďalších prác TMAO spúšťa v endotelových bunkách a cievach zápalovú reakciu a mitochondriálnu dysfunkciu (73, 74).

Prognostickú hodnotu TMAO hodnotil Tang v štúdií (75) na 720 pacientoch so stabilným srdcovým zlyhávaním. Pacienti s vyššou koncentráciou TMAO mali vyššie riziko úmrtia. V ďalšej práci sledoval TMAO u pacientov so srdcovým zlyhávaním s redukovanou ejekčnou frakciou a zistil, že vyššia hladina TMAO bola asociovaná so závažnejšou diastolickou dysfunkciou ľavej komory a s horším prežívaním (75). Suzuki et al. sledovali TMAO u pacientov hospitalizovaných

pre akútne srdcové zlyhávanie, pričom pacienti s vyššími koncentraciami TMAO mali významne vyššie riziko jedno-ročnej mortality a po kombinácii s NT-proBNP mali vyšší prognostický význam (76).

Podiel mikrobiómu na vzniku a progresii kardiovaskulárnych ochorení je dokázaný viacerými vedeckými prácami. Mnohé mechanizmy nie sú ešte úplne vysvetlené a je potrebné ďalšie skúmanie tohto problému. TMAO je pravdepodobne vhodný diagnostický a prognostický marker hodnotiaci vzťah GIT a kardiovaskulárneho systému a tiež potenciálny terapeutický cieľ.

Záver

Srdcové zlyhávanie je konečným štádiom veľkej časti kardiovaskulárnych ochorení. Počet pacientov so SZ neustále narastá a napriek rôznorodosti základnej etiológie a patofyziologického podkladu vzniku srdcového zlyhávania je liečba s minimálnymi rozdielmi u týchto pacientoch veľmi podobná.

Dnešné diagnostické a terapeutické kroky sa pri srdcovom zlyhávaní opierajú o dve základné klasifikácie – ejekčná frakcia ľavej komory a NYHA klasifikácia. Zdá sa, že tieto klasifikácie nie sú dostačujúce aj vzhľadom na pokroky, ktoré sa v ostatnom období zaznamenali na poli farmakologickej liečby. Očakáva sa, že v najbližšom čase budú pacienti so SZ a redukovanou EF ľavej komory liečení kombináciou viacerých liekov. ACE inhibítory, ARNI, betablokátory, antagonisti aldosterónových receptorov, SGLT2 inhibítory, vericiguat aj omecantiv mecarbil majú za sebou medicínu dôkazov ich prospešnosti v širokej populácii pacientov so SZ. Subpopulácie pacientov budú vyžadovať aj ďalšie farmakologické alebo intervenčné postupy. Už dnes sa ukazuje, že zásadným problémom v liečbe pacientov so SZrEF nebude nedostatok účinných molekúl, ale definovanie taktiky farmakoterapie pre individuálneho pacienta. Je veľmi pravdepodobné, že práve v tejto oblasti nájdu uplatnenie biomarkery.

Literatúra

1. Lesyuk W, Kriza C, Kolominsky-Rabas P. Cost-of-illness studies in heart failure: A systematic review 2004-2016. *BMC Cardiovasc Disord.* 2018; May 2;18:74.
2. Korewicki J. Cardiac transplantation is still the method of choice in the treatment of patients with severe heart failure. *Cardiol J.* 2009;16:493–499.
3. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:9–95.
4. Sarhene M, Wang Y, Wei J, et al. Biomarkers in heart failure: the past, current and future. *Heart Failure Reviews.* 2019;24:867–903.

5. Nadar SK, Shaikh MM. Biomarkers in routine heart failure clinical care. *Card Fail Rev*. 2019; Feb 11;5:50–56.
6. Sachdeva A, Horwich TB, Fonarow GC. Comparison of usefulness of each of five predictors of mortality and urgent transplantation in patients with advanced heart failure. *Am J Cardiol*. 2010; Sep 15;106:830–835.
7. Bettencourt P, Azevedo A, Pimenta J, et al. N-terminal-pro-brain natriuretic peptide predicts outcome after hospital discharge in heart failure patients. *Circulation*. 2004; Oct 12;110:2168–2174.
8. Cleland JGF, McMurray JJV, Kjekshus J, et al. Plasma Concentration of Amino-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide in Chronic Heart Failure: Prediction of Cardiovascular Events and Interaction With the Effects of Rosuvastatin. A Report From CORONA (Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure). *J Am Coll Cardiol*. 2009; Nov 10;54:1850–1859.
9. Masson S, Latini R, Carbonieri E, et al. The predictive value of stable precursor fragments of vasoactive peptides in patients with chronic heart failure: Data from the GISSI-heart failure (GISSI-HF) trial. *Eur J Heart Fail*. 2010; Apr;12:338–347.
10. Shah RV, Truong QA, Gaggin HK, et al. Mid-regional pro-atrial natriuretic peptide and pro-adrenomedullin testing for the diagnostic and prognostic evaluation of patients with acute dyspnoea. *Eur Heart J*. 2012; Sep;33:2197–2205.
11. Wesseling M, de Poel JHC, de Jager SCA. Growth differentiation factor 15 in adverse cardiac remodelling: from biomarker to causal player. *ESC Heart Failure*. 2020;7:1488–1501.
12. Sukova J, Ostadal P, Widimsky P. Profile of patients with acute heart failure and elevated troponin I levels. *Exp Clin Cardiol*. 2007;12:153–156.
13. Perna ER, Macin SM, Canella JPC, et al. Minor myocardial damage detected by troponin T is a powerful predictor of long-term prognosis in patients with acute decompensated heart failure. *Int J Cardiol*. 2005; Mar 18;99:253–261.
14. Peacock WF, De Marco T, Fonarow GC, et al. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med*. 2008; May 15;358:2117–2126.
15. Latini R, Masson S, Anand IS, et al. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. *Circulation*. 2007; Sep;116:1242–1249.
16. Masson S, Anand I, Favero C, et al. Serial measurement of cardiac troponin T using a highly sensitive assay in patients with chronic heart failure: Data from 2 large randomized clinical trials. *Circulation*. 2012; Jan 17;125:280–288.
17. Azevedo PS, Piegato BF, Minicucci ME, et al. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*; 2016;106:62–69.
18. Frohlich ED. Risk mechanisms in hypertensive heart disease. *Hypertension* 1999;782–789.
19. Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: Recent advances in basic science. *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2011;378:704–712.
20. Bartunek J, Delrue L, Van Durme F, et al. Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. *J Am Coll Cardiol*. 2008; Dec 16;52:2166–2174.
21. Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The biology of ST2: The international ST2 consensus panel. *Am J Cardiol*. 2015; Apr 2;115:3B–7B.
22. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, et al. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. 2007; Jun 1;117:1538–1549.
23. Parikh RH, Seliger SL, Christenson R, et al. Soluble ST2 for prediction of heart failure and cardiovascular death in an elderly, community-dwelling population. *J Am Heart Assoc*. 2016; Aug 1;5:8.
24. Ky B, French B, McCloskey K, et al. High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure. *Circ Heart Fail*. 2011; Mar;4:180–187.
25. Wang TJ, Wollert KC, Larson MG, et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: The Framingham heart study. *Circulation*. 2012; Sep 25;126:1596–1604.
26. Januzzi JL, 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; Aug 14;50:607–613.
27. Mueller T, Dieplinger B, Gegenhuber A, et al. Increased plasma concentrations of soluble ST2 are predictive for 1-year mortality in patients with acute destabilized heart failure. *Clin Chem*. 2008; Apr 1;54:752–756.
28. Friões F, Lourenço P, Laszczynska O, et al. Prognostic value of sST2 added to BNP in acute heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *Clin Res Cardiol*. 2015; Jun 29;104:491–499.
29. De Boer RA, Yu L, Van Veldhuisen DJ. Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. *Current Heart Failure Reports*. Current Science Inc. 2010;7:1–8.
30. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Ellinor PT, et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2006; Sep 19;48:1217–1224.
31. Lok DJA, Van Der Meer P, De La Porte, 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; May;99:323–328.
32. Unsicker K, Spittau B, Kriegelstein K. The multiple facets of the TGF- β family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine Growth Factor Rev*; 2013;24:373–384.
33. Xu X, Li Z, Gao W. Growth differentiation factor 15 in cardiovascular diseases: From bench to bedside. *Biomarkers* 2011;16:466–475.
34. Kempf T, Eden M, Strelau J, et al. The transforming growth factor- β superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2006; Feb;98:351–360.
35. Lee DH, Yang Y, Lee SJ, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res*. 2003; Aug;63:4648–4655.
36. Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA, et al. Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clin Cancer Res*. 2004; Apr 1;10:2386–2392.

37. Anand IS, Kempf T, Rector TS, et al. Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: Relation to disease severity and prognosis in the valsartan heart failure trial. *Circulation*. 2010; Oct 5;122:1387–1395.
38. Sharma A, Stevens SR, Lucas J, et al. Utility of Growth Differentiation Factor-15, A Marker of Oxidative Stress and Inflammation, in Chronic Heart Failure: Insights From the HF-ACTION Study. *JACC Hear Fail*. 2017;Oct 1;5:724–734.
39. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: A meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2002;40:221–226.
40. Lassus J, Harjola VP, Sund R, et al. Prognostic value of cystatin C in acute heart failure in relation to other markers of renal function and NT-proBNP. *Eur Heart J*. 2007; Aug;28:1841–1847.
41. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;Dec;54:1012–1024.
42. Aghel A, Shrestha K, Mullens W, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in predicting worsening renal function in acute decompensated heart failure. *J Card Fail*. 2010;Jan;16:49–54.
43. Damman K, van Veldhuisen DJ, Navis G, et al. Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), a marker of tubular damage, is increased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2008;Oct;10:997–1000.
44. Danková M, Matevičová J, Kalužay J. Význam vyšetrenia lipokálinu asociovaného so želatinázou (NGAL) v moči v diagnostike akútneho obličkového poškodenia u pacientov s akútnym srdcovým zlyháváním. *Cardiol Lett*. 2012;21:12–13.
45. Jougasaki M, Burnett JC. Adrenomedullin: Potential in physiology and pathophysiology. *Life Sci*. 2000;66:855–872.
46. Maisel A, Mueller C, Nowak R, et al. Mid-Region Pro-Hormone Markers for Diagnosis and Prognosis in Acute Dyspnea. Results From the BACH (Biomarkers in Acute Heart Failure) Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2010; May 11;55:2062–2076.
47. Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005;Aug 16;122:553–563.
48. Lindner K, Haier J, Wang Z, et al. Circulating microRNAs: Emerging biomarkers for diagnosis and prognosis in patients with gastrointestinal cancers. *Clinical Science*. 2015;128:1–15.
49. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;Oct 2;18:997–1006.
50. Liu X, Tong Z, Chen K, et al. The role of miRNA-132 against apoptosis and oxidative stress in heart failure. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
51. Gómez AM, Valdivia HH, Cheng H, et al. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science (80-)*. 1997; May 2;276:800–806.
52. Kumar R, Woo MA, Birrer BVX, et al. Mammillary bodies and fornix fibers are injured in heart failure. *Neurobiol Dis*. 2009;Feb;33:236–242.
53. Neupane B, Zhou Q, Gawaz M, et al. Personalized medicine in inflammatory cardiomyopathy. *Personalized Medicine*. 2018;15:127–136.
54. Dłudla PV, Dias SC, Obonye N, et al. A systematic review on the protective effect of n-acetyl cysteine against diabetes-associated cardiovascular complications. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2018;18:283–298.
55. Güven Bağla A, Içkin Gülen M, Ercan F, et al. Changes in kidney tissue and effects of erythropoietin after acute heart failure. *Biotech Histochem*. 2018;Jul 4;93:340–353.
56. Fang Y, Yeh C. Role of microRNAs in vascular remodeling. *Curr Mol Med*. 2015;Sep 23;15:684–696.
57. Villar AV, García R, Merino D, et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. *Int J Cardiol*. 2013;167:2875–2881.
58. Ucar A, Gupta SK, Fiedler J, et al. The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat Commun*. 2012;Sep 25;3:1–11.
59. Täubel J, Hauke W, Rump S, et al. Novel antisense therapy targeting microRNA-132 in patients with heart failure: results of a first-in-human Phase 1b randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Eur Heart J*. 2021; Jan 7;42:178–188.
60. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, et al. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2016;Apr 1;18:414–423.
61. Endo K, Naito Y, Ji X, et al. MicroRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure. *Biol Pharm Bull*. 2013;Jan;36:48–54.
62. Xiao J, Gao R, Bei Y, et al. Circulating miR-30d predicts survival in patients with acute heart failure. *Cell Physiol Biochem*. 2017;May 1;41:865–874.
63. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124:837–848.
64. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circulation Research*. 2017;214:1183–1196.
65. Peng J, Xiao X, Hu M, et al. Interaction between gut microbiome and cardiovascular disease. *Life Sciences*. 2018;214:153–157.
66. Takala J. Determinants of splanchnic blood flow. *Br J Anaesth*. 1996;77:50–58.
67. Chioncel O, Ambrosy AP. Trimethylamine N-oxide and risk of heart failure progression: marker or mediator of disease. *European Journal of Heart Failure*. 2019;21:887–890.
68. Zhang Y, Wang Y, Ke B, et al. TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure. *Translational Research*. 2021;228:109–125.
69. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;Apr 7;472:57–65.
70. Zhu W, Buffa JA, Wang Z, et al. Flavin monooxygenase 3, the host hepatic enzyme in the metaorganismal trimethylamine N-oxide-generating pathway, modulates platelet responsiveness and thrombosis risk. *J Thromb Haemost*. 2018;Sep 1;16:1857–1872.
71. Tang WHW, Bäckhed F, Landmesser U, et al. Intestinal microbiota in cardiovascular health and disease. *JACC State-of-the-Art Review*. 2019;73:2089–2105.
72. Organ CL, Otsuka H, Bhushan S, et al. Choline diet and its gut microbe-derived metabolite, trimethylamine N-Oxide, exacerbate pressure overload-induced heart failure. *Circ Hear Fail*. 2016;Jan 1;9:1.

73. Li Z, Wu Z, Yan J, et al. Gut microbe-derived metabolite trimethylamine N-oxide induces cardiac hypertrophy and fibrosis. *Lab Invest*. 2019;Mar 1;99:346–357.
74. Sun X, Jiao X, Ma Y, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;Dec 2;481:63–70.
75. Tang WHW, Wang Z, Fan Y, et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: Refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol*. 2014;Nov 4;64:1908–1914.
76. Suzuki T, Heaney LM, Bhandari SS, et al. Trimethylamine N-oxide and prognosis in acute heart failure. *Heart*. 2016;Jun 1;102:841–848.