

# **Valore prognostico della determinazione di biomarcatori ematici in pazienti con scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata: correlazioni con imaging ecocardiografico e di risonanza magnetica.**

## **INTRODUZIONE**

### Definizione ed epidemiologia

Lo scompenso cardiaco (HF) è una sindrome clinica complessa causata da anomalie strutturali e/o funzionali del miocardio tali da compromettere il riempimento ventricolare o l'eiezione di sangue. È una delle principali cause di morbidità e mortalità in tutto il mondo e colpisce almeno 26 milioni di persone, con prevalenza crescente (1).

Si stima che nel 2050 il numero totale di soggetti over-60 raddoppierà rispetto al miliardo registrato nel 2017 (2).

Sulla base di questi dati si può pertanto prevedere che la prevalenza dello scompenso cardiaco crescerà sensibilmente nei prossimi 20 anni (3).

L'ultima classificazione dello scompenso cardiaco proposta dall'European Society of Cardiology (ESC) prevede 3 categorie, distinte in base al valore di frazione d'eiezione del ventricolo sinistro (LVEF):

- insufficienza cardiaca a frazione d'eiezione ridotta (HFrEF), ovvero  $LVEF \leq 40\%$ ;
- insufficienza cardiaca a frazione d'eiezione leggermente ridotta (HFmrEF), ovvero LVEF tra il 41% e il 49%;
- insufficienza cardiaca a frazione d'eiezione preservata (HFpEF), ovvero  $LVEF \geq 50\%$ , determinante sintomi e/o segni di scompenso cardiaco, con evidenza di anomalie cardiache strutturali e/o funzionali e/o alterazioni dei peptidi natriuretici (NP) (4).

Lo scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata è responsabile del 50% dei casi di insufficienza cardiaca (5).

Esso è associato ad un alto tasso di morbidità e mortalità. La qualità di vita dei pazienti con HFpEF è tanto compromessa quanto quella dei pazienti con HFrEF. La sopravvivenza media a 5 anni dopo una ospedalizzazione per HFpEF è di circa il 35% (5).

### Fisiopatologia

L'HFpEF è una sindrome con numerose eziologie sottostanti e molteplici alterazioni fisiopatologiche. Esso tipicamente deriva dalla combinazione di fattori di rischio e comorbidità tra cui l'età avanzata, il sesso femminile, l'obesità, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, la nefropatia, l'anemia, i disordini del sonno e le broncopneumopatie cronico ostruttive (6).

Il meccanismo fisiopatologico principale nello HFpEF è la disfunzione diastolica, correlata a rilassamento ventricolare ridotto, aumentata rigidità parietale, ridotta

compliance, aumento dello stress ossidativo, irrigidimento vascolare, fibrosi interstiziale e ipertrofia dei miocardiociti.

Mentre lo scompenso cardiaco a frazione d' eiezione ridotta risulta associato ad un danno miocardico primario - quale il danno ischemico, virale o tossico, per citarne alcuni - l'HFpEF può derivare da un danno del miocardio secondario alla presenza di comorbidità che portano ad uno stato di infiammazione sistemica con conseguente danno endoteliale diffuso, disfunzione microvascolare cardiaca e, in ultimo, cambiamenti molecolari intracellulari che provocano fibrosi e irrigidimento ventricolare.

Tra le comorbidità l'obesità e la sindrome metabolica ad essa correlata hanno un ruolo preponderante.

Le alterazioni metaboliche tipiche dell'obesità si associano infatti ad uno stato infiammatorio sistemico cronico, generalmente di basso grado di intensità, e questa stretta relazione ha portato a coniare il termine di "metainfiammazione" (7). Essa sembra svolgere un ruolo cruciale nella patogenesi dello HFpEF.

La maggior parte dei pazienti con HFpEF è in sovrappeso o in franca obesità, e ciò determina un peggioramento dei loro parametri funzionali (8). Sebbene l'obesità aumenti il rischio di coronaropatia, gli individui obesi sono significativamente più a rischio di HFpEF indipendentemente dal potenziale concomitante danno ischemico (9).

Si stima che negli Stati Uniti l'80% dei pazienti con HFpEF sia obeso, con un BMI medio superiore a 35 kg/m<sup>2</sup> (10).

I pazienti obesi con HFpEF hanno una classe NYHA (New York Heart Association) peggiore, parametri indicativi di rimodellamento cardiaco avverso e capacità d'esercizio significativamente minore rispetto a pazienti con HFpEF non obesi (11).

Nonostante l'evidenza di una stretta correlazione tra obesità e HFpEF, non sono ad oggi noti i precisi meccanismi biologici sottostanti.

Essi vanno ben al di là dei semplici effetti del sovraccarico meccanico che l'obesità comporta sull'organismo. Essa indirettamente amplifica i suoi effetti deleteri inducendo, ad esempio, insulino-resistenza e ipertensione arteriosa, ma è direttamente a livello del tessuto adiposo che si attivano complessi meccanismi che vedono coinvolti dei fattori di regolazione in grado di promuovere lo stato infiammatorio sistemico (12), e di iniziare il reclutamento di macrofagi mediante la secrezione di chemochine (13).

Le alterazioni metaboliche sono strettamente associate ad una disregolazione immunitaria, e tale relazione appare avere un ruolo critico nella patogenesi delle malattie cardiometaboliche, di cui l'HFpEF è un'espressione rappresentativa (12).

L'infiammazione sistemica contribuisce al deterioramento clinico nel paziente con HFpEF. I livelli circolanti di citochine proinfiammatorie sono da 1,34 a 2,4 volte maggiori nei pazienti con HFpEF rispetto a quelli con HFrEF (14), ed influiscono sul rimodellamento del ventricolo sinistro attraverso molteplici meccanismi.

L'infiammazione cardiaca e l'attivazione del Tissue Growing Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) inducono la sintesi di collagene, promuovono la fibrosi interstiziale e alterano la funzione diastolica del ventricolo sinistro nei pazienti con HFpEF.

La fibrosi miocardica sarebbe associata ad una "rarefazione" del microcircolo coronarico, dimostrata su campioni autoptici (15), che insieme alla disfunzione microvascolare contribuirebbe al danno miocardico a riposo, all'ischemia indotta dallo sforzo e quindi alla riduzione della riserva coronarica nei pazienti con HFpEF (16).

Elevati livelli di infiammazione sembrano persistere anche dopo la fase acuta dello scompenso cardiaco, come emerge da studi in cui alla normalizzazione degli indici di stress meccanico, che si osserva a risoluzione del quadro di scompenso, non si associa una pari riduzione dei markers di infiammazione (17).

Nella fisiopatologia dello HFpEF risultano inoltre implicati meccanismi di regolazione del calcio intracellulare, alterazioni dello stato di fosforilazione, anomalie nell'asse regolatorio cardio-renale e cardio-polmonare.

Le elevate pressioni di riempimento del ventricolo sinistro determinano una significativa riduzione della riserva sistolica durante esercizio, a causa della ridotta suzione diastolica, con conseguente impossibilità di aumentare lo stroke volume durante stress; esse inoltre determinano delle ripercussioni a monte del ventricolo sinistro, ovvero rimodellamento e disfunzione dell'atrio sinistro e progressivo instaurarsi di ipertensione polmonare, compromissione degli scambi gassosi, sovraccarico del ventricolo destro, alterazioni che clinicamente si manifestano con dispnea, a riposo o durante esercizio, e riduzione della capacità aerobica.

### Diagnosi

La diagnosi clinica di HFpEF è generalmente meno immediata di quella di HFrEF, per i sintomi più spesso aspecifici, non infrequentemente attribuiti a comorbidità.

Sono stati proposti degli score diagnostici quali l'H2FPEF e l'HFA-PEFF.

L'H2FPEF score considera alcune variabili predittive di scompenso, nello specifico obesità, fibrillazione atriale, età > 60 anni, trattamento con due o più antipertensivi, rapporto E/e' >9, e valutazione ecocardiografica di pressione arteriosa polmonare >35 mmHg. Tale score composito varia da 0 a 9 ed ha dimostrato di poter discriminare l' HFpEF da cause non cardiache di dispnea (18).

L'HFA-PEFF (19) è un algoritmo diagnostico che procede in 4 step: Step 1 (P=valutazione pre-test): valutazione ambulatoriale di segni e sintomi, elettrocardiogramma, ecocardiogramma, analisi di laboratorio. Secondo step (E: ecocardiogramma e peptide natriuretico): valutazione ecocardiografica approfondita e dosaggio delle concentrazioni ematiche di peptide natriuretico. Uno score  $\geq 5$  implica una diagnosi definitiva di HFpEF; un punteggio  $\leq 1$  rende la diagnosi di HFpEF improbabile. Un punteggio intermedio (2-4 punti) implica di passare allo step 3 (F1: test funzionale) ovvero valutazione ecocardiografica con stress fisico o

valutazione emodinamica invasiva, e successivamente allo step 4 (F2: eziologia finale), per stabilire la specifica causa di HFpEF o spiegazioni alternative.

Ad oggi è riconosciuto solo ai peptidi natriuretici il ruolo di marcatori diagnostici e prognostici di scompenso cardiaco.

Recentemente, per una migliore valutazione dello scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata sono stati proposti nuovi biomarcatori, espressione di meccanismi fisiopatologici differenti rispetto a quelli che portano all'incremento dei peptidi natriuretici - ovvero lo stress meccanico del miocardio - essendo correlati ad altre vie che si attivano nello scompenso cardiaco quali la fibrogenesi, la risposta infiammatoria, lo stress ossidativo (20).

Iniziali evidenze a favore di nuovi marcatori di scompenso cardiaco emergono da studi che ne dimostrano la capacità di fornire informazioni consensuali, e in alcuni casi aggiuntive, rispetto a quelle fornite dai peptidi natriuretici in termini di utilità diagnostica e prognostica (21; 22; 23)

#### - Peptidi natriuretici

Il peptide natriuretico cerebrale (BNP) e la sua parte N-terminale (NT-proBNP) sono biomarcatori sierici consolidati per la diagnosi e la prognosi nell'insufficienza cardiaca acuta o cronica e sono sempre più utilizzati per guidare la gestione dei pazienti con scompenso cardiaco (24).

Il BNP, peptide biologicamente attivo, ed il suo frammento amino-terminale inattivo NT-proBNP sono sintetizzati nel miocardio ventricolare in risposta allo stiramento dei miociti e/o al sovraccarico pressorio. Gli effetti fisiologici principali del BNP sono la natriuresi, la vasodilatazione e l'inibizione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) e del sistema nervoso simpatico (25).

Il BNP è rapidamente degradato da un'endopeptidasi ed il recettore C del peptide natriuretico ha un'emivita di circa 20 minuti. L'NT-proBNP circola invece come sostanza biologicamente inattiva, secreta passivamente dal rene, e pertanto ha un'emivita maggiore, di circa 1-2 ore (26).

I livelli del peptide natriuretico mostrano ampie variazioni biologiche, risentendo di fattori quali l'età, la funzione renale e l'indice di massa corporea (BMI), per citarne alcuni. Tali caratteristiche li rendono marcatori a bassa specificità, aumentando anche in numerose condizioni patologiche non cardiache. Ulteriori limiti al loro utilizzo sono rappresentati dall'esistenza di una zona grigia nei valori di cut-off e dalle ridotte evidenze in pazienti con HFpEF, essendo stati di gran lunga più studiati in pazienti con frazione d'eiezione ridotta. Diversi studi hanno comunque dimostrato che il peptide natriuretico di tipo B è tipicamente più alto nell'HFpEF rispetto ai pazienti senza scompenso (27; 28).

Per il BNP è stato suggerito un valore di cut-off di 35 pg/ml, mentre per NT-proBNP il valore corrispondente è 125 pg/ml, anche se per pazienti di età superiore a 75 anni può essere considerata una soglia pari a 300 pg/ml. Nonostante i livelli circolanti di peptidi natriuretici siano elevati nei pazienti con HFpEF rispetto ai

soggetti senza HF, di solito essi sono inferiori ai livelli osservati nei pazienti con HFrEF (29). Sebbene infatti le pressioni di riempimento endoventricolari siano ugualmente elevate nello HFpEF e nello HFrEF, il rimodellamento concentrico che si ha nello HFpEF rispetto a quello eccentrico dello HFrEF si traduce in un minore stress di parete e quindi in un ridotto stimolo alla secrezione di BNP da parte del miocardio, perché il raggio del ventricolo sinistro è minore e lo spessore di parete maggiore.

In pazienti in fibrillazione atriale sono stati riportati valori medi di peptidi natriuretici 3–3.5 volte maggiori rispetto ai pazienti in ritmo sinusale (30).

In generale concorda con una diagnosi di scompenso cardiaco un valore di NT-proBNP >220 pg/ml o BNP >80 pg/ml in pazienti in ritmo sinusale e un valore di NT-proBNP >660 pg/ml o di BNP >240 pg/ml in pazienti in fibrillazione atriale (19)

Il valore dei peptidi natriuretici va dunque sempre interpretato nel singolo contesto. Elementi diagnostici aggiuntivi, strumentali e laboratoristici, appaiono pertanto fondamentali nell'inquadramento dei pazienti con scompenso cardiaco.

#### - Interleuchina 6 (IL-6)

L'interleuchina-6 (IL-6) è una citochina pleiotropica con un'ampia gamma di effetti immunitari umorali e cellulari.

Le citochine sono piccole proteine solubili che trasducono segnali alle cellule adiacenti o ad organi distanti. La maggior parte delle citochine è associata a specifici recettori attraverso cui vengono trasmessi segnali alle cellule bersaglio (31).

Il complesso IL-6/recettore è coinvolto nella patogenesi di diverse affezioni, e l'inibizione di questo asse si è dimostrata molto efficace nell'arrestare la progressione di alcune patologie autoimmuni (32).

L'IL-6 è prodotta non solo dalle cellule immunitarie e dalle cellule accessorie del sistema immunitario, ma anche da componenti cardiovascolari, come cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vasali e miociti ischemici.

Livelli elevati di IL-6 sono stati riscontrati in pazienti affetti da insufficienza cardiaca acuta e cronica, e correlano con gravità della classe funzionale NYHA, riduzione della frazione d'eiezione e prognosi sfavorevole (33).

È stato riportato che nella maggior parte degli individui sani i valori medi di IL-6 sono nell'intervallo 4.631 - 5.740 pg/ml (34).

In uno studio di Gwechenberger et al. in pazienti con HF stabile i valori medi di IL-6 erano compresi tra 1.76 e 1.73, mentre nei pazienti che tendevano ad un peggioramento della classe funzionale erano riportati valori compresi tra 4.62 e 7.98 pg/ml (35).

#### - Solubile ST2 (Sst2)

L' ST2 (source of tumorigenicity 2) è una proteina appartenente alla famiglia dei recettori dell'interleuchina-1 (36).

Esso ha due isoforme: una transmembrana e una solubile (sST2). Il ligando di entrambe le forme è l'interleuchina-33 (IL-33) che dopo essersi legata al recettore transmembrana esercita un effetto anti-ipertrofico e anti-fibrotico, e quindi protettivo, sul miocardio (37). Al contrario, quando l'sT2 solubile lega e rimuove dal circolo l'IL-33 si promuovono potenzialmente ipertrofia cardiaca, fibrosi e disfunzione ventricolare (38).

L'sST2 rappresenta pertanto un nuovo biomarcatore di stress meccanico misurabile nel siero e correla con ipertrofia cardiaca, fibrosi e disfunzione ventricolare (39). Diversi studi clinici hanno valutato l'associazione tra sST2 e prognosi nei pazienti con insufficienza cardiaca, ed i risultati ottenuti sono contrastanti: in uno studio di Fries et al. (27) sST2 si è dimostrato capace di predire la prognosi nei pazienti con HFrEF ma non in quelli con HFpEF; al contrario, uno studio di Manzano-Fernandez e coll. (22) ha dimostrato una capacità prognostica dell'sST2 sovrapponibile nello HFpEF e nello HFrEF.

Nello studio PARAMOUNT (40) elevati livelli di sST2 erano associati ad età avanzata, sesso maschile, classe NYHA più avanzata, più elevati livelli di NT-proBNP e più basso valore di filtrato glomerulare, più alto rapporto E/e' e maggiore dimensione dell'atrio sinistro.

Il cut-off per l'sST2 approvato dalla Food and Drug Administration è di 35 ng/ml.

- Growth differentiation factor-15 (GDF-15)

Il fattore di differenziazione della crescita 15 (GDF-15) è un membro della superfamiglia del transforming growth factor- $\beta$  ed è un marker indicativo di diverse vie di stress miocardico e di infiammazione (41).

L'espressione del GDF-15 è indotta nei cardiomiociti in risposta allo stress metabolico quale quello secondario all'ischemia o al sovraccarico pressorio, mediati rispettivamente dall'ossido nitrico e dal sistema RAAS (42).

I livelli sierici di GDF-15 correlano con la massa ventricolare (43) e con l'entità della fibrosi miocardica (44).

Chan et al. (45) hanno dimostrato prestazioni abbastanza uniformi di GDF-15 come marker prognostico in presenza di varie comorbidità nei pazienti con HFpEF. Gli autori hanno concluso che la precisione diagnostica di GDF-15 era almeno pari a quella di NT-proBNP e che una loro combinazione ha migliorato significativamente l'accuratezza diagnostica. Risultati simili sono stati riportati da Santhanakrishnan et al. (46).

Izumiya Y. et al. (47) hanno misurato i livelli sierici di GDF-15 in 149 pazienti consecutivi con disfunzione diastolica del ventricolo sinistro e frazione d' eiezione normale (>50%), indicando il GDF-15 come biomarcatore prognostico potenzialmente utile nei pazienti con HFpEF.

Il valore medio di GDF-15 riportato in volontari sani era di 695.0 pg/ml in uno studio di Lukaszyk e coll. (48) e di 399 pg/ml in uno studio di Hamon e coll. (49).

Un recente studio condotto da Kastiris ha riportato che 750 pg/ml è il limite superiore della norma per il GDF-15 in individui senza malattie cardiovascolari (50).

#### - Galectina (Gal-3)

La galectina-3 è una proteina appartenente alla famiglia delle lectine leganti il  $\beta$ -galattoside solubile, secreta dai macrofagi attivati (40). Essa può essere individuata in un'ampia varietà di cellule e di superfici tissutali. La sua funzione è probabilmente correlata alla cascata infiammatoria successiva al danno miocardico, così come alla regolazione della contrattilità miocardica (51).

È noto come essa sia coinvolta nell'adesione cellulare, nella chemio-attrazione, nella crescita e differenziazione cellulare, nell'attivazione dei fibroblasti e nell'apoptosi (52; 53).

La galectina-3 svolge un ruolo unico nella progressione dell'insufficienza cardiaca ed è anche associata al rimodellamento cardiaco e alla fibrogenesi, configurandosi come un efficace indicatore prognostico degli esiti a breve e lungo termine (54).

Da Boer et al. hanno mostrato che i livelli di galectina-3 erano correlati con livelli più elevati di IL-6. Il valore predittivo della galectina-3 era più forte nei pazienti con HFpEF rispetto ai pazienti con HFrEF. La combinazione dei livelli plasmatici di galectina-3 e BNP ha aumentato il valore prognostico rispetto ai biomarcatori considerati singolarmente (47).

Recenti studi mediante determinazione della galectina-3 nel contesto dell'insufficienza cardiaca hanno rivelato il potenziale valore clinico di questo biomarcatore come indicatore prognostico (55). In una popolazione di circa 5800 anziani senza malattia cardiovascolare nota, valori di GAL-3 <11.2 ng/ml sono stati individuati come indicatori di rischio "negativo", ovvero correlati con una bassa probabilità a breve termine di malattia cardiovascolare (56).

Livelli >17,8 ng/mL, indipendenti dai sintomi, dai risultati clinici e da altre misure di laboratorio, predicono che un paziente potrebbe avere una rapida progressione dell'insufficienza cardiaca, con conseguente ricovero in ospedale (57).

#### - TMAO

TMAO (Trimethylamine N-oxide) è un metabolita del microbiota intestinale; enzimi prodotti da quest'ultimo convertono sostanze come colina, carnitina e betaina - contenute nella carne rossa, nelle uova, nel pesce e nei prodotti caseari - in trimetilamina, che a livello epatico è poi trasformata in TMAO.

Il microbiota intestinale è recentemente emerso come potente regolatore di numerosi processi fisiopatologici; cambiamenti nella sua composizione - determinanti un quadro di disbiosi - responsabili di infiammazione e compromissione dell'integrità della barriera intestinale e di aumento dei livelli circolanti di metaboliti batterici, sono stati messi in relazione allo sviluppo di aterosclerosi, ipertensione arteriosa e disfunzione vasale (6).

Recenti studi hanno sottolineato il potenziale ruolo delle alterazioni del microbiota intestinale nella patogenesi dello scompenso cardiaco (58; 59).

L'ipoperfusione e la congestione intestinale determinano infatti ipossia e metabolismo anaerobio a livello delle cellule epiteliali intestinali, con una sovrespressione dello scambiatore sodio/idrogeno (59; 60) e conseguente aumento del riassorbimento di sodio ed immisione di ioni idrogeno nel lume intestinale, che determina riduzione del pH locale e alterazioni della flora intestinale. Lo squilibrio del microbiota intestinale determina un aumento della produzione di metaboliti dannosi, tra cui TMAO.

TMAO sembra inoltre responsabile di ipertrofia miocardica e fibrosi interstiziale (61), infiammazione e disfunzione mitocondriale (62).

Il valore prognostico di TMAO è stato studiato in pazienti con HF<sub>r</sub>EF (63; 64) mentre non è stato ben stabilito in pazienti con HF<sub>p</sub>EF, sebbene da alcuni studi sia emerso che livelli elevati di TMAO alla dimissione siano associati ad un aumentato rischio di eventi cardiaci nei pazienti con HF<sub>p</sub>EF, in particolare con la complicazione della malnutrizione (65).

La concentrazione plasmatica media di TMAO in una popolazione priva di malattie cardiovascolari, nefropatia cronica e diabete, era 3.91  $\mu\text{mol/l}$  negli uomini, con un intervallo di riferimento di 1.28–19.67  $\mu\text{mol/l}$ ; nelle donne la concentrazione media di TMAO era 3.56  $\mu\text{mol/l}$  e l'intervallo di riferimento 1.08–17.12  $\mu\text{mol/l}$  (66).

In una popolazione di pazienti ricoverati per scompenso cardiaco acuto elevati livelli di TMAO erano definiti come superiori al valore medio riscontrato pari a 20.37  $\mu\text{mol/l}$  (67).

#### - Ecocardiografia

Ad oggi la maggior parte degli studi condotti sullo scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata utilizza la metodica ecocardiografica quale strumento di definizione del rimodellamento ventricolare, facendo riferimento a parametri comuni come spessori parietali, massa miocardica, dimensioni cavitari, funzione sistolica e diastolica.

La valutazione ecocardiografica della funzione contrattile del ventricolo sinistro si è basata tradizionalmente sul calcolo della frazione d'eiezione e sulla valutazione visivo-qualitativa del movimento parietale e dell'ispessimento segmentario. Tali metodi mancano tuttavia di standardizzazione e sono molto sensibili alle condizioni di carico. La frazione d'eiezione, inoltre, si modifica significativamente solo negli stadi avanzati di cardiopatia (68). Pertanto nel tempo è cresciuto l'interesse per metodiche che permettessero una valutazione più oggettiva e riproducibile della funzione contrattile e consentissero di coglierne più precocemente eventuali modificazioni subcliniche.

L'imaging di deformazione miocardica ha risposto a questa esigenza. Esso deriva da metodiche, basate sul Doppler oppure sullo speckle-tracking, che valutano

l'accorciamento e l'allungamento miocardico in termini di strain e strain rate. Lo strain è il cambiamento della lunghezza di un segmento miocardico rispetto alla sua lunghezza a riposo ed è espresso come percentuale. Lo strain rate è la velocità della deformazione. I parametri misurabili sono lo strain longitudinale, radiale e circonferenziale, per la cui comprensione è necessario un richiamo di anatomia e fisiologia del miocardio.

La composizione della parete del ventricolo sinistro prevede tre distinti strati: quello subendocardico, formato da fibre orientate longitudinalmente dalla base all'apice; quello intermedio, formato da fibre ad orientamento circonferenziale; quello subepicardico, formato dalle fibre dello strato subendocardico che riemergono in corrispondenza della punta e risalgono con andamento longitudinale-obliquo verso la base. La disposizione delle fibre longitudinali dello strato subendocardico e subepicardico è tale per cui si genera una continua variazione dell'angolo di orientamento rispetto alle fibre circolari dello strato intermedio, cosicché le fibre subepicardiche formano una spirale antioraria, mentre quelle subendocardiche una spirale oraria (69).

Questa complessa architettura fa sì che in sistole il ventricolo si deformi in diverse direzioni che determinano un accorciamento longitudinale e circonferenziale, un ispessimento radiale e torsione del ventricolo.

La maggior parte della gittata sistolica sarebbe dovuta alla traslazione longitudinale del piano atrio-ventricolare, dal momento che in sistole l'apice è relativamente fisso mentre il piano dell'anello mitralico si abbassa verso la punta, con un meccanismo simile a quello di un pistone (69). Carlsson et al. (70) hanno documentato mediante risonanza magnetica che il 60% circa dello stroke volume viene generato da questo meccanismo, sia nei soggetti sani sia nei pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa. L'ispessimento parietale rappresenterebbe invece un meccanismo di "salvataggio" messo in atto dal miocardio in condizioni di alterata funzione di accorciamento poiché, spostando il bordo endocardico verso l'interno della cavità ventricolare, si riesce comunque a garantire una buona gittata sistolica.

Riassumendo, quindi, lo strain longitudinale è un accorciamento del ventricolo in direzione base-apice mentre lo strain circonferenziale è un accorciamento lungo il perimetro circolare del ventricolo sinistro; essi hanno un valore normale negativo, compreso tra -17 e -20% (71); lo strain radiale è invece un ispessimento della parete miocardica verso il centro della cavità ventricolare ed ha un valore positivo, compreso tra +20 e 40% (72).

Il global longitudinal strain (GLS) del ventricolo sinistro è misurato come media dello strain sistolico ottenuto da tutti i segmenti del ventricolo sinistro in proiezione apicale 4 camere, apicale 2 camere e apicale asse lungo (3 camere) (73).

La valutazione dello strain e dello strain rate miocardico ha permesso di individuare anomalie nella deformazione del ventricolo sinistro anche in caso di frazione d'eiezione conservata. Sebbene quest'ultima sia un importante predittore di morte

e mortalità cardiovascolare, è limitata come misura di contrattilità dalla dipendenza dal carico, e dal fatto che significative riduzioni si manifestano solo in caso di disfunzione sistolica avanzata (74). Il suo valore prognostico è pertanto limitato in caso di valori normali o lievemente ridotti.

Alterazioni dello strain longitudinale riflettono principalmente una compromissione delle fibre subendocardiche, alterazioni dello strain circonferenziale sono invece generalmente espressione di una disfunzione miocardica più estesa (75).

Anomalie apprezzabili mediante valutazione dello strain appaiono quindi particolarmente utili in fase di compromissione preclinica, prima cioè che siano evidenti franche alterazioni tipiche di uno scompenso cardiaco manifesto (76).

Diverse evidenze riportano una maggiore capacità di parametri quali strain e strain rate di predire la prognosi rispetto alla frazione d'eiezione (77; 78; 79).

Strain e strain rate possono essere utilizzati anche per lo studio della deformazione delle altre cavità cardiache, ovvero atri e ventricolo destro (80; 81).

L'ecocardiografia speckle tracking (STE) fornisce quindi immagini non dipendenti dal Doppler e non dipendenti dall'angolo di incidenza del fascio di ultrasuoni, per una valutazione oggettiva della deformazione miocardica (82), ma ha comunque bisogno di uno specifico frame-rate (50-70 frame/secondo) e di immagini ecocardiografiche di buona qualità, non sempre ottenibili in pazienti con scarsa finestra acustica (68).

#### - Risonanza magnetica cardiaca

La risonanza magnetica cardiaca (CMR) è riconosciuta come il gold standard per la valutazione della maggior parte dei parametri morfofunzionali del ventricolo sinistro.

Il cuore nell'HFpEF appare rimodellato verso una forma ipertrofica e non dilatata, come accade invece nell'HFrEF; la dilatazione atriale sinistra è molto frequente e la maggior parte dei pazienti con HFpEF ha evidenza di disfunzione diastolica (83).

Il principale valore aggiunto della CMR rispetto all'ecocardiografia è la possibilità di ottenere una caratterizzazione tissutale della parete miocardica, ovvero di distinguere miocardio sano, aree di fibrosi focale, fibrosi diffusa, edema, grasso, depositi di altro tipo.

Svolgendo la fibrosi del miocardio un ruolo importante nell'HFpEF, la risonanza magnetica cardiaca è emersa come potente strumento per la sua valutazione in modo non invasivo; i più recenti sviluppi riguardanti le sequenze T1-mapping, permettono di quantificare la fibrosi miocardica sia focale che diffusa attraverso il calcolo della frazione di volume extracellulare, ovvero la percentuale di tessuto miocardico corrispondente allo spazio extracellulare (84). Quest'ultima tecnica si avvale della somministrazione di agenti di contrasto a base di gadolinio che si accumulano temporaneamente in regioni di aumentato spazio extracellulare (a causa di cicatrice miocardica, necrosi, fibrosi, infiltrazione), seguendo il processo fisiopatologico sottostante e creando tipici modelli che guidano la diagnosi (85).

Lo studio mediante risonanza magnetica con metodiche di T1 mapping potrebbe fornire importanti informazioni aggiuntive sul rimodellamento ventricolare, in particolare sulla presenza di fibrosi diffusa, che del rimodellamento è espressione diretta e più strettamente correlata al quadro istopatologico; essa correla con cambiamenti strutturali fini, non rilevabili con metodiche di late gadolinium enhancement (LGE), che potrebbero tardare nel tradursi in alterazioni funzionali apprezzabili all'esame ecocardiografico (41; 86; 87).

Recenti dati hanno inoltre evidenziato una relazione tra fibrosi miocardica diffusa e grasso epicardio (88), inteso come organo metabolicamente attivo in grado di influenzare, mediante il rilascio di mediatori dell'infiammazione, la morfologia e la funzione cardiaca (89; 90).

La CMR ha dimostrato di avere capacità predittiva sulla prognosi in pazienti con HFpEF. La presenza di LGE, espressione di fibrosi focale, è predittiva di un alto rischio di eventi avversi (91; 92) così come anomali valori di T1mapping, espressione di fibrosi diffusa, correlano con alto tasso di eventi cardiovascolari (93), morte e/o riospedalizzazione (94).

#### Valutazione dello strain mediante CMR

Anche la risonanza magnetica cardiaca mediante metodiche di future-tracking permette la valutazione dello strain e dello strain rate quali parametri di deformazione miocardica, applicabili ad entrambe le cavità atriali e ventricolari.

I principi sono gli stessi della metodica ecocardiografica, con il vantaggio di poter analizzare bene anche pazienti con finestra acustica sub-ottimale e prevalentemente in post-processing (68).

#### Terapia

Pur avendo caratteristiche eziologiche, demografiche, strumentali e prognostiche differenti rispetto a quelle dello scompenso cardiaco a frazione d'eiezione ridotta, l'HFpEF viene ad oggi trattato con strategie terapeutiche di dimostrata efficacia solo in pazienti con disfunzione sistolica.

- Terapia convenzionale

- ACE-inibitori e sartani

Contrariamente a quanto dimostrato per l'HFReEF, ACE-inibitori e sartani non si associano ad un miglioramento dell'outcome clinico in pazienti con HFpEF.

Nello studio CHARM-PRESERVED il Candesartan ha ridotto le ospedalizzazioni per HFpEF ma non la mortalità cardiovascolare (95).

Il Perindopril ha mostrato di migliorare i sintomi e la capacità di esercizio ma non morbilità e mortalità in 850 pazienti con età media di 76 anni (PEP-CHF) (96).

Nell' I-PRESERVE, l'Irbesartan non ha ridotto l'ospedalizzazione per cause cardiovascolari né la mortalità per tutte le cause in pazienti con scompenso cardiaco e FE di almeno il 45% (97).

- Antagonisti dei recettori dei mineralcorticoidi

L'aldosterone induce fibrosi miocardica contribuendo a rigidità parietale e aumento delle pressioni di riempimento che si osservano nello scompenso cardiaco (98).

Gli antagonisti dei recettori dei mineralcorticoidi (MRAs) contrastano questi effetti deleteri dell'aldosterone.

L' ALDO-DHF trial ha dimostrato che lo spironolattone migliora la funzione diastolica riducendo il rapporto E/e', l'ipertrofia ventricolare e i livelli di NT-proBNP, ma non i sintomi, la tolleranza allo sforzo e la qualità di vita (99).

Anche nel TOPCAT trial lo spironolattone non ha mostrato significativo beneficio in 3445 pazienti con HFpEF (LVEF  $\geq$  45%) (100), anche se questo risultato in parte può essere stato influenzato da significative differenze nella compliance al trattamento tra i pazienti arruolati. Il sottogruppo di pazienti arruolati in America infatti ha mostrato una significativa riduzione di mortalità cardiovascolare e ospedalizzazioni per scompenso cardiaco. Pertanto le linee guida americane ACC/AHA/HFSA suggeriscono gli MRAs per pazienti con HFpEF.

Due studi attualmente in corso, uno prospettico (SPIRIT-HF trial), l'altro randomizzato (SPIRIT-HF), stanno rivalutando l'uso dello spironolattone nei pazienti con HFpEF.

- Betabloccanti

Una subanalisi dello studio CHART-2 ha dimostrato che l'elevata frequenza cardiaca era associata a più alta mortalità cardiovascolare nei pazienti con HFpEF (101).

Nello studio ELANDD 6 mesi di trattamento con nebivololo hanno portato a riduzione della frequenza cardiaca senza tuttavia effetti su capacità d'esercizio in termini di 6-minutes walking test e consumo d'ossigeno in 116 pazienti con HFpEF (102).

Il registro OPTIMIZE-HF non ha mostrato un effetto prognostico rilevante dei betabloccanti nei pazienti con HFpEF (103).

Sarebbero tuttavia necessari ulteriori studi per verificare gli effetti di specifici selezionati betabloccanti nello HFpEF.

- Sacubitril/valsartan

Il PARAGON-HF ha valutato gli effetti del sacubitril/valsartan in 4822 pazienti con HF e LVEF  $\geq$  45% (104); esso non ha raggiunto l'endpoint primario di riduzione delle ospedalizzazioni per HF e mortalità cardiovascolare. Tuttavia l'analisi per sottogruppi

ha mostrato effetti positivi di sacubitril/valsartan nelle donne e in pazienti con LVEF inferiore alla media dei pazienti arruolati (45–57%).

- Ivabradina

Nello studio EDIFY l'ivabradina ha ridotto la frequenza cardiaca del 30% senza tuttavia portare ad un miglioramento del rapporto E/e, della tolleranza allo sforzo e dei livelli di NT-proBNP nei pazienti con HFpEF (105).

- Digitalici

Nel DIG trial i glicosidi digitalici hanno ridotto il rischio di ospedalizzazione globale e ospedalizzazione per riacutizzazione di scompenso nei pazienti con HFrEF e HFpEF (LVEF > 45%) (97).

Non vi sono state però differenze significative tra digossina e placebo su mortalità globale e mortalità cardiovascolare (95).

Pertanto i glicosidi digitalici possono essere considerati per il controllo della frequenza nelle tachiaritmie nei pazienti con HFpEF.

Recenti studi hanno evidenziato sia la natura sistemica dello HFpEF sia la presenza di sub-fenotipi nell'ambito di questa complessa sindrome, sottolineando la necessità di terapie ottimizzate in base al fenotipo predominante (5).

- Nuove opzioni terapeutiche

- Strategie antifibrotiche

Una delle principali caratteristiche istologiche dello HFpEF è la fibrosi, che può coinvolgere altri organi oltre al cuore.

Farmaci utilizzati per la fibrosi polmonare idiopatica, come il pirfenidone, sono stati proposti per l'HFpEF (106).

- Modulazione metabolica

Una riduzione del burden metabolico nel paziente con HFpEF, quale quella derivante dalla chirurgia bariatrica, si è dimostrata efficace nel migliorare la capacità funzionale del paziente (107).

Calo ponderale e restrizione calorica possono determinare un beneficio indiretto riducendo lo stato infiammatorio sistemico che si ha nella cosiddetta metainfiammazione (108).

Sia l'attività fisica che la dieta ipocalorica sono importanti al fine di ridurre l'obesità ed hanno mostrato di avere un impatto sulla prognosi. In una post hoc analisi del TOPCAT trial, rischio di ospedalizzazione per scompenso e mortalità erano più bassi in pazienti con HFpEF fisicamente attivi rispetto a pazienti mediamente attivi o sedentari (109).

Nello studio Ex-DHF, l'attività fisica supervisionata ha migliorato la capacità d'esercizio e la qualità di vita ed ha portato ad un rimodellamento inverso dell'atrio sinistro e alla riduzione della disfunzione diastolica nei pazienti con HFpEF (110).

- Antagonisti del cotrasportatore sodio-glucosio (SGLT2)

Questa nuova classe di farmaci antidiabetici ha dimostrato di avere effetti ulteriori rispetto al controllo glicemico, in particolare in termini di prevenzione dello scompenso cardiaco nei soggetti diabetici. Essi riducono il riassorbimento renale di glucosio e ne aumentano l'escrezione urinaria, aumentando quindi la diuresi (111).

L'EMPEROR-Preserved trial ha testato l'efficacia e la sicurezza di empagliflozin in pazienti con HFpEF, dimostrandone la capacità di ridurre significativamente l'ospedalizzazione per scompenso e la mortalità cardiovascolare, indipendentemente dalla presenza di diabete mellito (112).

- Aumento della disponibilità di ossido nitrico e terapie antinfiammatorie

L'aumento della disponibilità di ossido nitrico è stata testata in molti trials sullo HFpEF. Essendo noto che la ridotta disponibilità di NO contribuisce alla rigidità parietale, si è tentato di individuare dei meccanismi che potessero aumentare il segnale NO-Guanosin-monofosfato ciclico (cGMP), ad esempio mediante inibitori della fosfodiesterasi-5 (PDE5), donatori di NO, stimolatori della guanilato ciclasi (sGC, vericiguat e riociguat) (113; 114).

Tali tentativi sono tuttavia stati infruttuosi (115), in parte probabilmente a causa di un peggioramento della funzione renale (116).

La somministrazione di nitrato organico e l'inalazione di nitrito inorganico non ha mostrato beneficio in termini di attività fisica e capacità d'esercizio nei pazienti con HFpEF (117; 118).

I precedenti metodi per aumentare il segnale cGMP/PKG (proteina chinasi cGMP-dipendente) coinvolgono la via dell'NO/guanilato ciclasi solubile, portando ad un aumento del cGMP intracellulare senza effetti sui livelli circolanti di cGMP, e questo potrebbe spiegare la loro inefficacia nello HFpEF. Un ulteriore metodo per aumentare il segnale cGMP/PKG è bloccare la peptidasi neprilisina, che riduce il clivaggio del peptide natriuretico, aumentando i livelli circolanti e urinari di cGMP.

La combinazione di un inibitore della neprilisina, il sacubitril, e di un bloccante del recettore per l'angiotensina, il valsartan, si è dimostrata efficace nel migliorare l'outcome in pazienti con HFrEF ma non nei pazienti con HFpEF (104); il sacubitril-valsartan si è dimostrato comunque potenzialmente efficace nelle donne e nei pazienti con FE al di sotto della media (<57%).

Gli inibitori della fosfodiesterasi-9 (PDE9) potrebbero rappresentare un metodo alternativo per inibire il clivaggio del cGMP. Essi permetterebbero di aggirare la compromissione del segnale della via dell'ossido nitrico derivante dallo stress ossidativo e dall'infiammazione (119). Queste molecole – inizialmente sviluppate per

le patologie neurocognitive – hanno fornito risultati interessanti per il potenziale sviluppo di future terapie nello scompenso cardiaco (120).

- Farmaci che bersagliano l'inflammasoma

IL-6 è una molecola di particolare interesse per lo sviluppo di nuovi farmaci per l'HFpEF. Agenti che hanno come target l'IL-6 sono stati utilizzati con successo in numerose patologie autoimmuni (tocilizumab, sarilumab, siltuxumab) (121).

Il canakinumab, un anticorpo monoclonale neutralizzante l'IL-6, in pazienti con precedente infarto miocardico ha portato ad una significativa riduzione delle ospedalizzazioni per scompenso e della mortalità cardiovascolare (122; 123).

Il metotrexato è un farmaco utilizzato principalmente per il trattamento dell'artrite reumatoide. In un trial condotto su pazienti con FE <45% esso ha portato ad una significativa riduzione di TNF e IL-6, e ad un aumento di citochine antinfiammatorie (IL-10 e antagonista solubile del recettore IL-1), con un conseguente miglioramento della classe funzionale del paziente scompensato, della distanza al 6-minute walking test e della qualità di vita. Non ha comunque prodotto effetti positivi sul rimodellamento ventricolare (124).

Il metotrexato potrebbe pertanto essere d'ausilio nel trattamento dello HFpEF, soprattutto nei pazienti con elevato burden infiammatorio (125).

In un modello sperimentale di cardiomiopatia diabetica indotta dalla streptozotocina nel ratto sono stati utilizzati un anticorpo monoclonale contro il tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) ed un inibitore dell'enzima di conversione dell'IL-6, con effetti protettivi sul miocardio in termini di riduzione dell'infiammazione e della fibrosi (126; 127).

- Ranolazina

I disturbi del metabolismo del calcio intracellulare concorrono all'alterazione del rilascio miocardico nello HFpEF. La corrente tardiva di ingresso del sodio nelle cellule cardiache è aumentata nello scompenso cardiaco, portando ad un sovraccarico intracellulare di calcio. La ranolazina inibisce la corrente tardiva del sodio; essa nello studio Ranolazine for the Treatment of Diastolic Heart Failure (RALI-DHF) ha ridotto la pressione telediastolica ventricolare sinistra senza interferire con la capacità d'esercizio (128).

- Levosimendan

Il levosimendan è un farmaco calcio-sensibilizzante e un inibitore della fosfodiesterasi-3 con proprietà vasodilatatorie. Come riportato nelle linee guida europee il Levosimendan può essere utilizzato in pazienti con scompenso cardiaco acuto e severa riduzione della gittata cardiaca (129).

Esso in pazienti con scompenso cardiaco avanzato ha migliorato inoltre la funzione diastolica e la funzione sistolica del ventricolo destro. Ha inoltre un ruolo nella

regolazione dello stato infiammatorio attraverso un'alterazione del rapporto IL-6/IL-10 (130).

L'HELP trial (Hemodynamic Evaluation of Levosimendan in Patients With pulmonary Hypertension and HFpEF) ha dimostrato che l'infusione settimanale per 6 settimane di levosimendan non modifica significativamente la pressione capillare polmonare ma aumenta la capacità d'esercizio valutata con 6 minutes walking test (131).

## **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

Valutare nei pazienti con quadro di scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata i seguenti end-point:

- correlazione esistente tra specifici biomarcatori ematici e parametri ecocardiografici e di risonanza magnetica, al fine di individuare la diversa espressione strutturale e funzionale dello scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata;
- capacità di specifici fattori clinici, biomorali e strutturali di predire gli eventi ad un anno, in particolare mortalità per tutte le cause e ri-ospedalizzazione per scompenso, così da identificare precocemente i pazienti a maggior rischio.

## **MATERIALI E METODI**

Previa approvazione del progetto di ricerca da parte dell'Internal Board Review dell'Università degli Studi dell'Aquila ed il parere favorevole del Comitato Etico delle Strutture coinvolte, è stato condotto uno studio osservazionale prospettico, multicentrico, con arruolamento dei pazienti presso la Clinica Di Lorenzo di Avezzano (AQ) e l' Unità operativa di Cardiologia dell'Ospedale Sandro Pertini di Roma.

Sono stati arruolati pazienti affetti da HFpEF che rispondessero alle seguenti caratteristiche:

### Criteri di inclusione:

Segni e sintomi di scompenso cardiaco attuali o pregressi

Frazione d'eiezione preservata (>50%) e mild reduced (40-49%)

Classe funzionale NYHA I-IV

### Criteri di esclusione:

Coronaropatia nota, infarto miocardico o bypass aorto-coronarico pregresso, test ergometrico positivo

Valvulopatia moderato-severa

Età < 18 anni

Fibrillazione atriale permanente con scarso controllo della frequenza

Patologie infiltrative del miocardio

Cardiopatia congenita complessa (con effetti emodinamici persistenti e/o correzione chirurgica maggiore)

Insufficienza renale terminale (GFR <15 ml/min)

Epatopatia cronica

Anemia severa

Malattia polmonare cronica (capacità vitale <80% o forced expiratory volume al primo second FEV1<80%)

Malattie infiammatorie acute concomitanti

Malattie infiammatorie croniche, connettivopatie, neoplasie concomitanti

Terapia immunosoppressiva

Recente trauma o chirurgia (< 6 mesi)

Comorbidità con aspettativa di vita < 1 anno

Stato di gravidanza

### Valutazione dei biomarcatori

Previo consenso informato, i Pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematico per il dosaggio di emocromo, parametri renali, frammento N-terminale della proforma

del BNP (NT-proBNP), fattore solubile ST2, galectina 3 (Gal-3), interleuchina 6 (IL-6), growth differentiation factor 15 (GDF-15), ossido di trimetilamina (TMAO).

I biomarcatori sono stati determinati su campioni di siero conservati a -80°C e successivamente analizzati presso il Laboratorio di Immunopatologia dell'Università degli studi dell'Aquila, con metodo ELISA (enzyme-linked immunoassorbent assay).

I livelli di NT-proBNP sono stati misurati con Human NT-proBNP ELISA KIT, catalog nr: e-el-h0902 (ELABSCIENCE), sensibilità 0.38 ng/ml, limite di rilevabilità di 0.63 ng/ml - 40 ng/ml. Ripetibilità: coefficiente di variazione <10%.

La concentrazione di sST2 è stata determinata utilizzando un test ELISA ad alta sensibilità (Human sST2 ELISA KIT, catalog nr: E-EL-H165 (ELABSCIENCE) con un limite di rilevabilità di 31.25 pg/ml - 2000 pg/ml e una sensibilità di 18.75 pg/ml. Ripetibilità: coefficiente di variazione <10%.

La Galectina-3 è stata misurata con Human Galectin-3 / LGAS3, ELISA KIT. Catalog nr: EK0764 (BOSTER) con un limite di rilevabilità di 156 pg/ml - 10000 pg/ml e una sensibilità <10 pg/ml.

Il GDF-15 è stato misurato con Human GDF-15 ELISA KIT catalog nr: EK0767 con limite di rilevabilità di 31.2 pg/ml - 2000 pg/ml e sensibilità <10 pg/ml.

IL-6 è stata misurata con Human IL6 ELISA KIT catalog nr: EK0410 con limite di rilevabilità di 4.69 pg/ml - 300 pg/ml e sensibilità <0.3 pg/ml.

Il TMAO è stato dosato con IK5181 Human Trimethylamine-N-Oxide ELISA Kit.

### Valutazione ecocardiografica

L'indagine ecocardiografica è stata rivolta alla valutazione degli indici di funzione sistolica e diastolica biventricolare mediante valutazione strutturale bidimensionale, color-Doppler, analisi del profilo di flusso trans-mitralico e trans-tricuspidale, Doppler tissutale dell'anulus mitralico.

L'esame è stato eseguito con apparecchio Esaote MyLab 50.

I valori normali per spessori parietali, dimensioni cavitari, funzione sisto-diastolica, flussimetrie e pressioni sono quelli riportati dalle Società Scientifiche di riferimento (132).

### Valutazione mediante risonanza magnetica

I pazienti che hanno accordato il proprio consenso sono stati sottoposti a risonanza magnetica cardiaca con scanner da 1.5 Tesla (GE Sigma Horizon HD).

- Protocollo di studio di CMR

Per la valutazione di volumi, funzione, massa miocardica del ventricolo sinistro sono state utilizzate immagini cine steady-state free precession (echo time/reception time 1.5/3.0 ms, flip angle 60°), acquisite in asse corto (spessore di strato 8 mm; intervallo tra strati 0 mm) e asse lungo radiale (10 scansioni a coprire l'intera

circonferenza del ventricolo). Lo studio del late gadolinium enhancement è stato escluso dalla corrente analisi.

- **Analisi post-processing**

L'analisi post-processing è stata effettuata con software dedicato (Circle, cvi, Calgary, Canada; version 5.11.4). I contorni endocardici sono stati definiti manualmente in fase diastolica e sistolica per valutare i volumi del ventricolo sinistro e la funzione sistolica. I contorni epicardici sono stati definiti in fase diastolica per valutare la massa miocardica.

L'analisi tissue-tracking è stata effettuata dopo definizione della fase diastolica e correzione per ogni potenziale bias. Il tratto d'efflusso del ventricolo sinistro ed il piano valvolare mitralico sono stati esclusi dall'analisi. Sono stati utilizzati i valori 2D invece dei 3D per il potenziale mismatch tra asse corto e asse lungo.

Il Global longitudinal strain è stato registrato.

Sono stati considerati come valori di riferimento normali per il ventricolo sinistro una massa miocardica <95 g/m<sup>2</sup> per le donne e <115 g/m<sup>2</sup> per gli uomini; una FE > 52% negli uomini e >54% nelle donne (132); un volume atriale sinistro indicizzato <34 ml/m<sup>2</sup> e un GLS >-16% (19)

Tutte le analisi sono state condotte da un singolo osservatore con alto expertise in campo di risonanza magnetica cardiaca.

### Follow-up

I pazienti sono stati seguiti con follow-up telefonico. Il follow-up ha inevitabilmente risentito delle limitazioni legate alla pandemia da Covid-19 che non ha permesso di rivalutare clinicamente e con esami strumentali molti dei pazienti, in considerazione della sospensione dell'attività ambulatoriale che per mesi è andata di pari passo con il lock-down nazionale.

In pazienti con molteplici eventi, il tempo rispetto al primo di essi è stato utilizzato per la valutazione dell'outcome.

### **Analisi statistica**

Sono state condotte analisi descrittive per illustrare le caratteristiche demografiche e cliniche del campione in studio. Le variabili categoriche sono espresse in percentuale e le differenze sono state testate con il test del  $\chi^2$  o di Fisher. Le variabili continue sono espresse come media ( $\pm$  deviazione standard) o mediana (range interquartile) in base alla normalità della distribuzione valutata con il test di Shapiro-Wilk. Per le variabili continue le differenze tra gruppi con diversa espressione di HFpEF ottenuti con imaging ecocardiografico e di risonanza magnetica sono state testate con Mann-Whitney U-test per dati non parametrici e con test t-Student per dati parametrici. Per confronti tra più di due gruppi è stato utilizzato il test Kruskal

Wallis o ANOVA, seguito dall'analisi post-hoc attraverso l'utilizzo del metodo di Mann-Whitney o Sheffè.

Un'analisi della correlazione è stata effettuata per esaminare il grado di relazione lineare tra i valori dei biomarcatori cardiaci e i parametri ecocardiografici e di risonanza magnetica.

La regressione logistica multivariata, con la stima dell'Odds Ratio ed i relativi intervalli di confidenza al 95%, è stata eseguita per individuare i fattori predittivi indipendenti della diversa espressione dello scompenso, ponendo come variabile dipendente la presenza/assenza delle differenti espressioni di HFpEF e come variabili esplicative i livelli circolanti dei biomarcatori cardiaci investigati.

Tramite Kaplan-Meier è stata analizzata la sopravvivenza libera da eventi (morte, riospedalizzazione) tra gruppi con diversa espressione di HFpEF, con un follow-up di un anno. La significatività statistica del confronto tra le due curve è stata valutata con il log-rank test. Verranno utilizzati test bidirezionali con un livello di significatività del 5%. I dati sono stati elaborati usando il programma STATA 15/IC.

## RISULTATI

Dal gennaio 2018 al febbraio 2021 sono stati arruolati 56 pazienti.

Dei 56 pazienti 38 (68%) erano femmine.

L'età media della popolazione era  $67 \pm 11$  anni.

51 pazienti (91%) presentavano ipertensione arteriosa, 32 pazienti (57%) dislipidemia, 15 (26%) diabete mellito, 9 (16%) abitudine tabagica.

Il BMI medio della popolazione era  $28 \pm 6$ ;  $1.8 \pm 0.2$  il BSA medio.

La classe NYHA al momento dell'arruolamento era I-II in 15 (26.8 %) pazienti, II in 21 pazienti (37.5%), II-III in 18 (32.1%), IV in 2 (3.6%) pazienti.

17 pazienti (30%) presentavano anamnesi positiva per fibrillazione atriale.

Il filtrato glomerulare medio della popolazione era  $68.5 \pm 23.9$  ml/min, l'emoglobina media  $13.2 \pm 1.7$  g/dl, la pressione arteriosa sistolica media era  $132 \pm 14.7$  mmHg, la diastolica  $79 \pm 8.4$  mmHg

39 pazienti (68.4%) erano in ritmo sinusale; 18 (31.5%) in fibrillazione atriale.

La frequenza cardiaca media era  $71 \pm 12$  bpm.

7 pazienti (12.2%) presentavano blocco atrio-ventricolare di I grado, 51 un ritardo di conduzione intraventricolare ( $PR \geq 80$  msec), di cui 5 con blocco di branca sinistra, 2 blocco di branca destra, 7 emiblocco anteriore sinistro.

38 pazienti erano in terapia betabloccante, 16 in terapia con ACE-inibitori, 26 con sartani, 34 con diuretici, 10 con antiaritmici.

Le caratteristiche della popolazione sono riportate in tabella 1.

Tabella 1.

Caratteristiche della popolazione	Uomini	Donne	Totale
Numero	18 (32%)	38 (68%)	56
Età	67±11.6	67.97±11	67±11
BMI kg/m <sup>2</sup>	26.9±6	29.1±6	28±6
BSA m <sup>2</sup>	1.8±0.3	1.7±0.3	1.8±0.2
IPERTENSIONE	15 (83.3%)	36 (94.7%)	51 (91%)
DISLIPIDEMIA	10 (55.5%)	22 (57.8%)	32 (57%)
DIABETE MELLITO	3 (16.6%)	12 (31.5%)	15 (26%)
FUMO	6 (33.3%)	3 (7.8%)	9 (16%)
STORIA DI FA	8 (44.4%)	9 (23.6%)	17 (30%)
PA SIST mmHg	131±14.5	132±14.8	132 ± 14.7
PA DIAST mmHg	80.5±8.2	78±8.5	79 ±8.4
HB media g/dl	14.8±1.7	12.5±1.8	13.2±1.7
GFR medio ml/min	76±22.8	64.2±23.9	68.5±23.9
FC bpm	67±12.9	73.5±12.8	71±12
BETABLOCCANTE	9 (50%)	28 (73.6%)	37 (66%)
ACE-I	4 (22.2%)	8 (21%)	12 (21%)
SARTANO	5 (27.7%)	20 (52.6%)	25 (45%)
IVABRADINA	1 (5.5%)	0	1.8%
DIURETICI	10 (55.5%)	24 (63.1%)	34 (60%)
ANTIARITMICO	5 (27.7%)	5 (13.1%)	10 (18%)

BMI: body mass Index; BSA: Body Surface Area; FA: fibrillazione atriale; PA sist: pressione arteriosa sistolica; PA diast: pressione arteriosa diastolica; HB: emoglobina; GFR: glomerular filtration rate; FC: frequenza cardiaca; ACE-i: angiotensin converting enzyme inhibitor.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione ecocardiografica transtoracica.

I principali dati morfofunzionali sono riportati nella tabella 2.

La popolazione in studio presentava un ventricolo sinistro con prevalente rimodellamento concentrico, dimensioni endoventricolari e funzione contrattile conservata, valori medi di frazione d'eiezione vicini al limite superiore di normalità. Le sezioni destre erano in media lievemente dilatate, in assenza di importante disfunzione contrattile e di significativa ipertensione polmonare.

Tabella 2.

Parametri ecocardiografici	
DTD Vsx mm	47.5±7
SIV mm	10.5±2
PP mm	9.8±2
FE %	55.7±7
VOLUME ATRIO Sx ml	56±20
RVD2 mm	43±12
TAPSE mm	22±5
PAPS mmHg	31±9

DTD Vsx: diametro telediastolico ventricolo sinistro; SIV: setto interventricolare; PP: parete posteriore; FE: frazione d'eiezione; RVD2: diametro ventricolare destro medio; TAPSE: escursione sistolica del piano dell'anello tricuspideale; PAPS: pressione arteriosa polmonare sistolica

20 Pazienti sono stati sottoposti a risonanza magnetica cardiaca.

I parametri morfofunzionali di interesse ai fini del presente studio sono riportati in tabella 3.

La popolazione in studio presentava buona funzione sistolica biventricolare, atrio sinistro in media lievemente dilatato (37 ml/m<sup>2</sup>), global longitudinal strain del ventricolo sinistro più basso dei valori riportati nella popolazione sana (-14% vs -16%).

Tabella 3.

Parametri RM CARDIACA	
MASSA MIOCARDICA g/m <sup>2</sup>	65.7±24.5
FE VSx %	61.9±9.7
GLS %	-14.6±2.9
FE VDx %	63±7.7
VOL Atrio sx ml	67.5±16.8

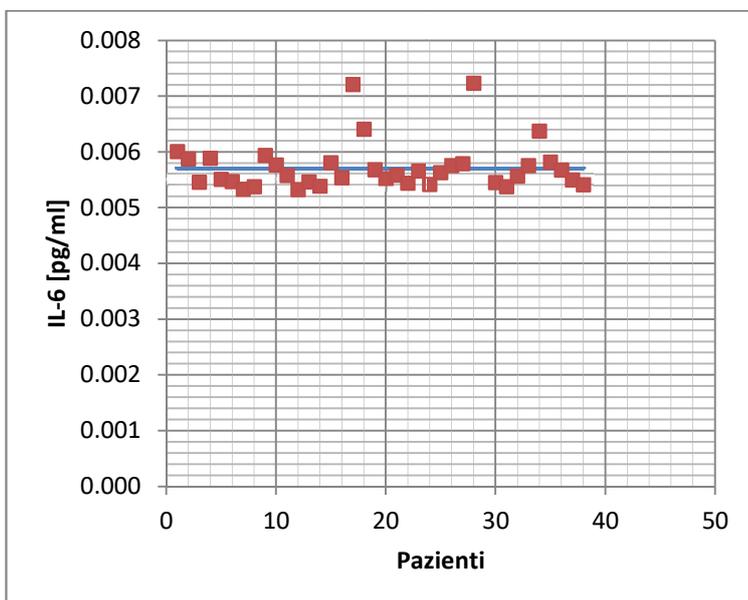
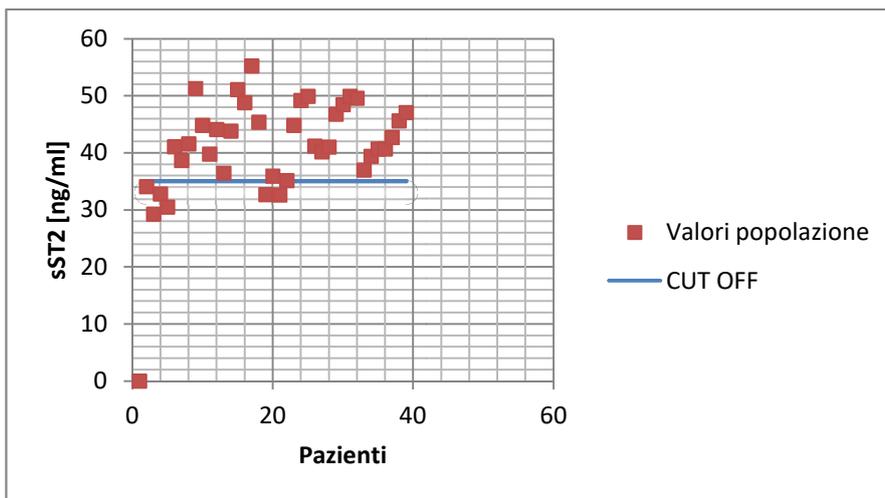
FE VSx: frazione d'eiezione ventricolo sinistro; GLS: global longitudinal strain; FE VDx: frazione d'eiezione del ventricolo destro

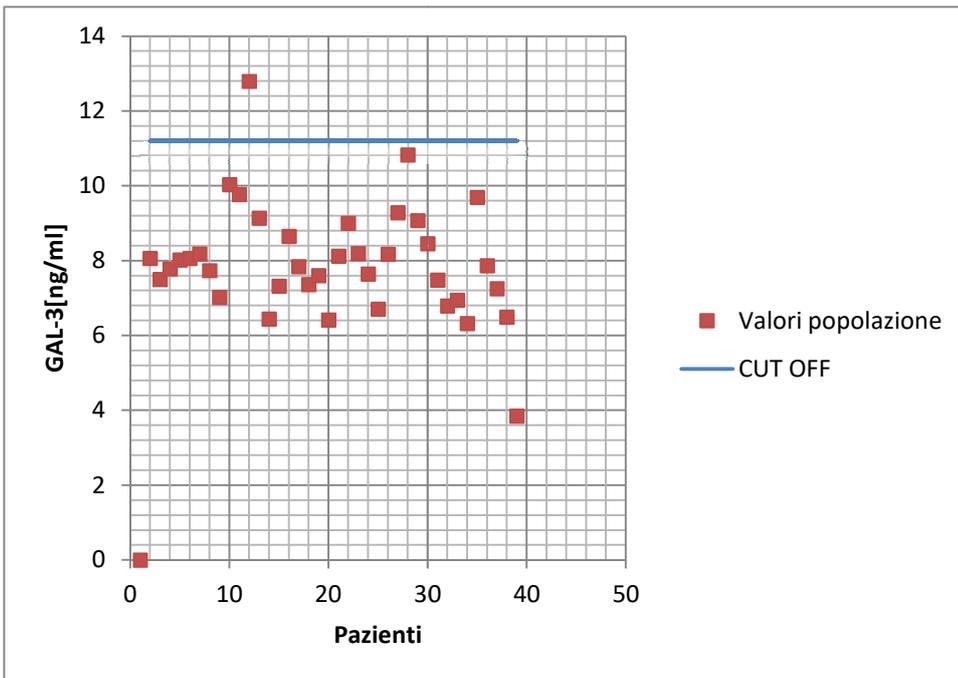
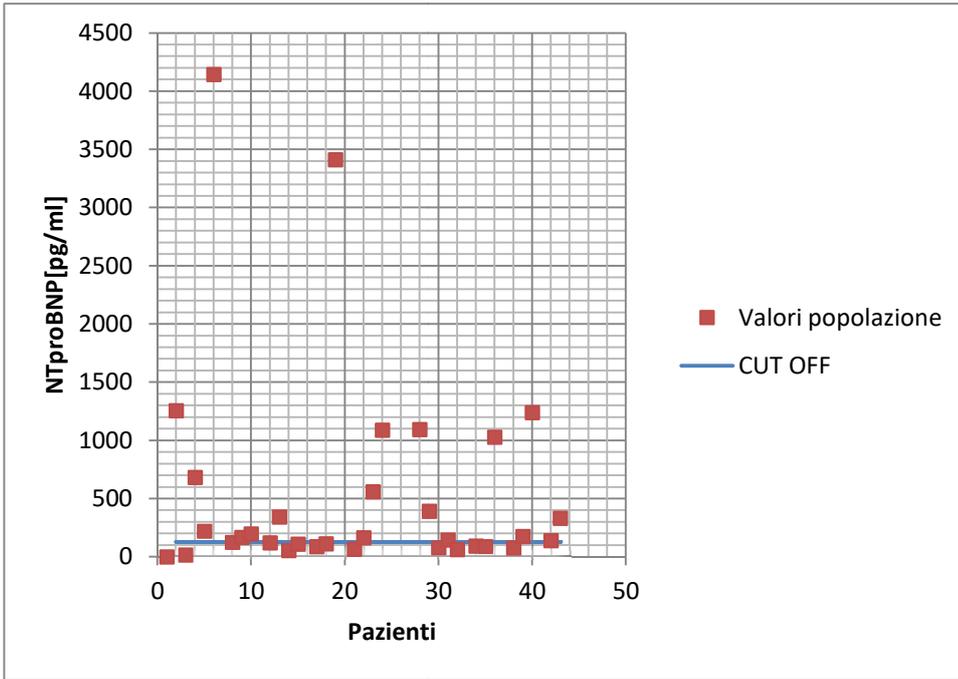
Il prelievo ematico per il dosaggio dei biomarcatori è stato effettuato in 38 Pazienti. Nella tabella 4 sono riportati i valori medi di ciascuno di essi.

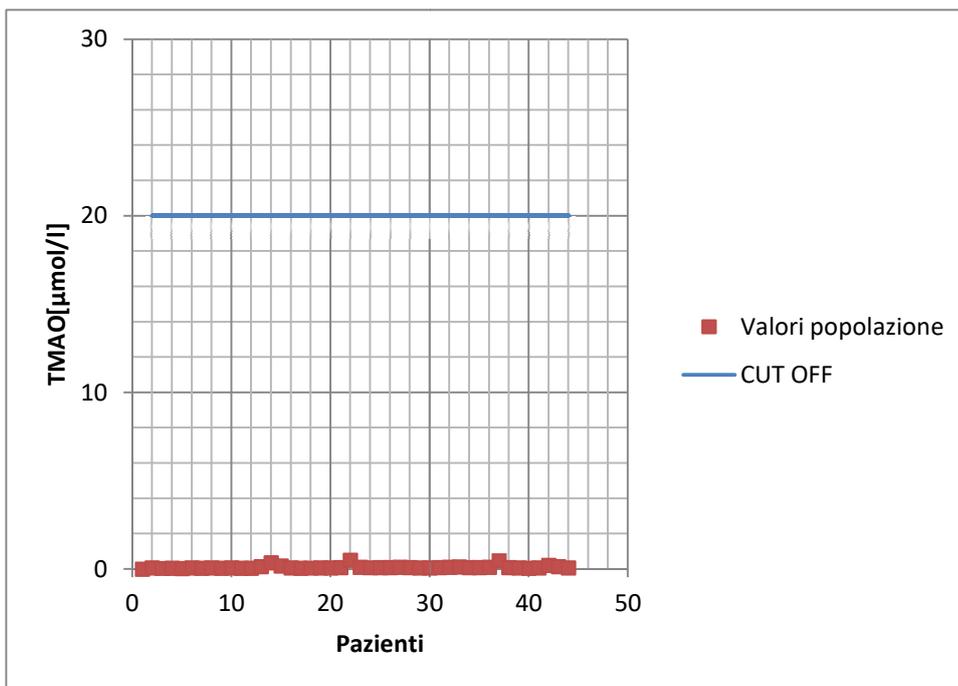
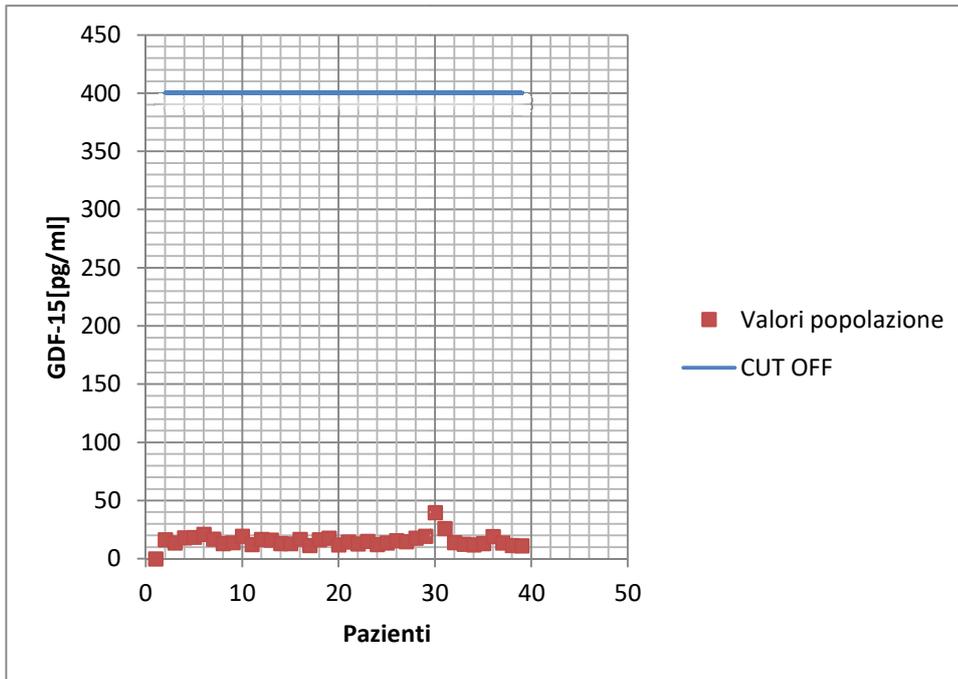
Tabella 4.

Biomarcatori ematici	
<b>Stress meccanico</b>	
NT-PROBNP pg/ml	559,06±930,68
<b>Fibrosi interstiziale/rimodellamento tissutale</b>	
ST2 Ng/ml	42±6,47
GALECTIN 3 ng/ml	7,9±1,48
GDF-15 pg/ml	16,01±5,04
<b>Infiammazione/stress ossidativo</b>	
IL-6 pg/ml	5,72±0,44
TMAO ng/ml	8,13±7,52

Vengono di seguito riportati i grafici di distribuzione delle determinazioni dei singoli biomarcatori ematici nella popolazione in studio rispetto ai cut-off esistenti in letteratura.







L'analisi statistica tra le concentrazioni dei diversi biomarcatori ematici e le caratteristiche cliniche e strumentali dei pazienti arruolati ha evidenziato che in questa popolazione non vi erano differenze significative nelle concentrazioni dei biomarcatori in pazienti con diverse caratteristiche antropometriche (sesso/BMI/BSA), né con diversa espressione dei comuni fattori di rischio cardiovascolare.

Non vi era altresì correlazione significativa tra concentrazione dei biomarcatori e grado di disfunzione diastolica all'ecocardiogramma e global longitudinal strain alla risonanza magnetica cardiaca.

Solo per l'NT-proBNP è emersa una relazione statisticamente significativa rispetto alla classe funzionale del paziente al follow-up ( $p= 0.014$ ) e agli eventi al follow-up ( $p=0.05$ ), come riportato nelle tabelle 5 e 6.

È stata inoltre osservata una differenza statisticamente significativa nelle concentrazioni di sST2 in pazienti distinti in base alla presenza o meno di dilatazione del ventricolo destro, espressa come  $RVD2>35$  mm (tabella 7).

Un ulteriore dato significativo emerso è relativo agli eventi al follow-up, intesi come occorrenza di fibrillazione atriale, nuovo episodio di scompenso cardiaco o exitus, in pazienti con diverso grado di disfunzione diastolica, suddivisa in lieve (grado I) e avanzata (II grado o superiore) ( $p=0.04$ ).

Tabella 5.

Biomarcatori ematici	Media±DS		
	NYHA I-II al FU	NYHA III-IV al FU	
ST2 Ng/ml	42±6.4	38.6±7.3	$p= 0.39$
NT-PROBNP pg/ml	438.3±952.4	1919.4±1151	$p= 0.014$
GALECTIN 3 ng/ml	7.9±1.5	7.7±1.3	$p= 0.89$
GDF-15 pg/ml	16.3±5.1	15.5±2.6	$p= 0.8$
IL-6 pg/ml	5.7±0.4	6.02±0.4	$p= 0.29$
TMAO ng/ml	7.8±7.9	5.4±8.1	$p= 0.55$

Tabella 6.

Biomarcatori ematici	Pazienti con eventi al FU	Pazienti senza eventi al FU	
ST2 Ng/ml	40.5	42.3	$p= 0.39$
NT-PROBNP pg/ml	1274	426	$p= 0.05$
GALECTIN 3 ng/ml	7.6	8	$p= 0.59$
GDF-15 pg/ml	15.3	16.1	$p= 0.7$
IL-6 pg/ml	5.7	5.7	$p= 0.7$
TMAO ng/ml	8	7.5	$p= 0.8$

Tabella 7.

Biomarcatori ematici	Media±DS		
	Pazienti con dilatazione VDx	Pazienti senza dilatazione VDx	
ST2 Ng/ml	43,04±6,5	37,02±6,1	$p= 0.03$
NT-PROBNP pg/ml	500,5±930,6	1059±1004	$p= 0.09$
GALECTIN 3 ng/ml	8±1,5	7,9±1,36	$p= 0.6$
GDF-15 pg/ml	16,15±5	15,3±5,2	$p= 0.6$
IL-6 pg/ml	5,74±0,44	5,68±0,45	$p= 0.3$
TMAO ng/ml	8,5±7,6	5,14±7,65	$p= 0.2$

## DISCUSSIONE

- Caratteristiche della popolazione

La popolazione arruolata era composta prevalentemente da donne a medio profilo di rischio cardiovascolare, prevalendo tra i fattori di rischio l'ipertensione arteriosa e l'obesità.

L'ipertensione arteriosa risultava ben controllata dalla terapia in atto. Buoni in media anche i valori di emoglobina e di filtrato glomerulare.

Con la terapia in atto i pazienti presentavano una frequenza cardiaca nei limiti di norma. Un terzo circa dei pazienti aveva storia di fibrillazione atriale.

- Imaging e biomarcatori ematici

Per sST2, GAL-3, IL-6 e NTpro-BNP sono stati ottenuti valori vicini a quelli riportati in letteratura per popolazioni dalle caratteristiche sovrapponibili a quella in studio.

Il dosaggio di GDF-15 e TMAO ha invece prodotto risultati nettamente differenti rispetto a quelli riportati in letteratura, seppure per questi due biomarcatori esista una grande variabilità nell'intervallo di riferimento considerato normale (399-695 pg/ml per GDF-15 (48; 49); 3.5-20 microMol/l per TMAO (66).

Dei biomarcatori analizzati, l'NT-proBNP e l'sST2 hanno raggiunto l'end point primario, correlando rispettivamente con la prognosi (bassa classe funzionale e alta probabilità di eventi al follow-up) e con la possibilità di definire uno dei molteplici fenotipi con cui lo scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata può esprimersi (133), ovvero la prevalente dilatazione ventricolare destra. Quest'ultima, nella popolazione oggetto di studio, è verosimilmente espressione di una iniziale disfunzione del ventricolo destro, non essendo ancora associata ad una riduzione della contrattilità del ventricolo destro, sebbene quest'ultima sia stata valutata con il solo TAPSE, e ad ipertensione polmonare. La conferma di questa ipotesi potrebbe giungere da una valutazione più approfondita della funzione ventricolare destra mediante metodiche ecocardiografiche (fractional area changing, onda S al Doppler tissutale, global longitudinal strain, frazione d'eiezione tridimensionale) o di risonanza magnetica cardiaca.

I biomarcatori espressione di fibrosi interstiziale e rimodellamento tissutale (GDF-15 GAL-3, sSt2) non hanno mostrato in questa popolazione correlazioni significative con i parametri strutturali analizzati - relativamente al ventricolo sinistro - in termini di funzione sisto-diastolica, verosimilmente a conferma del fatto che alterazioni precoci nella composizione tissutale tardano ad esprimersi in una compromissione funzionale valutata con metodiche standard.

D'altra parte gli studi finora condotti sull'utilità diagnostica e prognostica dei nuovi biomarcatori hanno prodotto risultati contraddittori, risentendo spesso di limiti metodologici connessi alla scarsa numerosità del campione, alla diversa popolazione in studio – focalizzandosi in alcuni casi su pazienti con scompenso acuto, in altri con

scompenso cronico – alla diversa categoria di pazienti, ovvero con frazione d’iezione ridotta o preservata, generando molta confusione sul reale apporto che ne deriverebbe dall’introduzione nella pratica clinica.

Dati significativi concordano comunque nell’evidenziare la possibilità di un loro effettivo contributo in termini prognostici se in aggiunta alla determinazione dei ben più consolidati peptidi natriuretici, con una capacità superiore rispetto a quella che ciascun altro biomarker avrebbe se utilizzato da solo (134; 27), oltre al vantaggio di determinazioni seriate, capaci di definire un trend temporale più ampio, rispetto a singole determinazioni all’ingresso o alla dimissione del paziente (21); inoltre la determinazione combinata di tali biomarkers in aggiunta ai peptidi natriuretici consentirebbe di definire con maggiore oggettività la classe funzionale dei pazienti con scompenso (135).

Lo studio contrastografico in risonanza magnetica, mediante la ricerca della fibrosi focale e diffusa, potrebbe fornire informazioni aggiuntive per individuare precocemente alterazioni strutturali fini che anticipano le ripercussioni sui parametri funzionali.

## **IMPLICAZIONI**

Lo scompenso cardiaco a frazione d’iezione preservata è un’entità clinica proteiforme che deve necessariamente entrare nella diagnosi differenziale in corso di valutazione di pazienti con segni e/o sintomi che ad una prima valutazione potrebbero erroneamente essere attribuiti alle frequenti comorbidità che questa categoria di pazienti presenta.

Bisogna pertanto che nella medicina “generale” - ovvero non specialistica cardiologica – primo step di valutazione del paziente, l’HFpEF si affermi come entità clinica ben definita, e che se ne comprenda l’equivalente impatto in termini di qualità di vita e mortalità rispetto allo scompenso cardiaco a frazione d’iezione ridotta.

La successiva valutazione specialistica, con i dati aggiuntivi apportati da metodiche laboratoristiche e di imaging, porterà alla migliore caratterizzazione di questa condizione patologica.

Perché l’uso di nuovi biomarcatori ematici entri nella routine di valutazione dei pazienti con HFpEF appare necessaria una migliore definizione dei loro range di normalità, esistendo al momento un’eccessiva variabilità.

## **LIMITI E PUNTI DI FORZA**

La scarsa numerosità del campione di pazienti rappresenta certamente un limite dello studio. Va ad ogni modo sottolineata l’attenta selezione dei pazienti che è stata alla base dell’arruolamento, essendo stati esclusi - tra gli altri - pazienti con patologie sistemiche o precedente radio/chemioterapia, condizioni che potrebbero aver influenzato i valori dei biomarcatori - così come i reperti di imaging di risonanza magnetica - in altri studi nei quali non si fa menzione di tale selezione.

Un gruppo di controllo avrebbe permesso di ottenere dati più consistenti per la definizione delle concentrazioni dei biomarcatori.

Un ulteriore limite è l'assenza di informazioni che avrebbe potenzialmente permesso di ottenere l'uso del mezzo di contrasto nello studio di risonanza magnetica cardiaca.

Rappresenta altresì un limite l'assenza di un follow-up clinico-strumentale dei pazienti a causa delle restrizioni imposte dalla pandemia da COVID-19, che hanno reso possibile solo un follow-up telefonico; tale condizione ha significativamente impattato l'esito dello studio rispetto ai risultati attesi dal disegno iniziale.

## CONCLUSIONI

Il presente studio ha permesso di dimostrare che in pazienti con insufficienza cardiaca a frazione d'eiezione preservata:

- elevati valori di NT-proBNP correlano con la classe funzionale al follow-up;
- valori elevati di NT-proBNP ed un grado di disfunzione diastolica  $\geq$  II correlano con alta probabilità di eventi al follow-up;
- elevati valori di sST2 predicono dilatazione del ventricolo destro;
- il global longitudinal strain della popolazione con HFpEF è significativamente ridotto rispetto a quello della popolazione sana.

L'individuazione precoce di alterazioni strutturali, funzionali, laboratoristiche, potrebbe consentire di intervenire tempestivamente e tentare di arrestare la progressione della patologia con una terapia mirata.

La caratterizzazione cardiaca mediante risonanza magnetica, consentendo di comprendere come sia strutturata la parete cardiaca e di avere importanti dettagli funzionali, appare pertanto fondamentale e - sebbene ancora remota la possibilità di sottoporvi tutti i pazienti - certamente per soggetti giovani o con sintomi che compromettono significativamente la qualità di vita, così come nei pazienti con importanti alterazioni morfofunzionali ecocardiografiche, può apportare un significativo valore aggiunto.

È auspicabile che la risonanza magnetica cardiaca entri nella routine clinico-strumentale per la valutazione del paziente con HFpEF, e che parametri quali strain e quantificazione del volume extracellulare diventino elementi ausiliari di valutazione e pianificazione terapeutica.

## Bibliografia

1. *Evaluation of Galectin-3 as a Novel Diagnostic Biomarker in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction.* **Mohan1, Jyothirmayi Kanukurti1 Noorjahan Mohammed1 N. N. Sreedevi1 Siraj Ahmed Khan1 K.S.S. Sai Baba1 M. Vijaya Bhaskar1 O. Sai Satish2 Shaik Mohammad Naushad3 Iyyapu Krishna.** Telangana, India : J Lab Physicians, 2020, Vols. 12:126–132. DOI <https://doi.org/10.1055/s-0040-1716608>.
2. **United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division.** *World Population Ageing 2017 - Highlights (ST/ESA/SER.A/397).* 2017.
3. **Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM.** Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* 2017, 14, pp. 591-602.
4. *2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure.* **Theresa A. McDonagh, M. Metra, M. Adamo, R. S. Gardner, A. Baumbach, M. Böhm, H. Burri, J. Butler, J. Celutkiene, O. Chioncel, J. G.F. Cleland, A. J.S. Coats, M. G. Crespo-Leiro, D. Farmakis, M. Gilard, S. Heymans, A. W. Hoes, T. Jaarsma, E. A. Jankowska.** s.l.: ESC GUIDELINES, 2021. doi:10.1093/eurheartj/ehab368.
5. **Shah SJ, Borlaug BA, Kitzman DW et al.** Research Priorities for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group Summary. *Circulation.* 2020 Mar 24;141(12):1001-1026.
6. *How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA–PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC).* **Burkert Pieske, Carsten Tschöpe, Rudolf A de Boer, Alan G Fraser, Stefan D Anker, Erwan Donal, Frank Edelmann, Michael Fu, Marco Guazzi, Carolyn S P Lam, Patrizio Lancellotti, Vojtech Melenovsky, Daniel A Morris, Eike Nagel, et al.** s.l.: Oxford Academic, 2019, Vol. 42.
7. **Hotamisligil GS.** Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006, 444, pp. 860-867.
8. **Obokata M, Reddy YNV, Pislaru SV et al.** Obokata M, Reddy YNV, Pislaru SV, Melenovsky V, Borlaug BA. Evidence supporting the existence of a distinct obese phenotype of heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation.* 2017, 136, pp. 6-19.
9. **Packer M.** Do most patients with obesity or type 2 diabetes, and atrial fibrillation, also have undiagnosed heart failure? A critical conceptual framework for understanding mechanisms and improving diagnosis and treatment. *Eur J Heart Fail.* 2020, 22, pp. 214-227.
10. **Kitzman DW, Lam C.** Obese heart failure with preserved ejection fraction phenotype: from pariah to central player. *Circulation.* 2017, 136, pp. 20-23.
11. **Dalos D, Mascherbauer J, Zotter-Tufaro C.** Functional status, pulmonary artery pressure, and clinical outcomes in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2016, 68, pp. 189-199.
12. **Schiattarella G, Rodolico D, Joseph A.** Metabolic inflammation in heart failure with preserved ejection fraction. *Hill Cardiovascular Research.* 2021, 117, pp. 423-434.
13. **McNelis JC, Olefsky JM.** Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity.* 2014, 41, pp. 36-48.
14. *Therapeutic Stalemate in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.* **Rohan Samson, MD and Thierry H. Le Jemtel, MD.** s.l.: Journal of the American Heart Association, 2021. DOI: 10.1161/JAHA.121.021120.
15. **Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, et al.** Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation.* 2015, 131, pp. 550-559.
16. **Obokata M, Reddy YNV, Melenovsky V, et al.** Myocardial injury and cardiac reserve in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2018, 72, pp. 29-40.

17. **Boulogne M, Sadoune M, Launay JM, et al.** Inflammation versus mechanical stretch biomarkers over time in acutely decompensated heart failure with reduced ejection fraction. *Int J Cardiol.* 2016, 226, pp. 53-59.
18. **Reddy YNV, Carter RE, Obokata M et al.** A Simple, Evidence-Based Approach to Help Guide Diagnosis of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 2018 August 28; 138(9): 861–870.
19. **Pieske B, Tschope C, de Boer R, et al.** How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA–PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal.* 2019, 40, pp. 3297–3317.
20. **D'Elia E, et al.** Role of biomarkers in cardiac structure phenotyping in heart failure with preserved ejection fraction: critical appraisal and practical use. *European Journal of Heart Failure.* 2015, 17, pp. 1231-1239.
21. **van der Velde AR, Gullestad L, Ueland T, et al.** Prognostic value of changes in galectin-3 levels over time in patients with heart failure: data from CORONA and COACH. *Heart Fail.* 2013, 6, pp. 219-226.
22. **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. *The American journal of cardiology.* 2011, 107, pp. 259-267.
23. **Chan MMY, Santhanakrishnan R, Chong JPC, et al.** Growth differentiation factor 15 in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction. *European Journal of Heart Failure.* 2016, 18, pp. 81-88.
24. **Comparison of Soluble ST2, Pentraxin-3, Galectin-3, and High-Sensitivity Troponin T of Cardiovascular Outcomes in Patients With Acute Decompensated Heart Failure.** **MASAYOSHI YAMAMOTO, MD, PhD,<sup>1</sup> YOSHIHIRO SEO, MD, PhD,<sup>2</sup> TOMOKO ISHIZUA, MD, PhD,<sup>1</sup> DAISHI NAKAGAWA, MD,<sup>3</sup> KIMI SATO, MD, PhD,<sup>1</sup> TOMOKO MACHINO-OHTSUKA, MD, PhD,<sup>1</sup> ISAO NISHI, MD, PhD,<sup>4</sup> YOSHIE HAMADA-HARIMURA, MD, PhD,<sup>5</sup> SEIKA SAI, MD,<sup>6</sup> AKINORI SUGANO, MD, PhD,<sup>00</sup>** Ibaraki, Nagoya, and Tokyo, Japan : *Journal of Cardiac Failure*, 2021, Vol. 00.
25. **Meara E, de Denu S, Rouleau JL, Desai A.** Circulating biomarkers in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Curr Heart Fail Rep.* 2013, 10, pp. 350-8.
26. **Palmer SC, Yandle TG, Nicholls MG, et al.** Regional clearance of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide from human plasma. *Eur J Heart Fail.* 2009, 11, pp. 832-9.
27. **Friões F, Lourenço P, Laszczynsk O, et al.** Prognostic value of sST2 added to BNP in acute heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *Clinical Research in Cardiology.* 2015, Vol. 104, pp. 491-499.
28. **van Vark LC, Lesman-Leegte I, Baart SJ, et al.** Prognostic value of serial ST<sup>2</sup> measurements in patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2017, Vol. 70.
29. **Prognostic value of soluble suppression of tumorigenicity-2 in chronic heart failure: a meta-analysis.** **Aimo A, Vergaro G, Passino C, et al.** 280-6, s.l. : *J Am Coll Cardiol HF*, 2017, Vol. 5.
30. **van Doorn S, Geersing GJ, Kievit RF, et al.** Opportunistic screening for heart failure with natriuretic peptides in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of individual participant data of four screening studies. *Heart.* 2018, 104, pp. 1236-1237.
31. **Dinarello CA.** Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.* 2007, 37(S1, Suppl 1):S34–S45.
32. **Kang S, Tanaka T, Narazaki M, et al.** Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity.* 2019, Vols. 16;50(4):1007-1023.
33. **Differential Hemodynamic Effects of Exercise and Volume Expansion in People with and without Heart Failure.** **Mads J. Andersen, MD, PhD, et al., et al.** 41-48, s.l. : *Circ heart Fail.*, 2015, Vol. 8.

34. **Said EA, Iman Al-Reesi, Al-Shizawi N, et al.** Defining IL-6 levels in healthy individuals: A meta-analysis. *J Med Virol.* 2012; Vols. 93(6):3915-3924.
35. **Gwechenberger M, Hülsmann M, Berger R, et al.** Interleukin-6 and B-type Natriuretic Peptide Are Independent Predictors for Worsening of Heart Failure in Patients With Progressive Congestive Heart Failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2004.
36. **Shah RV, Januzzi JL.** ST2: a novel remodeling biomarker in acute and chronic heart failure. *Curr Heart Fail.* 2010, Vols. 1:9–14.
37. **Schmitz J, Owyang A Oldham E, et al.** IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor signals via the IL-1 receptor related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005, Vols. 23: 479-90.
38. **Seki K, Sanada S, Kudinova AY, et al.** Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail.* 2009, 2: 684-91.
39. **circulating biomarkers in patients with heart failure and preserved ejection fraction. O'Meara E, de Denus S, Rouleau JL, Desai A.** 350-358, s.l. : Curr Heart Fail Rep , 2014, Vol. 10.
40. **Soluble ST2 is associated with markers of diastolic dysfunction in patients with heart failure with preserved ejection fraction in the PARAMOUNT trial. Jhund PS, Claggett BL, Zile MR, et al.** 340-1 Abstract, s.l. : Eur. Heart J. , 2014, Vol. 35.
41. **Noninvasive imaging of myocardial extracellular matrix for assessment of fibrosis. Won S, Davies-Venn C, Liu S et al.** 282-289, s.l. : Current Opinion in Cardiology, May 2013, Vol. 28(3).
42. **Kempf T, Eden M, Strelau J, et al.** The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. . *Circ Res* 2006; 98: 351-60.
43. **Lind L, Wallentin L, Kempf T, et al.** Growth-differentiation factor-15 is an independent marker of cardiovascular dysfunction and disease in the elderly: results from the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *Eur Heart J* 2009; 30:2346-53.
44. **Zhou YM, Li MJ, Zhou YL et al.** Growth differentiation factor-15 (GDF-15), novel biomarker for assessing atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation and rheumatic heart disease. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 21201-7.
45. **CMR-verified diffuse myocardial fibrosis is associated with diastolic dysfunction in HFpEF. M.Y. Su, L.Y. Lin, Y.H. Tseng, et al.** s.l. : JACC Cardiovasc. Imaging, 2014.
46. **Myocardial T1 and extracellular volume fraction measurement in asymptomatic patients with aortic stenosis: reproducibility and comparison with age-matched controls. A. Singh, M.A. Horsfield, S. Bekele, J. Khan, A. Greiser, G.P. McCann,** s.l. : Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging , 2015.
47. **Biomarkers, myocardial fibrosis and co-morbidities in heart failure with preserved ejection fraction: an overview. Marta Michalska-Kasieczak<sup>1, 2</sup>, Agata Bielecka-Dabrowa<sup>1,3</sup>, Stephan von Haehling<sup>4</sup>, Stefan D. Anker<sup>5,6</sup>, Jacek Rysz<sup>7</sup>, Maciej Banach<sup>1</sup>.** s.l. : Arch Med Sci, 4 June 2018.
48. **Lukaszyk E , Lukaszyk M, Koc E et al.** GDF 15, iron, and inflammation in early chronic kidney disease among elderly patients . *Int Urol Nephrol* (2016) 48:839–844.
49. **Hamon SM, Griffin TP, Islam M et al.** Defining reference intervals for a serum growth differentiation factor-15 (GDF-15) assay in a Caucasian population and its potential utility in diabetic kidney disease (DKD). *Clin Chem Lab Med* 2019 Mar 26;57(4):510-520.
50. **Galectin-3: a novel Blood Test for the Evaluation and Management of Patients with Heart Failure . Peter A. McCullough, MD, MPH, FACC, FACP, FAHA, FCCP,<sup>1</sup> Ariyo Olobatoke, MD,<sup>1</sup> Thomas E. Vanhecke, MD<sup>2</sup>.** 4, 2011, Vol. 12.
51. **Borlaug BA, Paulus WJ.** Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J.* 2011; 32: 670-9.

52. *Growth differentiation factor 15 in heart failure with preserved vs reduced ejection fraction.* **Michelle M.Y. Chan, Rajalakshmi Santhanakrishnan, Jenny P.C. Chong, Zhaojin Chen, Bee Choo Tai, OiWah Liew, Tze Pin Ng, Lieng H. Ling, David Sim, Kui Toh G. Leong, Poh Shuan Daniel Yeo, Hean-Yee Ong, Fazlur Jaufeerally, Raymond Ching-ChiewWong, Ping C.** 81-88, s.l. : european Journal of Heart Failure, 2016, Vol. 18.
53. *Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) is a new Biomarker with Independent Prognostic Significance for survival and Renal Outcomes in Different Cohorts of Patients with Light Chain (AL) Amyloidosis.* **Efstathios Kastritis, MD , Giampaolo Merlini, MD , Ioannis Papassotiriou, PhD , Paolo Milani, MD , Evangelos Terpos , Marco Basset, MD , Athanasios Akalestos , Francesca Russo , Erasmia Psimenou , Filia Apostoloakou , Maria Roussou , Maria Gavriatopoulou.** 2016.
54. **Deborah French, Alan H.B. Wu.** *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition).* 2013.
55. **35. Benjamin French, PhD, Le Wang, MS, Bonnie Ky, MD, MSCE, Jeffrey Brandimarto, MS, Anupam Basuray, MD, MPH.**
56. **Bødtker Mortensen M , Fuster V et al.** Negative Risk Markers for Cardiovascular Events in the Elderly. *JACC VOL. 74, NO. 1, 2019 JULY 9, 2019:1 – 1 1.*
57. **French B, Wang L, Ky B.** Prognostic Value of Galectin-3 for Adverse Outcomes in Chronic Heart Failure. *J Card Fail. 2016 April ; 22(4): 256–262.*
58. **Suzuki T, Yazaki Y, Voors AA, et al.** Association with outcomes and response to treatment of trimethylamine N-oxide in heart failure: results from BIostat-CHF. . *Eur J Heart Fail 2019; 21: 877–886.*
59. **Zhang Y, Wang Y, Ke B, Du J.** TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure. *Transl Res 2021; 228: 109–125.*
60. **Polsinelli VB, Marteau L, Shah SJ.** The role of splanchnic congestion and the intestinal microenvironment in the pathogenesis of advanced heart failure. *Curr Opin Support Palliat Care 2019; 13: 24–30.*
61. **Li Z, Wu Z, Yan J.** Gut microbe-derived metabolite trimethylamine N-oxide induces cardiac hypertrophy and fibrosis. *Lab Invest 2019; 99: 346–357.*
62. **Makrecka-Kuka M, Volska K, Antone U.** Trimethylamine N-oxide impairs pyruvate and fatty acid oxidation in cardiac mitochondria. *Toxicol Lett 2017; 267: 32–38.*
63. *Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis.* **Tang WH, Wang Z, Fan Y, Levison B, Hazen JE, Donahue LM, Wu Y, Hazen SL.** 1908-1914, *J Am Coll Cardiol* 2014, Vol. 64.
64. *Trimethylamine N-oxide and prognosis in acute heart failure.* **Suzuki T, Heaney LM, Bhandari SS, Jones DJ, Ng LL.** 841-848, *Heart* 2016, Vol. 102.
65. *Trimethylamine N-oxide and outcomes in patients hospitalized with acute heart failure and preserved ejection fraction.* **Yoshiharu Kinugasa, Kensuke Nakamura, Hiroko Kamitani, Masayuki Hirai, Kiyotaka Yanagihara, Masahiko Kato and Kazuhiro Yamamoto.** 2103-2110, s.l. : Wiley Online Library, *ESC HEART FAILURE* 2021, Vol. 8. DOI: 10.1002/ehf2.13290.
66. **Gessner A, di Giuseppe R, Koch M.** Trimethylamine-N-oxide (TMAO) determined by LC-MS/MS: distribution and correlates in the population-based PopGen cohort. . *Clin Chem Lab Med.* 2020 04 28; 58(5):733-740.
67. **Kinugasa Y, Nakamura K, Ka H.** Trimethylamine N-oxide and outcomes in patients hospitalized with acute heart failure and preserved ejection fraction. *ESC HEART FAILURE ESC Heart Failure* 2021; 8: 2103–2110.
68. **Scatteia A, Baritussio A, Bucciarelli-Ducci C.** Strain imaging using cardiac magnetic resonance . *Heart Fail Rev (2017) 22:465–476).*

69. **Donadio MC , Adriano A, Wilson A.** Cardiac Mechanics Evaluated by Speckle Tracking Echocardiography. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* · March 2014 .
70. **Carlsson M, Ugander M, Mosen H.** Atrioventricular plane displacement is the major contributor to left ventricular pumping in healthy adults, athletes, and patients with dilated cardiomyopathy. . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1452-H1459.
71. **Claus P, Omar AMS, Pedrizzetti G et al.** Tissue tracking technology for assessing cardiac mechanics: principles, normal values, and clinical applications. *JACC Cardiovasc Imaging* 8: 1444–1460. 2015.
72. **Taylor RJ, Moody WE, Umar F et al.** Myocardial strain measurement with feature-tracking cardiovascular magnetic resonance: normal values. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015.
73. **Voigt JU, Pedrizzetti G, Lysyansky P et al.** Definitions for a common standard for 2D speckle tracking echocardiography: consensus document of the EACVI/ASE/ Industry Task Force to standardize deformation imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015;16:1–11.
74. **Solomon SD, Anavekar N, Skali H et al.** Candesartan in Heart Failure Reduction in Mortality (CHARM) Investigators. Influence of ejection fraction on cardiovascular outcomes in a broad spectrum of heart failure patients. *Circulation*. 2005;112:3738 –3744.
75. **Shah AM , Solomon SD.** Myocardial Deformation Imaging Current Status and Future Directions. *Circulation*. 2012;125:e244-e248.
76. **Wang J, Nagueh SF.** Current perspectives on cardiac function in patients with diastolic heart failure. . *Circulation*. 2009;119:1146 –1157.
77. **Cho G-Y, Marwick TH, Kim H-S et al.** Global 2-dimensional strain as a new prognosticator in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:618–624.
78. **Nahum J, Bensaïd A, Dussault C et al.** Impact of longitudinal myocardial deformation on the prognosis of chronic heart failure patients. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3:249 –256.
79. **Hung C-L, Verma A, Uno H et al.** Longitudinal and circumferential strain rate, left ventricular remodeling, and prognosis after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56: 1812–1822.
80. **Kurt M, Wang J, Torre-Amione G, Nagueh SF.** Left atrial function in diastolic heart failure. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009;2:10 –15. .
81. **Oxborough A, Charlesworth S, Foulds H et al.** Dilatation and dysfunction of the right ventricle immediately after ultraendurance exercise: exploratory insights from conventional two-dimensional and speckle tracking echocardiography.
82. **Marwick TH, Leano RL, Brown J et al.** Myocardial strain measurement with 2-dimensional speckle-tracking echocardiography. *JACC Cardiovasc Imaging* 2:80–84. 2009.
83. *Diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction: Understanding mechanisms by using noninvasive methods.* **Obokata, M., Reddy, Y.N.V. and Borlaug, B.A.** 245–257, s.l. : J. Am. Coll. Cardiol. Imaging, 2020, Vol. 13.
84. *Magnetic Resonance Imaging of Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.* **Julio A. Chirinos, MD, PHD.** 11, s.l.: ELSEVIER, 2019, Vol. 12. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2018.12.019>.
85. *Myocardial phenotypes and dysfunction in HFpEF and HFrEF assessed by echocardiography and cardiac magnetic resonance .* **Marino, Bostjan Berlot & Chiara Bucciarelli-Ducci & Alberto Palazzuoli & Paolo.** 75-84, s.l. : Springer, 2019, Vol. 25. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09880-4>.
86. **A.E. Huis in't Veld et al.** How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the value of invasive stress testing. *Neth Heart J* (2016) 24:244–251.
87. **Treibel TA, Zemrak F, Sado DM et al.** Extracellular volume quantification in isolated hypertension - changes at the detectable limits? *Journal oCardiovascular Magnetic Resonance* (2015) 17:74.

88. **Wu et al.** Eat and myocardial diffuse fibrosis. *Journal of Clinical Lipidology* (2017) 11, 1421–1431.
89. **Mazurek et al.** Inflammation in Epicardial Adipose Tissue. *Circulation* 2003;108:2460-2466.
90. **Greenstein et al.** Local Inflammation and Hypoxia Abolish the Protective Anticontractile Properties of Perivascular Fat in Obese Patients. *Circulation* 2009;119:1661-1670.
91. **Pöyhönen P, Kivistö S, Holmström M, Hänninen H.** Quantifying late gadolinium enhancement on CMR provides additional prognostic information in early risk-stratification of nonischemic cardiomyopathy: a cohort study. *BMC Cardiovascular Disor.* 2014.
92. **Kato S, Saito N, Kirigaya H et al.** Prognostic significance of quantitative assessment of focal myocardial fibrosis in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Int. J. Cardiol.* 2015, 191, 314–319.
93. **Severino P, D’Amato A, Prosperi S et al.** Myocardial Tissue Characterization in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: From Histopathology and Cardiac Magnetic Resonance Findings to Therapeutic Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7650.
94. **Mascherbauer J, Marzluft BA, Tufaro C et al.** Cardiac magnetic resonance postcontrast T1 time is associated with outcome in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 2013, 6, 1056–1065.
95. **Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K et al.** Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-preserved trial. *Lancet.* 2003, 362(9386):777–781 ).
96. **Cleland JGF, Tendera M, Adamus J et al.** The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *Eur Heart J.* 2006, 27(19):2338–2345.
97. **Massie BM, Carson PE, McMurray et al.** Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2008, 359(23):2456–2467.
98. **Brown NJ.** Aldosterone and end-organ damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005, 14(3):235–241).
99. **Edelmann F, Wachter R, Schmidt AG, Al E.** Effect of spironolactone on diastolic function and exercise capacity in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *JAMA.* 2013, 309(8):781–791.
100. **Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF et al.** Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2014;370:1383–1392.
101. **Takada T, Sakata Y, Miyata S et al.** Impact of elevated heart rate on clinical outcomes in patients with heart failure with reduced and preserved ejection fraction: a report from the CHART-2 Study. *Eur J Heart Fail.* 2014, 16(3):309–316.
102. **Conraads VM, Metra M, Kamp O, et al.** Effects of the long-term administration of nebivolol on the clinical symptoms, exercise capacity, and left ventricular function of patients with diastolic dysfunction: results of the ELANDD study. *Eur J Heart Fail.* 2012, 14(2):219–225).
103. **Fonarow GC, Stough WG, Abraham WT et al.** Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry. *J Am Coll Cardiol.* 2007, 50(8):768–777.
104. **Solomon SD, McMurray JJV, Anand IS et al PARAGON-HF Investigators and Committees.** Angiotensin-nepriylsin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2019;381:1609–1620.
105. **Komajda M, Isnard R, Cohen-Solal A et al.** Effect of ivabradine in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the EDIFY randomized placebo-controlled trial. *Eur J Heart Fail.* 2017, 19(11):1495–1503.
106. **Aimo A, Cerbai E, Bartolucci G et al.** Pirfenidone is a cardioprotective drug: mechanisms of action and preclinical evidence. *Pharmacol Res* 2020;155:104694.

107. **Algahim MF, Sen S, Taegtmeier H.** Bariatric surgery to unload the stressed heart: a metabolic hypothesis. . *Am J Physiol Heart Circul Physiol* 2012;302:H1539–H1545 .
108. **Gabbande-Rodriguez E, Gomez de las Heras MM, Mittelbrunn M.** Control of inflammation by calorie restriction mimetics: on the crossroad of autophagy and mitochondria. . *Cells* 2019;9:82.
109. **Hegde SM, Claggett B, Shah AM et al.** Physical activity and prognosis in the TOPCAT Trial (Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist). *Circulation*.2017, 136(11):982–992.
110. **Edelmann F, Gelbrich G, Dungen H-D et al.** Exercise training improves exercise capacity and diastolic function in patients with heart failure with preserved ejection fraction: results of the Ex-DHF (Exercise training in Diastolic Heart Failure) pilot study. *J Am Coll Cardiol.* 2011, 58(17):1780–1791.
111. **Butler J, Hamo CE, Filippatos G et al.** The potential role and rationale for treatment of heart failure with sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors. *European Journal of Heart Failure.* 2017.
112. **Anker SD, Butler J, Filippatos G et al.** Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med* 2021; 385:1451-1461.
113. **Tschöpe C, Van Linthout S, Spillmann F et al.** Cardiac contractility modulation signals improve exercise intolerance and maladaptive regulation of cardiac key proteins for systolic and diastolic function in HFpEF. *Int J Cardiol* 203:1061–1066. 2016.
114. **Esler MD, Krum H, Sobotka PA et al.** Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *2010 Lancet* 376(9756):1903–1909.
115. **Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA et al.** Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: A randomized clinical trial. *2013 JAMA*, 309(12), 1268–1277.
116. **Pieske B, Maggioni AP, Lam CSP et al.** Vericiguat in patients with worsening chronic heart failure and preserved ejection fraction: results of the SOLuble guanylate Cyclase stimulator in heart failure patients with PRESERVED EF (SOCRATES-PRESERVED) study. *Eur Heart J.* 2017;38:1119–1127.
117. **Borlaug BA, Anstrom KJ, Lewis GD et al.** Effect of inorganic nitrite vs placebo on exercise capacity among patients with heart failure with preserved ejection fraction: the INDIE-HFpEF randomized clinical trial. . *JAMA.* 2018;320:1764–1773.
118. **Redfield MM, Anstrom KJ, Levine JA et al.** Isosorbide mononitrate in heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2015;373:2314–2324.
119. **Lee DI, Zhu G, Sasaki T et al.** Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature.* 2015;519:472–476.
120. **Richards DA, Aronovitz MJ, Liu P et al.** CRD-733, a novel phosphodiesterase 9 inhibitor, reverses pressure overload-induced heart failure. *Circ Heart Fail.* 2021 January ; 14(1): e007300.
121. **Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S.** Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. . *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:395–412.
122. **Everett BM, Cornel JH, Lainscak M et al.** Anti-inflammatory therapy with canakinumab for the prevention of hospitalization for heart failure. *Circulation*,2019. 139(10), 1289–1299.
123. **Ridker PM, Everett BM, Pradhan A et al.** Low-dose methotrexate for the prevention of atherosclerotic events. *The New England Journal of Medicine*,2019. 380(8), 752–762.
124. **Gong K, Zhang Z, Sun X et al.** The nonspecific anti-inflammatory therapy with methotrexate for patients with chronic heart failure. *American Heart Journal.*2006, 151(1), 62–68.
125. **Kessler EL, Oerlemans M, van den Hoogen P et al.** Immunomodulation in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Current State and Future Perspectives. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2021 Feb;14(1):63-74.

126. **Westermann D, Linthout S, Dhayat S et al.** Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*, 2007. 102(6), 500–507.
127. **Westermann D, Van Linthout S., Dhayat S et al.** Cardioprotective and antiinflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2007, 56(7), 1834–1841.
128. **Maier LS, Layug B, Karwatowska-Prokopczuk E et al.** RANoLazine for the Treatment of Diastolic Heart Failure in Patients with Preserved Ejection Fraction: The RALI-DHF Proof-of-Concept Study. *JACC Heart Fail.* 2013, 1, 115–122.
129. **Nieminen MS, Buerke M, Parissis J et al.** Pharmaco-economics of levosimendan in cardiology: A European perspective. *Int. J. Cardiol.* 2015, 199, 337–341.
130. **Parissis JT, Paraskevidis I, Bistola V et al.** Effects of levosimendan on right ventricular function in patients with advanced heart failure. *Am. J. Cardiol.* 2006, 98, 1489–1492.
131. **Burkhoff D, Borlaug BA, Shah SJ et al.** Levosimendan Improves Hemodynamics and Exercise Tolerance in PH-HFpEF: Results of the Randomized Placebo-Controlled HELP Trial. *JACC Heart Fail.* 2021 May;9(5):360-370.
132. **Lang RM, Badano LP, Mor-Av V et al.** Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2015;28:1-39.
133. *Phenotypic Spectrum of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction.* **Shah SJ.** (7) Phenotypic Spectrum of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. Sanjiv : Heart Fail Clin., 2014 July.
134. **Srivatsan V, George M, Shanmugam E.** Utility of galectin-3 as a prognostic biomarker in heart failure: where do we stand? *European Journal of Preventive Cardiology published online 29 September 2014.*
135. **YI-CHIH WANG et al.** Soluble ST2 as a Biomarker for Detecting Stable Heart Failure With a Normal Ejection Fraction in Hypertensive Patients. *Journal of Cardiac Failure Vol.19 No 3 2013.*