

## DIJAGNOSTIČKI I PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ BIOMARKERA

Nada Majkić-Singh<sup>1</sup>, Svetlana Ignjatović<sup>1</sup>, Radmila Kovačević<sup>2</sup>, Milica Ilić<sup>3</sup>, Nataša Lalić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije, Beograd

<sup>2</sup>Institut za kardiovaskularne bolesti »Dedinje«, Beograd

<sup>3</sup>Centar za medicinsku biohemiju, KC Niš, Niš

**Kratak sadržaj:** U savremenoj laboratorijskoj medicini teži se iznalaženju najspeficijfnijih i najosetljivijih biomarkera kao pokazatelja bolesti i dijagnostičkih sredstava za praćenje lečenja i uspešnosti terapije. Iznalaženju osetljivih biomarkera značajno su doprinele svetske kompanije koje se bave proizvodnjom dijagnostičkih reagensa. Danas se za određivanje pojedinih biohemijskih parametara najčešće primenjuju imunoodređivanja, koja koriste monoklonska antitela i različite vrste obeleživača, čime se postiže visoka specifičnost određivanja. Da bi iz grupe potencijalnih biomarkera bili izabrani oni koji su najznačajniji za kliničku praksu i koji pružaju najviše dijagnostičkih informacija, neophodno je opsežno ispitivanje, koje obuhvata utvrđivanje analitičke, kliničke i ekonomske primenljivosti. Primenom statističkih metoda, prvenstveno ROC analize utvrđuju se tzv. prelomne («cut-off») vrednosti na osnovu kojih se razdvajaju oboleli od zdravih. Naime, za određivanje kliničke specifičnosti neophodno je da se u evaluaciju uključe i pacijenti koji imaju sličnu kliničku sliku oboljenja za koje se marker ispituje. Razvoju i izboru biomarkera značajno doprinosi i IFCC pri optimizaciji postupaka i pripremi referentnih materijala. Odabrani i primenjeni biomarkeri moraju da budu isplativi pri kliničkoj primeni sa stanovišta cene koštanja i pružanja najoptimalnijih dijagnostičkih informacija. Principi izbora, primene biomarkera, kao i njihov dijagnostički i prognostički značaj ovde su opisani na primerima biomarkera kardiovaskularnih (troponin T i I, mioglobin, masa CK-MB), koštanih (deoksipiridinolin, osteokalcin, C-terminalni propeptid kolagena tip I, koštana alkalna fosfataza) i malignih oboljenja (PSA) i akutnog pankreatitisa (lipaza).

**Ključne reči:** biomarkeri, specifičnost, osetljivost, srčani markeri, koštani markeri, PSA, lipaza.

### Uvod

U medicinskoj praksi za dijagnostikovanje i prognostičko praćenje oboljenja najčešće se koriste laboratorijska dijagnostička određivanja (u daljem tekstu: dijagnostički testovi). Ova dijagnostička strategija uvek je u izvesnoj meri praćena nesigurnošću koja može da potekne od netačnosti samog dijagnostičkog testa ili netačnosti kliničkog sagledavanja stanja pacijenta ili interpretacije dijagnostičkog testa. Nesigurnost koju uslovljava prvi navedeni uzrok danas je u najvećoj meri smanjena razvojem novih, pogodnijih analitičkih postupaka i posvećivanjem više pažnje sprovođenju kontrole kvaliteta u laboratorijama. Analitičke laboratorijske metode i postupci se danas u najvećoj meri razvijaju za tzv. *biomarkere*, odnosno *biohemijske pokazatelje* oboljenja pojedinih organa koji moraju da ima-

ju niz specifičnih karakteristika da bi ispunili uslov da se primene kao biohemijski markeri za otkrivanje i razlikovanje pojedinih oboljenja datog organa. Primenom ovakve definicije približavamo se tzv. *organospecifičnosti* nekog biohemijskog parametra koja se primenjuje u kliničkoj enzimologiji, mada u organičenoj meri.

### Karakteristike biomarkera

*Uspešan biohemijski pokazatelj* mora da ispunji nekoliko uslova i to:

- 1) da mu je koncentracija relativno visoka u odgovarajućem tkivu, a zanemarljiva u drugim tkivima,
- 2) da je pogodno subcelularno raspodeljen, kako bi se nakon oštećenja tkiva brzo našao u cirkulaciji,
- 3) da se u cirkulaciji zadržava dovoljno dugo kako bi mogla da se prati njegova koncentracija,
- 4) da se može odrediti pomoću pogodne i osjetljive analitičke metode, primenljive i na automatskim analizatorima,

5) da su za njega ustanovljene rigorozne »cut-off« vrednosti, uzimajući u obzir da su klinička osetljivost i specifičnost međusobno povezane.

Primenom navedenih principa danas se u dijagnostici preporučuju brojni biohemijski markeri za dijagnostikovanje oboljenja pojedinih organa kao npr. za kost koštana alkalna fosfataza, osetokalcin, piridinolin i deoksimiridinolin u slučaju osteoporoze, za srce *citoplazmatiski markeri* (miogloblin, karboanhidraza III, izoenzimi i izoforme CK) i *strukturni markeri* (troponin T, troponin I), za pankreas lipaza, pankreasna  $\alpha$ -amilaza, za prostatu PSA i slobodni PSA itd.

### Procena biohemijskog pokazatelja

Da bi se utvrdilo da li neki od biohemijskih pokazatelja ispunjava navedene uslove za uspešnu primenu u dijagnostikovanju, mora se podvrći odgovarajućoj proceni, odnosno evaluaciji. Na ovaj način se uspostavlja veza između rezultata koji se za odabrani pokazatelj dobijaju i klinički definisane krajnje tačke (npr. prisustvo ili odustvo oboljenja, dobra ili loša prognoza). Naime, mora se tačno definisati namena biomarkera, kako bi se njegovom primenom dobila odgovarajuća dijagnostička korisnost (1). Ova vrsta procene danas se postiže odgovarajućim dizajniranjem proučavanja i statističkom evaluacijom rezultata (2, 3).

Početna ispitivanja primene biomarkera obuhvataju najmanje tri faze. U prvoj fazi procenjuje se analitička izvodljivost dijagnostičkog testa (utvrđuju se analitička nepreciznost i tačnost, osetljivost i specifičnost metode), kao i varijacije rezultata kod jedne osobe i između osoba dobijene pri kliničkoj primeni. Druga faza obuhvata poređenje rezultata odabranih pacijenata s odgovarajućim oboljenjem prema rezultatima kontrolnih osoba bez oboljenja. Ova faza može dati preterano optimistične rezultate s obzirom na to da se porede odabrani pacijenti sa poznatim stadijumom bolesti (dijagonalni spektar oboljenja) prema kontrolnoj grupi koja sadrži samo zdrave osobe. Međutim, ako primenjeno određivanje ne pokaže obećavajuće rezultate u ovoj fazi ispitivanja, malo je verovatno da će imati dijagnostičku vrednost u kliničkoj primeni. Treća faza ispitivanja obuhvata ispitivanje kliničke primenljivosti dijagnostičkog testa na ciljnoj populaciji za koju je planirana primena testa. Ova faza se izvodi kao slepa, kontrolisana, prospektivna studija koja treba da da odgovor na specifično kliničko pitanje.

Da bi se navedena ispitivanja uspešno sprovela moraju se obezbediti sledeći uslovi:

1. *Primena odgovarajućeg referentnog standarda.* Referentni (ili zlatni) standard koji se izvodi uz analizu svakog uzorka pacijenta koji je uključen u evaluaciju treba da bude što je moguće bliži »pravog« vrednosti (4). Na ovaj način izbegava se provera nagiba i odstupanja u vrednostima. Pošto netačni referentni standardi dovode do loše procene dijag-

nostičkog testa, to se danas intenzivno radi na uspostavljanju realnih referentnih standarda.

2. *Odgovarajući odabir pacijenata.* Sve dok populacija pacijenata koja se ispituje u potpunosti ne podseća na populaciju pacijenata na kojoj će test da se primenjuje klinički, ne može se proceniti odgovarajuća dijagnostička korisnost testa (5). Iz ovog razloga veoma je značajno da se pokrije što širi spektar pacijenata. Ako se izabere grupa pacijenata koja je usko definisana, odnosno potvrđena oboljenja porede prema kontrolnoj grupi zdravih osoba, dobiće se dijagnostička tačnost koja je precenjena. Ovakav rezultat se dobija ako se dijagnostička tačnost uporedi sa onom koja je izračunata ako je odabrana grupa pacijenata koja je imala širu oblast kliničke prezentacije oboljenja i to od umerenih do teških oblika, a poređeni su sa kontrolnom grupom koja je imala kliničku sliku koja je slična onoj kod oboljenja. Takođe je korisno da se uvrsti raspodela ispitanika prema godinama i polu, kliničkim simptomima i/ili stupnju oboljenja osoba, kao i drugi pogodni kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju (4). Tačnost testa karakterišu *osetljivost* (udeo obolelih pacijenata s pozitivnim rezultatom testa), *specifičnost* (udeo neobolelih pacijenata s negativnim rezultatom testa) i *odnosi verovatnoće* koji se računaju iz rezultata dobijenih kod obolelih prema neobolelim pacijentima.
3. *Merenje reproducibilnosti i prikaz rezultata.* Rezultati kliničkih ispitivanja moraju da sadrže i granice pouzdanosti, koje se naznačuju u zagradama pri ispitivanjima preciznosti i tačnosti određivanja (5).
4. *Odgovarajuća veličina uzorka.* Da bi se dobila odgovarajuća statistička pouzdanost pri ispitivanju tačnosti testa mora se obezbediti dovoljno veliki broj pacijenata. Međutim, još uvek ne postoji pouzdan način za ovu procenu, mada postoji više načina i formula za izračunavanje potrebnog broja uzoraka (6, 7).

Potencijalni biohemijski markeri mogu da se svrstaju u dve kategorije kao *kvantitativni* i *kvalitativni* testovi u zavisnosti od toga šta se datim markerom meri. Kvalitativni markeri najčešće imaju samo dva rezultata, koji govore o prisustvu i odsustvu parametra, ili se izražavaju preko skale koja ima tri ili više rezultata (npr. 1+, 2+, 3+, itd.). Kvantitativna određivanja daju širi spektar vrednosti kako kod zdravih tako i kod obolelih.

### Analitičke i statističke karakteristike biomarkera

Lekari najčešće koriste laboratorijske nalaze da bi potvrdili ili isključili dijagnozu koju trenutno razmatraju. Granične vrednosti koje lekaru pomažu pri ovom razmatranju različito se nazivaju i to:

granice odlučivanje,

prelomne vrednosti (*cutoff points*),  
kritične vrednosti,  
diskriminacione vrednosti i  
referentne vrednosti.

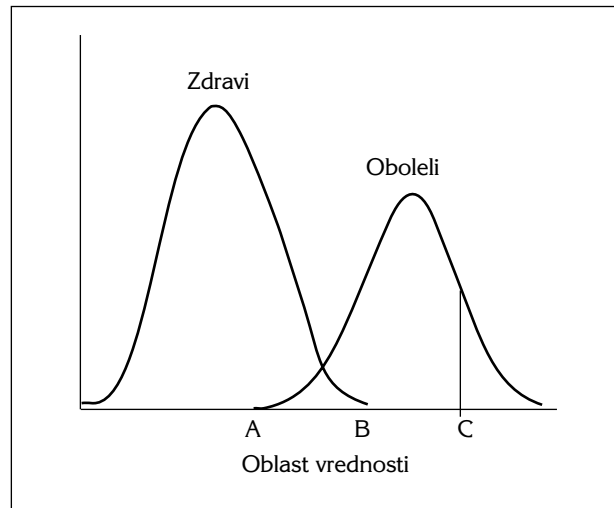
Na slici 1 može se razmatrati nekoliko vrednosti:

1. vrednost testa kojom će se isključiti prisustvo oboljenja (vrednosti levo od A na slici 1);
2. vrednost testa kojom će se potvrditi prisustvo oboljenja (vrednost desno od B);
3. vrednost testa u oblasti desno od C pokazuju da tretman više pomaže nego što šteti;
4. optimalna interpretacija rezultata testa koje se nalaze između A i B.

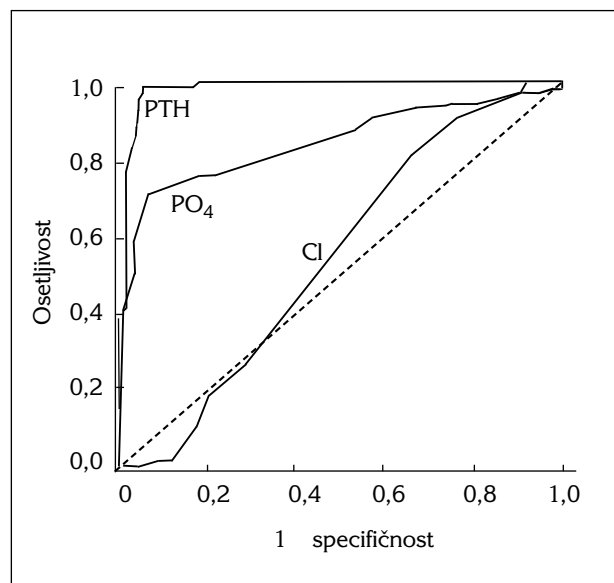
Navedene granične vrednosti mogu da se utvrde samo pažljivim izučavanjem oboljelih i zdravih koje se izvodi prema odgovarajućim protokolima. Da bi se utvrdila dijagnostička korisnost nekog biohemijskog markera koriste se statističke vrednosti *osetljivosti* i *specifičnosti* dijagnostičkog testa (8). Osetljivost testa se odnosi na njegovu sposobnost da da tačnu (pozitivnu) dijagnozu kod pacijenta sa potvrđenim oboljenjem, dok specifičnost testa omogućava da se postavi tačna (negativna) dijagnoza u potvrđenim negativnim slučajevima. Takođe je značajan statistički indeks tzv. *prediktivna vrednost dijagnostičkog testa*, koja govori da li je dijagnoza pacijentu tačno ili pogrešno postavljena na osnovu rezultata testa (9, 10). To znači da lekara interesuje verovatnoća kojom će se pozitivnim testom potvrditi dijagnoza oboljenja (tj. prediktivna vrednost pozitivnog rezultata). Prediktivna vrednost pozitivnog testa, prema tome se definiše procentom koliko je puta pozitivan rezultat potvrdio prisustvo oboljenja. Suprotno značenje ima negativna prediktivna vrednost testa.

Ako se procenjuju kvalitativni testovi postoje samo dva rezultata pozitivan ili negativan, pa su osetljivost, specifičnost i prediktivna vrednost dovoljni za dijagnostičku procenu. Međutim, u slučaju testa kojim se postiže više vrednosti, različite granice odlučivanja daju različitu osetljivost i specifičnost. Odnos između specifičnosti i osetljivosti, odnosno procena dijagnostičke tačnosti najbolje se postiže pomoću grafičkog prikaza poznatog kao ROC kriva (receiver operating characteristic). Tipična ROC kriva predstavlja sve moguće granice odlučivanja preko stvarno pozitivnih na ordinati i lažno pozitivnih na apscisi (1 - specifičnost). Pomoću ROC krive obezbeđuje se čisti indeks tačnosti i to u oblasti od niskih do visokih vrednosti (11).

Dobar dijagnostički test ima najviše pozitivnih i najmanje lažno pozitivnih vrednosti pri svim mogućim granicama odlučivanja, pa će ROC kriva za ovakav test imati približno pravougli položaj, a loš test imaće približno dijagonalni položaj kada je broj stvarno pozitivnih i lažno pozitivnih isti pri svakoj granici odlučivanja. Površina ispod krive (AUC) služi kao dobra mera ukup-



Slika 1. Hipotetična Gausova raspodela oboljelih i zdravih osoba. Vrednosti testa ispod granične linije označene pod A isključuju oboljenje, dok vrednosti testa iznad vrednosti B mogu da se koriste za dijagnostikovanje oboljenja. Druge granice odlučivanja (kao što je C) mogu se koristiti za druge medicinske svrhe.



Slika 2. Prikaz ROC krivih za serumski paratireoidni hormon (PTH), fosfat ( $PO_4$ ) i hlorid (Cl) pri razlikovanju pacijenata sa primarnim hiperparatireoidizmom (potvrđenim biopsijom paratireoidne žlezde) od zdravih osoba (12, 13).

ne kliničke tačnosti pošto odražava mogućnost testa da razlikuje pacijente sa oboljenjem od onih bez oboljenja u oblasti celokupnih granica odlučivanja. ROC kriva pruža mogućnost vizuelnog upoređivanja. Međutim, značajno je i izračunavanje vrednosti AUC kao i statističko testiranje značajnosti razlika (14, 15).

Primenom ROC krive moguće je utvrditi *cutoff*

*koncentracije.* Kao što je napred pomenuto za utvrđivanje kliničke specifičnosti biomarkera važno je uključiti pacijente koji imaju sličnu kliničku sliku kao i samo oboljenje za koje se specifičnost markera ispituje. To npr. znači da za biomarker koji će se koristiti za otkrivanje akutnog infarkta miokarda (AIM), pri utvrđivanju njegovog dijagnostičkog značaja treba uključiti pacijente sa koronarnim srčanim oboljenjem koje nije AIM. Ako se za poređenje i isključivanje koriste samo zdrave osobe može se dobiti lažno povećana klinička specifičnost (16).

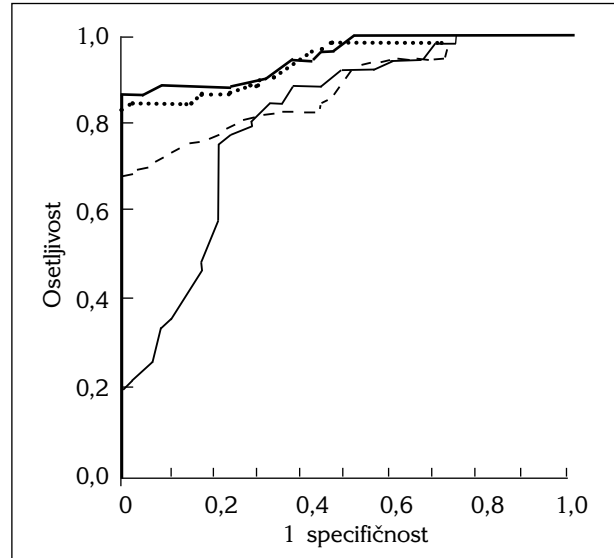
### Primena biomarkera

*Markeri koštanog metabolizma.* Mada različiti serumski i urinarni markeri metaboličkog prometa kosti uključuju enzime, neezimske peptide i minerale ovi se obično klasifikuju prema metaboličkom procesu koji odražavaju (17). Mi smo se bavili izučavanjem biohemijskih markera kod potvrđene postmenopauzalne osteoporoze u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih žena u postmenopauzi iste starosne dobi (18-21). Sumarna dijagnostička značajnost kroz tačnost i specifičnost za koštanu alkalnu fosfatazu (BAP), C-terminalni propeptid kolagena tip I (CICP), deoksipiridinolin (Dpd) i osteokalcin (OC) prikazana je na slici 3 preko ROC dijagrama (20).

Izborom *cutoff* vrednosti pri kojima se postizu najviše osetljivosti i dijagnostičke specifičnosti primenjenih parametara i to za BAP 42 U/L, za CICP 180 ng/mL, za Dpd 8,5 mol Dpd/mol Cr i za OC 25 ng/mL utvrđeno je da su osteokalcin, BAP i CICP parametri izbora s najvećom specifičnosti i osetljivosti za utvrđivanje promena usled osteoporoze (19, 20).

Osteokalcin je specifičan marker osteoblastne funkcije (22). Utvrđeno je da se direktno posle njegovog oslobađanja iz osteoblasta najveći deo novosintetisanog proteina ugrađuje u ekstracelularni koštani matriks gde čini približno 15% nekologene proteinske frakcije. Manji deo oslobađa se u cirkulaciju gde može da se odredi. Serumski nivoi su u dobroj korelaciji sa brzim formiranjem kosti što se potvrđuje histomorfometrijski (23, 24). Takođe, pošto je OC ugrađen u koštani matriks, neki istraživači ukazuju da se OC fragmenti mogu da oslobađaju i u toku koštane resorpcije. Ovo se verovatno odnosi i na neke manje N-terminalne fragmente OC koji se nalaze kod osoba s visokim koštanim prometom (25, 26).

Kolagen tip I je najzastupljeniji kolagen kosti koji čini približno 90% ukupne proteinske frakcije (27). Pored amino (N-) terminalnog propeptida (PINP) čini prekursorske molekule koji se karakterišu signalnom sekvencom i terminalnim peptidima. Nakon sekrecije u ekstracelularni prostor, globularni trimerni propeptidi enzimski se razlažu (28) i prelaze u cirkulaciju. Pošto CICP i PINP nastaju iz novo sintetisanog kolagena u stehiometrijskom odnosu, ovi propeptidi su kvantitativna mera novo formiranog kolagena tip I. Mada propeptidi kolagena tip I mogu poteci i iz drugih izvora, većina



Slika 3. ROC krive za BAP (—), CICP (—), Dpd (—) i OC (····) koje su računate poređenjem vrednosti kod pacijenata sa i bez postmenopauzalne osteoporoze koja je potvrđena merenjem mineralne koštane gustine (BMD). Površine ispod ROC krivih (AUC) sa odgovarajućim standardnim greškama (SE) iznose za: BAP AUC = 0,8790, SE = 0,0340; CICP AUC = 0,9532, SE = 0,0197; Dpd AUC = 0,8055, SE = 0,0449; OC AUC = 0,9417, SE = 0,0227.

neskeletnih tkiva ima sporiji promet od kosti i učestvuje veoma malo u rezervi propeptida u cirkulaciji.

*Primena tumorskog markera.* Dugo se smatralo da PSA potiče isključivo iz epitelnih ćelija prostate. Danas se zna da se nalazi i u drugim tkivima i organima kao što su periuretralne i analne žlezde, endometrijum, dojka itd. PSA je proteaza koja se u serumu nalazi vezana za inhibitore i to uglavnom alfa-1-antihimotripsin. Manja količina PSA se nalazi u slobodnom obliku. PSA stvaraju epitelijalne prostatične ćelije (29). Nalazi se u serumu i u seminalnoj plazmi. U seminalnoj plazmi PSA je uglavnom u slobodnom aktivnom enzimskom obliku, a samo se oko 5% nalazi vezan sa C inhibitorom (30). U serumu je oko 75-90% PSA vezano za dva glavna inhibitora alfa-1-antihimotripsin i alfa-2-makroglobulin, a oko 10-15% je slobodno (31). Zahvaljujući antigenim determinantama moguća su određivanja oba oblika PSA (32). Danas se koriste brojne imunološke metode za određivanje PSA. Ove se međusobno razlikuju po antitelima, markerima, standardima i PSA vrednostima. Dobar imunološki test iziskuje standardizovane kalibratore i odgovarajuća antitela. Ovo je veoma važno kako bi se dobijali uporedni rezultati i istog kliničkog značenja. Zato kod svakog postupka treba odrediti *donji detekcioni limit* (33), *biološki detekcioni limit* (34) i *klinički prag (threshold)* ili *detekcioni limit* za kancer (35).

Određivanje *analitičkog i biološkog detekcionog limita* je od velikog praktičnog značaja za rano

otkrivanje ponovne pojave kancera posle radikalne prostatektomije. Teoretski gledano, nakon uklanjanja cele prostate u serumu ne bi trebalo da bude više PSA. U zavisnosti od osetljivosti metode nalaženje PSA u serumu može da se koristi za otkrivanje ponovne pojave kancera.

Način određivanja biološkog detekcionog limita kao veoma značajnog parametra koji govori o osetljivosti primenjenog postupka proverili smo analiziranjem seruma kod 18 pacijenata sa urađenom cistoprostatektomijom. Vrednosti PSA analizirane su primenom dva komercijalna testa (DIALAB i DELFIA). Utvrđeno je da su nađene vrednosti PSA između 0,2 i 0,3 ng/mL Dialab testom i 0,12 i 0,17 ng/mL Delfia testom nakon radikalne prostatektomije *vrednosti biološkog detekcionog limita*, odnosno mogu se smatrati kao negativan nalaz.

Shodno tome, *biološki detekcioni limit* se koristi da se definišu PSA koncentracije iznad kojih postoji 95% pouzdanosti da će pri ponovljenim određivanjima u istom uzorku PSA vrednosti biti iznad *donjeg detekcionog limita (LLD)*. Ova određivanja zavise od preciznosti postupka. Tako donji detekcioni limit (LLD) predstavlja najnižu PSA vrednost koja se razlikuje od nule sa 95% pouzdanošću pod idealnim analitičkim uslovima. Računa se kao srednja vrednost plus dve standardne devijacije iz 20 ili više ponovljenih analiziranja puferskog rastvora ili uzorka seruma koji ima koncentraciju PSA »nula« (35, 36).

Primenom istih testova utvrđena je i *analitička osetljivost* koja je srednja vrednost PSA ( $\bar{x} \pm 2SD$ ) dobijena kada se 10 puta ponovi određivanje PSA u standardu označenom kao »nula« standarda. Za EIA postupak (Dialab test) utvrđene su vrednosti PSA 0,038 ng/mL ( $\bar{x} = 0,019$ ,  $SD = 0,0075$ ,  $KV = 5,0\%$ ) kao analitički detekcioni limit, odnosno 0,016 ng/mL ( $\bar{x} = 0,012$ ,  $SD = 0,002$ ,  $KV = 1,3\%$ ) za Delfia postupak (37).

*Osetljivost srčanih markera*. Brojni radovi bave se pitanjem evaluacije novih proteinskih markera akutnog infarkta miokarda (AIM). Od posebnog značaja su mioglobin, izoenzim kreatin kinaze (CK-MB) određen kao masena koncentracija primenom monoklonskih antitela specifičnih za MB dimer, izoforme CK-MB i dva srčana troponina, troponin I (cTnI) i troponin T (cTnT) (38-44). Primenom brzih automatskih određivanja moguće je odrediti koncentracije ovih parametara za svega nekoliko minuta (40). Kako se radi o dijagnostikovanju veoma teškog kliničkog stanja, značajno je da se proceni kapacitet markera da razdvoji pacijente sa infarktom od onih bez infarkta. Ovaj kapacitet ima dve glavne komponente: *osetljivost* kojom se meri koliko dobro test otkriva prisustvo infarkta kod pacijenata s oboljenjem i *specifičnost* kao merom koliko dobro test isključuje prisustvo infarkta kod osoba bez oboljenja. Dijagnostička osetljivost markera ne može da se razmatra izolovano. Izvođenje merenja zavisi i od kliničkih okolnosti. Kod pacijenata s infarktom veoma je značajno i vreme uzimanja uzor-

ka nakon pojave simptoma i vremenske zavisnosti osetljivosti markera (41).

Prema tome, srčani markeri za otkrivanje malih oštećenja miokarda moraju biti krajnje specifični i osetljivi. Kako CK-MB nije specifičan za mala oštećenja, troponini su veoma značajno dijagnostičko sredstvo za akutni koronarni sindrom. Osetljivost troponina T ispitana je i u slučaju ugrađivanja koronarnog arterijskog bajpasa, kod koga se može dogoditi perioperativni infarkt miokarda kao veoma značajan klinički događaj sa negativnim prognostičkim implikacijama (42, 45).

*Markeri akutnog pankreatitisa*. Akutni pankreatitis (AP) kao inflamatorno oboljenje nema specifične znake bolesti ili simptome pa se dijagnostikuje na osnovu kombinacije kliničkih, laboratorijskih i radioloških tehnika. Više biohemijskih markera se koristi za dijagnostikovanje akutnog pankreatitisa. Da bi utvrdili koji se od parametara ponaša kao najosetljiviji biohemijski marker određivani su alfa<sub>2</sub>-makroglobulin (AMG), alfa-amilaza (AMY), C-reaktivni protein (CRP), lipaza (LIP), neesterifikovane masne kiseline (NEFA), pankreasna alfa-amilaza (PAMY) i fosfolipaza A (PAL) za dijagnostikovanje i prognozu akutnog pankreatitisa kod grupe pacijenata s akutnim abdominalnim bolom (46, 47). Ispitan je ukupno 131 pacijent primljen u Urgentni centar KCS s akutnim abdominalnim bolom. Dijagnoza je uvek postavljana na osnovu kliničkih razmatranja, potpomognuta laboratorijskim i radiografskim tehnikama, ultrasonografijom i/ili tomografijom.

Sva određivanja ispitivanih parametara izvedena su primenom komercijalnih testova prema uputstvu proizvođača. Za analizu podataka korišćena je ROC kriva uz izračunavanje površine ispod krive (AUC) i odgovarajuće standardne greške (SE) (48). Klinička tačnost za LIP, PAMY i AMY pri dijagnostikovanju akutnog pankreatitisa izračunata je na osnovu incijalnih enzimskih aktivnosti (prve određene vrednosti u roku od 24 h nakon prijema). Primenom ROC analize upoređivani su rezultati dobijeni kod pacijenata sa AP i abdominalnim ekstrapankreasnim poremećajima. Razlike između AUC za LIP (AUC = 0,9934, SE = 0,0046), PAMY (AUC = 0,9821, SE = 0,0087) i za AMY (AUC 0,9763, SE = 0,0099) nisu bile statistički značajne. Pri »cuttof« vrednostima od 656 U/L za LIP, 182 U/L za PAMY i 245 U/L za AMY nađene su odlične dijagnostičke efikasnosti, osetljivosti, specifičnosti, pozitivne i negativne prediktivne vrednosti koje se nalaze između 0,900 i 1,000 pri dijagnostikovanju akutnog pankreatitisa. Na ovaj način je potvrđeno da određivanje serumskih enzima ostaje »zlati standard« za dijagnostikovanje akutnog pankreatitisa.

CRP, AMG, NEFA i PLA su određivani da bi se utvrdila njihova klinička tačnost pri razdvajanju akutnog edematoznog pankreatitisa i akutnog nekrotizirajućeg pankreatitisa. Primenom ROC analize utvrđeno je da najveću vrednost pri ovom ispitivanju ima CRP pri »cuttof« vrednosti od 126 mg/L. Nešto manju značajnost imalo je određivanje PLA. Primena NEFA i AMG imali su manju prognostičku tačnost (46, 47).

## DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF BIOMARKERS

Nada Majkić-Singh<sup>1</sup>, Svetlana Ignjatović<sup>1</sup>, Radmila Kovačević<sup>2</sup>, Milica Ilić<sup>3</sup>, Nataša Lalić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade

<sup>2</sup>Dedinje Institute of Cardiovascular Diseases, Belgrade

<sup>3</sup>Centre of Medical Biochemistry, Clinical Centre, Niš

**Summary:** In modern laboratory medicine there is a growing tendency for finding out the most specific and most sensitive biomarkers as indicators of a disease and diagnostic means for the follow-up treatment and therapeutical results. Detection of sensitive biomarkers was speeded up by world companies as manufacturers of diagnostic reagents. Today, the determination of some biochemical parameters is performed by immunodetermination which uses monoclonal antibodies and different markers, and thus achieving the desired high specificity of determination. The selections of biomarkers which are the most important for the clinical practice and which will give the best diagnostic information, requires large researches including analytical, clinical and economic properties. Thanks to statistical methods, especially to ROC analysis, the so-called cutoff-values are determined. On the basis of these values differentiation between sick people and healthy individuals is possible. In other words, the evaluation of clinical specificity requires also inclusion of patients whose clinical picture reflects the disease for which a marker is tested. The development and choice of biomarkers is also helped by IFCC with suggestion of the best procedures and preparation of reference materials. The use of selected biomarkers must be profitable in respect of the price and diagnostic information. In the paper the principles of selection, use, diagnostic and prognostic significance of biomarkers is discussed. The following biomarkers served as examples: cardiovascular (troponin T and I, myoglobin, CK-MB mass), bone (deoxypyridinolin, osteocalcin, C-terminal propeptide collagen, type I, osteo-alkaline-phosphase), malignant (PSA) and for pancreas diseases (lipase, PAM).

**Key words:** biomarkers, specificity, sensitivity, cardiac markers, bone markers, PSA, lipase.

### Literatura

- Magid E. Some concepts and principles of clinical test evaluation. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; Suppl 208: 9 12.
- Robertson EA, Zweig MH, Van Steirteghem AC. Evaluation the clinical efficacy of laboratory tests. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 78 86.
- Moller-Petersen J. Evaluation of diagnostic tests. Design and phases. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; Suppl 208: 35 50.
- Reid MC, Lachs MS, Feinstein AR. Use of methodological standards in diagnostic test, A. Are the results of the study valid? *J Am Med Assoc* 1994; 271: 389 91.
- Ransohoff DF, Feinstein AR. Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests. *N Engl J Med* 1978; 299: 926 930.
- Dixon WJ, Masswy FJ Jr. Introduction to Statistical Analysis, Fourth edition, New York, McGraw-Hill, 1983, pp 319 24.
- Greenberg RA, Jekel JF. Some problems in the determination of the false positive and false negative results of tuberculin tests. *Am Rev Respir Dis* 1969; 100: 645 50.
- Yerushalmy J. Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. *Public Health Rep* 1947, 62: 1432 49.
- Vecchio TJ. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. *N Engl J Med* 1966; 274: 1171 3.
- Galen RS, Gambino SR. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnoses. New York, Wiley, 1975.
- Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristics (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39: 561 77.å
- Boyd JC. Mathematical tools for demonstrating the clinical usefulness of biochemical markers. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 46 63.
- Boyd JC, Ladenson JH. Value of laboratory tests in the differential diagnosis of hypercalcemia. *Am J Med* 1984; 77: 863 72.
- Bamber D. The area above the ordinal dominance graph and the area below the receiver operating characteristic curve. *J Math Psychol* 1975; 12: 387 415.
- Campbell G. General methodology I. Advances in statistical methodology for the evaluation of diagnostic and laboratory tests. *Stat Med* 1994; 13: 499 508.
- Wu AHB. Introduction to Coronary Artery Disease (CAD) and Biochemical Markers. In: Cardiac Markers, Ed. Alan HB Wu, Humana Press, Totowa, New Jersey 1998; pp 3 20.

17. Majkić-Singh N. The role of biochemical markers in detection of bone metabolism and diseases. *Jug Med Biohem* 1997; 16: 185 196.
18. Ilić M, Majkić-Singh N. The biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Le medicine Biopathologiste* 1977; 43 44: 51.
19. Ilić M, Majkić-Singh N. Značaj kliničko-biohemijskih parametara za praćenje osteoporoze. *Jugoslav Med Biohem* 1996; 15: 216.
20. Majkić-Singh N, Ilić M, Ignjatović S. The role of biochemical markers in detection of bone metabolism and diseases. *Balkan J Clin Lab* 1997; 4:45.
21. Majkić-Singh N. The biochemical markers of osteoporosis. *Scientific Review* 2000; 27: 57 74.
22. Brown JP, Delmas PD, Malaval L et al. Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984; 1: 1091 1093.
23. Delmas PD, Malaval L, Arlot M et al. Serum bone-Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone* 1985; 6: 339 41.
24. Carpenter T, Mackowiak SJ, Troiano N, Gundberg CM. Osteocalcin and its message: relationship to bone histology in magnesium-deprived rats. *Am J Physiol* 1992; 263: E107-E114.
25. Chen JT, Hosoda K, Hasumi K, Ogata E, Shiraki M. Serum N-terminal osteocalcin is a good indicator for estimating responders to hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Bone Min Res* 1996; 11: 1784 92.
26. Gorai L, Hosoda K, Taguchi Y et al. A heterogeneity in serum osteocalcin N-terminal fragments in Paget's diseases: comparison with other biochemical indices in pre- and post-menopause. *J Bone Min Res* 1997; 12 (S1): T678.
27. Liu SH, Yang RS al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament and bone healing. A current review. *Clin Orthop* 1995; 318: 265 78.
28. Fessler LI, Morris NP, Fessler JH. Procollagen: biological scission of amino and carboxy extension peptides. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975; 72: 4905 09.
29. Watt KWK, Lee PJ, M Timkulu T. Human prostate specific antigen: Structural and functional similarity with serine protease. *Proc Nat Acad Sci* 1986; 83: 316 17.
30. McCormic RT, Rittenhouse HG, Faimly JA. Molecular forms of prostate specific antigen and the human kallikrein gene family: A new era. *Urology* 1995; 45: 729 44.
31. Christensson A, Laurell CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostate specific antigen and its reactions with extracellular serine protease inhibitors. *Eur J Biochem* 1990; 194: 755 63.
32. Vessella LR, Lange PH. Issues in the assessment of PSA immunoassays. *The Urologic Clinics of North America* 1993; 20: 607 17.
33. Rudy JL. Differentiating between sensitivity and limit of detection (Letter). *Clin Chem* 1989; 35:509.
34. Lange PH, Ercole CJ, Lightner DJ. The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. *J Urol* 1989; 141: 873 9.
35. Vessella RL, Noteboom J, Lange PH. Evaluation of the Abbott IMx automated immunoassay of prostate specific antigen. *Clin Chem* 1992; 38: 2044 54.
36. Weber TH, Kapyaho KI, Tanner P. Endogenous interference in immunoassays in clinical chemistry: A review. *Scand J Lab Invest* 1990, 50: 77 82.
37. Lalić N, Majkić-Singh N, Mičić S, Džamić Z, Aćimović M, Bojanić N, Hadži-Đokić J. Correlation of methods for determination of prostate specific antigen. *Jug Med Biohem* 1998; 17: 81 86.
38. Christenson RH, Azzary HME. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998; 44: 1855 86.
39. Hartmann F, Kampmann M, Frey N, Muller-Bardorff M, Katus HA. Biochemical markers in the diagnosis of coronary artery disease. *Eur Heart J* 1998; 19: Suppl N: N2 7.
40. Panteghini M, Apple FS, Christianson RH, Dati F, Mair J, Wu AH. Use of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 687 93.
41. Henderson AR. The use of biochemical markers in ischemic heart disease: Prefatory remarks. *Clin Chem Acta* 1998; 272:3 9.
42. Panteghini M, Pagani F, Bonetti G. The sensitivity of cardiac markers: an evidence-based approach. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37:1097 106.
43. Majkić-Singh N. Biohemijski parametri za dijagnostikovanje infarkta miokarda. *Infarm* 1998; 4:18 19.
44. Majkić-Singh N. Novi biohemijski markeri oštećenja miokarda. *Arhiv za farmaciju* 1998; 5: 577
45. Majkić-Singh N. Biohemijski markeri oštećenja miokarda. U knjizi: *Interna medicina Odabrana poglavlja*, V. Drecun, NR Paleev, M. Babić, S. Stožinić, Knjiga prva. I.P. Obeležja, Beograd 2000.
46. Ignjatović S. Biohemijski parametri akutnog pankreatitisa: analitička i klinička vrednost. *Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Beograd, 1997.*
47. Ignjatović S, Majkić-Singh N, Mitrović M, Gvozdrenović M. Biochemical evaluation of patients with acute pancreatitis. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:1141 44.
48. Kairisto V, Poola A. Software for illustrative presentation of basic clinical characteristics of laboratory tests-GraphRoc for Windows. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; Suppl 222: 43 60.

*Rad primljen: 15. 09. 2001*

*Prihvaćen za štampu: 21 01. 2002*