



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di Dottorato di Ricerca in
Scienze Biomediche Integrate e Bioetica
XXXV ciclo - A.A. 2019-2020

Ruolo del microbiota intestinale e dei suoi metaboliti nei meccanismi di fibrosi miocardica e fibrillazione atriale post-operatoria

*Intestinal microbiote and derived metabolites in
myocardial fibrosis and post-operative atrial fibrillation*

Dott. Antonio Nenna

Coordinatore

Prof. Raffaele Antonelli Incalzi

Tutor

Prof. Massimo Chello

Dott.ssa Alice Laudisio

22 Marzo 2023

*A Rebecca, Beatrice e Rafael Francesco,
alla nostra famiglia*

Corso di Dottorato – XXXV ciclo – Anno Accademico 2019/2020

Scienze Biomediche Integrate e Bioetica

Curricula: Malattie dell’Invecchiamento e Rigenerazione Cellulare

Ruolo del microbiota intestinale e dei suoi metaboliti nei meccanismi di fibrosi miocardica e fibrillazione atriale post-operatoria

Ph.D. Course – XXXV CYCLE – Academic Year 2019/2020

Integrated Biomedical Sciences and Bioethics

Curricula: Science of Aging and Tissue Regeneration

Intestinal microbiote and derived metabolites in myocardial fibrosis and post-operative atrial fibrillation

Candidato: Dott. Antonio Nenna

Supervisore: Prof. Raffaele Antonelli Incalzi

Tutor: Prof. Massimo Chello, Dott.ssa Alice Laudisio

INDICE

Abstract	4
Capitolo 1	8
Introduzione	
Capitolo 2	12
Materiali e Metodi	
Capitolo 3	23
Risultati	
Capitolo 4	37
Discussione	
Capitolo 5	40
Conclusioni	
Bibliografia	41

ABSTRACT

Razionale. La fibrillazione atriale (FA) è una aritmia comune nella popolazione generale, con incidenza dell'1-2%. La fibrosi del tessuto atriale rappresenta la via finale comune di differenti fattori di rischio e condizioni. Il microbiota ed i suoi metaboliti, come la trimetilammina-N-ossido (TMAO), sono noti attivatori dell'inflammasoma e possono indurre fibrosi generalmente attraverso la via TGFb/SMAD. La fibrillazione atriale post-operatoria (POAF) è la aritmia più comune dopo interventi di cardiocirurgia, con una incidenza del 30-35% (30 volte maggiore rispetto alla FA non-cardiocirurgica) ed è associata ad outcomes negativi nel breve termine e nel lungo termine, per aumentato rischio di stroke, infarto miocardico e mortalità. L'alta incidenza di POAF rispetto alla FA non-cardiocirurgica dipende da alcune peculiarità chirurgiche, come la manipolazione atriale per la circolazione extracorporea, la pericardiectomia con aumento delle citochine pro-infiammatorie intra-pericardiche (c.d. "infiammazione sterile"), la disregolazione autonoma e lo stress ossidativo. Molti fattori sono noti per influenzare il remodeling atriale e la POAF, ma il ruolo del microbiota nella modulazione della fibrosi cardiaca non è stato valutato. Questo studio mira ad analizzare l'effetto del microbiota e dei suoi metaboliti (come il TMAO) nella fibrosi del tessuto miocardico (in atrio destro), per valutarne il ruolo nella POAF.

Materiali e metodi. Sono stati inclusi pazienti sottoposti ad intervento cardiocirurgico in circolazione extracorporea con cannulazione atrio-cavale, in ritmo sinusale e senza anamnesi per FA. Sono stati esclusi i pazienti con cannulazione bicavale (es. chirurgia mitralica), i pazienti sottoposti ad intervento in urgenza o off-pump ed i pazienti candidati a re-intervento cardiocirurgico (redo). La stima della dimensione campionaria ha indicato di arruolare 100 pazienti. Un frammento di atrio destro è stato analizzato in maniera qualitativa (tramite colorazioni di routine, per grading di fibrosi, angiogenesi e infiammazione) e quantitativa dell'mRNA (tramite qRT-PCR, per collagen-1, collagen-3, fibronectin, TGFb e SMAD-2, normalizzando l'espressione per il gene di riferimento GADPH). Un campione ematico è stato analizzato in ELISA per sP-selectin (marker di attivazione piastrinica), lipopolisaccaride [LPS] (marker di presenza batterica), zonulina (marker di permeabilità intestinale), TGFb (marker di fibrosi) e TMAO (metabolita del microbiota). Dopo l'intervento chirurgico, il ritmo cardiaco del paziente è stato registrato fino alla dimissione come da pratica clinica.

L'endpoint primario dello studio è l'identificazione di fattori predittivi di POAF, cercando di identificare una relazione tra fibrosi atriale, metaboliti del microbiota e aritmie postoperatorie. Questo studio, monocentrico, osservazionale e no-profit, è stato approvato del Comitato Etico.

Risultati. Sono stati inclusi 100 pazienti, e la POAF ha avuto incidenza del 38%. Le variabili preoperatorie ed intraoperatorie erano simili nei pazienti che hanno sviluppato POAF e in quelli rimasti in ritmo sinusale ("no-POAF"). Istologicamente, un grado maggiore di fibrosi, angiogenesi ed infiammazione è stato osservato nei POAF (P=0.001). La valutazione quantitativa ha dimostrato una maggiore espressione di mRNA per geni pro-fibrotici nel gruppo POAF: collagen-1 (POAF vs no-POAF: 2.47 ± 0.29 vs 2.00 ± 0.32 , P=0.001), collagen-3 (1.48 ± 0.35 vs 1.22 ± 0.18 , P=0.001), fibronectin (2.46 ± 0.36 vs 1.92 ± 0.63 , P=0.001), TGFb (3.23 ± 0.42 vs 2.88 ± 0.46 , P=0.001) e SMAD-2 (1.57 ± 0.15 vs 1.44 ± 0.25 , P=0.030). Le metodiche di ELISA hanno dimostrato livelli più elevati di TMAO (73.8 [58.6-86.7] vs 57.5 [45.2-71.1] ng/mL, P=0.001), LPS (49.7 [28.9-87.9] vs 14.7 [6.3-64.6], P=0.001) e TGFb (77.3 [66.2-94.1] vs 58.6 [49.6-68.5], P=0.001) nei POAF, con livelli simili di sP-selectin (P=0.189) e zonulin (P=0.218). In regressione multivariata, dopo adeguamento del modello e analisi di cutoff, TMAO ≥ 61.8 ng/mL (OR 2.88 [1.35-6.16], P=0.006), anemia preoperatoria con Hb < 13.1 g/dL (OR 2.37 [1.07-5.24], P=0.033) e ridotta funzione ventricolare destra con TAPSE < 20 mm (OR 2.38 [1.17-4.83], P=0.017) erano fattori predittivi indipendenti di POAF. Inoltre, TMAO è associato a POAF tramite un meccanismo fibrosi-dipendente.

Conclusioni. Il microbiota intestinale è cruciale nei meccanismi che portano a fibrosi miocardica, che rappresenta un fattore essenziale per la POAF. I pazienti in ritmo sinusale che svilupperanno POAF hanno aumentata espressione genica di collagen-1, collagen-3 e fibronectin, con aumento della fibrosi a livello istologico. La via di signaling cellulare TGFb/SMAD ha un ruolo essenziale anche nei pazienti cardiocirurgici. La presenza batterica (LPS) ed il TMAO sono più elevati nei pazienti che svilupperanno POAF, e valori elevati di TMAO (≥ 61.8 ng/mL) sono un fattore di rischio significativo per POAF. Nel futuro, la modulazione del microbiota o l'inibizione delle vie del TMAO possono essere un target contro la fibrosi del tessuto miocardico e le aritmie correlate, permettendo di ridurre l'impatto negativo sui pazienti.

ABSTRACT

Background. Atrial fibrillation (AFib) is a common arrhythmia in the general population, with an incidence of 1-2%. Atrial fibrosis has been shown to be one final common pathway of different risk factors and conditions. Microbiome and its metabolites, such as trimethylamine-N-oxide (TMAO), are known activators of inflammasomes and can induce fibrosis mainly through TGFb/SMAD pathways. Post-op AFib (POAF) is the most common disorder after cardiac surgery, with an incidence of 30-35% (30 times greater than "common" AFib), and is associated with detrimental short-term and long-term outcomes (higher risk of stroke, myocardial infarction and mortality). The high incidence of POAF compared to general AFib relies on specific surgical features, such as atrial manipulation / atriotomy / cannulation for cardiopulmonary bypass, pericardiectomy with increase of intrapericardial inflammatory cytokines ("sterile inflammation"), perioperative autonomic demodulation, inflammation and oxidative stress. Many factors have been shown to be involved in atrial remodeling and POAF. However, in the setting of postsurgical AFib, the role of microbiome in the modulation of cardiac fibrosis is still not investigated. This study aimed to analyze the effect of microbiome and its metabolites (TMAO) in the fibrosis of myocardial tissue evaluated in the right atrium, to investigate its role in the pathogenesis of POAF.

Methods. Patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass and central atrio-caval cannulation, with preoperative sinus rhythm with no history of AFib, were included. Patients undergoing bicaval cannulation, urgent surgery, off-pump surgery and redo procedures were excluded. Sample size calculation estimated an enrollment of 100 patients. A fragment of right atrium was analyzed for qualitative evaluation (with routine staining, for fibrosis, angiogenesis and inflammation) and mRNA quantitative evaluation (with qRT-PCR, for collagen-1, collagen-3, fibronectin, TGFb and SMAD-2, with a normalized expression for reference gene GADPH). A blood sample was analyzed with ELISA assay for sP-selectin (marker of platelet activation), lipopolisaccardide [LPS] (marker of bacterial presence), zonulin (marker of gut permeability), TGFb (marker of fibrosis), and TMAO (microbiome metabolite). After the surgical procedure, patient rhythm was recorded as part of the clinical routine until hospital discharge. The primary endpoint of the study was to find predictive factors of

postoperative AFib, trying to identify a relationship among atrial fibrosis, microbiome metabolites and postoperative arrhythmias. This study was monocentric, observational, no-profit. Study was approved by the Ethical Committee.

Results. A total of 100 patients have been included, and POAF was observed in 38%. Baseline characteristics and intraoperative variables were similar between POAF and “no-POAF” (i.e. patients who remained in sinus rhythm) groups. Histologically, a higher degree of fibrosis, angiogenesis and inflammation has been observed in POAF (P=0.001). Quantitative evaluation showed increased mRNA expression of collagen-1 (POAF vs no-POAF: 2.47 ± 0.29 vs 2.00 ± 0.32 , P=0.001), collagen-3 (1.48 ± 0.35 vs 1.22 ± 0.18 , P=0.001), fibronectin (2.46 ± 0.36 vs 1.92 ± 0.63 , P=0.001), TGFb (3.23 ± 0.42 vs 2.88 ± 0.46 , P=0.001) and SMAD-2 (1.57 ± 0.15 vs 1.44 ± 0.25 , P=0.030) in POAF group. ELISA analysis showed higher levels of TMAO (73.8 [58.6-86.7] vs 57.5 [45.2-71.1] ng/mL, P=0.001), LPS (49.7 [28.9-87.9] vs 14.7 [6.3-64.6], P=0.001) and TGFb (77.3 [66.2-94.1] vs 58.6 [49.6-68.5], P=0.001) in POAF, with similar levels of sP-selectin (P=0.189) and zonulin (P=0.218). Regression analysis showed that, after multivariate model adjustment and cut-off analysis, TMAO ≥ 61.8 ng/mL (OR 2.88 [1.35-6.16], P=0.006), preoperative anemia with Hb < 13.1 g/dL (OR 2.37 [1.07-5.24], P=0.033) and impaired right ventricular function with TAPSE < 20 mm (OR 2.38 [1.17-4.83], P=0.017) were independent predictors of POAF. Also, TMAO was significantly associated with POAF by means of increased fibrosis.

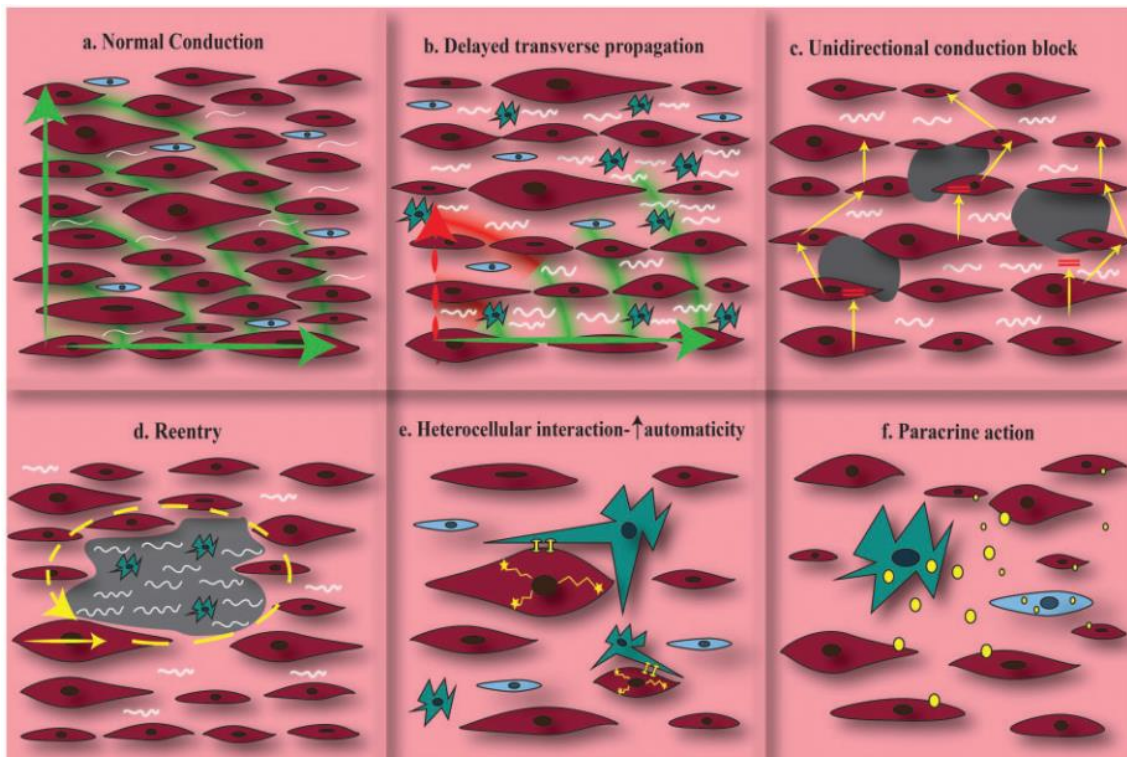
Conclusions. Gut microbiome is crucial for myocardial fibrosis, which is a key factor for POAF. Patients in preoperative sinus rhythm who will develop POAF have increased genetic expression of collagen-1, collagen-3 and fibronectin, with enhanced fibrosis in histological staining. Cellular signaling through TGFb/SMAD pathway plays a pivotal role even in patients undergoing cardiac surgery. Bacterial presence (LPS) and TMAO values are higher in patients who will develop POAF, and higher TMAO levels (≥ 61.8 ng/mL) are a significant risk factor for POAF. In the future, modulation of microbiome or inhibition of detrimental downstream products might be a potential target against fibrosis of myocardial tissue and related arrhythmias, trying to dampen their negative effects.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

La fibrillazione atriale è una aritmia molto comune nella popolazione generale, con incidenza di circa 1-2%. I rischi della fibrillazione atriale sono connessi sia al potenziale embolico sia alla riduzione della funzione ventricolare dovuta ad una elevata risposta ventricolare mantenuta nel tempo (c.d. tachicardiomiopatia); le terapie basate su anticoagulanti e antiaritmici possono avere complicanze rispettivamente emorragiche o bradicardiche, e pertanto il paziente è sottoposto a frequenti controlli clinici[1].

La sua eziopatogenesi è multifattoriale, in quanto le anomalie elettriche sono dovute a ritardi di conduzione causate da ritardo nella propagazione trasversale dell'impulso, blocchi di conduzione unidirezionali, circuiti di rientro, e aumento degli automatismi elettrici per interazioni intracellulari e mediatori paracrini. A livello tissutale, queste anomalie determinano fibrosi nel tessuto atriale, che rappresenta la principale via finale comune dei vari fattori di rischio[2-4].

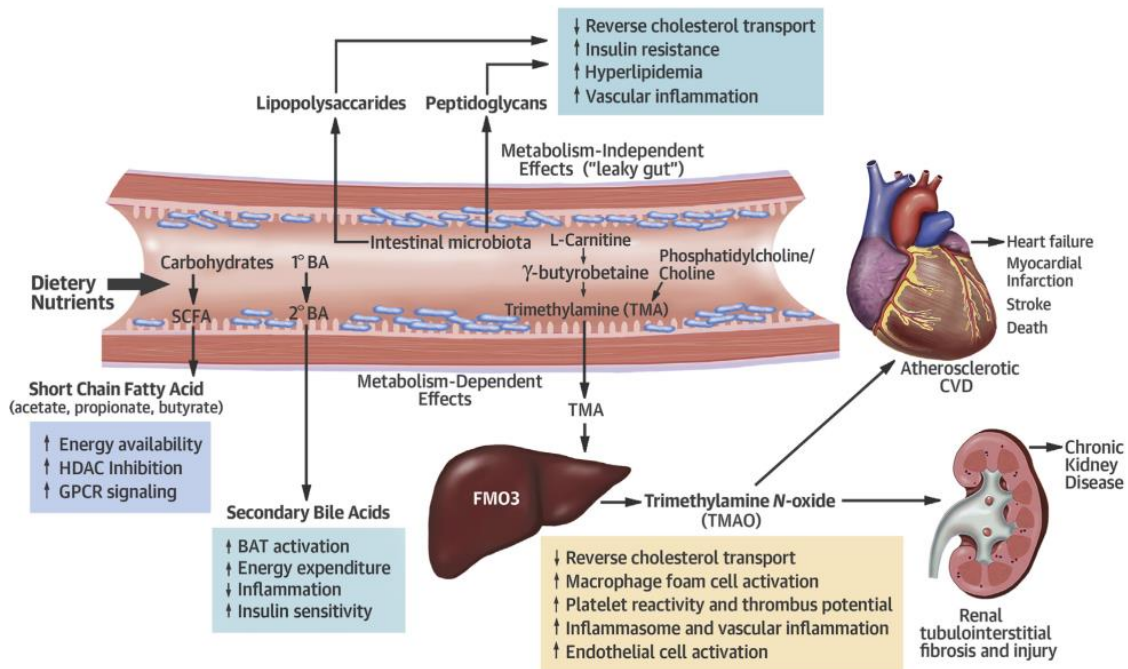


Adattata da Xintarakou et al.[2]

I principali pathway implicati nei meccanismi fibrotici sono dipendenti dalle vie di comunicazione TGFb/SMAD e MAPK, che portano ad aumentata deposizione di collagene, fibronectina e proteine della matrice extracellulare[2-5].

In questo contesto, il ruolo del microbiota intestinale è stato analizzato dalla letteratura recente. In modelli animali, la trimethylamine-N-oxide (TMAO) è implicata nella fibrosi cardiaca tramite l'attivazione dell'inflammasoma mediato dalla via NLRP-3[6], e la TMAO può indurre ipertrofia e fibrosi tramite la via TGFb/Smad-2 dipendenti[7, 8]. L'analisi del microbiota e dei suoi metaboliti ha permesso di identificare condizioni di aumentata mortalità e scarsa prognosi in pazienti con patologie cardiovascolari[9].

In modelli animali, la disbiosi intestinale correlata all'età promuove la fibrillazione atriale attraverso aumento dei livelli circolanti di lipopolisaccaride e glucosio, con attivazione dell'inflammasoma NLRP3, portando a fibrosi del tessuto atriale. Il trapianto di microbiota in modelli animali o l'inibizione selettiva di NLRP3 attenuano la fibrosi e la suscettibilità alle aritmie, sottolineando il ruolo della infiammazione sistemica correlata alla disbiosi come elemento patogenetico della fibrillazione atriale[10-12].

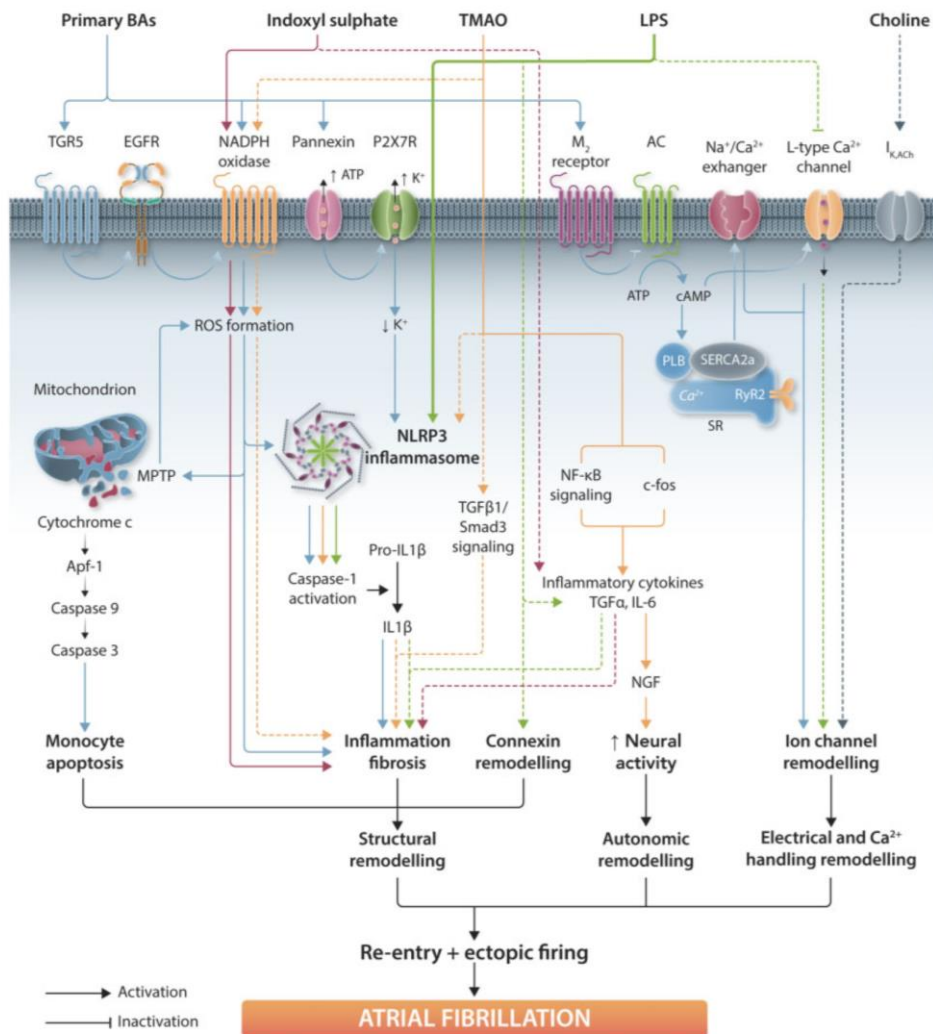


Adattata da Tang et al.[9]

La letteratura recente si è focalizzata sul ruolo del TMAO e sugli effetti del microbiota nella fibrillazione atriale nella popolazione generale[10, 13, 14].

Le differenti popolazioni batteriche del microbiota intestinale sono state correlate a differenti pattern di fibrillazione atriale (parossistica vs persistente) e alla durata degli episodi di fibrillazione atriale[13], e il ruolo (e l'importanza) del TMAO come via finale comune dei metabolismi del microbiota determinante effetti clinici è stato progressivamente delineato[12, 15-17].

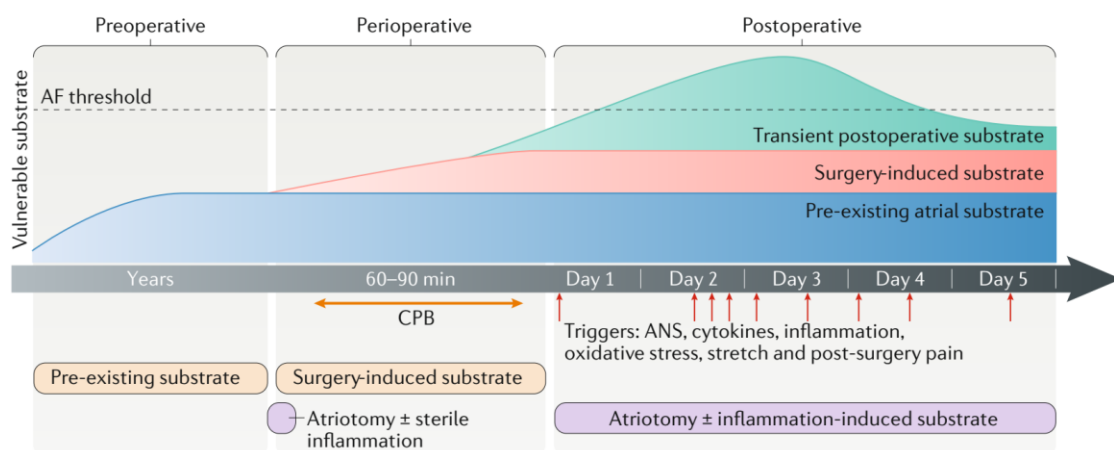
Una recente metanalisi ha dimostrato una relazione dose-dipendente tra rischio di fibrillazione atriale e livelli sierici di TMAO nella popolazione generale, con rischio aumentato dal 6% per ogni incremento di 1 $\mu\text{mol/L}$ fino al 73% per ogni incremento di 10 $\mu\text{mol/L}$ (OR 1.73, 95%CI 1.05-2.86)[18].



Adattata da Gawalko et al.[13]

Nel setting cardiocirurgico, la fibrillazione atriale è l'aritmia post-operatoria più comune, con una incidenza del 30-35% nei pazienti adulti (circa 30 volte maggiore rispetto alla popolazione generale), ed è associata a peggioramento degli outcomes clinici nel breve termine, con aumento significativo del rischio di stroke (circa 3 volte maggiore), e nel lungo termine, con aumento significativo del rischio di mortalità (circa 3 volte maggiore)[19, 20].

L'elevata incidenza di fibrillazione atriale post-operatoria (POAF) rispetto a quella non-cardiocirurgica dipende da fattori specifici correlati all'intervento, come la manipolazione del tessuto atriale destro per la cannulazione venosa della circolazione extracorporea, la pericardiectomia (con aumento delle citochine pro-infiammatorie nel pericardio, c.d. "infiammazione sterile"), la demodulazione autonoma peri-operatoria e lo stato infiammatorio sistemico (con stress ossidativo) peri-operatorio[20].



Adattata da Dobrev et al.[20]

Nel corso degli anni, molti fattori sono stati considerati cruciali nel remodeling pro-fibrotico atriale e nella POAF[1], ma il ruolo nel microbiota intestinale e dei suoi metaboliti non è stato ancora valutato in maniera specifica nei pazienti cardiocirurgici.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

Obiettivo dello studio

L'obiettivo primario del lavoro è l'identificazione di fattori di rischio associati a fibrillazione atriale post-operatoria (POAF), analizzando il ruolo e l'effetto dei metaboliti del microbiota intestinale (come il TMAO) sulla fibrosi del tessuto miocardico (valutata in atrio destro). L'obiettivo secondario del lavoro è l'individuazione dei fattori di rischio clinici oppure ecocardiografici preoperatori associati a POAF; in maniera analoga verranno valutati ulteriori endpoint rilevanti.

Design dello studio

Questo studio è monocentrico, osservazionale, no-profit.

Nessun aspetto dello studio ha modificato la pratica clinica o chirurgica.

Non è stato previsto utilizzo di farmaco.

Non sono state richieste analisi invasive escluse dalla routine assistenziale.

Criteri di inclusione

- pazienti sottoposti ad intervento cardiocirurgico con circolazione extracorporea e cannulazione atrio-cavale
- pazienti con ritmo sinusale preoperatorio in assenza di anamnesi di fibrillazione atriale
- consenso informato

Criteri di esclusione

- pazienti sottoposti a procedure su mitrale, tricuspide, setto interatriale o setto interventricolare, in maniera isolata o combinata ad altre procedure
- pazienti sottoposti a intervento a cuore battente (es. bypass off-pump)
- pazienti sottoposti a intervento in urgenza o emergenza (criteri EuroSCORE)
- pazienti sottoposti a re-intervento cardiocirurgico (redo procedure)

Endpoint

L'endpoint primario dello studio è l'insorgenza di fibrillazione atriale post-operatoria. Per la valutazione dell'endpoint primario, il paziente è stato sottoposto a monitoraggio ECG continuo, dall'intervento chirurgico fino alla dimissione, come da routine. L'insorgenza di fibrillazione atriale post-operatoria e le terapie effettuate sono state registrate in cartella clinica come da prassi clinica.

Come endpoint secondari, sono state analizzate tutte le complicanze postoperatorie annotate in diario clinico (come ad esempio toracentesi, utilizzo di emoderivati) e la durata della degenza post-operatoria.

Follow up

Non è stato previsto follow up extraospedaliero e lo studio è stato concluso alla dimissione del paziente.

Dimensione campionaria

In considerazione delle ipotesi di lavoro e dell'incidenza attesa di fibrillazione atriale postoperatoria (30-35%), sono stati inclusi 100 pazienti nello studio.

In dettaglio, è stato inizialmente calcolato un sample size minimo per regressione univariata, considerando un odds ratio atteso di 3, con proporzione nel gruppo di eventi del 10% per la variabile considerata, e valori standard di errore alfa e beta (secondo Hsieh[21]); si è ottenuta una dimensione campionaria minima iniziale di 75 pazienti. Successivamente la dimensione campionaria è stata corretta considerando un numero massimo di 3 variabili indipendenti in regressione (k) (secondo Blackstone[22]), con proporzione di pazienti con outcome del 30% (p) (valore atteso da analisi si letteratura), applicando " $N = 10 * k / p$ " (secondo Peduzzi[23]), si è ottenuto un sample size definitivo di 100 pazienti.

Prelievo dei campioni

Per ogni paziente è stato prelevato un frammento di circa 1 cm² dall'atrio destro, in corso della normale procedura di cannulazione venosa (cannula doppio stadio in atrio destro e vena cava inferiore) per la circolazione extracorporea. Il campione è stato

analizzato per istologia (morfologia, infiammazione, angiogenesi e fibrosi) e la fibrosi è stata analizzata in maniera quantitativa tramite qRT-PCR (UOC Anatomia Patologica). In aggiunta agli esami ematochimici di routine richiesti per la pratica assistenziale la sera prima dell'intervento, è stato prelevato un campione ematico che, dopo centrifugazione, è stato aliquotato e conservato a -80° per la successiva ELISA (UOC Laboratorio Analisi).

Analisi istologica

Dalle inclusioni paraffinate, sono state effettuate colorazioni H/H (per morfologia, infiammazione e angiogenesi) e Masson (per fibrosi), con grading qualitativo tra 0 a 3 tramite scale di valutazione utilizzate nella pratica clinica (“Abramov scoring system” e valutazioni del Committee of American Heart Association[24])

Variable	Score			
	0	1	2	3
Acute inflammation	None	Scant	Moderate	Abundant
Chronic inflammation	None	Scant	Moderate	Abundant
Granulation tissue amount	None	Scant	Moderate	Abundant
Granulation tissue fibroblast maturation	Immature	Mild maturation	Moderate maturation	Fully matured
Collagen deposition	None	Scant	Moderate	Abundant
Reepithelialization	None	Partial	Complete but immature or thin	Complete and mature
Neovascularization	None	Up to five vessels per HPF	6–10 vessels per HPF	More than 10 vessels per HPF

Analisi qRT-PCR

Per valutare l'espressione di mRNA e quantificare il grado di fibrosi tramite qRT-PCR, è stata effettuata una estrazione di RNA dai campioni istologici tramite Trizol (protocollo del produttore). Un campione standard di RNA è stato trascritto in maniera inversa a cDNA tramite SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Thermofisher) e amplificato tramite real-time PCR. Sono stati analizzati i seguenti geni tramite gli assay:

- collagen tipo 1 [COL1], assay Hs00164004_m1
- collagen tipo 3 [COL3], assay Hs00943809_m1
- fibronectin, assay Hs00365052_m1
- TGFb, assay Hs00998133_m1
- SMAD-2, assay Hs00998187_m1

L'espressione relativa dei geni analizzati è stata normalizzata per l'espressione del gene di riferimento GADPH (assay Hs99999905_m1) tramite il metodo $\Delta\Delta Ct$.

Analisi ELISA

Le analisi di ELISA (enzyme linked immunoassay) sono state effettuate tramite kit commerciali validati ed utilizzati secondo scheda tecnica per valutare:

- sP-selectin, marker di attivazione piastrinica, Thermofisher BMS219-4
- lipopolisaccaride [LPS], marker di presenza batterica, Cusabio CSB-E09945h
- zonulina [ZNL], marker di permeabilità intestinale, Cusabio CSB-EQ027649HU
- TGFb, marker di fibrosi, Thermofisher BMS249-4
- TMAO, metabolita del microbiota, MyBioSource MBS7269386

La lettura allo spettroscopio è stata effettuata come da indicazioni presenti sulla scheda tecnica, da personale dedicato. Le analisi sono state effettuate in duplicato ed è stato registrato il valore medio; in nessun caso si è verificata una differenza >10% tra le misure duplicate.

Analisi statistica

Le variabili continue, sulla base del test di normalità (Shapiro-Wilk test), sono state espresse come media e deviazione standard o mediana e range interquartile (25-75°), e i confronti tra gruppi sono stati effettuati con test parametrici (es. t-test) o non-parametrici (es. Mann-Whitney test); le variabili sono rappresentate graficamente con box-plot o con istogrammi. Sono forniti dati per la popolazione complessiva e suddivisi sulla base dell'endpoint analizzato. Le variabili discrete sono riportate in tabelle di contingenza e analizzate con test di Chi². Per le analisi di regressione, è utilizzata una regressione logistica (*logit* o *probit*) in considerazione dell'endpoint principale binario ("fibrillazione atriale post-operatoria"). Le variabili con P<0.200 in univariata sono incluse nel modello multivariabile (c.d. "analisi multivariata"). Il modello è ottimizzato con approccio backward stepwise, analizzando ogni step con likelihood ratio test e con Wald test fino ad ottenere un modello minimo. La fitness del modello è valutata con c-statistic, test di Hosmer-Lemeshow, link test e con il grafico dei residui parziali. Le analisi di cut-off per eventuali variabili continue sono basate sulla AUC per generare variabili binarie. Gli odds ratio sono presentati con il relativo 95% percentile di intervallo di confidenza. La soglia di significatività statistica è fissata a 0.05. L'analisi è stata effettuata con STATA ver. 17 (licenza personale).

Iter autorizzativo

Il protocollo preliminare ed i dettagli dello studio sono stati definiti tra Novembre 2019 e Gennaio 2020. A causa della pandemia di Covid, con i conseguenti impegni urgenti e inderogabili dei colleghi interessati nel progetto, tutti i meeting sono stati posticipati a Maggio 2020. Il protocollo è stato sottomesso al Comitato Etico di questa Università in data 25/06/2020, con codice protocollo “Micro-AFib” (Co-Principal Investigator: Prof. M. Chello, Dott. A. Nenna), ed è stato discusso nella prima sessione a disposizione (28/07/2020). La notifica di approvazione da parte del Comitato Etico è arrivata in data 18/08/2020 e lo studio è iniziato con l’arruolamento del primo paziente in data 04/09/2020. L’arruolamento dei pazienti è stato completato il 15/05/2022, con l’arruolamento di 100 pazienti e con evidenza di 38 eventi di fibrillazione atriale post-operatoria, endpoint principale dello studio.

A seguire:

- lettera di trasmissione / richiesta di parere al Comitato Etico
- pagina di intestazione di protocollo
- sinossi
- consenso / informativa paziente
- espressione di parere favorevole del Comitato Etico alla conduzione dello studio
- *Gantt chart*

LETTERA DI TRASMISSIONE

Al Magnifico Rettore
Prof. Raffaele Calabrò
dell'Università Campus Bio-Medico di Roma
Via Alvaro del Portillo 21, 00128 Roma

Al Presidente del Comitato Etico
Prof. Francesco Pallone
dell'Università Campus Bio-Medico di Roma
Via Alvaro del Portillo 21, 00128 Roma

Oggetto: Richiesta di Parere alla conduzione di studio clinico

Titolo protocollo	Ruolo del microbiota e dei suoi metaboliti nei meccanismi di fibrosi miocardica e fibrillazione atriale post-operatoria
Codice protocollo (acronimo)	Micro-AFib
Promotore	Università Campus Bio-Medico di Roma
Sperimentatore Principale	Prof. Massimo Chello
Unità di Ricerca (UR)	Cardiochirurgia

Egredi,
il sottoscritto Prof. Massimo Chello, a seguito dell'interesse manifestato dal Dott. Antonio Nenna (Scuola di Specializzazione in Cardiochirurgia, UOC di Cardiochirurgia, Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche Integrate e Bioetica – XXXV ciclo, Unità Operativa di Cardiochirurgia), intende avviare lo studio in oggetto presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma, pertanto sottopone a questo Comitato Etico il protocollo e la documentazione ad esso allegata per opportuna valutazione.

Lo studio verrà condotto dal sottoscritto in qualità di sperimentatore principale e la documentazione necessaria per la valutazione da parte del Comitato Etico della Struttura sarà inviata dal sottoscritto.

Lo studio è di tipo (indicare con una crocetta i casi pertinenti):

interventistico osservazionale prospettico osservazionale retrospettivo

monocentrico multicentrico nazionale internazionale

con:

farmaco dispositivo medico integratore procedura diagnostica/chirurgica

PROTOCOLLO
STUDIO OSSERVAZIONALE

Titolo dello Studio:	Ruolo del microbiota e dei suoi metaboliti nei meccanismi di fibrosi miocardica e fibrillazione atriale post-operatoria
Codice del Protocollo:	Micro-AFib
Versione del Protocollo:	01
Data:	22/06/2020
Promotore:	Università Campus Bio-Medico di Roma
Centro Coordinatore:	Università Campus Bio-Medico di Roma (studio monocentrico)
Sperimentatore Principale:	Prof. Massimo Chello Cardiologia, m.chello@unicampus.it
Altri Sperimentatori:	Dott. Antonio Nenna Cardiologia, a.nenna@unicampus.it
	Dott.ssa Alice Laudisio Geriatría, a.laudisio@unicampus.it
	Dott.ssa Chiara Taffon Anatomia Patologica, c.taffon@unicampus.it
	Dott.ssa Anna Crescenzi Anatomia Patologica, a.crescenzi@unicampus.it
	Prof.ssa Silvia Angeletti Laboratorio Analisi, s.angeletti@unicampus.it
	Prof. Massimo Ciccozzi Statistica medica, m.ciccozzi@unicampus.it

Informazioni di Contatto

Nome Contatto Promotore	Antonio Nenna a.nenna@unicampus.it 3337014743
Nome Contatto per la Farmacovigilanza	-

SINOSI

TITOLO DELLO STUDIO	Ruolo del microbiota e dei suoi metaboliti nei meccanismi di fibrosi miocardica e fibrillazione atriale post-operatoria
SPONSOR	-
ELENCO CENTRI COINVOLTI	Università Campus Bio-Medico di Roma
BACKGROUND e RAZIONALE	La fibrillazione atriale è l'aritmia più comune in cardiocirurgia, con una incidenza del 30-35% nei pazienti adulti, ed è associata a peggioramento degli outcomes clinici nel breve e nel lungo termine. Il ruolo della fibrosi atriale è stato notevolmente studiato negli ultimi anni come "via finale comune" dei vari fattori di rischio. Il microbiota ed i suoi metaboliti potrebbero essere determinanti nei meccanismi di fibrosi per la patogenesi della fibrillazione atriale.
OBIETTIVI DELLO STUDIO	Lo studio si propone di analizzare l'effetto del microbiota e dei suoi metaboliti nella fibrosi del tessuto cardiaco (valutato a livello dell'atrio destro) e di vasi di grosso/medio calibro, per valutarne il ruolo nella patogenesi della fibrillazione atriale post-operatoria ed in altre complicanze post-operatorie. Endpoint primario: valutazione fibrillazione atriale postoperatoria Non sono richieste analisi invasive post-operatorie escluse dalla routine assistenziale per gli scopi di questo studio. Endpoint secondari Complicanze postoperatorie annotate in diario clinico. Non sono richieste analisi invasive post-operatorie escluse dalla routine assistenziale per gli scopi di questo studio.
DISEGNO DELLO STUDIO	Osservazionale prospettico, studio su campioni biologici
POPOLAZIONE IN STUDIO	Pazienti sottoposti ad intervento cardiocirurgico Numero di pazienti da arruolare: 100 Criteri di inclusione: intervento chirurgico in circolazione extracorporea Criteri di esclusione: nessuno Criteri per il ritiro: decisione del paziente Sostituzione dei pazienti: nessuna
TEMPISTICHE DELLO STUDIO	Durata dello studio per paziente: ricovero ospedaliero Durata dell'arruolamento: 2 anni Durata dello studio in toto: 2 anni
DIMENSIONAMENTO DEL CAMPIONE E METODI STATISTICI DI ANALISI DEI DATI	In considerazione della natura osservazionale dello studio e dell'assenza di riferimenti di letteratura, e considerando l'attuale incidenza di eventi aritmici postoperatori, verrà effettuata una analisi preliminare dopo l'arruolamento di 100 pazienti (con 35 eventi attesi). Successivamente verrà effettuata l'analisi della dimensione campionaria definitiva dello studio. La fase preliminare di arruolamento durerà pertanto circa 13-15 settimane



INFORMATIVA SUL TRATTAMENTO DEI DATI PERSONALI COMUNI E PARTICOLARI PER RICERCA SCIENTIFICA

Ai sensi dell'Art. 13 del Regolamento Generale sulla protezione dei Dati Personali (UE) 2016/679 o GDPR

Gentile Signora/Egregio Signore,
Lei ha accettato di partecipare allo studio clinico dal titolo:

Ruolo del microbiota e dei suoi metaboliti nei meccanismi di fibrosi miocardica e fibrillazione atriale post-operatoria

Acronimo: Micro-AFib

Promotore dello Studio: Università Campus Bio-Medico di Roma

L'Università Campus Bio-Medico utilizzerà le informazioni che La riguardano per le finalità legate allo studio. La presente informativa ha lo scopo di spiegarle quali siano queste informazioni, per quali scopi verranno utilizzate, a chi potranno essere comunicate, e quali sono i diritti del partecipante ad uno studio relativi alla riservatezza.

Lei potrà decidere, tramite un suo atto di volontà libero, se autorizzare o meno l'Università Campus Bio-Medico di Roma al trattamento dei Suoi dati personali e particolari, firmando il modello predisposto che troverà alla fine del presente documento

1. Base giuridica del trattamento

Il trattamento dei Suoi dati personali viene effettuato dal Titolare nell'ambito di esecuzione dei propri compiti di interesse pubblico (per finalità di ricerca scientifica) ai sensi dell'art. 6, par. 1, lett. e) del GDPR. Il trattamento delle categorie particolari di dati personali viene effettuato per fini di ricerca scientifica ai sensi dell'art. 9, par. 2, lett. g) e j) del GDPR e sulla base di un consenso esplicito da Lei prestato ai sensi dell'art. 7, comma 2, lett. a) delle Regole deontologiche per i trattamenti a fini statistici o di ricerca scientifica, del Decreto Legislativo n. 101/2018 e delle "Linee Guida per i trattamenti di dati personali nell'ambito di sperimentazioni cliniche di medicinali" del 24 luglio 2008 nonché dalle Autorizzazioni Generali del Garante n. 8/2016 (Autorizzazione al trattamento dei dati genetici) e n. 9/2016 (Autorizzazione al trattamento dei dati personali effettuato per scopi di ricerca scientifica).

2. Chi è il Titolare del trattamento dei Suoi dati personali?

Il Titolare del trattamento dei Suoi dati personali è l'**Università Campus-Bio-Medico di Roma**, con sede in Roma, Via Alvaro del Portillo 21, 00128 Roma quale "**Centro di Sperimentazione**"

3. Chi è il Responsabile del trattamento.

Il Responsabile del trattamento dei dati che la riguardano è l'Università Campus-Bio-Medico di Roma, e il medico principale dello studio (Prof. Massimo Chello, Dott. Antonio Nenna).



Università Campus Bio-Medico di Roma
Prof. Massimo Chello
Area Cardiochirurgia
SEDE

Roma il 17/08/2020
Prot.: **64/20 OSS** ComEt CBM

Oggetto: Espressione di parere su studio osservazionale prospettico monocentrico dal titolo:
“Ruolo del microbiota e dei suoi metaboliti nei meccanismi di fibrosi miocardica e fibrillazione atriale post-operatoria”

Codice protocollo: **Micro-AFib**
Studio non profit;
Promotore: UCBM
Sperimentatore UCBM: Prof. Massimo Chello

In merito al protocollo indicato in oggetto, esaminata la documentazione ricevuta completa in data 27/07/2020:

1. Lettera di trasmissione per richiesta di valutazione di studio osservazionale del 22/06/2020;
2. Allegato 1 alla lettera di intenti -Elenco esami previsti nel protocollo di studio dentro/fuori profilo assistenziale datato 22/06/2020;
3. Dichiarazione pubblica sul conflitto di interessi dello Sperimentatore datata 22/06/2020;
4. Dichiarazione sulla natura indipendente e non profit dello studio (All. 1 D.M. 17/12/2004) datata 22/06/2020;
5. Dichiarazione sulla natura osservazionale dello studio datata 22/06/2020;
6. Dichiarazione relativa alle U.R./U.O.C. collaboranti datata 22/06/2020;
7. Scheda di fattibilità locale per studio non profit;
8. Dichiarazione su fonti di finanziamento/supporto per studio non profit datata 22/06/2020;
9. Protocollo versione 01 del 22/06/2020;
10. Sinossi in italiano versione n. 1 del 22/06/2020;
11. Foglio informativo e Modulo consenso informato per la partecipazione allo studio versione 01 del 22/06/2020;
12. Informativa e consenso al trattamento dati personali comuni e particolari per ricerca scientifica versione n. 01 del 22/06/2020;
13. Dichiarazione sulle procedure adottate per garantire la protezione dei dati del 22/06/2020;
14. Curriculum vitae dello sperimentatore principale

il Comitato Etico dell'Università Campus Bio-Medico di Roma, riunitosi in data **28 luglio 2020** in modalità telematica, accertata la sussistenza dei requisiti del DM 17 dicembre 2004,

APPROVA

la conduzione dello studio presso questa Università.

Segreteria Tecnico-Scientifica del Comitato Etico – comitato.etico@unicampus.it
(+39) 06-22541 8812- 8718 - 8873 fax 06-225411920 – Via Álvaro del Portillo 5, Roma 00128

1

Phase	Details (months, duration of the PhD program)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
1) Study design		[Red bar from month 2 to 10]																		
	Protocol drafting, revision and approval	[Grey bar from month 2 to 10, with a white circle at month 8]																		
	COVID-19 related delays	[Black bar from month 2 to 10]																		
	IRB submission and approval	[Grey bar from month 2 to 10, with a white diamond at month 10]																		
2) Study conduction		[Red bar from month 12 to 32]																		
	<i>2a) Patients enrollment</i>	[Red bar from month 12 to 28]																		
	Patients enrollment (initial phase, overall feasibility)	[Grey bar from month 12 to 24, with a white circle at month 24]																		
	Patients enrollment (complete)	[Grey bar from month 12 to 26, with a white diamond at month 26]																		
<i>2b) Histology and ELISA</i>		[Red bar from month 12 to 32]																		
	Hystologic analysis	[Grey bar from month 12 to 30, with a white circle at month 24 and a white diamond at month 30]																		
	Microbiota (ELISA) analysis (acquisition, set up, analysis)	[Grey bar from month 12 to 32, with a white diamond at month 32]																		
	Database creation and preparation for final analysis	[Grey bar from month 12 to 30, with a white diamond at month 30]																		
3) Study reporting		[Red bar from month 12 to 32]																		
	Data analysis	[Grey bar from month 12 to 32, with a white diamond at month 32]																		
	Manuscript drafting and presentation of final results	[Grey bar from month 12 to 32, with a white diamond at month 32]																		

CAPITOLO 3

RISULTATI

Sono stati arruolati complessivamente 100 pazienti, registrando 38 eventi di fibrillazione atriale post-operatoria (*Post Operative Atrial Fibrillation*, POAF). La presentazione dei risultati è distinta sulla base dell'endpoint primario (POAF vs persistenza di ritmo sinusale, ovvero "no POAF").

Le caratteristiche pre-operatorie sono riassunte in **Tabella 1**.

Tabella 1. Variabili pre-operatorie.

	Pazienti totali N=100	POAF N=38	No POAF N=62	P value
Età	69 (64-78)	68.5 (64-78)	69.5 (64-78)	0.646
Sesso maschile	58 (58%)	24 (63.2%)	34 (54.8%)	0.413
Ipertensione	98 (98%)	37 (97.4%)	60 (96.8%)	0.866
Dislipidemia	75 (75%)	28 (73.7%)	47 (75.8%)	0.812
Diabete	54 (54%)	24 (63.2%)	30 (48.4%)	0.150
Fumatori o ex	61 (61%)	29 (76.3%)	52 (83.9%)	0.350
Alcol (unità/sett)	4 (2-5)	3 (1-5)	4 (2-6)	0.102
Emoglobina (g/dL)	12.8 (11.7-13.9)	12.2 (11.7-13.6)	13.1 (11.8-14.0)	0.062
Creatinina (mg/dL)	1.1 (0.9-1.3)	1.1 (0.8-1.3)	1.1 (0.9-1.3)	0.421
BMI (kg/m ²)	31.9 (29.1-34.5)	31.9 (29.6-34.6)	31.3 (28.4-34.3)	0.432
LVEDD (mm)	51 (48-53)	51.5 (48-53)	49 (47-52)	0.098
LVEF (%)	55 (50-60)	55 (50-60)	50 (50-55)	0.081
LAVI	33 (31-35)	33 (31-35)	33 (30-35)	0.731
LAVI ≥ 34	44 (44%)	17 (44.7%)	27 (43.5%)	0.907
TAPSE (mm)	21 (17-22)	21 (17-23)	19.5 (17-22)	0.086

BMI: body mass index; LVEDD: diametro telediastolico ventricolo sinistro; LVEF: frazione di eiezione ventricolare sinistra; LAVI: volume atrio sinistro indicizzato; TAPSE: escursione sistolica del piano dell'anello tricuspidalico, marker di funzione ventricolare destra.

La popolazione arruolata ha profilo di rischio cardiovascolare elevato per classici fattori di rischio, con buona funzione sistolica ventricolare sinistra e destra, seppur con disfunzione diastolica nel 44% dei casi. Non ci sono differenze significative nelle variabili pre-operatorie nei pazienti che hanno successivamente avuto POAF; in accordo con quanto noto dalla letteratura, i pazienti con POAF hanno trend tendente ad anemia pre-operatoria (P=0.062).

Sulla base dei criteri di inclusione ed esclusione dello studio, i pazienti sono stati sottoposti a chirurgia coronarica (82%), sostituzione valvolare aortica (8%) o chirurgia dell'aorta ascendente (10%), tutti in anestesia generale e circolazione extracorporea con cannulazione venosa singola. Sono stati esclusi i pazienti candidati a chirurgia mitralica o tricuspidalica in quanto il rischio di aritmie atriali postoperatorie è strettamente correlato al remodeling delle camere cardiache conseguente al sovraccarico di pressione o volume. Non ci sono differenze significative nel rischio operatorio globale dei pazienti (EuroSCORE II) e nella durata di circolazione extracorporea e clampaggio aortico (**Tabella 2**).

Tabella 2. Variabili intra-operatorie.

	Pazienti totali	POAF	No POAF	P value
	N=100	N=38	N=62	
Tipo intervento				0.857
Bypass aortocoronarici	82 (82%)	32 (84.2%)	50 (80.6%)	
Sostituzione valvolare aortica	8 (8%)	3 (7.9%)	5 (8.1%)	
Sostituzione aorta ascendente	10 (10%)	3 (7.9%)	7 (11.3%)	
Durata CEC (min)	55 (41-69)	56 (45-71)	54 (40-69)	0.594
Durata XCL (min)	46 (30-58)	47 (32-59)	46 (30-58)	0.604
EuroSCORE II	2.21 (1.70-3.03)	2.27 (1.7-3.4)	2.20 (1.6-2.8)	0.454

CEC: circolazione extra-corporea; XCL: clampaggio aortico.

Le complicanze e le caratteristiche post-operatorie sono riassunte in **Tabella 3**.

La POAF è stata la complicanza più frequente, osservata nel 38% dei casi, in linea con i dati di letteratura. E' stato effettuato drenaggio di versamento pleurico tramite toracentesi nel 26% dei casi, mentre l'incidenza di versamento pericardico significativo (> 1 cm o necessitante drenaggio chirurgico) è stata del 3%.

Tabella 3. Complicanze e variabili post-operatorie.

	N=100
Fibrillazione atriale post-operatoria (POAF)	38 (38%)
Toracentesi	26 (26%)
Durata degenza post-operatoria (giorni)	7 (5.5-8)
Trasfusioni emazie concentrate (numero unità)	1 (0-2)
Mortalità ospedaliera	0 (0%)
Sanguinamento postoperatorio con revisione chirurgica	2 (2%)
Versamento pericardico significativo	3 (3%)

Valutazione istologica atrio destro

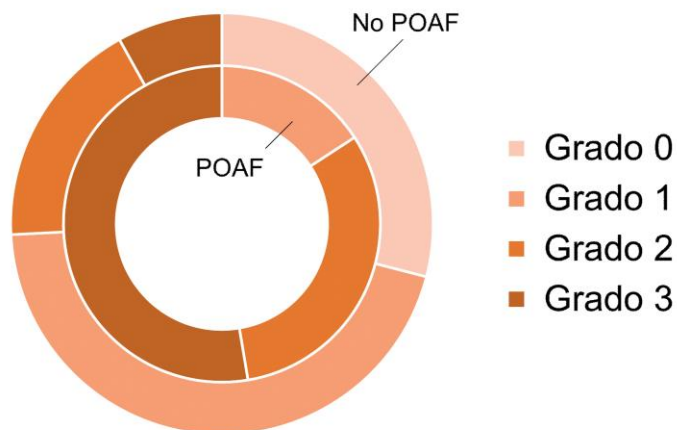
L'analisi istologica del tessuto atriale destro è stata effettuata in tutti i pazienti (**Tabella 4**). E' stato riscontrato un grado più elevato di fibrosi nel tessuto atriale dei pazienti che hanno successivamente sviluppato fibrillazione atriale (P=0.001). Inoltre i pazienti che sviluppano POAF hanno un maggior livello (qualitativo) di angiogenesi tissutale e di infiltrato infiammatorio nel tessuto atriale destro.

Tabella 4. Valutazione istologica atrio destro.

	Pazienti totali N=100	POAF N=38	No POAF N=62	P value
Fibrosi				0.001
Grado 0	18 (18%)	0 (0%)	18 (29.0%)	
Grado 1	34 (34%)	6 (15.8%)	28 (45.2%)	
Grado 2	23 (23%)	12 (31.6%)	11 (17.7%)	
Grado 3	25 (25%)	20 (52.6%)	5 (8.1%)	
Fibrosi grado ≥ 2	48 (48%)	32 (84.2%)	16 (25.8%)	0.001
Angiogenesi				0.018
Grado 0-1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Grado 2	62 (62%)	18 (47.4%)	44 (71.0%)	
Grado 3	38 (38%)	20 (52.6%)	18 (29.0%)	
Infiammazione				0.033
Grado 0	44 (44%)	14 (36.8%)	30 (48.4%)	
Grado 1	47 (47%)	17 (44.7%)	30 (48.4%)	
Grado 2	9 (9%)	7 (18.4%)	2 (3.2%)	

Un elevato grado istologico di fibrosi ha incidenza 3.2 volte maggiore dei pazienti che sviluppano POAF (**Figura 1**).

Figura 1. Grading qualitativo istologico del livello di fibrosi.



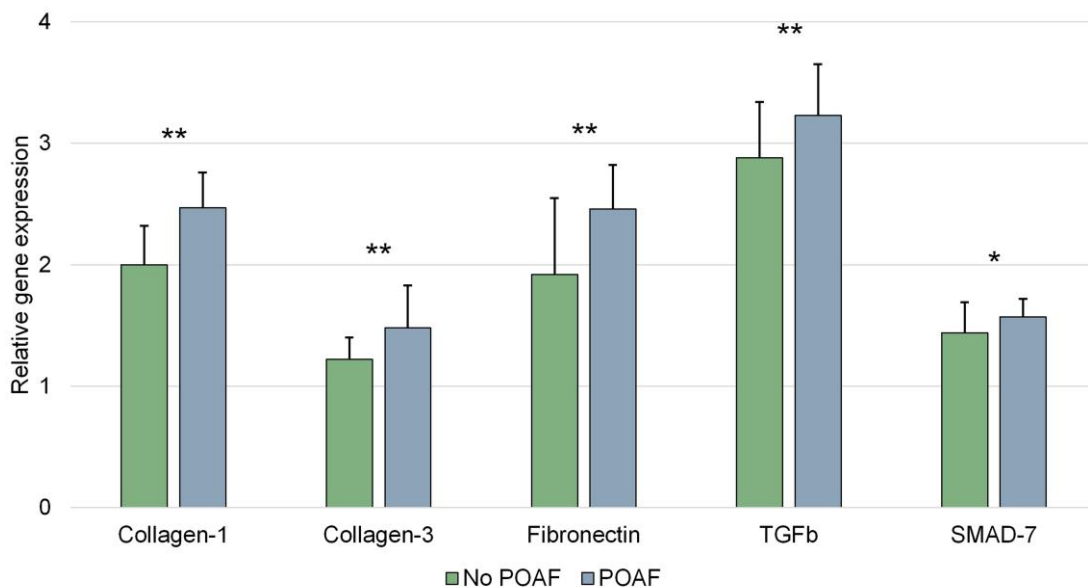
Questi dati sono stati confermati tramite valutazione quantitativa in qRT-PCR (**Tabella 5, Figura 2**), che ha mostrato un aumento nella espressione genica per i geni interessati nei meccanismi di fibrosi (TGFb e SMAD-2) e nella produzione di matrice extracellulare (Collagen-1, Collagen-3 e Fibronectin) nei pazienti che successivamente hanno sviluppato fibrillazione atriale post-operatoria.

Tabella 5. Risultati di qRT-PCR per fibrosi.

	Pazienti totali N=100	POAF N=38	No POAF N=62	P value
Collagen-1	2.2 (1.9-2.5) 2.18±0.39	2.4 (2.2-2.7) 2.47±0.29	2.0 (1.8-2.3) 2.00±0.32	0.001
Collagen-3	1.3 (1.1-1.5) 1.32±0.29	1.6 (1.1-1.8) 1.48±0.35	1.2 (1.0-1.4) 1.22±0.18	0.001
Fibronectin	2.2 (1.7-2.6) 2.13±0.60	2.4 (2.1-2.8) 2.46±0.36	2.0 (1.3-2.4) 1.92±0.63	0.001
TGFb	3.0 (2.6-3.4) 2.98±0.48	3.2 (2.9-3.6) 3.23±0.42	2.9 (2.5-3.2) 2.88±0.46	0.001
SMAD-2	1.5 (1.3-1.7) 1.49±0.22	1.6 (1.5-1.7) 1.57±0.15	1.5 (1.3-1.6) 1.44±0.25	0.030

L'espressione dei geni analizzati è normalizzata per l'espressione del gene di riferimento GADPH.

Figura 2. Espressione genica relativa nei geni interessati nei meccanismi di fibrosi, sulla base della successiva evidenza di fibrillazione atriale post-operatoria.



** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Nel dettaglio, i pazienti che sviluppano successivamente POAF hanno incremento di espressione di Collagen-1 del 20% circa, di Collagen-3 e Fibronectin del 25% circa, e di TGFb e SMAD-2 del 5-10% circa, supportando l'ipotesi che la deposizione di matrice extracellulare sia sostenuta da meccanismi TGFb/SMAD correlati.

Risultati ELISA

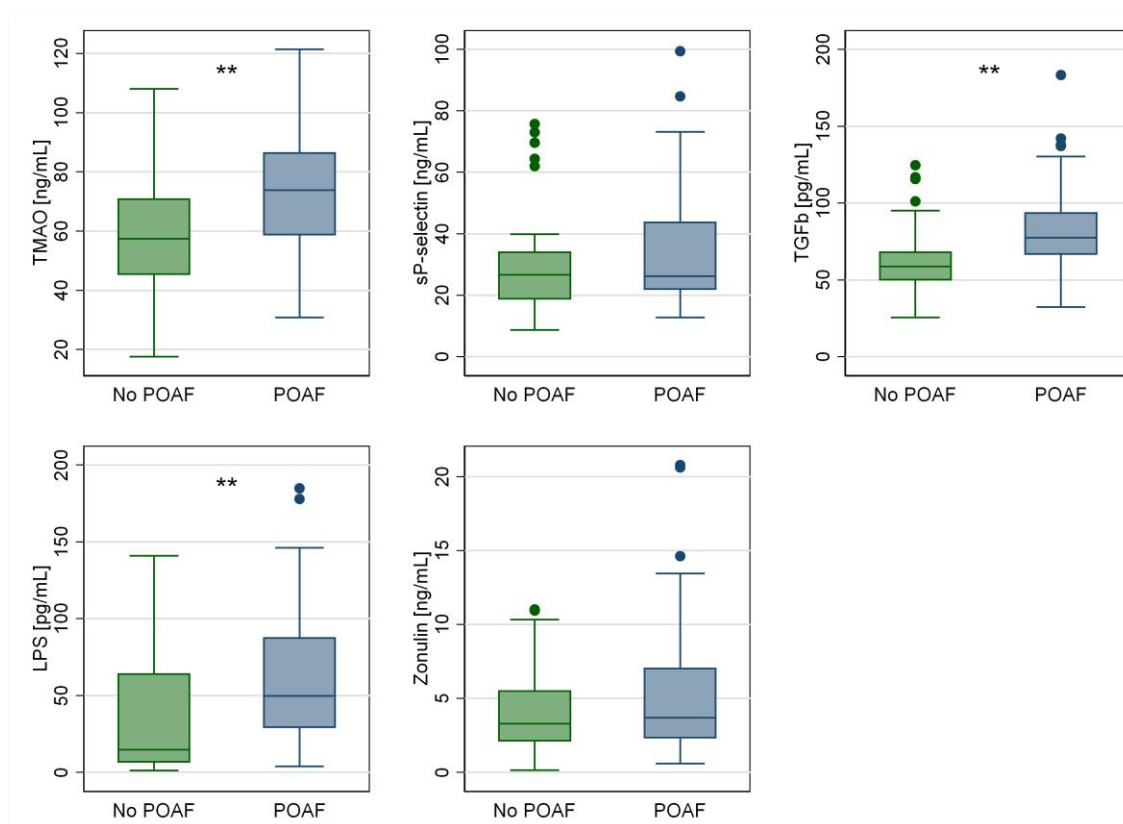
Le analisi ELISA effettuate su siero (con prelievi ematici effettuati la sera prima dell'intervento chirurgico) hanno mostrato che i pazienti che sviluppano POAF hanno aumentati livelli di trimetilammina-N-ossido [TMAO] (principale prodotto metabolico del microbiota intestinale) (+28%, $P=0.001$), TGFb (molecola implicata nei meccanismi pro-fibrotici) (+32%, $P=0.001$) e lipopolisaccaride [LPS] (marker di presenza batterica) ($P=0.001$) (Tabella 6, Figura 3).

I livelli di zonulina (marker e modulatore della permeabilità intestinale tramite disassemblaggio delle tight junction intercellulari) e sP-selectina (marker e modulatore di attivazione piastrinica) sono simili tra i due gruppi ($P=0.218$ e $P=0.189$, rispettivamente) (Tabella 6, Figura 3).

Tabella 6. Risultati di ELISA per endpoint primario (POAF).

	Pazienti totali N=100	POAF N=38	No POAF N=62	P value
TMAO [ng/mL]	61.7 (51.6-75.2)	73.8 (58.6-86.7)	57.5 (45.2-71.1)	0.001
sP-selectin [ng/mL]	26.6 (20.0-36.5)	26.2 (21.7-44.0)	26.6 (18.6-34.2)	0.189
TGFb [pg/mL]	66.2 (51.5-75.8)	77.3 (66.2-94.1)	58.6 (49.6-68.5)	0.001
LPS [pg/mL]	28.9 (10.9-68.0)	49.7 (28.9-87.9)	14.7 (6.3-64.6)	0.001
Zonulin [ng/mL]	3.47 (2.13-5.94)	3.70 (2.30-7.08)	3.30 (2.08-5.56)	0.218

Figura 3. Box-plot per risultati di ELISA.



** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Analisi di regressione

Le variabili cliniche preoperatorie ed intraoperatorie e i valori sierici derivanti dalla analisi ELISA sono stati esplorati per identificare i parametri predittivi di POAF tramite regressione logistica. Sono state escluse le variabili derivate da analisi istologiche (qualitative e quantitative) in quanto la loro applicazione clinica verrebbe influenzata dal tempo tecnico necessario per le analisi.

I risultati della analisi univariata sono mostrati in **Tabella 7**.

Tabella 7. Regressione univariata per “fibrillazione atriale post-operatoria”.

Variabile	Odds ratio	95% CI	P value	Incluso in multivariata?
Età	0.99	0.93-1.04	0.729	-
Sesso maschile	1.41	0.62-3.22	0.414	-
Ipertensione	1.23	0.11-14.08	0.866	-
Dislipidemia	0.89	0.35-2.25	0.812	-
Diabete	1.82	0.80-4.17	0.152	+
Fumo	0.62	0.22-1.69	0.352	-
Alcol	0.79	0.65-0.97	0.028	+
Emoglobina	0.77	0.54-1.08	0.138	+
Creatinina	0.50	0.09-2.64	0.418	-
BMI	0.95	0.84-1.09	0.511	-
LVEDD	0.89	0.78-1.02	0.104	+
LVEF	0.89	0.81-0.98	0.024	+
LAVI	0.96	0.82-1.13	0.643	-
LAVI \geq 34	1.04	0.46-2.36	0.907	-
TAPSE	0.89	0.78-1.02	0.093	+
Tipo intervento				-
BAC	Ref	Ref	Ref	
SVA	0.93	0.21-4.19	0.933	
SAA	0.67	0.16-2.78	0.581	
Durata CEC	1.01	0.98-1.03	0.629	-
Durata XCL	1.01	0.98-1.03	0.618	-
EuroSCORE II	1.28	0.78-2.10	0.322	-
TMAO	1.05	1.02-1.08	0.001	+
sP-selectin	1.03	1.00-1.05	0.035	+
TGFb	1.04	1.02-1.06	0.001	+
LPS	1.01	1.00-1.02	0.003	+
Zonulin	1.10	0.99-1.23	0.059	+

Le variabili con $P < 0.200$ sono state incluse nel modello iniziale di multivariata, mostrato in **Tabella 8**.

Tabella 8. Regressione multivariata, modello iniziale.

Variabile	Odds ratio	95% CI	P value	Incluso in modello finale?
Diabete	1.99	0.54-7.39	0.299	-
Alcol	0.70	0.49-0.99	0.047	-
Emoglobina	0.77	0.47-1.27	0.313	+
LVEDD	1.00	0.85-1.19	0.944	-
LVEF	0.93	0.80-1.07	0.305	-
TAPSE	0.89	0.72-1.10	0.293	+
TMAO	1.08	1.03-1.14	0.001	+
sP-selectin	0.94	0.89-0.99	0.041	-
TGFb	1.07	1.03-1.11	0.001	+
LPS	1.02	1.00-1.04	0.003	-
Zonulin	1.07	0.90-1.27	0.452	-

Questo modello è stato ottimizzato con approccio backward stepwise, analizzando ogni step con likelihood ratio test e con Wald test fino ad ottenere in maniera univoca il modello mostrato in **Tabella 9**.

Tabella 9. Regressione multivariata, modello finale.

Variabile	Odds ratio	95% CI	P value
Emoglobina	0.75	0.59-0.97	0.030
TAPSE	0.85	0.73-0.99	0.044
TMAO	1.05	1.02-1.08	0.001
TGFb	1.04	1.01-1.06	0.001

La fitness del modello è stata valutata con c-statistic (AUC, area al di sotto della curva ROC) (**Figura 4**), il test di Hosmer-Lemeshow, il link test e con il grafico dei residui parziali per ogni variabile (*logitcprplot*) (**Figura 5**). Tali analisi hanno confermato una buona discriminazione e calibrazione del modello.

AUC (c-statistic) = 0.859 (95%CI 0.824-0.894)

Hosmer Lemeshow $\chi^2 = 9.08$, P=0.335

Link test (prediction squared), P=0.338

Figura 4. Curva ROC riferita al modello di regressione logistica in Tabella 8.

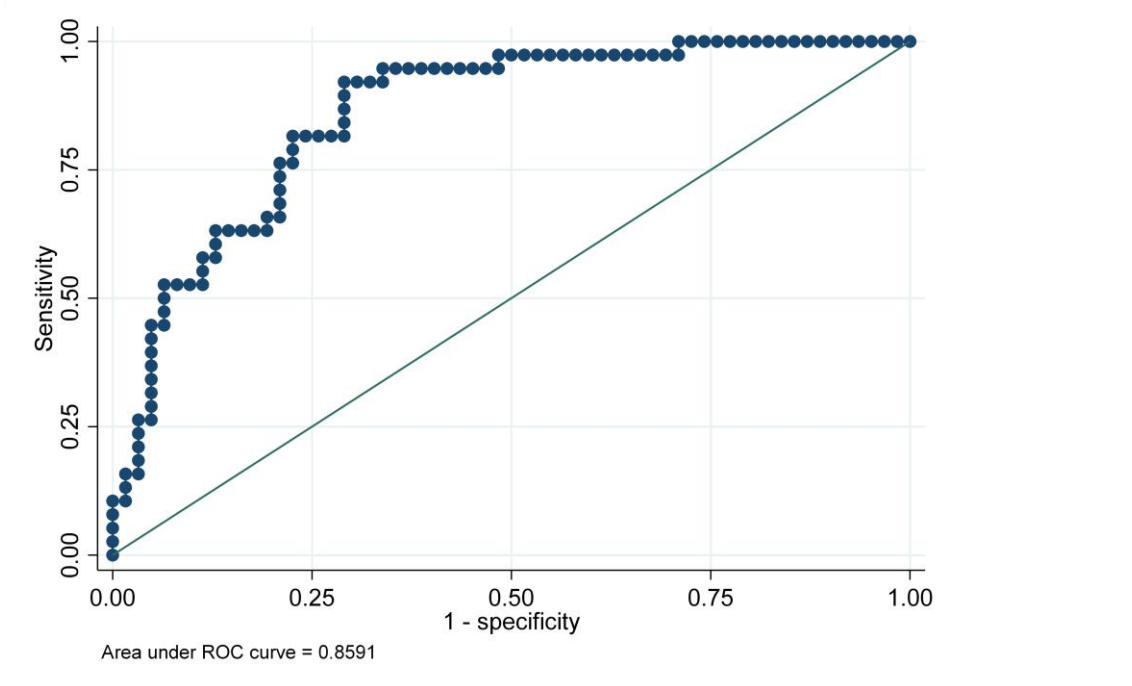
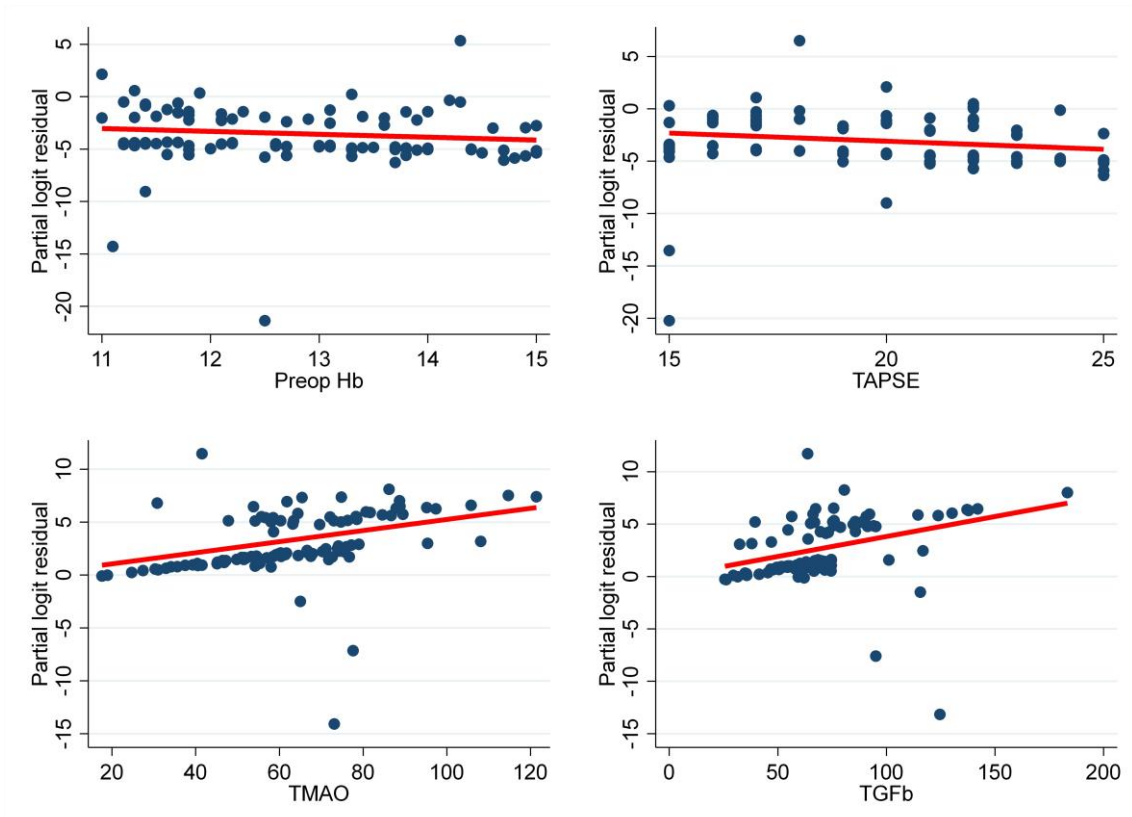


Figura 5. Grafico dei residui parziali (i.e. component-plus-residual plot) per ogni variabile del modello di regressione logistica in Tabella 8.



Al fine di migliorare e semplificare l'applicabilità clinica di questo modello di regressione, è stata effettuata una analisi di cut-off basata sulla AUC (*dtroc*) per le 4 variabili continue inserite nel modello per trasformarle in variabili binarie.

L'analisi di cut-off è mostrata in **Tabella 10**.

Tabella 10. Analisi di cut-off per creazione di variabili binarie.

Variabile	AUC	95% CI	Cut-off	Se	Sp	PPV	NPV
Emoglobina	0.41	0.32-0.52	13.1	39.5	48.4	31.9	56.6
TAPSE	0.40	0.30-0.50	20	50.0	37.1	32.8	54.8
TMAO	0.77	0.68-0.85	61.8	71.1	85.5	73.5	80.3
TGFb	0.74	0.65-0.82	72.1	65.8	62.9	54.0	78.0

Inserendo le variabili binarie così ottenute nel modello di regressione in **Tabella 9**, si ottiene un modello di regressione (**Tabella 11**) che è stato ulteriormente ottimizzato. La **Tabella 12** mostra il modello finale di regressione multivariata con variabili binarie.

Tabella 11. Regressione multivariata con variabili binarie, modello iniziale.

Variabile	Odds ratio	95% CI	P value	Incluso in modello finale?
Hb \geq 13.1 g/dL	0.40	0.17-0.97	0.042	+
TAPSE \geq 20 mm	0.23	0.10-0.56	0.001	+
TMAO \geq 61.8 ng/mL	7.18	2.57-20.03	0.001	+
TGFb \geq 72.1 pg/mL	1.77	0.75-4.19	0.195	-

Tabella 12. Regressione multivariata con variabili binarie, modello finale.

Variabile	Odds ratio	95% CI	P value
Hb < 13.1 g/dL	2.37	1.07-5.24	0.033
TAPSE < 20 mm	2.38	1.17-4.83	0.017
TMAO \geq 61.8 ng/mL	2.88	1.35-6.16	0.006

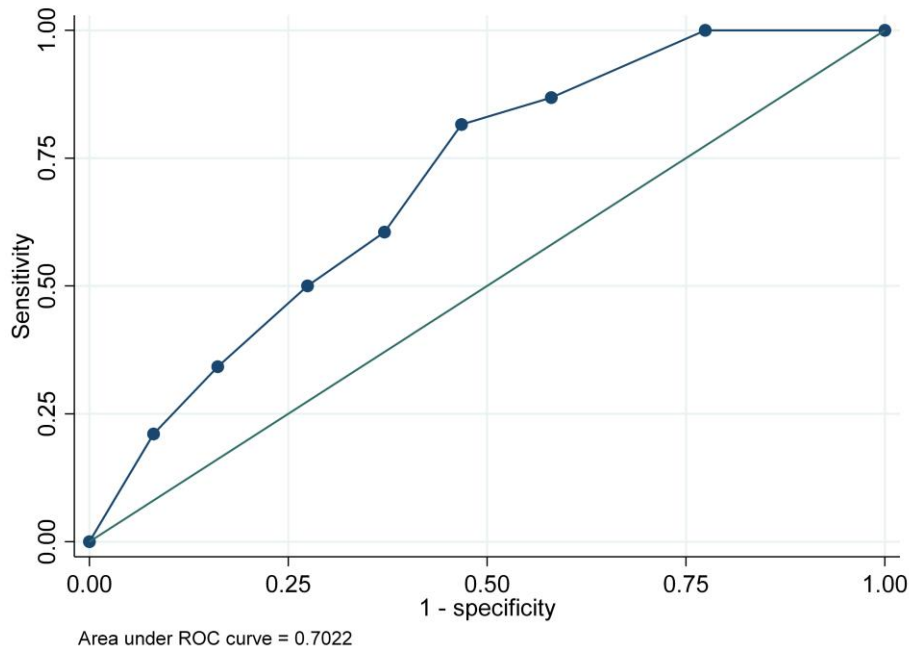
Tali analisi di fitness hanno confermato una buona discriminazione e calibrazione del modello in **Tabella 12**.

AUC (c-statistic) = 0.702 (95% CI 0.675-0.729) (**Figura 6**)

Hosmer Lemeshow $\chi^2 = 8.11$, $P=0.230$

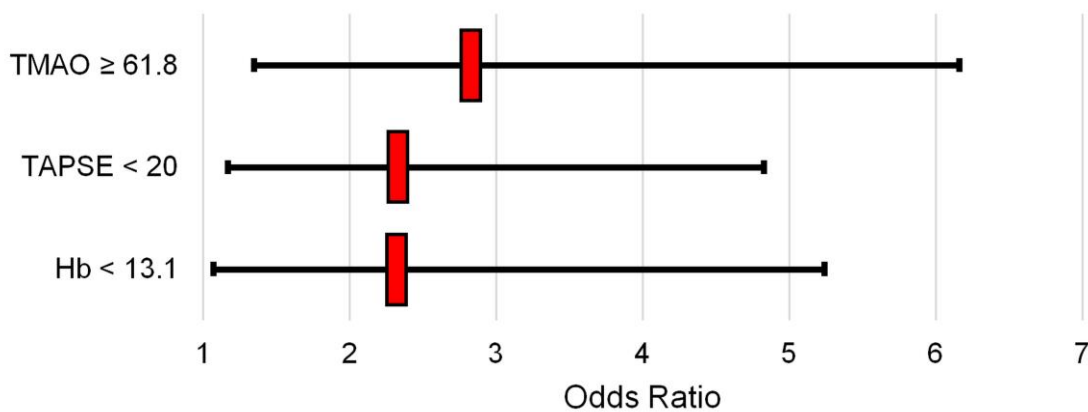
Link test (prediction squared), $P=0.709$

Figura 6. Curva ROC riferita al modello di regressione logistica in Tabella 12.



Anemia pre-operatoria ($Hb < 13.1$ g/dL, $P=0.033$), ridotta funzione sistolica ventricolare destra ($TAPSE < 20$ mm, $P=0.017$) ed elevati livelli di TMAO nel siero (≥ 61.8 ng/mL, $P=0.006$) sono fattori associati ad una maggiore probabilità di POAF (**Figura 7**).

Figura 7. Dot-plot per odds ratio riferiti al modello in Tabella 12.



Al fine di esplorare la relazione tra prodotti del microbiota intestinale (livelli di TMAO), presenza di fibrosi miocardica significativa, livelli dei biomarker di fibrosi e rischio di POAF, sono state effettuate delle analisi di interazione e una regressione con co-variabili endogene (comando *ivprobit*).

In regressione univariata, valori elevati di TMAO (≥ 61.8 ng/mL) hanno un odds ratio di 2.67 (95% CI 1.19-5.98, $P=0.017$) per fibrosi miocardica di grado ≥ 2 . Considerando invece la POAF come variabile dipendente, sia il TMAO (OR 4.16, $P=0.001$) sia la fibrosi (OR 15.33, $P=0.001$) sono significativamente correlati in univariata. Successivamente le variabili TMAO e fibrosi sono state valutate sia in bi-variata sia valutandone l'interazione. L'effetto della variabile di interazione è risultato significativo, pertanto TMAO e fibrosi sono parzialmente correlati (**Tabella 13**).

Tabella 13. Regressione (logit) con interazione tra TMAO e fibrosi.

	Odds ratio	95% CI	P value	
Variabile dipendente: fibrosi (grado ≥ 2)				
TMAO (≥ 61.8 ng/mL)	2.67	1.19-5.98	0.017	
Variabile dipendente: POAF (univariata)				
TMAO (≥ 61.8 ng/mL)	4.16	1.74-9.93	0.001	
Fibrosi (grado ≥ 2)	15.33	5.41-43.43	0.001	
Variabile dipendente: POAF (bivariata)				
TMAO (≥ 61.8 ng/mL)	3.43	1.23-9.58	0.019	
Fibrosi (grado ≥ 2)	13.86	4.74-40.51	0.001	
Variabile dipendente: POAF (interazione)				
Fibrosi # TMAO				
0	1	0.43	0.12-1.21	0.063
1	0	1.25	0.49-3.17	0.638
1	1	2.75	1.22-6.17	0.014
Variabile dipendente: POAF (fattoriale completo)				
Fibrosi (grado ≥ 2)				
TMAO (≥ 61.8 ng/mL)				
Fibrosi # TMAO				
1	1	6.60	1.34-32.52	0.020

Per conferma della associazione fibrosi-correlata tra TMAO e POAF, è stato analizzato un modello di regressione probit con covariate endogene, considerando altresì la relazione tra fibrosi istologica, biomarkers (TGFb in ELISA), e TMAO (**Tabella 14**). Tale modello ha AUC (c-statistic) di 0.895 (95% CI 0.855-0.935).

Tabella 14. Regressione (probit) con covariate endogene.

	Coefficiente	95% CI	P value	
Var. dipendente: POAF				
Fibrosi (grado ≥ 2)	2.51	2.05-2.96	0.001	
TMAO	2.08	1.75-2.1	0.001	
Var. dipendente: fibrosi (grado ≥ 2)				
TMAO	1.21	1.03-1.40	0.034	
TGFb (ELISA)	1.51	1.32-1.71	0.018	
	ρ_{12}	-1.82	-2.85/-0.79	0.001
	σ_{12}	-0.74	-0.89/-0.61	0.001
Err. corr (e.fibrosi, e.POAF)	-0.95	-0.99/-0.66	-	
SD (e.fibrosi)	0.47	0.41-0.54	-	

Endpoint secondario: toracentesi

E' stata effettuata una sub-analisi dei dati ELISA considerando la necessità di toracentesi post-operatoria come endpoint, in quanto possono essere correlate ad uno squilibrio idro-elettrolitico peggiorato dalla infiammazione sistemica della CEC e potenzialmente aggravato da modifiche di permeabilità intestinale. Non sono emerse differenze statisticamente significative (**Tabella 15**) e non sono state effettuate ulteriori analisi descrittive.

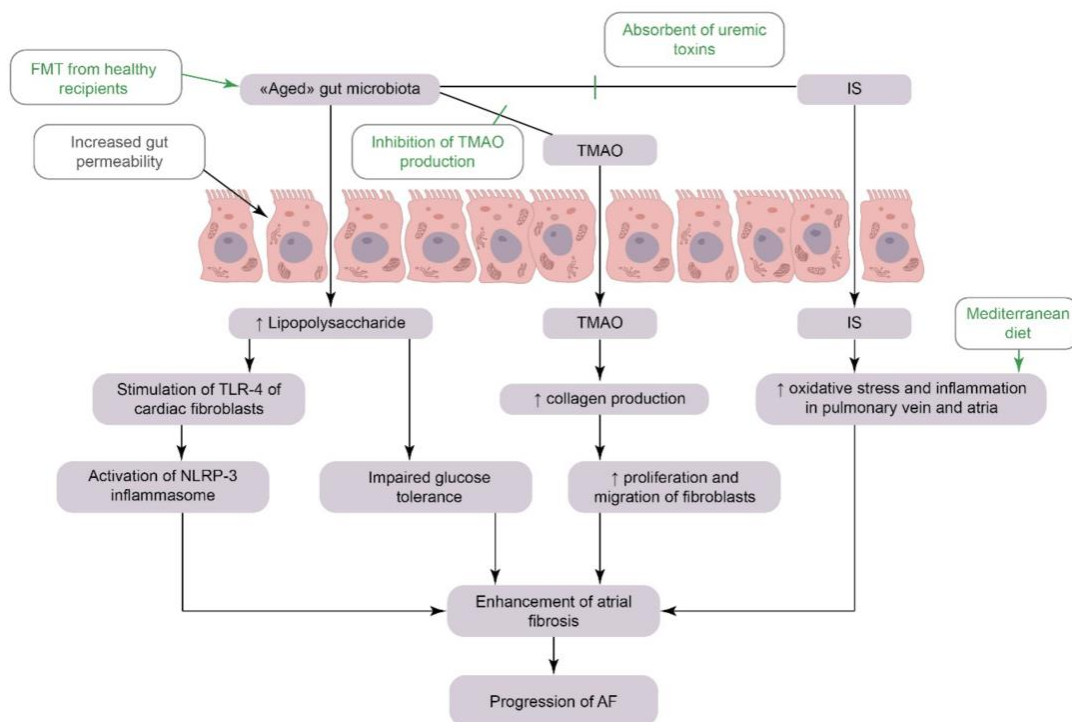
Tabella 15. Risultati di ELISA per endpoint secondario (toracentesi).

	Pazienti totali	Toracentesi	No toracentesi	P value
	N=100	N=26	N=74	
TMAO [ng/mL]	61.7 (51.6-75.2)	62.5 (56.7-64.7)	61.0 (49.8-75.6)	0.383
sP-selectin [ng/mL]	26.6 (20.0-36.5)	28.5 (20.8-37.9)	25.9 (19.7-34.9)	0.404
TGFb [pg/mL]	66.2 (51.5-75.8)	72.4 (54.5-95.1)	63.7 (50.7-74.6)	0.082
LPS [pg/mL]	28.9 (10.9-68.0)	20.6 (13.3-38.9)	32.2 (8.22-75.3)	0.609
Zonulin [ng/mL]	3.47 (2.13-5.94)	4.82 (3.14-6.84)	3.17 (2.08-5.66)	0.084

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

Le alterazioni nel microbiota intestinale contribuiscono alla suscettibilità alla fibrillazione atriale tramite meccanismi infiammatori[25]. Il TMAO, principale prodotto batterico, è stato dimostrato cruciale nel favorire la disregolazione autonoma e stimolare il rilascio di citochine pro-infiammatorie, contribuendo alla produzione di fibroblasti e deposizione di matrice extracellulare[25]. Inoltre il TMAO aumenta la suscettibilità alla fibrillazione atriale anche tramite meccanismi pro-aterosclerotici e di remodeling, in associazione al lipopolisaccaride, tramite meccanismi TLR-4 dipendenti[25].



Questo studio valorizza il ruolo del TMAO e della fibrosi miocardica nella patogenesi della fibrillazione atriale, come già evidenziato da altre fonti di letteratura, e ne sottolinea l'importanza anche nel caso di fibrillazione atriale post-cardiochirurgica, nota per le differenze fisiopatologiche rispetto a quella della popolazione generale e per il negativo impatto a breve ed a lungo termine nel paziente cardio-operato.

Tutti i pazienti arruolati nello studio erano in ritmo sinusale nel periodo preoperatorio, e sia i prelievi ematochimici sia le analisi istologiche sono state effettuate quando i pazienti non avevano ancora sviluppato fibrillazione atriale. E' stata registrata una incidenza di POAF del 38%, in linea con i dati di letteratura. Nei pazienti con POAF, i valori sierici di TMAO, LPS e TGFb prima dell'intervento chirurgico risultavano significativamente aumentati. Lo stesso TGFb è stato inoltre rilevato in misura maggiore in atrio destro, confermando l'importanza del meccanismo fibrotico TGFb/SMAD dipendente che si associa ad un aumento di collagene (col-1 e col-3) e proteine di matrice extracellulare (fibronectina). Questo conferma l'ipotesi di lavoro e suggerisce che i prodotti del metabolismo intestinale (come il TMAO) modulano l'attività fibrotica nel miocardio rendendolo suscettibile alle aritmie.

Livelli di TMAO elevati (TMAO \geq 61.8 ng/mL, OR 2.88 con P=0.006) aumentano il rischio di POAF indipendentemente da anemia preoperatoria (Hb < 13.1 g/dL, OR 2.37 con P=0.033) e ridotta contrattilità ventricolare destra (TAPSE < 20 mm ,OR 2.38 con P=0.017).

Vari meccanismi sono stati descritti nella patogenesi della fibrillazione atriale correlata al TMAO: disregolazione del sistema nervoso autonomo, infiammazione, remodeling cardiaco e fibrosi, stress ossidativo, e disfunzione endoteliale[26]. La cardiocirurgia, con l'attivazione endoteliale e lo stress ossidativo dovuti alla circolazione extracorporea, appare particolarmente suscettibile agli effetti del TMAO, come suggerito da altre linee di ricerca.

Nei pazienti con scompenso cardiaco end-stage sottoposti a impianto di LVAD o trapianto cardiaco, i valori ematici di TMAO sono persistentemente elevati sia nella fase di scompenso acuto sia dopo l'impianto di assistenze ventricolari, e quindi sono considerati indipendenti da altre misure di infiammazione, endotossitemia, stress ossidativo e disbiosi intestinale[27, 28]. Inoltre le modifiche del microbioma sono state recentemente considerate nei pazienti sottoposti a trapianto cardiaco[29], e possono essere associate a necessità di trattamento immunosoppressivo differenziale[30]. Elevati valori di TMAO, in associazione alla attivazione del pathway cellulare carnitine-butyrobetaine-TMAO, sono associati ad aumentato rischio di rigetto post-trapianto cardiaco nell'immediato post-operatorio e ad aumento del burden aterosclerotico nel lungo termine[31].

Tali considerazioni supportano la necessità di studiare adeguatamente il microbiota e dei suoi metaboliti in cardiocirurgia per migliorare outcomes sia a breve termine che a lungo termine[32]. La riduzione dei livelli di TMAO rappresenta una promettente strategia per modulare l'ipertrofia e la fibrosi cardiaca, generando un effetto anti-aritmico indiretto. In modelli animali, l'inibizione di TMAO tramite 3,3-dimetil-1-butanolo (DMB) attenua il remodeling strutturale ed elettrico dovuto all'aumento di post-carico e di scompenso[33, 34]. Ridurre i livelli di TMAO può quindi ridurre il rischio di fibrillazione atriale sia nella popolazione generale sia nei pazienti post-cardiologici.

Limiti dello studio

In aggiunta ai limiti riconosciuti dalla letteratura sugli studi monocentrici osservazionali o retrospettivi[35], in questo studio non è stato possibile includere la analisi genetica sul profilo del microbioma intestinale estratto da materiale fecale. Inoltre, i pathway esplorati tramite analisi su siero e su tessuto istologico necessitano ulteriori ampliamenti per chiarire le cascate del segnale maggiormente rilevanti. In aggiunta, è necessario verificare i risultati anche in pazienti sottoposti a chirurgia mitralica o tricuspidaica, in quanto maggiormente a rischio di complicanze aritmiche postoperatorie per patogenesi multifattoriale. Oltre a supportare gli attuali risultati e conclusioni, queste successive analisi permetterebbero di selezionare in maniera più precisa eventuali strategie terapeutiche per ricerche future.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

E' stata confermata una associazione tra la presenza di fibrosi miocardica ed elevati livelli di TMAO, che si trasforma in aumentato rischio di POAF, supportando l'ipotesi di lavoro riguardo il ruolo del microbiota intestinale sulla POAF mediato dalla fibrosi miocardica.

Il microbiota intestinale ed i suoi metaboliti (come il TMAO) sono elementi importanti nei meccanismi di fibrosi miocardica, substrato fisiopatologico della fibrillazione atriale post-operatoria (POAF). A livello tissutale, i pazienti che svilupperanno POAF (nonostante siano in ritmo sinusale pre-operatorio) hanno incremento dell'espressione genica di collagen-1, collagen-3 e fibronectina, con un grado maggiore di fibrosi miocardica a livello istologico. La via di signaling TGFb/SMAD-2 sembra avere un ruolo importante in questi meccanismi anche nel setting cardiocirurgico, in quanto risulta maggiormente espressa sia a livello sierico che a livello del tessuto atriale. La presenza batterica (lipopolisaccaride) ed il TMAO sono significativamente maggiori nei pazienti che svilupperanno POAF, ed elevati livelli ematici di TMAO (≥ 61.8 ng/mL) sono un fattore di rischio per POAF.

Tuttavia, la fibrosi del tessuto miocardico e le aritmie postoperatorie hanno molteplici aspetti fisiopatologici, ed il microbiota non è l'unico elemento determinante. Tuttavia, la modulazione del microbiota intestinale o la modulazione dei suoi prodotti potrebbero essere utilizzati come strategia aggiuntiva per proteggere il miocardio contro le reazioni fibrotiche, riducendo così l'insorgenza di aritmie e le relative conseguenze negative nel breve e nel lungo termine. In considerazione dei risultati di questo studio, l'inibizione della produzione di TMAO potrebbe rappresentare un potenziale target terapeutico per ridurre la fibrosi del tessuto cardiaco e le conseguenti complicanze aritmiche nei pazienti cardiocirurgici.

BIBLIOGRAFIA

1. Chen YC, Voskoboinik A, Gerche A, Marwick TH, McMullen JR. Prevention of Pathological Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(22):2846-2864. doi:10.1016/j.jacc.2021.04.012
2. Xintarakou A, Tzeis S, Psarras S, Asvestas D, Vardas P. Atrial fibrosis as a dominant factor for the development of atrial fibrillation: facts and gaps. *Europace*. 2020;22(3):342-351. doi:10.1093/europace/euaa009
3. Shen MJ, Arora R, Jalife J. Atrial Myopathy. *JACC Basic Transl Sci*. 2019;4(5):640-654. doi:10.1016/j.jacbts.2019.05.005
4. Sohns C, Marrouche NF. Atrial fibrillation and cardiac fibrosis. *Eur Heart J*. 2020;41(10):1123-1131. doi:10.1093/eurheartj/ehz786
5. Nattel S. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol*. 2017;3(5):425-435. doi:10.1016/j.jacep.2017.03.002
6. Li X, Geng J, Zhao J, Ni Q, Zhao C, Zheng Y, et al. Trimethylamine N-Oxide Exacerbates Cardiac Fibrosis via Activating the NLRP3 Inflammasome. *Front Physiol*. 2019;10:866. doi:10.3389/fphys.2019.00866
7. Li Z, Wu Z, Yan J, Liu H, Liu Q, Deng Y, et al. Gut microbe-derived metabolite trimethylamine N-oxide induces cardiac hypertrophy and fibrosis. *Lab Invest*. 2019;99(3):346-357. doi:10.1038/s41374-018-0091-y
8. Yang W, Zhang S, Zhu J, Jiang H, Jia D, Ou T, et al. Gut microbe-derived metabolite trimethylamine N-oxide accelerates fibroblast-myofibroblast differentiation and induces cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;134:119-130. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.07.004
9. Tang WHW, Backhed F, Landmesser U, Hazen SL. Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(16):2089-2105. doi:10.1016/j.jacc.2019.03.024
10. Linz D, Gawalko M, Sanders P, Penders J, Li N, Nattel S, et al. Does gut microbiota affect atrial rhythm? Causalities and speculations. *Eur Heart J*. 2021;42(35):3521-3525. doi:10.1093/eurheartj/ehab467
11. Liu L, Su J, Li R, Luo F. Changes in Intestinal Flora Structure and Metabolites Are Associated With Myocardial Fibrosis in Patients With Persistent Atrial Fibrillation. *Front Nutr*. 2021;8:702085. doi:10.3389/fnut.2021.702085
12. Lu D, Zou X, Zhang H. The Relationship Between Atrial Fibrillation and Intestinal Flora With Its Metabolites. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:948755. doi:10.3389/fcvm.2022.948755

13. Gawalko M, Agbaedeng TA, Saljic A, Muller DN, Wilck N, Schnabel R, et al. Gut microbiota, dysbiosis and atrial fibrillation. Arrhythmogenic mechanisms and potential clinical implications. *Cardiovasc Res.* 2022;118(11):2415-2427. doi:10.1093/cvr/cvab292
14. Coutinho-Wolino KS, de FCLFM, de Oliveira Leal V, Mafra D, Stockler-Pinto MB. Can diet modulate trimethylamine N-oxide (TMAO) production? What do we know so far? *Eur J Nutr.* 2021;60(7):3567-3584. doi:10.1007/s00394-021-02491-6
15. Svingen GFT, Zuo H, Ueland PM, Seifert R, Loland KH, Pedersen ER, et al. Increased plasma trimethylamine-N-oxide is associated with incident atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2018;267:100-106. doi:10.1016/j.ijcard.2018.04.128
16. Buttner P, Okun JG, Hauke J, Holzwirth E, Obradovic D, Hindricks G, et al. Trimethylamine N-oxide in atrial fibrillation progression. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2020;29:100554. doi:10.1016/j.ijcha.2020.100554
17. Sanchez-Gimenez R, Ahmed-Khodja W, Molina Y, Peiro OM, Bonet G, Carrasquer A, et al. Gut Microbiota-Derived Metabolites and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review of Prospective Cohort Studies. *Nutrients.* 2022;14(13). doi:10.3390/nu14132654
18. Yang WT, Yang R, Zhao Q, Li XD, Wang YT. A systematic review and meta-analysis of the gut microbiota-dependent metabolite trimethylamine N-oxide with the incidence of atrial fibrillation. *Ann Palliat Med.* 2021;10(11):11512-11523. doi:10.21037/apm-21-2763
19. Eikelboom R, Sanjanwala R, Le ML, Yamashita MH, Arora RC. Postoperative Atrial Fibrillation After Cardiac Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Thorac Surg.* 2021;111(2):544-554. doi:10.1016/j.athoracsur.2020.05.104
20. Dobrev D, Aguilar M, Heijman J, Guichard JB, Nattel S. Postoperative atrial fibrillation: mechanisms, manifestations and management. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(7):417-436. doi:10.1038/s41569-019-0166-5
21. Hsieh FY, Bloch DA, Larsen MD. A simple method of sample size calculation for linear and logistic regression. *Stat Med.* 1998;17(14):1623-1634. doi:10.1002/(sici)1097-0258(19980730)17:14<1623::aid-sim871>3.0.co;2-s
22. Blackstone EH. Sufficient data. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;152(5):1235-1236. doi:10.1016/j.jtcvs.2016.07.046
23. Peduzzi P, Concato J, Kemper E, Holford TR, Feinstein AR. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol.* 1996;49(12):1373-1379. doi:10.1016/s0895-4356(96)00236-3
24. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on

- Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-1374. doi:10.1161/01.cir.92.5.1355
25. Drapkina OM, Yafarova AA, Kaburova AN, Kiselev AR. Targeting Gut Microbiota as a Novel Strategy for Prevention and Treatment of Hypertension, Atrial Fibrillation and Heart Failure: Current Knowledge and Future Perspectives. *Biomedicines*. 2022;10(8). doi:10.3390/biomedicines10082019
 26. Huang R, Yan L, Lei Y. The Gut Microbial-Derived Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Atrial Fibrillation: Relationships, Mechanisms, and Therapeutic Strategies. *Clin Interv Aging*. 2021;16:1975-1986. doi:10.2147/CIA.S339590
 27. Yuzefpolskaya M, Bohn B, Javaid A, Mondellini GM, Braghieri L, Pinsino A, et al. Levels of Trimethylamine N-Oxide Remain Elevated Long Term After Left Ventricular Assist Device and Heart Transplantation and Are Independent From Measures of Inflammation and Gut Dysbiosis. *Circ Heart Fail*. 2021;14(6):e007909. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007909
 28. Yuzefpolskaya M, Bohn B, Nasiri M, Zuver AM, Onat DD, Royzman EA, et al. Gut microbiota, endotoxemia, inflammation, and oxidative stress in patients with heart failure, left ventricular assist device, and transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2020;39(9):880-890. doi:10.1016/j.healun.2020.02.004
 29. Sen T, Thummer RP. The Impact of Human Microbiotas in Hematopoietic Stem Cell and Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2022;13:932228. doi:10.3389/fimmu.2022.932228
 30. Jennings DL, Bohn B, Zuver A, Onat D, Gaine M, Royzman E, et al. Gut microbial diversity, inflammation, and oxidative stress are associated with tacrolimus dosing requirements early after heart transplantation. *PLoS One*. 2020;15(5):e0233646. doi:10.1371/journal.pone.0233646
 31. Troseid M, Mayerhofer CCK, Broch K, Arora S, Svardal A, Hov JR, et al. The carnitine-butyrobetaine-TMAO pathway after cardiac transplant: Impact on cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2019;38(10):1097-1103. doi:10.1016/j.healun.2019.06.003
 32. Svinarich JT. The functional medicine approach to atrial fibrillation: can a cure for atrial fibrillation be found in the gut? *Curr Opin Cardiol*. 2021;36(1):44-50. doi:10.1097/HCO.0000000000000819
 33. Wang G, Kong B, Shuai W, Fu H, Jiang X, Huang H. 3,3-Dimethyl-1-butanol attenuates cardiac remodeling in pressure-overload-induced heart failure mice. *J Nutr Biochem*. 2020;78:108341. doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108341

34. Chen K, Zheng X, Feng M, Li D, Zhang H. Gut Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide Contributes to Cardiac Dysfunction in Western Diet-Induced Obese Mice. *Front Physiol.* 2017;8:139. doi:10.3389/fphys.2017.00139
35. Talari K, Goyal M. Retrospective studies - utility and caveats. *J R Coll Physicians Edinb.* 2020;50(4):398-402. doi:10.4997/JRCPE.2020.409