I LIVELLI PROTEICI LINFOCITARI DI G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR KINASE-2 COME MARKER PROGNOSTICO IN PAZIENTI ANZIANI CON INSUFFICIENZA CARDIACA

Rengo G, Pagano G, Femminella GD, de Lucia C, Liccardo D, Cannavo A, Gambino G, Formisano R, Komici K, Petraglia L, Allocca E, Silvestri C, Parisi V, Leosco D, Ferrara N.

Dott. Gennaro Pagano

Università degli studi di Napoli Federico II
Dpt di Scienze Mediche Traslazionali

Conflitti di interesse

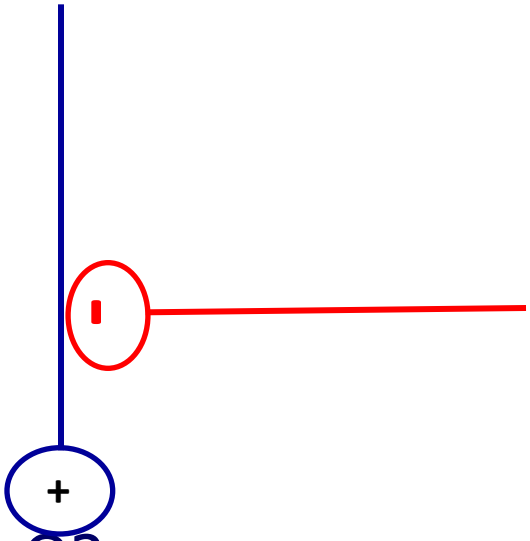
Rengo G: nessuno. Pagano G: nessuno. Femminella GD: nessuno. de Lucia C: nessuno. Liccardo D: nessuno. Cannavo A: nessuno. Gambino G: nessuno. Formisano R: nessuno. Komici K: nessuno. Petraglia L: nessuno. Allocca E: nessuno. Silvestri C: nessuno. Parisi V: nessuno. Leosco D: nessuno. Ferrara N: nessuno.

Introduzione

- L'iperattività del sistema nervoso simpatico (SNS) ha un ruolo cardine nell'insufficienza cardiaca cronica ma, sebbene sia associata ad una prognosi infausta, non esiste alcun test effettuato di routine nella pratica clinica che si propone di misurata [1,2].
- L'ipertono adrenerico è responsabile dell'aumento dei livelli cardiaci della proteina G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) [3], che svolge un ruolo cruciale nel controllo dei recettori β adrenergici (βAR) attraverso un processo di down-regulation/desensibilizzazione recettoriale.
- Infatti, la riduzione dell'attività e dei livelli dei βAR riduce ulteriormente la funzione già depressa nell'insufficienza cardiaca cronica.
- In studi preclinici, è stato dimostrato che l'inibizione di GRK2 nel cuore scompensato migliora la funzione cardiaca, il "reverse remodeling", ripristina le anomalie dei βAR e

1. Lymperopoulos A et al. Circ Res. 2013; 113(6):729-53.
3. Rengo G et al. Circ Heart Fail. 2012;5(3):385-91.

Iperattività del SNS



β-bloccanti

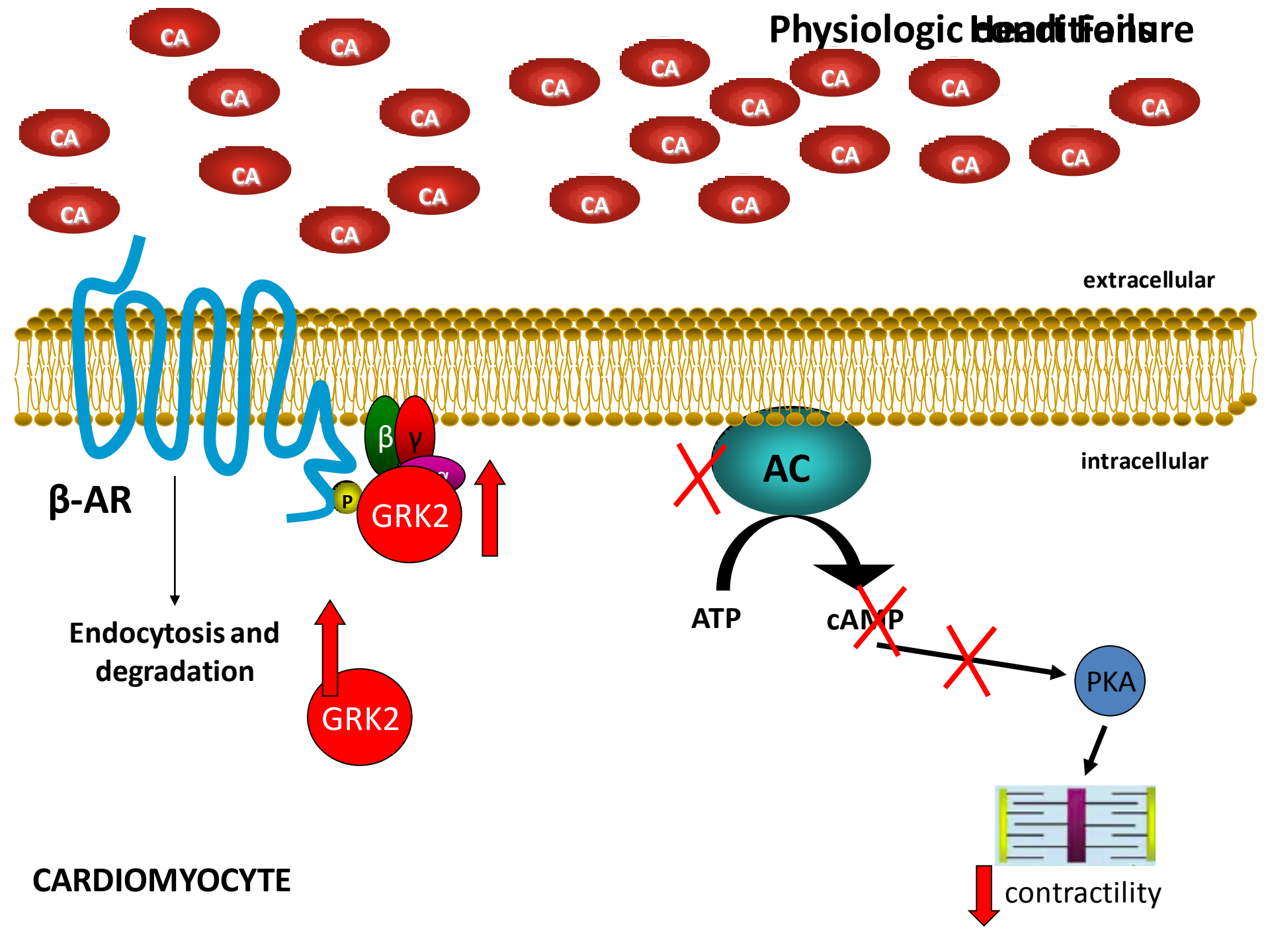
Consumo miocardico O2 *(J Mol Cell Cardiol 1985);*
Fibrosi interstiziale cardiaca *(Eur J Pharmacol 2004);*
Apoptosi dei cardiomiociti *(Cardiovasc Res 2004);*
Rimodellamento avverso *(Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007);*
Riduzione della riserva inotropa *(NEJM 1982);*
Produzione miocardica di ROS *(J Cell Mol Med 2007);*
Rischio di aritmie *(NEJM 1991);*
Sistema renina-angiotensina-aldosterone *(Am J Physiol 1992);*
Resistenze vascolari renali and periferiche *(JACC*

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Decreased Catecholamine Sensitivity and β-Adrenergic-Receptor Density in Failing Human Hearts

Michael R. Bristow, M.D., Ph.D., Robert Ginsburg, M.D., Wayne Minobe, B.S., Roger S. Cubicciotti, M.S., W. Scott Sageman, M.S., Keith Lurie, M.D., Margaret E. Billingham, M.D., Donald C. Harrison, M.D., and Edward B. Stinson, M.D.

N Engl J Med 1982; 307:205-211 | July 22, 1982


Physiologic
CA
extracellular
intracellular
β-AR
β
γ
P
GRK2
AC
ATP
cAMP
PKA
Endocytosis and degradation
GRK2
contractility
CARDIOMYOCYTE

European Heart Journal (2001) **22**, 1136–1143
doi:10.1053/euhj.2000.2407, available online at http://www.idealibrary.com on IDEAL®

Effect of cardiac sympathetic nervous activity on mode of death in congestive heart failure

H. P. Brunner-La Rocca, M. D. Esler, G. L. Jennings and D. M. Kaye

Alfred and Baker Medical Unit, Baker Medical Research Institute, Alfred Hospital, Melbourne, Australia

PLASMA NOREPINEPHRINE AS A GUIDE TO PROGNOSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC CONGESTIVE HEART FAILURE

JAY N. COHN, M.D., T. BARRY LEVINE, M.D., MARIA TERESA OLIVARI, M.D., VICTORIA GARBERG, R.N., DENNIS LURA, B.S., GARY S. FRANCIS, M.D., ADA B. SIMON, PH.D., AND THOMAS RECTOR, PH.D.

JACC Vol. 26, No. 5
November 1, 1995:1257–63

Adverse Consequences of High Sympathetic Nervous Activity in the Failing Human Heart

DAVID M. KAYE, MBBS, PHD, FRACP,* JEFFREY LEFKOVITS, MBBS, FRACP,
GARRY L. JENNINGS, MDBS, FRACP, PETER BERGIN, MBBS, FRACP,
ARCHER BROUGHTON, MBBS, PHD, FRACP, MURRAY D. ESLER, MBBS, PHD, FRACP

Come si misura l'iperattività del SNS nell'IC

Metodi	Vantaggi	Limitazioni
Norepinefrina plasmatica	• Misurazione semplice;	• Alta variabilità; • Sovrastima dovuta alla ridotta clearance renale nell'anziano con IC; • Norepinefrina sistemica non riflette le concentrazioni organo-specifiche;
Spillover cardiaco/renale della norepinefrina	• Informazioni sull'attività simpatica organo-specifica; • Indipendente dal grado di IC;	• Tecnica invasiva; • Disponibile solo in alcuni centri;
Heart rate variability	• Misurazione semplice e non invasiva;	• Heart rate variability riflette la risposta senoatriale alla stimolazione simpato/vagale; • Non esiste una componente spettrale specifica per la modulazione del sistema adrenergico;

Reciprocal In Vivo Regulation of Myocardial G Protein–Coupled Receptor Kinase Expression by β-Adrenergic Receptor Stimulation and Blockade

Guido Iaccarino, MD; Eric D. Tomhave, BS; Robert J. Lefkowitz, MD; Walter J. Koch, PhD

Background—Impaired myocardial β-adrenergic receptor (βAR) signaling, including desensitization and functional uncoupling, is a characteristic of congestive heart failure. A contributing mechanism for this impairment may involve enhanced myocardial β-adrenergic receptor kinase (βARK1) activity because levels of this βAR-desensitizing G protein–coupled receptor kinase (GRK) are increased in heart failure. An hypothesis has emerged that increased sympathetic nervous system activity associated with heart failure might be the initial stimulus for βAR signaling alterations, including desensitization. We have chronically treated mice with drugs that either activate or antagonize βARs to study the dynamic relationship between βAR activation and myocardial levels of βARK1.

Methods and Results—Long-term in vivo stimulation of βARs results in the impairment of cardiac βAR signaling and increases the level of expression (mRNA and protein) and activity of βARK1 but not that of GRK5, a second GRK abundantly expressed in the myocardium. Long-term β-blocker treatment, including the use of carvedilol, improves myocardial βAR signaling and reduces βARK1 levels in a specific and dose-dependent manner. Identical results were obtained in vitro in cultured cells, demonstrating that the regulation of GRK expression is directly linked to βAR signaling.

Conclusions—This report demonstrates, for the first time, that βAR stimulation can significantly increase the expression of βARK1, whereas β-blockade decreases expression. This reciprocal regulation of βARK1 documents a novel mechanism of ligand-induced βAR regulation and provides important insights into the potential mechanisms responsible for the effectiveness of β-blockers, such as carvedilol, in the treatment of heart failure. (***Circulation.*** **1998;98:1783-1789.)**

Key Words: heart failure ■ receptors, adrenergic, beta ■ myocardium ■ catecholamines

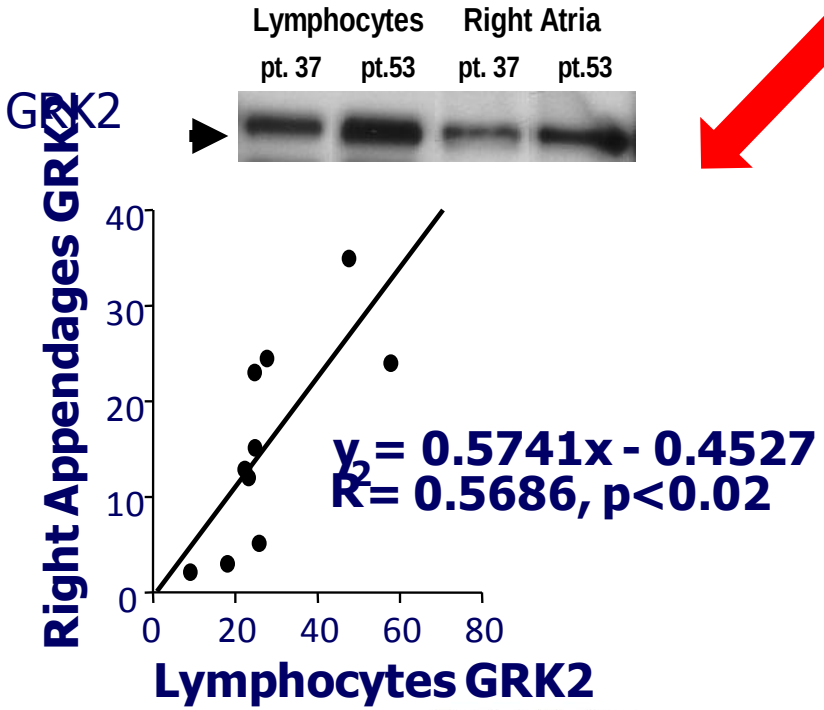
Iaccarino G et al Circulation 1998

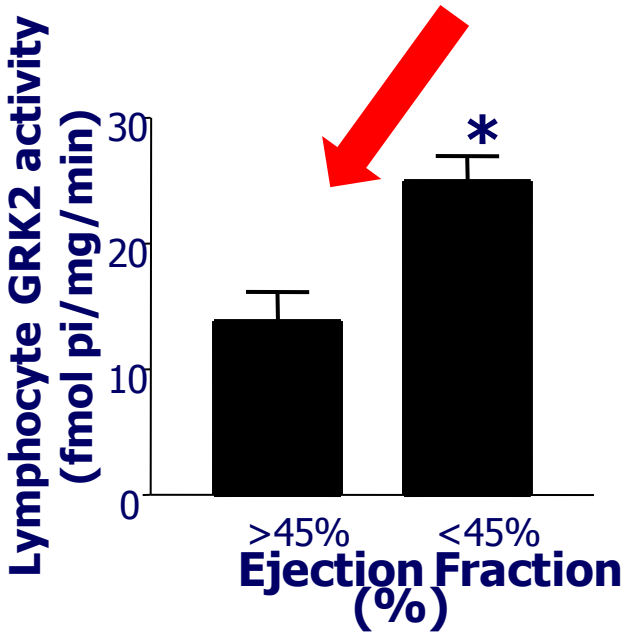
L'iperattività simpatica correla con la disfunzione dei βAR e quest'ultima è dovuta all'aumentata attività di GRK2

Si può ipotizzare che

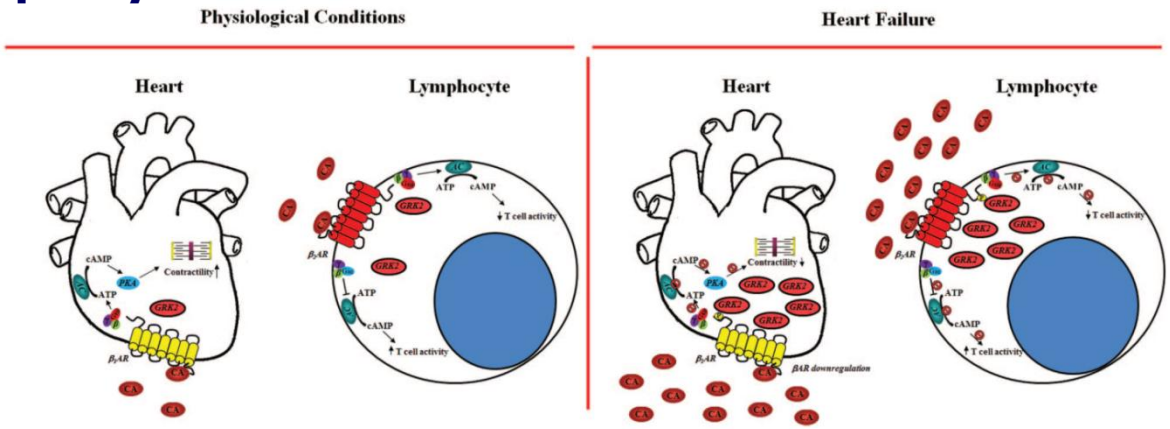
GRK2 potrebbe quindi rappresentare un nuovo biomarker di IC in grado di dare informazioni sul grado di iperattività simpatica e quanto quest'ultima danneggi il βAR

Elevata espressione di GRK2 nel miocardio e nei linfociti nell'IC





Iaccarino G et al Eur Heart J 2005

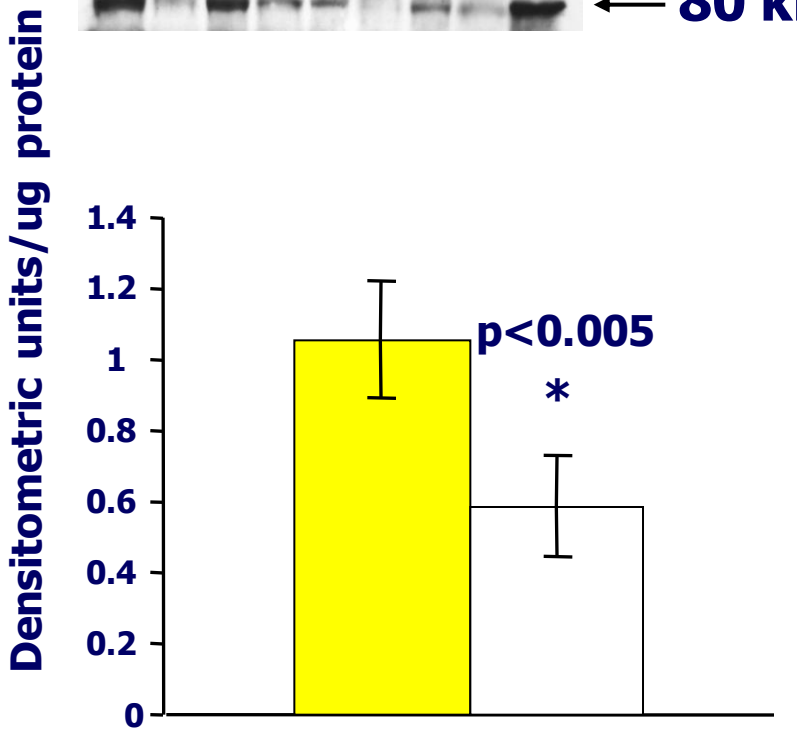


Rengo G et al Circ Heart Fail 2012

Livelli di βARK dopo LVAD nella IC

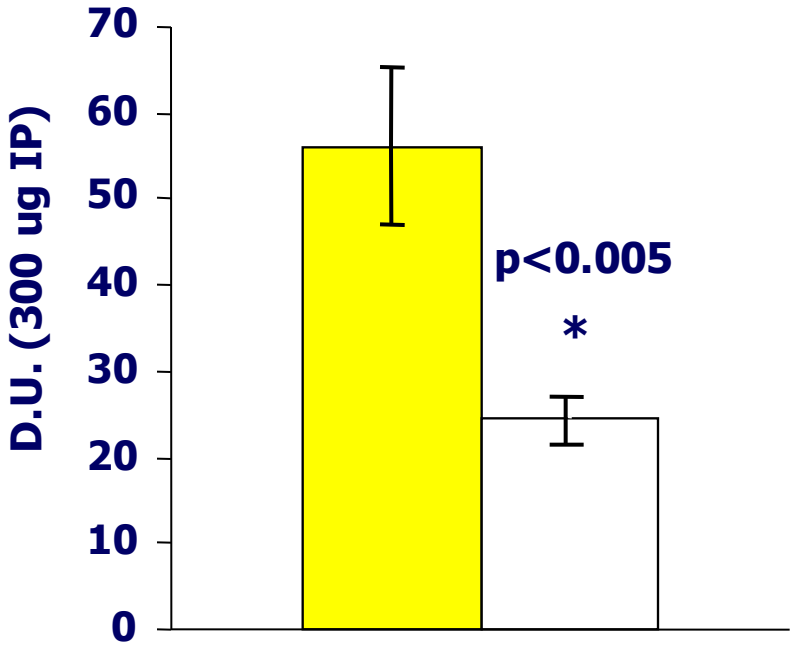
Myocardial GRK2 protein

← 80 kDa



Human Pre/Post LVAD Lymphocyte GRK2

← 80 kD



Pre-LVAD (n=12)

Post- LVAD (n=12)

Hata G et al J Card Fail 2006

Scopo dello studio

Lo scopo del nostro studio è misurare il valore preditivo dei livelli linfocitari di GRK2 sulla prognosi cardiovascolare in pazienti anziani con insufficienza cardiaca cronica e ridotta frazione di eiezione.

Disegno dello studio

- Abbiamo arruolato prospetticamente 303 pazienti consecutivi con diagnosi di IC tra il Gennaio 2007 e il Luglio 2010. Di questi 303 soggetti, 21 sono stati esclusi perché l'estratto linfocitario era di bassa qualità.

- 282 pazienti hanno completato il follow-up e sono stati inclusi nell'analisi.

Popolazione

- **Criteri di Inclusione:**

  1) Diagnosi di insufficienza cardiaca cronica di eziologia ischemica e non ischemica;
  2) Frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) ≤45%;
  3) Stabilità clinica da almeno un mese prima dell'inclusione nello studio;
  4) Terapia medica ottimizzata basata sulle attuali linee.

- **Criteri di Esclusione:**

  1) Rivascolarizzazione cardiaca o infarto acuto del miocardio nei 3 mesi precedenti l'entrata nello studio;
  2) Ipertensione incontrollata;
  3) Insufficienza renale severa (Filtrato Glomerurale <30 ml/min);
  4) Comorbidità associate ad anomala attivazione dei linfociti (cancro, infezioni in atto,

Metodi

All'arruolamento è stato valutato in tutti i pazienti:

1) una valutazione clinica completa (includendo classe NYHA e ecocardiogramma);
2) Dati Demografici (Età, Sesso);
3) Fattori di Rischio Cardiovascolare;
4) Presenza di Comorbidità (BPCO, IRC etc);
5) Terapia farmacologica;
6) N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NTproBNP) sierico;
7) Norepinefrina plasmatica;
8) Livelli linfocitari di GRK2

NT-proBNP:

I livelli sierici di NT-proBNP sono stati misurati mediante kit test radioimmunoassay prodotto da Shionogi and Co e distribuito dalla Bayer Corporation.

Livelli di GRK2 linfocitario:

Campioni di sangue sono stati raccolti da tutti i pazienti in tubi di EDTA. I linfociti sono stati isolati tramite gradinte ficoll usando il kit HISTOPAQUE 1077 (Sigma), congelati, e conservati a -80 C fino al giorno della misurazione. I livelli proteici di GRK2 sono stati misurati mediante western blot

Endpoint

Endpoint primario:

- Morte cardiaca.

Endpoint secondari:

- Morte per tutte le cause;
- Ospedalizzazioni per motivo cardiaco.

Le cause di morte erano stabilite da una commissione di tre medici dopo la revisione delle cartelle cliniche, i certificati di morte ed interpellando le famiglie o i medici di medicina generale.

Erano considerati motivi cardiaci: la progressione dell'insufficienza cardiaca cronica (aumento della classe NYHA), infarto acuto del miocardio e richiesta di ospedalizzazione.

Il periodo di follow-up è terminato alla fine dello periodo di studio (30 Luglio 2012) o in caso del sopraggiungere di un evento (morte o ospedalizzazione). Il tempo

Analisi statistica

Le variabili continue sono espresse come media standard deviation e comparate mediante il test t di Student (variabili distribuite normalmente) o come mediana valore di interquartile range e comparate mediante il test di Mann-Whitney U test (variabili distribuite in maniera non normale). La normalità è stata testata con il test di Kolmorov-Smirnov.
Le variabili catergoriche sono espresse come proporzione e comparate mediante il test chi-square con valutazione del risk ratios e dell'intervallo di confidenza al 95%.

Per determinare i predittori indipendenti di endpoint, un'analisi di sopravvivenza secondo Cox è stata utilizzata e le variabili che raggiungevano una significatività pari a $p < 0.10$

Analisi statistica

Per testare il potenziale valore prognostico incrementale sulla morte cardiaca con l'addizione progressiva di predittori di IC, abbiamo effettuato quattro analisi multivariate di sopravvivenza secondo Cox: 1) un modello con le variabili cliniche significative alla multivariata e aggiustati per età e sesso; 2) un modello con le variabili cliniche + LVEF; 3) un modello con le variabili cliniche + LVEF + NT-proBNP; 4) un modello con le variabili cliniche + LVEF + NT-proBNP + GRK2. Il valore prognostico additivo è stato valutato calcolando la C-statistic.

Tutti i dati sono stati inseriti in un database Excel ed analizzati mediante il programma SPSS versione 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois), e Stata versione 12.0 (StataCorp LP, College Station, Texas). La significatività statistica era

Risultati

Table 1. Characteristic of patients in the overall study population and in patients stratified in survivors and non survivors

	All (n=282)	Survivors (n=142)	Non Survivors (n=140)	p value
Age, y	70.74±10.68	67.7±10.5	73.8±10	<0.0001
Gender, % Male (n)	70.2% (198)	73.9% (105)	66.4% (93)	0.193
LVEF, %	32±9.2	35.2±8.65	28.9±8.7	<0.0001
NYHA class	II = 21.3% (60) III = 78.7% (222)	II = 30.9% (44) III = 68.1% (98)	II = 11.4% (16) III = 88.6% (124)	<0.0001
Hypertension, % (n)	76.2% (215)	78.2% (111)	74.3% (104)	0.486
Diabetes, % (n)	44.7% (126)	41.5% (59)	47.9% (67)	0.338
Hypercolesterolemia, % (n)	33.7% (95)	33.8% (48)	33.6% (47)	1.000
AF, % (n)	18.8% (53)	18.3% (26)	19.3% (27)	0.880
COPD, % (n)	28.7% (81)	26.8% (38)	30.7% (43)	0.511
GFR <60 ml/mg, % (n)	37.2% (105)	28.9% (41)	45.7% (64)	0.005
Medication				
ACE I / ARBs, % (n)	83.7% (236)	84.5% (120)	82.9% (116)	0.749
BetaBlockers, % (n)	52.8% (149)	57% (81)	48.6% (68)	0.189
Diuretics, % (n)	69.9% (197)	66.9% (95)	72.9% (102)	0.301
CaChannelAnt, % (n)	24.5% (69)	26.8% (38)	22.1% (31)	0.407
Biochemical determinations				
Serum NT-proBNP, pg/dl	1851.4±1177.6	1357.4±988.3	2352.5±1114.8	<0.0001
Plasma Norepinephrine, pg/dl	607.3±241.5	553.8±221.5	661.5±249.4	<0.0001
Lymphocyte GRK2, D.U.	1.39±0.69	1.15±0.59	1.65±0.69	<0.0001

Data are expressed as mean±1 standard deviation or percentage.
LVEF= left ventricular ejection fraction; NYHA= New York Heart Association; AF= Atrial fibrillation; COPD= chronic obstructive pulmonary disease; GFR= Glomerural Filtration Rate; ACE I= angiotensin-converting-enzyme inhibitor; ARBs= angiotensin receptor blockers; NT-proBNP= N-terminal pro-brain natriuretic peptide; GRK2= G coupled-receptor Kinase 2

Rengo G et al JACC Heart Failure su

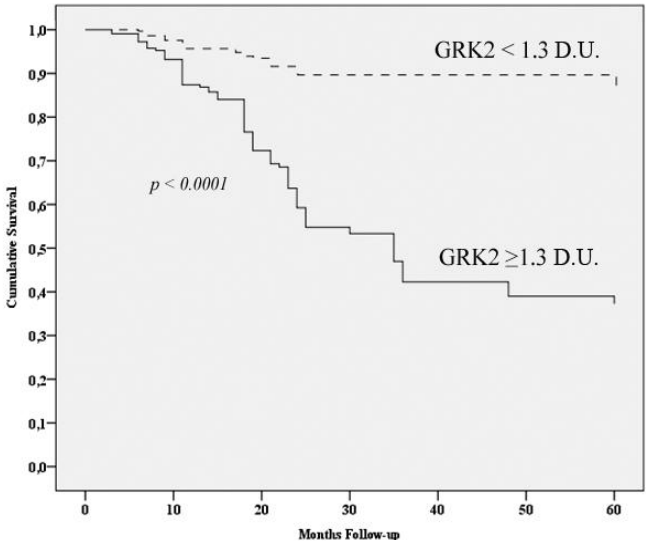
Risultati

	Cardiac Death				All Cause Death				HF re-hospitalization			
	Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR	p value	HR	p value	HR	p value	HR	p value	HR	p value	HR	p value
Age	1.055	<0.0001	1.031	0.015	1.047	<0.0001	1.030	0.006	1.028	0.001	1.025	0.014
Gender	1.402	0.088	0.858	0.483	0.818	0.262	1.211	0.320	1.377	0.041	1.060	0.742
LVEF	0.929	<0.0001	0.974	0.040	0.942	<0.0001	0.978	0.036	0.938	<0.0001	0.974	0.004
NYHA class	8.658	<0.0001	2.580	0.077	2.533	<0.0001	0.950	0.868	1.575	0.022	0.736	0.193
Hypertension	0.868	0.376	-	-	1.081	0.686	-	-	1.281	0.184	-	-
Diabetes	1.413	0.070	0.986	0.943	1.235	0.212	-	-	1.839	0.0001	1.505	0.011
Hypercolesterolemia	1.247	0.204	-	-	0.981	0.914	-	-	1.503	0.008	1.294	0.117
AF	0.865	0.378	-	-	0.886	0.572	-	-	0.926	0.701	-	-
COPD	0.828	0.251	-	-	0.821	0.281	-	-	1.016	0.923	-	-
GFR <60 ml/mg	2.345	<0.0001	1.562	0.026	1.811	0.0005	1.455	0.031	1.605	0.002	1.085	0.614
NT-proBNP*	4.205	<0.0001	2.090	<0.0001	3.144	<0.0001	1.823	0.0003	1.939	<0.0001	1.380	0.016
Norepinephrine*	2.156	0.002	1.014	0.956	2.205	0.0003	1.115	0.633	1.342	0.114	-	-
Lymphocyte GRK2*	4.340	<0.0001	2.541	0.001	4.274	<0.0001	2.892	<0.0001	6.769	<0.0001	5.607	<0.0001

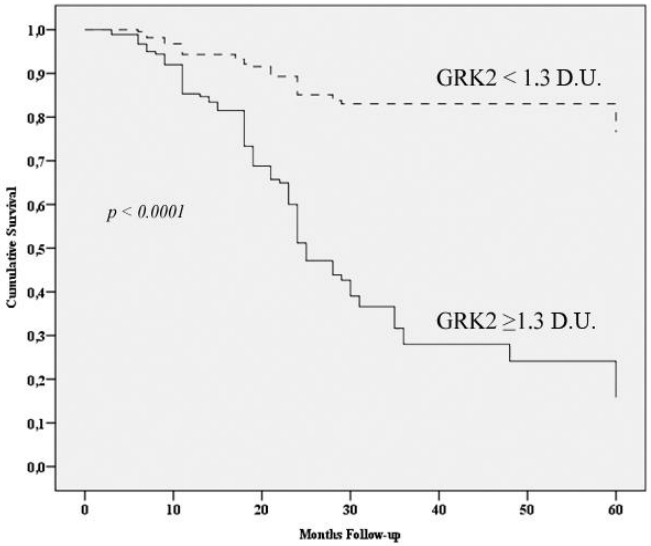
Rengo G et al JACC Heart Failure su

Risultati

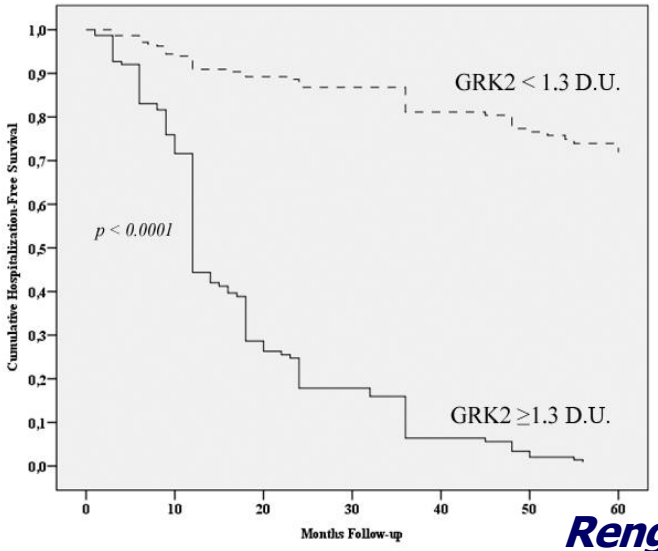
A Cardiac Death



B All Cause Mortality



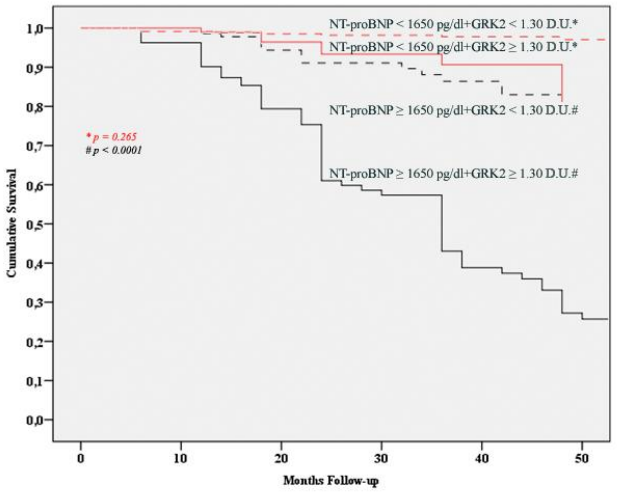
C HF re-hospitalization



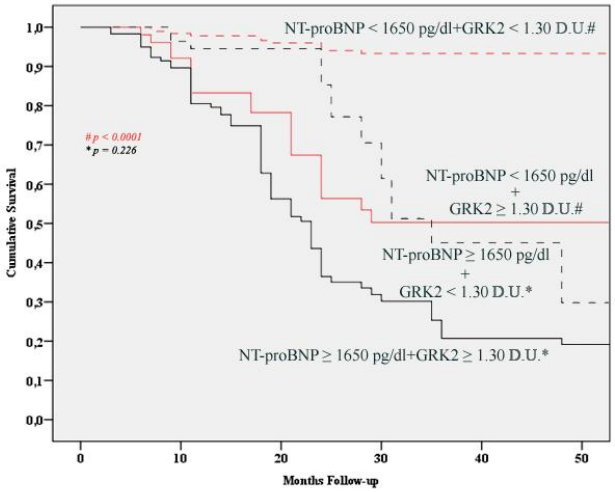
Rengo G et al JACC Heart Failure su

Risultati

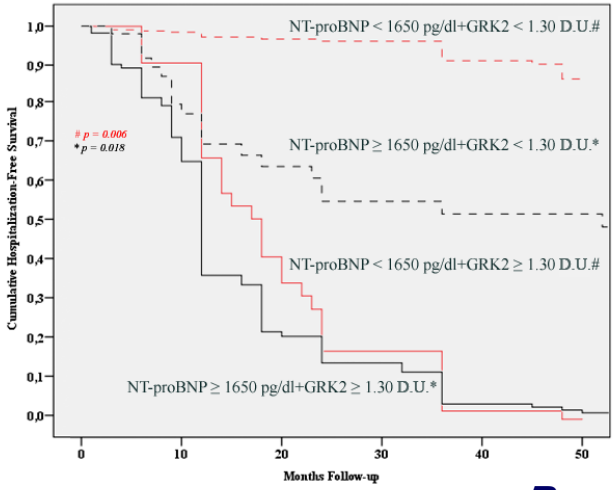
D Cardiac Death



E All Cause Mortality



F HF re-hospitalization



Rengo G et al JACC Heart Failure su

Risultati

Analisi del valore prognostico incrementale del GRK2 sui biomarker clinici e bioumorali

Variabile	C-Index (95% I.C.)	p Value
Modello 1*	0.693 (0.636-0.751)	NA
Modello 1+LVEF	0.742 (0.695-0.790)	0.023
Modello 1+LVEF+BNP	0.778 (0.740-0.817)	0.007
Modello 1+LVEF+BNP+GRK2	0.796 (0.758-0.834)	0.033

*Modello che include età, sesso e presenza di insufficienza renale cronica. NA = non applicabile.

Rengo G et al JACC Heart Failure su

Conclusioni

La misurazione del GRK2 linfocitario si propone come nuovo biomarker di iperattività simpatica con potere predittivo additivo ed indipendente sulla mortalità e morbidità in corso di scompenso cardiaco, aldilà e in aggiunta agli attuali marker utilizzati nella pratica clinica.

I LIVELLI PROTEICI LINFOCITARI DI G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR KINASE-2 COME MARKER PROGNOSTICO IN PAZIENTI ANZIANI CON INSUFFICIENZA CARDIACA

Rengo G, Pagano G, Femminella GD, de Lucia C, Liccardo D, Cannavo A, Gambino G, Formisano R, Komici K, Petraglia L, Allocca E, Silvestri C, Parisi V, Leosco D, Ferrara N.

Dott. Gennaro Pagano

Università degli studi di Napoli Federico II
Dpt di Scienze Mediche Traslazionali