

PRIMENA BIOHEMIJSKIH MARKERA ZA DIJAGNOSTIKOVANJE AKUTNOG KORONARNOG SINDROMA

Nada Majkić-Singh

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet, Beograd

Kratak sadržaj: Uprkos korišćenja niza medicinskih tehnika, dijagnostika se u većini slučajeva zasniva na merenju aktivnosti serumskih enzima, izoenzima i izoformi, uz određivanje koncentracije pojedinih strukturnih i drugih proteina koji se nalaze u srčanom mišiću. Merenje srčanih markera u krvi je preko 50 godina osnova dijagnostikovanja akutnog infarkta miokarda. Međutim, veoma rano je otkriveno da specifičnost AST, LDH i CK nije visoka za srčana oboljenja, s obzirom na to da oštećenja jetre i skeletnih mišića, kao i hemoliza dovode do pojave lažno pozitivnih rezultata. Primenom elektroforetskih tehnika utvrđeno je da veću specifičnost od određivanja ukupne aktivnosti CK imaju izoenzimi LDH i CK. Kako je elektroforetsko razdvajanje bilo zametno i dugotrajno za određivanje izoenzima CK-MB, 1975. godine primenjena je imunoinhibicija M-subjedinice izoenzima CK-MM i CK-MB. Razvojem imunoodređivanja omogućeno je određivanje koncentracije enzima, koja ne zavisi od toga da li je enzim aktivan ili nije. Princip određivanja »mase« omogućio je i merenje proteinskih markera koji sami nisu enzimi. Sledeći izmenu kliničke prakse, danas je neophodno da se otkrije minoran miokardijalni infarkt u pacijenata sa nestabilnom anginom. Proučavanja su pokazala da su pacijenti koji imaju povećanje troponina pod visokim i brzim rizikom od smrti i AIM. Najnovija saznanja o primeni srčanih markera omogućavaju izbor odgovarajuće terapije za pacijente sa akutnim koronarnim sindromom. Prednost novih srčanih markera kao što je troponin leži u njegovoj visokoj srčanoj specifičnosti i mogućnostima određivanja sa niskim detekcionim limitima. Danas se smatra da se tradicionalni enzimi kao što su CK i CK-MB izlučuju samo u slučaju ireverzibilnih miokardijalnih nekroza. Dokazano je da se srčani troponini i to slobodan citozolni troponin izlučuju osim u ireverzibilnom oštećenju ćelija i u reverzibilnoj ishemijski. Iz ovog razloga Komisija IFCC-a za standardizaciju srčanih markera (IFCC C-SMCD) preporučila je dve »cut-off« koncentracije za srčani troponin koje omogućavaju razlikovanje zdravih od osoba sa minornim miokardijalnim oštećenjem i AIM. U izvesnim slučajevima niska cut-off vrednost može da otkrije reverzibilne ishemijske promene.

Cljučne reči: akutni koronarni sindromi, akutni infarkt miokarda, biohemijski markeri, tradicionalni enzimi, srčano-specifični proteini

Uvod

Praćenje i tretman koronarnih srčanih oboljenja zahteva veoma velika ulaganja zdravstvenih resursa, počev od primene kompleksnih dijagnostičkih procedura, hirurških zahvata, uključujući i transplantaciju srca, pa do primene trombolitičke terapije nakon infarkta miokarda. Rana identifikacija i potvrda akutnog infarkta miokarda (AIM) veoma je značajna za zbrinjavanje pacijenta i donošenje pravovaljanih odluka. Približno 5 odstotno pacijenata sa AIM otpušta se nenamerno iz urgentne službe, što ih izlaže opasnosti od morbiditeta i mortaliteta usled infarktne komplikacije. Ovo se događa zato što kod oko jedne četvrtine pacijenata akutni infarkt miokarda prolazi bez atipičnih znakova i simptoma. Mada se elektrokardiografija (EKG) smatra najjednostavnijim, najpogodnijim, najrealnijim i najreproducibilnijim postupkom za rano dijagnostikovanje

miokarda, približno polovina ovih pacijenata ima nekarakterističan EKG u vreme prijema u hitnu službu.

Uprkos korišćenja niza medicinskih tehnika, dijagnostika se u većini slučajeva zasniva i oslanja na merenje aktivnosti serumskih enzima, izoenzima i izoformi, uz određivanje koncentracije pojedinih strukturnih i drugih proteina koji se nalaze u srčanom mišiću. Merenje srčanih markera u krvi je preko 50 godina osnova dijagnostikovanja akutnog infarkta miokarda. Primena ne-izotopskog imunoodređivanja omogućila je merenje koncentracije mase proteina umesto aktivnosti enzima. Sledeći izmenu kliničke prakse, danas je neophodno da se otkrije minoran miokardijalni infarkt u pacijenata sa nestabilnom anginom. Proučavanja su pokazala da su pacijenti koji imaju povećanje troponina pod visokim i brzim rizikom od smrti i AIM. Najnovija saznanja o primeni srčanih markera omogućavaju izbor

odgovarajuće terapije za pacijente sa akutnim koronarnim sindromom. Prednost novih srčanih markera kao što je troponin leži u njegovoj visokoj srčanoj specifičnosti i mogućnostima određivanja sa niskim detekcionim limitima. Danas se smatra da se tradicionalni enzimi kao što su CK i CK-MB izlučuju samo u slučaju ireverzibilnih miokardijalnih nekroza. Dokazano je da se srčani troponini i to slobodan citozolni troponin izlučuju osim u ireverzibilnom oštećenju ćelija i u reverzibilnoj ishemiji. Iz ovog razloga Komisija IFCC-a za standardizaciju srčanih markera (IFCC C-SMCD) preporučila je dve »cut-off« koncentracije za srčani troponin koje omogućavaju razlikovanje zdravih od minornog miokardijalnog oštećenja i AIM. U izvesnim slučajevima niska cut-off vrednost može da otkrije reverzibilne ishemijske promene.

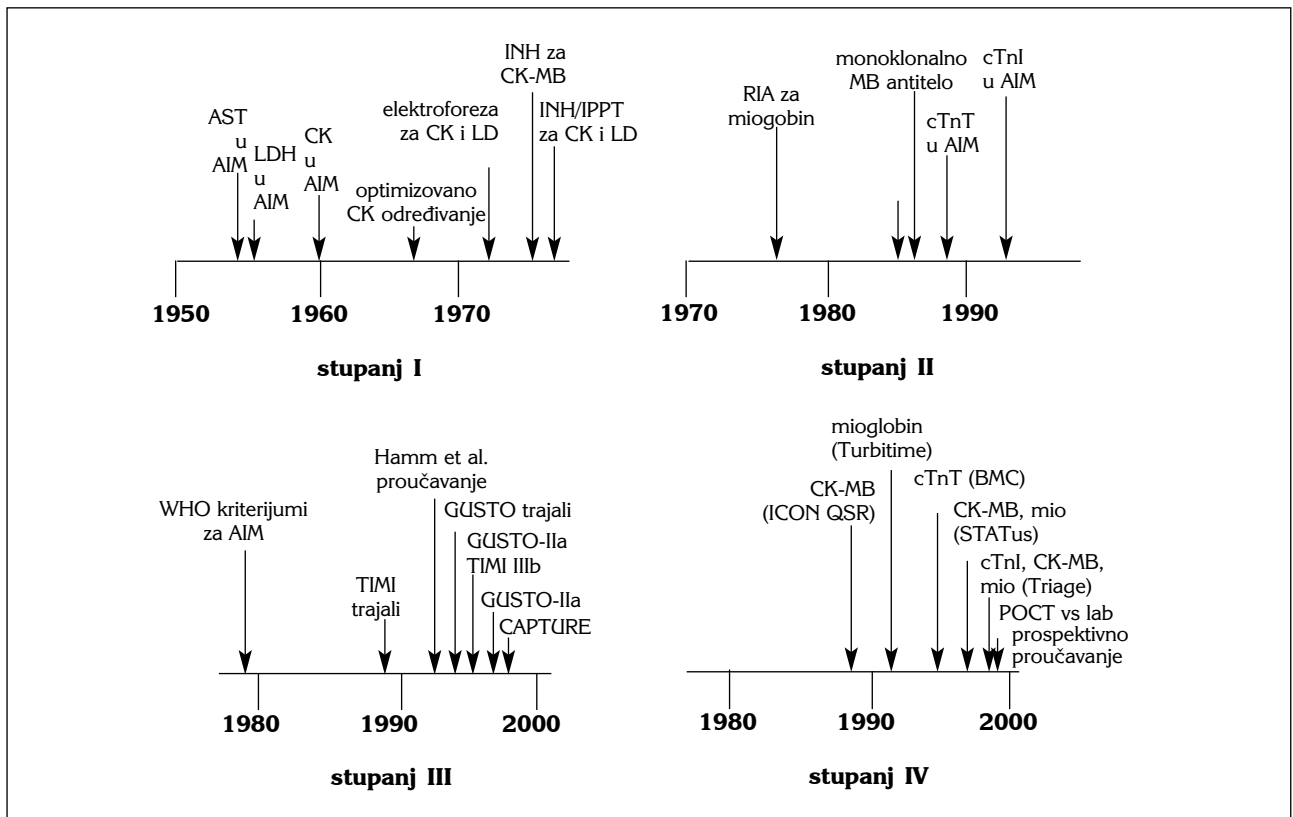
Razvoj i vrsta biohemijskih pokazatelja

Istorijski razvoj srčanih markera koji se primenjuje za evaluaciju kardiovaskularnih oboljenja prikazan je na slici 1 i to kroz četiri stupnja (I-IV) (1).

Stupanj I: enzimski markeri. Za dijagnostikovanje akutnog infarkta miokarda prvi put je 1954. go-

dine Karmen sa sar. (2) primenio aspartat aminotransferazu (AST) kao biohemijski marker. Godinu dana kasnije isti autori opisali su primenu laktat dehidrogenaze (LDH) u otkrivanju AIM (3). Primena kreatin kinaze (CK) za dijagnostikovanja AIM pacijenata prvi put je opisana 1960. godine (4). Oliver (5) je uveo metodu za određivanje CK koja se zasnivala na primeni heksokinaze i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze kao pomoćnog i mernog enzima; ovu metodu je nekoliko godina kasnije modifikovao Rosalki (6). Metoda zasnovana na ovom principu iskorišćena je kasnije za standardizaciju IFCC određivanja CK (7).

Veoma rano je otkriveno da specifičnost AST, LDH i CK nije visoka za srčana oboljenja, s obzirom na to da oštećenja jetre i skeletnih mišića, kao i hemoliza dovode do pojave lažno pozitivnih rezultata. Primenom elektroforetskih tehnika utvrđeno je da veću specifičnost od određivanja ukupne aktivnosti CK imaju izoenzimi LDH i CK (8). S obzirom na to da je elektroforetsko razdvajanje bilo zametno i dugotrajno za određivanje izoenzima CK-MB, 1975. godine primenjena je imunoinhibicija M-subjedinice izoenzima CK-MM i CK-MB. Specifična antitela su se vezivala i sterno inhibirala samo M-subjedinicu ovog enzima. U odsustvu CK-BB izoenzima i makro CK formi, preostala aktivnost odgova-



Slika 1. Stupnjevi uvođenja srčanih markera u dijagnostiku: *Stupanj I*: primena enzima kao nespecifičnih markera AIM.

Stupanj II: razvoj merjenja koncentracije mase proteina i enzima.

Stupanj III: visoko specifični i osetljivi markeri za stratifikaciju rizika i izbor terapije.

Stupanj IV: kvalitativna i kvantitativna point-of care tehnologija za srčane markere (1)

rala je B subjediničnik CK-MB. Ovo određivanje je postalo jako pogodno zbog niske cene koštanja, i mogućnosti primene na biohemijskim analizatorima. Uvođenjem precipitacionog stupnja (imunoprecipitacija) modifikovano je ovo određivanje. Naime, drugo precipitirajuće antitelo koje je dodato prepoznavalo je prvo. Precipitirajuće antitelo obezbeđivalo je »slepu probu« određivanja, s obzirom na to da su uklanjani CK-MM i CK-MB, kao i izoenzimi LDH 2 i 5.

Stupanj II: proteinski markeri. Inicijalni markeri za srčana oboljenja bili su enzimi čija je izmerena aktivnost odgovarala intenzitetu srčanog oštećenja. Međutim, razvojem imunoodređivanja omogućeno je određivanje koncentracije enzima, koja ne zavisi od toga da li je enzim aktivan ili nije. Princip određivanja »mase« omogućio je i merenje proteinskih markera koji sami nisu enzimi. Primenom radioimuno-određivanja (RIA), mioglobin je prvi proteinski marker primenjen za AIM (9). Nakon nekroze miokarda, mioglobin se pojavljuje u krvi ranije nego enzimi AST, CK i LDH, zbog svoje niske molekulske mase, koja iznosi 17 kDa. Međutim, RIA nije bila pogodna metoda za rutinsko i stat analiziranje, tako da kliničkog interesovanja za ovo određivanje nije bilo sve do ranih 1990. godina (10), kada je uvedeno automatizovano neizotopsko imunoodređivanje. Bez obzira na ovu činjenicu, mioglobin se rutinski ne određuje u većini bolnica širom sveta.

Godine 1985. opisano je prvo manuelno određivanje mase CK-MB, primenom anti-CK-M i anti-CK-B antitela (11). Još uvek se smatra da je određivanje CK-MB »zlatni standard« među biohemijskim markerima AIM.

Određivanja srčanih troponina T (cTnT) i I (cTnI) razvijena su kasnih 1980-ih godina (12, 13). Srčani troponin je superiorniji od CK-MB zato što se skeletni mišićni troponin strukturno razlikuje od srčanog troponina i nema ukrštene reaktivnosti između antitela koja se koriste u aktuelnim generacijama određivanja. Mioglobin i CK-MB iz srca su identični onim koji se nalaze u skeletnim mišićima. S obzirom na patentna prava, određivanje cTnT je moguće samo pomoću testa firme Roche Diagnostics (ranije Boehringer Mannheim Corporation), dok testove za određivanje cTnI proizvodi više svetskih kompanija. Iz navedenih razloga IFCC C-SMCD se bavi standardizacijom određivanja ovog troponina.

Stupanj III: kliničke studije. Nakon uspostavljanja kriterijuma Svetske zdravstvene organizacije, 1979. godine (14), enzimi su uključeni u trijadu AIM dijagnostike. Primena cTnT, 1989. godine, (12) i cTnI, 1992. godine (13) označila je novu prekretnicu u dijagnostikovanju kardiovaskularnih oboljenja.

Više velikih kliničkih studija u oblasti kardiologije obuhvatio je ulogu serumskih srčanih markera (15). Studija označena kao TIMI (The Thrombolysis in Myocardial Infarction) započeta je 1987. godine i bavila se poređenjem intravenske streptokinaze prema tkivnom

plazminogen aktivatoru (16). GUSTO (The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries) ispitivanja su otpočela 1993. godine i bavila su se pitanjima višestruke trombolitičke strategije (17). Nakon ovih bilo je više drugih TIMI i GUSTO trajala, uzimana je krv od ovih pacijenata i izvođena su brojna laboratorijska ispitivanja na ovim uzorcima.

Prvi dokaz o primeni cTnT u stratifikaciji rizika objavio je Hamm sa sar. (18) ispitujući 84 pacijenta sa nestabilnom anginom (NA), kada je pokazao da patološke koncentracije cTnT ukazuju na značajno veću učestalost srčane smrti i AIM nego u grupi pacijenata sa NA i negativnim rezultatima troponina. Ova preliminarna ispitivanja potvrđena su na mnogo većim studijama objavljenim istovremeno 1996. godine poznatim kao GUSTO-IIa za cTnT (19) i TIMI IIIb za cTnI (20). Kasnija ispitivanja korisnosti srčanih markera bila su vezana i za izbor terapije bolesti srca.

Stupanj IV: ispitivanje pored pacijenta (Point-of-care testing, POCT). Kvalitativna i kvantitativna »point-of-care« tehnologija za srčane markere razvijena je krajem dvadesetog veka. U vezi značaja POCT ispitivanja u kliničkoj praksi u ishemijske srčane bolesti ovde se navodi nekoliko prvih literaturnih podataka o ovoj problematici (21-27).

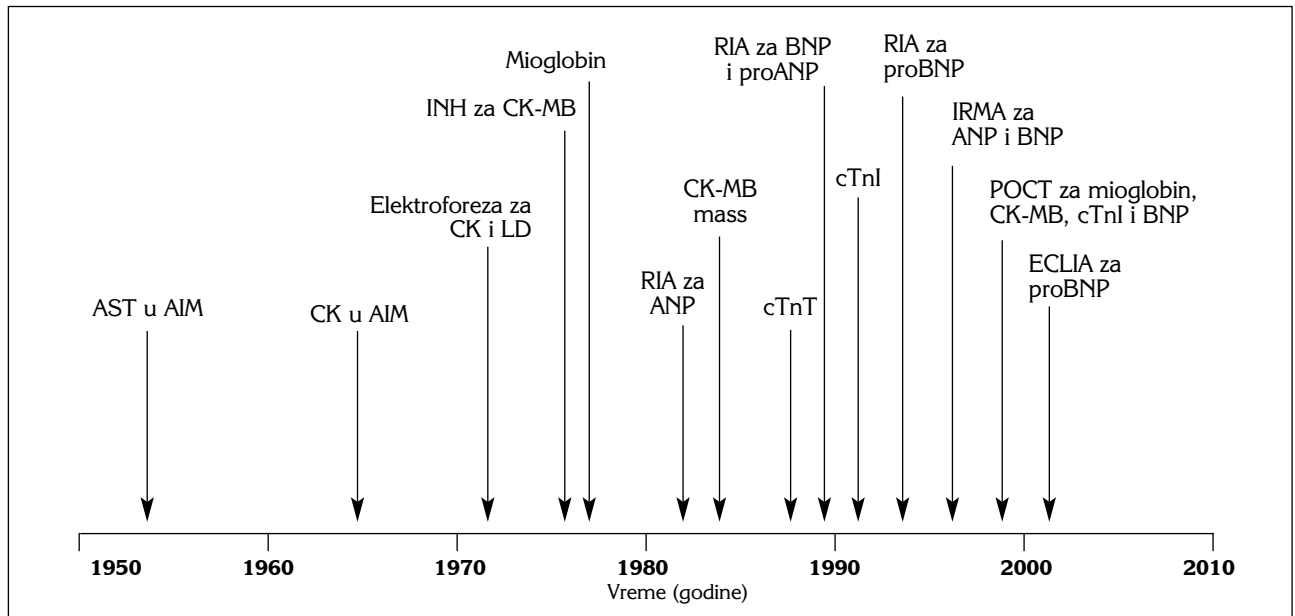
Shodno izloženom vidi se da je poslednjih 20 godina učinjen značajan napredak u razvijanju novih laboratorijskih određivanja markera srčanih oboljenja. Uvedena su određivanja visoko osetljivih i/ili specifičnih određivanja za otkrivanje miokardijalne ishemije (imunoodređivanja mioglobina, CK-MB i srčanih troponina I i T), a zatim i imunoodređivanja srčanih natriuretskih hormona (npr. atrijalnog natriuretskog peptida, ANP; moždanog natriuretskog peptida, BNP i drugih srodnih pro-peptida), koji se danas smatraju značajnim markerima miokardijalne funkcije (28-32), i komercijalno su dostupni. Shodno ovome na slici 2 prikazan je samo razvoj biohemijskih pokazatelja do današnjih dana.

Osim napred navedenih biohemijskih pokazatelja oštećenja miokarda u laboratorijsku dijagnostiku danas je uveden niz faktora rizika, koji su pridodati klasičnim faktorima rizika kardiovaskularnih oboljenja (v. Tabelu I).

Treba ukazati i na činjenicu da će intenzivan razvoj procedura za genetska ispitivanja uticati u oblasti kardiologije na definisanje dijagnoze na molekularnom nivou, uzimajući u obzir nove faktore rizika i bolje razumevanje mogućnosti farmakoterapije kod pacijenata sa kardiovaskularnim oboljenjima (33).

Shodno iznetom laboratorijski testovi koji su korisni u kliničkoj kardiologiji danas mogu da se klasifikuju u četiri grupe (v. Tabelu I).

Uvođenje visoko specifičnih i osetljivih pokazatelja oštećenja srčanog tkiva (prva grupa u Tabeli I) u kliničkoj praksi je dovelo do revolucije u klasifikaciji i patofiziologiji infarkta miokarda (34). Određivanje srča-



Slika 2. Razvoj i primena biohemijskih pokazatelja oštećenja tkiva miokarda i njegove funkcije.
 AST: aspartat aminotferaza; CK: kreatin kinaza; LD: laktat dehidrogenaza; cTn: srčani specifični troponin;
 ECLIA: elektroluminiscentno imunoodređivanje; POCT: point-of-care testing

Tabela I Klasifikacija laboratorijskih testova koji se primenjuju u kliničkoj kardiologiji

1. Određivanje pokazatelja oštećenja srčanog tkiva
2. Određivanje pokazatelja funkcije miokarda
3. Određivanje faktora kardiovaskularnog rizika
4. Genetska analiza gena kandidata ili faktora rizika za kardiovaskularna oboljenja

nih natriuretskih hormona (CNH) (tj. pokazatelja iz druge grupe u *Tabeli I*), koji su od skora uvedeni kao screening testovi u prvom stupnju algoritma za dijagnostikovanje srčanih poremećaja od *Task Force of the European Society of Cardiology* (35), bez obzira na činjenicu da uloga CNH u identifikaciji i zbrinjavanju pacijenata sa simptomatskom i asimptomatskom levom ventrikularnom disfunkcijom još uvek nije u potpunosti razjašnjena (36).

Treba istaći da se procena lipidnog profila [merenja LDL i HDL-holesterola, triglicerida i lipoproteina (a)], a od nedavno i određivanja C-reaktivnog proteina (37) preporučuju kao laboratorijski testovi za procenu individualnog rizika i/ili za procenu mogućnosti prevencije kardiovaskularnih oboljenja. Još uvek se proučavaju drugi mogući kardiovaskularni faktori rizika u odnosu na njihovu korisnost, naročito za prevenciju ili praćenje koronarnih arterijskih oboljenja (v. *Tabelu II*).

Tabela II Klasični (dobro dokumentovani) i neki noviji kardiovaskularni faktori rizika

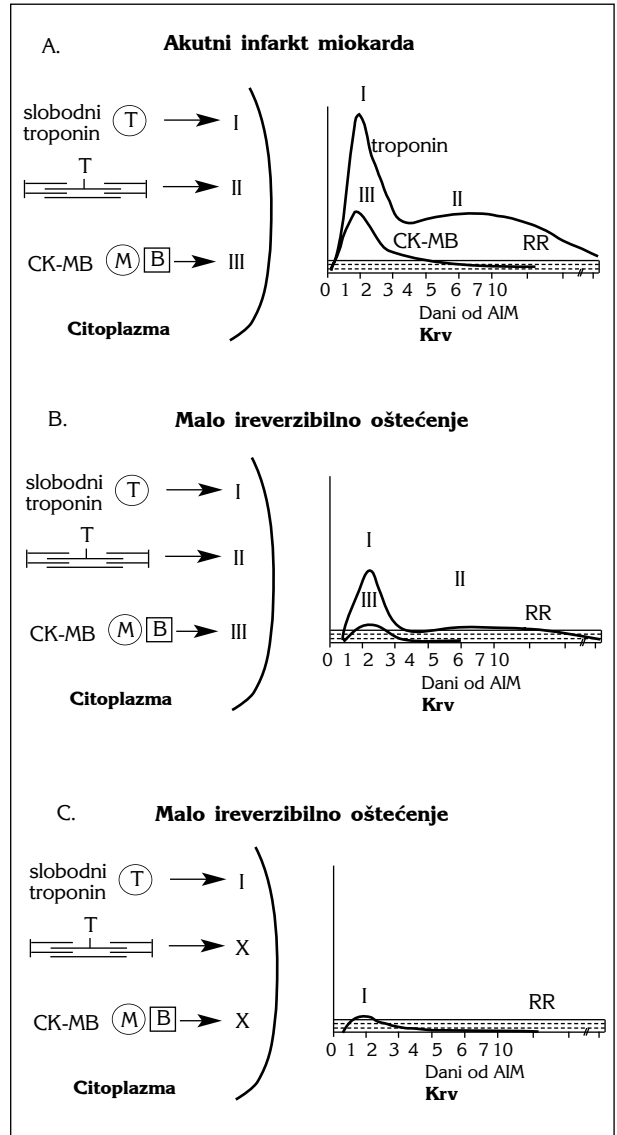
Klasični faktori rizika
<ul style="list-style-type: none"> ō godine ō pol ō pozitivna porodična istorija kardiovaskularnog oboljenja ō sistemska hipertenzija ō pušenje ō dislipidemija ō fizička neaktivnost ō debljina ō insulinska rezistencija i dijabetes ō mentalni stres i psihosocijalni faktori ō estrogeni status
Noviji faktori rizika
<ul style="list-style-type: none"> ō homocistein ō fibrinogen ō lipoprotein(a) ō mikroalbuminurija ō γ-glutamil transferaza ō angiotenzin II ō mokraćna kiselina ō markeri koagulacije i fibrinolitičke funkcije (PAI-1, t-PA, D-dimer i faktor V Leiden) ō markeri inflamacije (CRP, adhezione molekule: VCAM i ICAM) i pro-inflamatorni citokini (IL-6 i TNFα) ō infektivni agensi (<i>Citomegalovirus</i>, <i>Herpes simplex virus</i>, <i>Chlamydia pneumoniae</i>, <i>Helicobacter pylori</i>)

Izlazak biohemijskih markera nakon miokardijalne ishemije i nekroze

Jedno od najznačajnijih pitanja za interpretaciju srčanog markera koji je prešao u krv pacijenta sa akutnim koronarnim sindromima je njegovo subcelularno poreklo. Godinama je poznato da tradicionalni enzimi kao što su CK i LDH prelaze iz citozolnih pulova u cirkulaciju putem srčanog limfnog sistema. Na slici 3 prikazano je postulirano izlaženje srčanih markera nakon oštećenja.

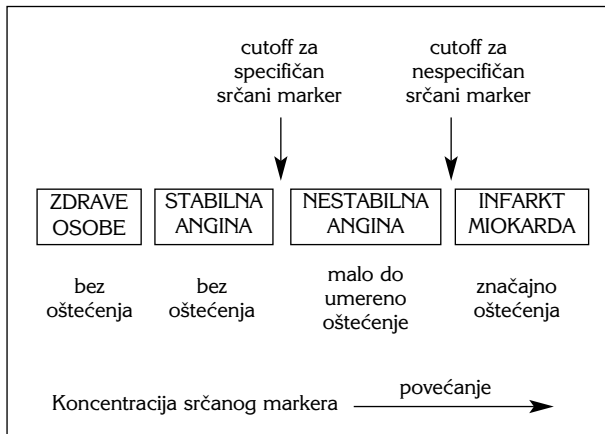
Kao što je prikazano na slici 3A i B, CK-MB se monofazno izlučuje posle AIM i ireverzibilnog minornog miokardijalnog oštećenja. Zbog velike molekulske mase ovih enzima (84 i 144 kDa), ovi proteini ne prolaze kroz membranu sve dok miociti nisu ireverzibilno oštećeni (3B). Srčani troponin je vezan za tropomiozin poprečno-prugastih mišića kao deo kompleksa tri sub-jedinice, T, I i C. Oko 6-8% cTnT i 2,8-4,1% cTnI je nađeno u citozolu u obliku slobodnih sub-jedinica (38). Nakon AIM i ireverzibilnog minornog miokardijalnog oštećenja (Slika 3A i B), izlazak cTnT je bifazan, sa inicijalnim izlučivanjem slobodnog oblika iz citozolnog pula, i produženim izlučivanjem isled oštećenja kontraktilnog aparata. Veoma je značajno pitanje da li / ili ne cTnT i cTnI prolaze kroz miokardijalnu ćelijsku membranu u reverzibilnoj ishemiji (kao što je postulirano na slici 3C). Molekulske mase ovih proteina su 21-24, odnosno 30-35 kDa, što znači da su značajno niže nego u CK i LDH (38). Podaci iz kliničkih proučavanja pokazuju da su koncentracije troponina često povećane u pojedinim pacijenata sa akutnim koronarnim sindromima sa normalnim koncentracijama CK, CK-MB i LDH. Ovo se može objasniti na dva načina: a) visoka osetljivost i specifičnost srčanog troponina omogućava korišćenje niskih »cut-off« koncentracija i bolje otkrivanje minornih miokardijalnih oštećenja, i b) troponin se izlučuje u slučaju reverzibilne (citozolna forma) i ireverzibilne (citozolna i strukturna forma) ishemije.

Klinički nalaz patoloških koncentracija srčanog troponina kod pacijenata u kojih je AIM isključen, i u kojih je koncentracija mase CK-MB ispod diskriminacionog limita označava se kao »minorno miokardijalno oštećenje« (39). Ova situacija se javlja u približno 20-40% pacijenata sa nestabilnom anginom. Razlike u načinu utvrđivanja »cut-off« koncentracija između ova dva određivanja mogu biti uzrok ove pojave. Za nespecifične markere, kao što je CK-MB, cut-off koncentracije su tradicionalno tako postavljene da razlikuju zdrave od stabilne angine, i pacijente sa nestabilnom anginom od AIM (40) (v. sliku 4). Pacijenti sa minornim miokardijalnim oštećenjem imaju rezultate koji će biti ispod cut-off vrednosti. Primena niže cut-off koncentracije usloviće povećan broj lažno pozitivnih rezultata u pacijenata ili osoba sa oštećenjem ili oboljenjem skeletnih mišića. S obzirom na to da je srčani troponin veoma specifičan marker, niža cut-off koncentracija može da se koristi za otkrivanje minornih miokardijalnih oštećenja bez pojave velikog broja lažno pozitivnih



Slika 3. Postulirano izlučivanje srčanih markera nakon oštećenja: A. Akutni infarkt miokarda (AIM). Inicijalna pojava cTn u krvi je posledica izlaska iz citozolnog pula (I), dok je produženo izlaženje posledica propadanja kontraktilnog aparata (II). Monofazna pojava CK (i izoenzima LDH) (III) je posledica izlaska iz citozolnog pula. B. Minorno ireverzibilno oštećenje. cTn i izoenzimi CK su kao i AIM, mada su koncentracije niže. C. Reverzibilno ishemijsko oštećenje. cTn se pojavljuje u krvi verovatno samo usled izlaska iz citozolnog pula. Kako nisu oštećeni strukturni elementi, klirens iz krvi je brz. U reverzibilnoj ishemiji nema povećanja izoenzima CK ili strukturnih proteina (označeno sa »X«). RR označavaju granice referentnih vrednosti (38)

rezultata, odnosno razlikovanje između zdravih pacijenata i onih sa stabilnom anginom od onih kod kojih su oštećenja izazvana nestabilnom anginom i AIM, bez bojazni da će se broj lažno pozitivnih rezultata sledstveno tome povećavati. Činjenica da troponina ima više u tkivima od CK-MB (10,8 mg cTnT/g vlažne težine, 5 mg cTnI/g vlažne težine, prema 1,4 mg CK-MB/g vlažne težine) takođe utiče da su ova određivanja



Slika 4. Izbor cut-off koncentracija i njihov uticaj na otkrivanje minornih miokardijalnih oštećenja (40)

osetljivija u slučaju ireverzibilnog minornog miokardijalnog oštećenja.

U toku anoksije koja je izazvana umanjnim protokom krvi i miokardijalnom ishemijom, izlaze proteini male molekulske mase kao što su cTnT i CTnI u krv, čak i kad su miociti u reverzibilnom stanju. Uspostavljanjem protoka krvi u ovih pacijenata ćelije se potpuno oporavljaju. Hipoteza reverzibilnog koncepta oštećenja je iskorišćena za postavljanje hipoteze da srčani troponini u reverzibilnoj ishemiji potiču iz slobodnog citozolnog pula a ne iz strukturnih elemenata (v. sliku 3C). Ako je ova hipoteza tačna, povećanje troponina u ovih pacijenata ne može da se objasni samo ukupno višim tkivnim sadržajem troponina u odnosu na CK-MB.

Ako se cTnT i cTnI izlučuju u krv u slučaju reverzibilne i ireverzibilne ishemije, to opravdava preporuku IFCC C-SMCD za uspostavljanjem dve cut-off koncentracije kao neopohodne za interpretaciju rezultata srčanog troponina. Prva vrednost je na gornjoj granici normalnih vrednosti i omogućava otkrivanje minornih miokardijalnih oštećenja. U izvesnim slučajevima troponin se oslobađa u reverzibilnoj ishemiji. Druga vrednost je postavljena radi razlikovanja nestabilne angine od AIM, i koristi se za otkrivanje ireverzibilnih oštećenja (v. sliku 4). Ova poslednja vrednost se koristi uz aktuelnu vrednost za CK-MB.

Određivanje markera oštećenja srčanog tkiva

Prvi biohemijski marker akutnog infarkta miokarda bila je aspartat aminotransferaza, koja je postepeno zamenjena sa određivanjem kreatin kinaze. Uvođenje elektroforetskih tehnika omogućilo je analizu izoenzima LDH i CK, kao mnogo specifičnijih od određivanja ukupne aktivnosti. Poslednjih 30 godina u kliničku praksu uvedena su imunoodređivanja srčanih enzima i strukturnih proteina, uključujući određivanja izoenzima CK-MB, mioglobina, miozina i troponina I i T. Istovremeno je došlo do revizije klasifikacije i patogeneze

koronarnih arterijskih oboljenja, što je omogućila primena visoko specifičnih i osetljivih markera oštećenja srčanog tkiva i to prvenstveno kao cTnI ili cTnT i delimično određivanje mase CK-MB. Ako se prihvati koncept da se bilo koji nivo nekroze miokarda izazvane ishemijom označi kao infarkt, znači da se neka osoba koja je ranije dijagnostikovana da ima tešku, stabilnu ili nestabilnu anginu pektoris, danas može da se dijagnostikuje da ima mali infarkt miokarda (34, 41).

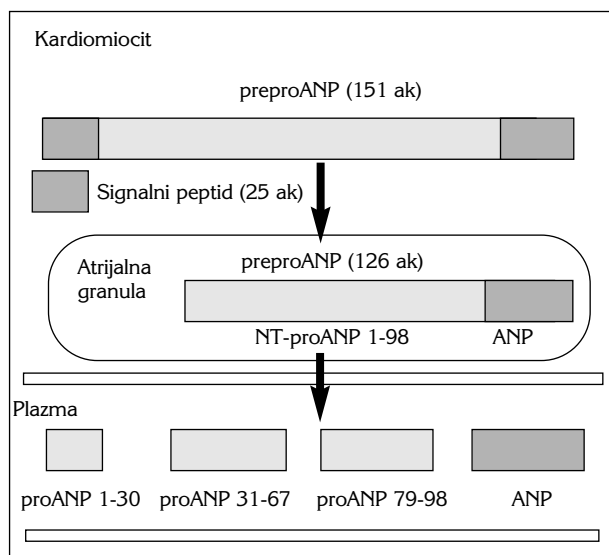
Pacijenti sa nestabilnom anginom mogu da se odvoje od onih sa infarktom miokarda bez povišenja ST-segmenta samo primenom određivanja troponina, kao specifičnih srčanih markera, kojima je moguće otkriti minimalnu (mikroskopsku) nekrozu miokarda. Da bi prema tome ovaj marker bio apsolutni pokazatelj promena potrebno je da mu se utvrde sve karakteristike uključujući referentne vrednosti, kao i detekcione limite, što je predmet opsežne standardizacije na međunarodnom nivou. Mora se imati na umu i da određivanje troponina kod svih pacijenata sa bolom u grudima, može da utiče na povećanje »lažno pozitivnih« rezultata, s obzirom na činjenicu da se nivo troponina može da poveća i u slučaju drugih kliničkih stanja osim u akutnom koronarnom sindromu (npr. miokarditis/perikarditis, kongestivni srčani poremećaj, sistemska arterijska hipertenzija, hipotiroidizam, srčana trauma, pulmonalni embolizam, amiloidoza, sepsa, hronični bubrežni poremećaji, itd.).

Određivanje markera funkcije miokarda

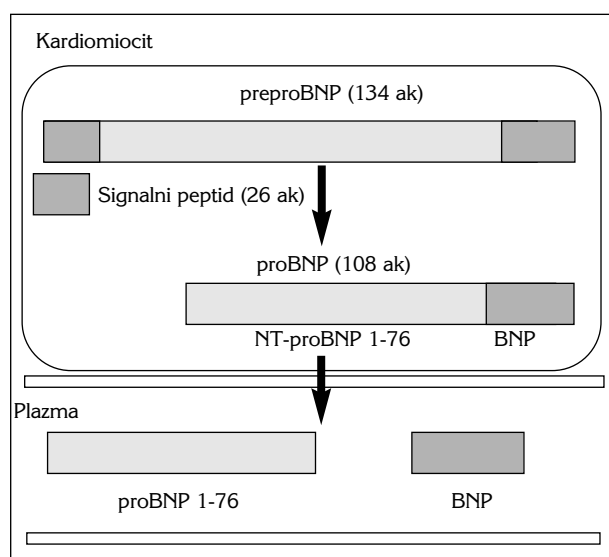
Utvrđeno je da srce ima endokrinu funkciju s obzirom na to da sintetizuje i izlučuje grupu peptidnih hormona sa značajnom diuretičnim, natriuretičnim i relaksirajućom aktivnosti na vaskularne glatke mišiće kompleksnim interakcijama sa hormonskim i nervnim sistemima. To znači da se srce odlikuje kako mehaničkom tako i neuroendokrinom funkcijom.

U kliničkoj praksi, mehanička funkcija (tj. pumpanje krvi kroz telo) ispituje se pomoću klasičnih invazivnih i neinvazivnih kardioloških ispitivanja, kao što je elektrokardiogram, scintigrafija ili srčana kateterizacija i nizom hemodinamskih ispitivanja.

Neuroendokrina funkcija srca uključuje ne samo srčani natriuretski hormonski sistem (CNH), već i simpatički i parasimpatički sistem, endotelinski sistem i renin-angiotenzin sistem, kao i druge faktore koji se proizvode u srčanom tkivu (42). Funkcionalna aktivnost ovih neuro-hormonskih sistema prati se pomoću specifičnih testova, kojima se mere nivoi ovih faktora u krvi ili u srčanom tkivu, kao i njihova kardijačna ekspresija, receptorska vezivanja i *in vivo* metabolizam (43). Kardijačni natriuretski hormoni su složena familija srodnih peptida sa sličnim peptidnim lancima kao i putevima razgradnje. CNH uključuju *atrijalni natriuretski peptid (ANP)* i *moždani natriuretski peptid (BNP)*, dok su drugi natriuretski peptidi, kao što su C-tip natriuretski peptid (CNP) i urodilatin, strukturno



Slika 5. Sinteza i sekrecija ANP



Slika 6. Sinteza i sekrecija BNP

slični ANP/BNP familiji peptida, mada ih ne produkuju i izlučuju srčana tkiva, već druga tkiva (28-32). CNH nastaju iz zajedničkih prekursora, prepro-hormona (tj. pre-pro-ANP i prepro-BNP), koji sadrže signalnu peptidnu sekvencu na amino-terminalnom kraju (v. Slike 5 i 6). Pro-hormoni (proANP i proBNP) nastaju otcepljenjem signalnog peptida; zatim se pro-hormonski peptid dalje cepa na duži NH₂-terminalni fragment (N-terminalni proANP ili N-terminalni proBNP) i kraći COOH-terminalni peptid (ANP ili BNP), koji se izlučuju u krv u ekvimolarnim količinama. Međutim, ANP i BNP imaju kraća poluvremena života u odnosu na N-terminalne peptide (proANP i proBNP) i shodno tome niže koncentracije u plazmi.

Proučavanja odnosa struktura-aktivnost ukazala su na značaj strukture centralnog prstena CNH koji se formira pomoću disulfidnog mosta između dva cisteinska ostatka. Ovaj cisteinski most je potreban za vezivanje specifičnih receptora. Hidrolitičko razgrađivanje prstena dovodi do gubitka biološke aktivnosti. Iz ovog razloga, samo ANP i NBP, koji imaju disulfidni most u peptidnom lancu, imaju tipičnu hormonsku aktivnost CNH, dok je N-terminalni proANP i proBNP nemaju. Mada danas postoji više načina za određivanje CNH, preostaje još uvek niz metodoloških problema i problema kliničke intepretacije rezultata određivanja CNH, da bi oni bili uvršteni u biološke markere srčane funkcije.

Srčani enzimi

Iskustvo je pokazalo da traganje za osetljivim biohemijskim markerima za rano dijagnostikovanje akutnih koronarnih sindroma i akutnog infarkta miokarda nalaže da se prevashodno poboljša dijagnostička tačnost markera koji se koriste za dijagnostikovanje kod pacijenata sa akutnim bolom u grudima.

Za dijagnostikovanje i praćenje koronarnih srčanih oboljenja danas se koriste sledeći dijagnostički testovi: određivanje aktivnosti kreatin kinaze, analiza izoenzima i izoformi CK, određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze i izoenzima LDH, aktivnosti aspartat aminotransferaze i izoenzima BB glikogen fosforilaze b.

CK-MB vrednosti izražavaju se preko aktivnosti, ali i kao udeo u odnosu na ukupnu CK aktivnost. Prednost izražavanja putem indeksa uzima u obzir CK-MB koja potiče iz skeletnih mišića, što znači da vrednosti udela CK-MB <0,05 i >0,05 ukazuju na oštećenje skeletnih mišića odnosno srčanog mišića. Ako se određuje masa CK-MB, CK-MB frakcija se označava kao »relativni indeks«, pošto se radi o rezultatima koji se izražavaju različitim jedinicama (44-55).

Uobičajeni izoenzimi kreatin kinaze su proizvodi gena koji se obeležavaju kao CK-3₃ i CK-2₂. CK izoenzimi imaju i svoje izoforme koje su prvi put razdvojene elektroforezom na poliakrilamidnom gelu 1972. godine (46). CK izoforme, koje su takođe poznate i pod nazivima subizoenzimi, subtipovi ili subforme, varijante su izoenzima CK-MM i CK-MB. Nastaju *in vivo* izmenama na M-subjedinici. CK-MM izoenzimski dimer ima tri izoforme (MM₃, MM₂ i MM₁) koje su označene prema elektroforetskoj pokretljivosti u odnosu na anodu. Izoforma MM₃ poznata je kao tkivna forma koja se nalazi u skeletnim mišićima i srcu. Nakon mišićnog oštećenja CK-MM₃ izlazi u serum, gde karboksipeptidaza-N otcepljuje karboksi-terminalni lizinski ostatak od jedne M-subjedinice, pri čemu nastaje intermedijerni oblik CK-MM₂. Zatim, i druga M-subjedinica gubi C-terminalni lizin i na taj način nastaje serumski oblik, CK-MM₁ (46). Karboksipeptidazna-N reakcija je reverzibilna i odigrava se sporo u toku 24 sata. S obzirom da je aktivnost karboksipeptidaze u serumu promenljiva, kao i količina

izoforni MM, to se one još uvek značajno ne koriste za procenu infarkta miokarda.

Karboksipeptidaza-N takođe deluje na M-subjedinicu CK-MB, pri čemu nastaju dve CK-MB izoforme i to prvo tkivna CK-MB₂, koja se prevodi u serumski oblik CK-MB₁ (47). Kod zdravih osoba koncentracija tkivne CK-MB₂ približno je jednaka koncentraciji serumске forme CK-MB₁. Primenom visoko naponske elektroforeze (900 V, Helena CardioRep analyzer) (48) moguće je za kratko vreme razdvojiti CK izoenzime i izoforme. Prema tome CK-MM i CK-MB izoforme su prirodni serumski degradacioni proizvodi jedinstvenog tkivnog izoenzima.

Izoenzim BB glikogen fosforilaze b (GP; EC 2.4.1.1) pretežno se nalazi u miokardu, gde ima značajnu ulogu u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata mobilizacijom glikogena. Ovaj enzim katalizuje prvi stupanj glikogenolize u kojoj se glikogen prevodi u glukozo-1-fosfat korišćenjem neorganskog fosfata. Aktivnost glikogen fosforilaze je alosterno regulisana vezivanjem AMPa i fosforilacijom. Fiziološka uloga ovog enzima se sastoji u obezbeđivanju energije za mišićne kontrakcije. U kardiomiocitima, udruživanjem GP sa glikogenom i sarkoplazmatičnim retikulumom, formira se makromolekularni kompleks. Stepenu udruživanja GP u ovom kompleksu zavisi od metaboličkog stanja miokarda. Pri tkivnoj hipoksiji fosforilaza kinaza prevodi GP b u aktivniji oblik GP a. Pri ovom procesu dolazi do razlaganja glikogena i prevođenja GP u rastvorljivi, citoplazmatični oblik, formiranja visokog koncentracionog gradijenta GPBB i izlučivanja iz kardiomiocita shodno povećanoj permeabilnosti ćelijskih membrana. Fiziološki oblik GP je dimer koji se sastoji iz dve identične subjedinice. U humanim tkivima nalaze se tri različita GP izoenzima: GPLL (jetreni), GPMM (mišićni) i GPBB (moždani). U srčanom mišiću se nalaze izoenzimi BB i MM, od kojih je izoenzim GPBB zastupljeniji u miokardu. Mada je ovaj enzim proučavan više godina, tek zadnjih desetak godina se preporučuje kao rani marker infarkta miokarda. Aktivnost izoenzima GPBB povećava se između prvog i četvrtog sata od pojave bola nakon infarkta miokarda. Pošto se u krvi nalazi mikrogramska količina ovog markera (0,6–4,0 µg/L) za određivanje njegove koncentracije moraju se koristiti osetljive imunoenzimske metode (56).

Srčani proteini i drugi srčani markeri

Od strukturnih i drugih proteina srčanog mišića značajno je određivanje mioglobina, troponinskog kompleksa, tropomiozina i lakih i teških lanaca miozina i većina će biti ovde detaljno opisana.

Od nedavno se posebna pažnja posvećuje proučavanju i primeni malih proteina koji se nalaze u strukturi srčanog mišića za dijagnostikovanje srčanih oboljenja i naročito infarkta miokarda. U prvom redu u svim mišićnim ćelijama u citoplazmi se nalazi *mioglobin*, protein koji sadrži hem (17,6 kDa) (57). S obzirom

na veličinu molekula i celularnu lokalizaciju, ovaj marker veoma brzo i lako izlazi iz oštećenih ćelija miokarda, što znači da je i prvi marker oštećenja srčanog mišića. Mioglobin se takođe veoma brzo eliminiše iz krvi, u roku od 12–24 h, ali se mora voditi računa da se značajno povećava i kod različitih oštećenja skeletnih mišića (vežbanje, trauma, intramuskularne injekcije, dejstvo otrova i lekova itd.). Normalno se u serumu ili plazmi nalazi manje od 90 µg/L.

U filamentima srčanog mišića troponinski kompleks je udružen sa tropomiozinom (58). Kompleks sadrži tri molekule: troponin C (18 kDa), I (21 kDa) i T (37 kDa). Kalcijum je fiziološki regulator mišićne kontrakcije i pri vezivanju kalcijuma troponin C podleže konformacionim promenama pri pokretanju filamenta. Troponin T i troponin I funkcionišu udruženo kao esencijalne komponente kontraktilnog aparata u poprečno-prugastim mišićima. Oba se nalaze u tri različite izoforme sa jedinstvenom strukturom. Troponinski kompleks se sastoji iz tri subjedinice i uključen je u kalcijum osetljivi mehanizam koji reguliše interakciju aktina i miozina u poprečno-prugastim mišićima.

Troponin I je inhibitorna subjedinica koja sprečava kontrakcije u odsustvu kalcijuma i troponina C. Troponin T vezuje troponinski kompleks sa tropomiozinom. Troponin C nema srčano-specifičnu strukturu, tako da je smanjenje njegove koncentracije u krvi posledica ili oštećenja skeletnih mišića ili srčanog mišića. Suprotno ovome, srčani troponin I razlikuje se za oko 40 odsto od troponina I iz skeletnih mišića, tako da ova razlika omogućava specifično određivanje srčanog troponina I. Troponin T se takođe nalazi u tri tkivna oblika i to kao srčani, i dva skeletna oblika, pokazujući oko 90 odsto homologije. Međutim, razlika koja kod srčanog troponina T postoji za oko 6 do 11 aminokiselinskih ostataka omogućava razlikovanje srčanog od mišićnog oblika, što je dovoljno za primenu specifičnih metoda određivanja sa monoklinalnim antitelima (59).

Dijagnostičke nade se polažu i u određivanje *tropomiozina* koji postoji u obliku α - i β -subjedinica. Obe ove jedinice nalaze se i u skeletnim mišićima. Međutim, izučavanja hemijskog sastava će omogućiti i dijagnostičku korisnost primene određivanja tropomiozina. *Laki* i *teški lanci miozina* nalaze se u filamentima sarkomere. Miozin prelazi u krv kao laki lanac (18–25 kDa) i u obliku fragmenta teških lanaca, koji se mogu primeniti u dijagnostičke svrhe.

Aktin je drugi strukturni protein mišićnih filamenta. Ima molekulsku masu oko 43 kDa i čini oko 20 odsto ukupnog ćelijskog proteina. To znači da ga ima sedam puta više od troponina i miozina (60). Ako bi se razvilo pogodno imunodređivanje odgovarajuće analitičke osetljivosti i specifičnosti, to znači da bi aktin mogao da bude osetljiviji marker neznatnih oštećenja miokarda. Međutim, još uvek je rano da se sudi o tome da li će aktin imati značajnu ulogu u dijagnostikovanju kardiovaskularnih oboljenja.

Osim opisanih markera danas se izučava i niz drugih markera, prevashodno kao potencijalnih markera inflamacije ili formiranja tromba. Akutni koronarni sindromi su praćeni inflamacijom i oslobađanjem *proteina akutne faze*, kao što su C-reaktivni protein (CRP), amiloid protein A, ukupna sijalinska kiselina itd. Pre nego što dođe do razvoja AIM, proteini akutne faze prelaze u cirkulaciju, što znači da mogu da ukažu na akutni koronarni napad. CRP se koristi dugo godina kao marker zapaljivog procesa. Ovaj protein ima RMM između 115 i 140 kDa i može se odrediti nefelometrijski ili turbidimetrijski. Potvrđeno je, mada je krajnje nespecifičan, da CRP može da ukaže na prisustvo akutnog koronarnog sindroma i da posluži za diferenciranje od stabilnih oblika kardiovaskularnih oboljenja.

Plazmatski markeri koji ukazuju na aktivno formiranje koaguluma mogu da se koriste kao vredna informacija za diferencijalnu dijagnozu bola u grudima. Nedavno je opisan novi postupak za određivanje *prekurzorskih proteina fibrina* (*desAA fibrin* i *desAABB fibrin*), poznat pod komercijalnim nazivom »trombus prekursor protein«, T_pP™ (American Biogenetic Sciences). Preliminarna izučavanja su pokazala da se ovaj protein povećava kod AIM nakon 6 sati od pojave bola (61).

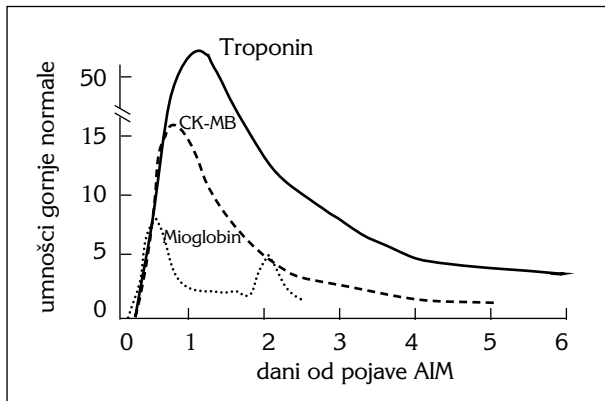
Pošto mioglobin nije specifičan samo za oštećenje srčanog mišića, pažnja je usmerena na druge proteine malih molekularnih masa, kao ranih potencijalnih markera. Takav protein je tzv. *FABP*, odnosno *srčani protein koji se vezuje za masnu kiselinu*, a čini ga familija od najmanje šest različitih nisko molekularnih proteina (14-15 kDa), koji funkcionišu kao prenosioci dugolančanih masnih kiselina. Nađen je u citoplazmi gde ima značajnu ulogu u metabolizmu lipida (62). Međutim, slično mioglobinu i FABP se nalazi u značajnim količinama u skeletnim mišićima. Zato se značajna dijagnostička strategija u primeni ovog proteina ostvaruje preko odnosa mioglobin/FABP (63).

Značaj srčanih markera

Veoma dobro su poznata vremenska ponašanja aktivnosti ukupne CK, CK-MB i mase CK-MB, kao i aktivnosti AST, LDH i izoenzima LDH-1 nakon infarkta miokarda, kao i njihova poluvremena života, koja su dugo godina korišćena kao parametri za otkrivanje i praćenje infarkta miokarda (64). Obično se smatralo da se infarkt miokarda uvek dogodio ako je aktivnost ukupne CK bila povišena. Međutim, dokazano je da jedan broj pacijenata nema ovaj tipičan profil; kod starijih osoba sa malom skeletnom mišićnom masom ukupna aktivnost CK može da ne prevaziđe gornju granicu normalne, mada su vrednosti CK-MB često patološke. To znači da se postavljeni algoritmi za vrednosti ukupne CK ne može primeniti u ovim slučajevima. Mada su određivanja aktivnosti ili mase CK-MB tkivno mnogo specifičnija od određivanja aktivnosti ukupne CK i u slučaju primene ovih markera postoji problem

lažno pozitivnih rezultata. CK-MB koja potiče iz skeletnih mišića nalazi se u cirkulaciji u slučaju mišićnih trauma, miopatija, efekata hipo- i hipertermije, itd. To znači da je potrebno da se ova stanja isključe kako bi se aktivnost CK-MB mogla koristiti za dijagnostikovanje infarkta miokarda. Izoenzimi LDH-1 i odnos LDH-1/LDH-2 povećani su značajno u toku prvih 24 h od pojave simptoma infarkta, dok se povećanje ukupne LDH zadržava i do 10 dana od pojave simptoma. Aktivnost AST se povećava 8-12 h nakon pojave simptoma a maksimalnu vrednost dostiže nakon 18-36 h. Vrednosti se vraćaju na normalu posle tri do četiri dana. AST enzim, koji je prvi korišćen za dijagnostikovanje infarkta miokarda, zbog nedovoljne tkivne specifičnosti izgubio je na značaju nakon uvođenja određivanja izoenzima CK-MB (65).

Preliminarna izučavanja ukazuju da *izoenzim BB glikogen fosforilaze b* predstavlja veoma značajan rani marker infarkta miokarda, koji se povećava pre pojave mioglobina (66). S obzirom da *mioglobin* ima malu relativnu molekularnu masu, on brzo izlazi iz monocita i nalazi se u cirkulaciji 1-1,5 h nakon pojave simptoma infarkta miokarda (67). Prema tome određivanje mioglobina je rano, mada ne sasvim specifično, detekcija infarkta. Nivo serumskog mioglobina vraća se na normalnu obično u toku 24 h, s obzirom da se veoma brzo eliminiše iz cirkulacije putem urina. Veliki nedostatak određivanja ovog parametra je njegovo kratko poluvreme života u cirkulaciji, nedovoljna tkivna specifičnost i uticaj drugih stanja na nivo njegove koncentracije u krvi. Do danas su postignuta velika dostignuća u određivanju *troponina T* i *troponina I*, koji se u krvi nalaze nakon 4 do 8 h od pojave simptoma infarkta, dostižu maksimalnu koncentraciju nakon 48 h, i zatim ponovo nakon 4 dana (bifazno dostizanje maksimuma) i ostaju povišeni do 14 dana (58). Rano povišenje koncentracije verovatno je posledica rastvorljive frakcije, dok drugi maksimum, nakon 4 dana, odražava ireverzibilno oštećenje subcelularnog kontraktilnog aparata. Mada troponin T ima poluvreme od samo 2 h, njegova koncentracija u krvi stalno se popunjava iz oštećenih miofibrila nekrotičnih miocita. Troponin T i izoenzim CK-MB istovremeno se pojavljuju u krvi, mada troponin T maksimalnu koncentraciju dostiže kasnije, a oba nakon pojave mioglobina u krvi. Troponin T ima malu vrednost u slučaju reinfarkta koji se desio nakon 14 dana, dok su u tom pogledu CK-MB i mioglobin mnogo korisniji. Promene troponina T se poklapaju sa promenama aktivnosti LDH, što ukazuje da je određivanje LDH nepotrebno. Kardio-specifičnost troponina T je mnogo veća od određivanja aktivnosti klasičnih enzima, što znači da se određivanje ovog parametra za dijagnostikovanje infarkta miokarda mora uvesti u dijagnostički protokol. Pri određivanju troponina T mogu se pojaviti lažno pozitivna povišenja (npr. kod akutnih i hroničnih bubrenih oboljenja i oštećenja skeletnih mišića), što nije uočeno u slučaju određivanja *troponina I*. *Troponin I* je srčani-specifični marker. Paralelno se povišava sa masom CK-MB, a vraća se na



Slika 7. Ponašanje troponina (T ili I), CK-MB i mioglobina u slučaju infarkta i reinfarkta miokarda.

normalu u toku 7-10 dana. I ovde se uočava bifazno ponašanje koncentracija. Prvi maksimum se postiže nakon prosečno 16 h od pojave simptoma (4, 30). Za razliku od troponina T, kod određivanja troponina I nisu uočeni lažno pozitivni rezultati. Povišenje troponina I ne izazivaju ni akutna i hronična oštećenja skeletnih mišića. Za sada su ograničena iskustva u primeni određivanja *tropomiozina, lakih i teških lanaca miozina i aktina*.

Kada pacijent sa sumnjom na infarkt miokarda stigne u bolnicu, primenjuje se inicijalna dijagnostička strategija koja treba da pomogne u dijagnostikovanju ovog stanja. Testovi koji se koriste moraju da imaju visoku osetljivost i visoku specifičnost, tj. >95 odsto. Naime, potrebno je uspostavljenje karakterističnog »srčanog profila« koji će za datog pacijenta pružiti najviše dijagnostičkih informacija. U jednom od savremenijih pristupa koristi se određivanje mioglobina, mase CK-MB (sa ili bez određivanja ukupne aktivnosti CK) i troponina T (ili I) (v. sliku 7). Od ovako postavljenog algoritma očekuje se postavljanje brze dijagnoze infarkta miokarda i diferenciranje ovih pacijenata od pacijenata sa stabilnom i nestabilnom anginom pectoris, ili bez ijednog od ovih stanja. Značajno je istaći i da se dijagnostički algoritam postavlja u zavisnosti od toga kada je pacijent stigao u bolnicu (nakon 6 h, između 6 i 12 h, između 12 i 24 h, i nakon 24 h od pojave simptoma) (65).

Uobičajeni serumski markeri, kreatin kinaza (CK) i CK-MB veoma su korisni za retrospektivnu potvrdu infarkta miokarda, ali ne i za evaluaciju pacijenata sa tegobama u grudima. U toku zadnjih godina nekoliko biohemijskih markera, kao što su mioglobin, masena koncentracija CK-MB, i odnos CK izoformi preporučuju

se za rano dijagnostikovanje akutnog infarkta miokarda. Navedeni parametri su značajnije osetljiviji od CK i CK-MB aktivnosti u toku prvih sati nakon uočavanja infarkta sličnih simptoma. Međutim, zbog izuzetno visoke specifičnosti za oštećenje miokarda, srčani troponini I (cTnI) i T (cTnT) su od posebnog su značaja (69, 70).

Da bi navedeni parametri mogli da se određuju na odgovarajući način razvijena su brza i specifična određivanja za merenje mioglobina, CK-MB mase, CK-MB i CK izoformi, cTnI i cTnT. Još uvek nije definitivno utvrđeno koji je od ovih serumskih markera najosetljiviji za rano dijagnostikovanje AIM u kliničkoj praksi. Izbor i dijagnostički značaj biohemijskih markera koji ukazuju na oštećenje miokarda zavisi od *dijagnostičke osetljivosti, dijagnostičke specifičnosti i vremenskog intervala u kome je marker pozitivan* (30).

Zaključak

Mada je određivanje izoenzima kreatin kinaze (CK-MB) i dalje »zlatni standard« među biohemijskim markerima za dijagnostikovanje infarkta miokarda, novouvedeni serumski parametri predstavljaju izazov koji dovodi u pitanje kliničku ulogu ovog enzima. Ovome svakako doprinosi i bolje razumevanje patofiziologije akutnog koronarnog sindroma, kao i mogućnosti farmakoloških i hirurških postupaka kao terapijskih sredstava. Uvođenje novih parametara zahteva dizajniranje takvih postupaka koji će pružiti najviše dijagnostičkih informacija i to u pogledu osetljivosti i specifičnosti određivanja. Dobar primer na kome ovaj problem može da se razmatra je upravo srčani troponin, koji se nakon infarkta miokarda u krvi nalazi u vidu smeše kompleksnih proteina, koji zahtevaju odgovarajuće utvrđivanje osetljivosti komercijalnih antiseruma na različite oblike ovog proteina. Poznato je da je danas u komercijalnim imunoodređivanjima postignuta veoma visoka specifičnost monoklonalnih antitela za CK-MB, kao i za druge srčane proteine. Drugi problem koji se pri primeni srčanih markera nameće jeste urgentnost određivanja ovih parametara, što znači da postoji potreba primene na automatskim analizatorima koji se mogu naći već pored samog pacijenata (eng. POC = point-of-care). Kao što je navedeno, svaka laboratorija mora za srčane markere da utvrdi referentne vrednosti, da poznaje vrednosti kod pacijenata bez infarkta miokarda a sa drugim srčanim oboljenjima (npr. kod kongestivnog srčanog oboljenja, nestabilne angine itd.). To znači da za izabrane srčane markere treba pažljivo utvrditi tzv. prelomne koncentracije (cut-off vrednosti) koje će se koristiti pri proceni srčanih oštećenja.

THE USE OF BIOCHEMICAL MARKERS FOR DIAGNOSIS OF THE ACUTE CORONARY SYNDROMES

Nada Majkić-Singh

*Institute of Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia and Pharmaceutical Faculty,
Belgrade, Serbia and Montenegro*

Summary: It was recognized very early that the specificity of AST, LDH, and CK was not high for cardiac diseases, as injury to the liver and skeletal muscles, and hemolysis produced falsely positive results. Thus the measurement of isoenzymes becomes important to improve the specificity of total enzyme measurements. Assays for CK and LD isoenzymes were initially developed using electrophoresis. Because this assay was time consuming and difficult to automate, immunoinhibition assays were soon developed. The development of immunoassay measurements enabled determination of the enzyme concentration, which was not dependent on whether or not the enzyme was active. These »mass assays« also enabled the measurement of protein markers which are themselves not enzymes. This led to the investigation of many other markers for potential use in cardiac diseases. With changing clinical practices, cardiac markers are now needed to detect the presence of minor myocardial infarction in patients with unstable angina. Outcome studies have shown that patients with increased troponin are at high short-term risk for death and AMI. The success of new cardiac markers such as troponin is due to their high cardiac specificity and the existence of assays with low detection limits.

Key words: acute coronary syndromes, acute myocardial infarction, biochemical markers, traditional enzymes; cardiac-specific proteins

References

1. Wu AHB. Cardiac markers: from enzymes to proteins, diagnosis to prognosis, laboratory to bedside. *Ann Clin Lab Sci* 1999; 29: 18–23.
2. Karmen A, Wroblewski F, LaDue JS. Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest* 1954; 34: 126–33.
3. Wroblewski F, Ladue JS. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exper Biol Med* 1955; 90: 210–13.
4. Dreyfus JC, Schapira G, Resnais J, Scebat L. La creatine kinase serique dans le diagnostic de l'infarctus myocardique. *Rev Franc Etud Clin et Biol* 1960; 5: 386–411.
5. Oliver IT. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J* 1955; 61: 116–22.
6. Rosalki SB. An improved procedures for serum creatine phosphokinase determination. *J Lab Clin Med* 1967; 69: 696–705.
7. Hørder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Division Committee on Enzymes: approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 435–56.
8. Roe CR, Limbird LE, Wagner GS, Nerenberg ST. Combined isoenzyme analysis in the diagnosis of myocardial injury: application of electrophoretic methods for the detection and quantitation of creatine kinase phosphokinase MB isoenzyme. *J Lab Clin Med* 1972; 80: 577–90.
9. Stone MJ, Willerson JT, Gomez-Sanchez CE, Waterman MR. Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. Results in patients with acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 1975; 56: 1334–9.
10. Wu AHB, Laios I, Green S, Gornet TG, Wong SS, Parmaley L, Tonnesen A, Plaisier B, Orlando R. Immunoassays for serum and urine myoglobin: myoglobin clearance assessed as a risk factor for acute renal failure. *Clin Chem* 1994; 40: 796–802.
11. Chan DW, Taylor E, Frye T, Blitzer RL. Immunoenzymetric assays for creatine kinase MB with subunit-specific monoclonal antibodies compared with an immunochemical method and electrophoresis. *Clin Chem* 1985; 31: 456–69.
12. Katus HA, Remppis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kubler W. Enzyme linked immunoassay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 1349–53.
13. Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH. Development of monoclonal antibodies for the assay of cardiac troponin I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clin Chem* 1992; 38: 2203–14.
14. World Health Organization Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization Task Force on Standardization of Clinical Nomenclature. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. *Circulation* 1979; 59: 607–9.
15. Wu AHB. Role of serum biochemical markers in clinical trials. In: *Myocardial damage. Early detection by novel*

- biochemical markers. Eds. Kaski JC, Holt DW, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998, pp. 189-99.
16. Chesebro JH, Knatterud G, Roberts R. et al. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: a comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. *Circulation* 1987; 76: 142-54.
 17. The GUSTO Investigators. An International randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 329: 673-82.
 18. Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, Jorgensen P, Peheim E, Ljungdahl L. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *N Engl J Med* 1992; 327: 146-50.
 19. Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, Granger CV, Katus HA, Hamm CW, O'Hanesian MA, Wagner GS, Kleiman NS, Harrell FE, Califf RM, Topol EJ. Risk stratification with admission cardiac troponin T levels in acute myocardial ischemia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1333-41.
 20. Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, Fischer GA, Fung AY, Thompson C, Wybenga D, Braunwald E. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996; 335: 1342-9.
 21. Wu AHB, Gornet TG, Harker CC, Chen HL. Role of rapid immunoassays for urgent («stat») determination of creatine kinase MB. *Clin Chem* 1989; 35: 1752-6.
 22. Delanghe J, Chapelle JP, el Allaf M, De Buyzere M. Quantitative turbidimetric assay for determining myoglobin evaluated. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 474-9.
 23. Antman EM, Grudzien C, Sacks DB. Evaluation of a rapid bedside assay for detection of serum cardiac troponin T. *JAMA* 1995; 273: 1279-82.
 24. Collinson PO, Thomas S, Siu L, Vasudeva P, Stubbs PJ, Canepa-Anson R. Rapid troponin T measurement in whole blood for detection of myocardial damage. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 454-8.
 25. Brogan GX, Bock JL, McCuskey CF, Hollander JE, Thode H, Gawad Y, Jackowski G. Evaluation of cardiac STATus CK-MB/myoglobin device for rapidly ruling out acute myocardial infarction. *Clin Lab Med* 1997; 17: 655-68.
 26. Apple FS, Christenson RH, Valdes R Jr., Andriak AJ, Berg A, Duh SH, Feng YJ, Jortani SA, Johnson NA, Koplen B, Mascotti K, Wu AHB. Simultaneous rapid measurement of whole blood cardiac troponin I, creatine kinase MB and myoglobin for detection of myocardial infarction. *Clin Chem* 1999; 45: 199-205.
 27. Collinson PO, John C, Cramp DRG, Canepa-Anson R. Prospective randomised controlled trial of point of care testing with central laboratory testing for cardiac enzyme measurement. (Abstract.) *Clin Chem* 1998; 44: A69.
 28. Sagnella GA. Measurement and significance of circulating natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Clin Sci* 1998; 95: 519-29.
 29. Suzuki T, Yamazaki Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc res* 2001; 51: 489-94.
 30. Mair J, Hammerar-Lercher A, Puchandorf B. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 571-88.
 31. Chen HH, Burnette JC Jr. Natriuretic peptides in the pathophysiology of congestive heart failure. *Cur Cardiol Rep* 2000; 2: 198-205.
 32. Struthers AD. Introducing a new role for BNP: as a general indicator of cardiac structural disease rather than a specific indicator of systolic dysfunction only. *Heart* 2002; 87: 97-8.
 33. Marian AJ. Genetic risk factors for myocardial infarction. *Curr Opin Cardiol* 1999; 13: 171-8.
 34. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 959-69.
 35. Remme WJ, Swedberg K. Task Force Report. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001; 22: 1527-60.
 36. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on the practice guidelines. Evaluation and management of chronic heart failure in the adult. ACC/AHA Practice Guidelines 2001.
 37. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. A statement of healthcare professionals from the Center for Disease Control and Prevention and American Heart Association. *Circulation* 2003; 107: 499-511.
 38. Dean KJ. Biochemistry and molecular biology of troponin I and T. In: *Cardiac markers*. Ed. Wu AHB, Humana, Totowa NJ, 1998, 193-204.
 39. Gerhardt W, Ljungdahl L. Troponin T: a sensitive and specific diagnostic and prognostic marker of myocardial damage. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 47-57.
 40. Wu AHB. Analytical and clinical evaluation of new diagnostic tests for myocardial damage. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 11-21.
 41. ACC/AHA 2002 guideline update for the Management of Patients with Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. A report of the American College of Cardiology/American Association task force on practice guidelines. Committee on the Management of Patients with Unstable Angina. American College of Cardiology and American Heart Association, Inc. 2002; 1-95.

42. Clerico A. Pathophysiological and clinical relevance of circulating levels of cardiac natriuretic hormones: Is their assay merely a marker of cardiac disease? (opinion article) *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 752-60.
43. Clerico A, Iervasi G, Pilo A. Turnover studies on cardiac natriuretic peptides: methodological, pathophysiological and therapeutical considerations. *Curr Drug Metab* 2000; 1: 85-105.
44. Lott JA, Stang JM. Differential diagnosis of patients with abnormal serum creatine kinase isoenzymes. *Clin Lab Med* 1989; 9: 627-42.
45. Henderson AR, McQueen MJ, Patten RL, et al. Testing for creatine kinase and creatine kinase-2 in Ontario: reference ranges and assay types. *Clin Chem* 1992; 38: 1365-70.
46. Smith AF. Separation of tissue and serum creatine kinase isoenzymes on polyacrylamide gel slabs. *Clin Chim Acta* 1972; 39: 351-9.
47. Wevers RA, Delsing M, Gebbink JAG, Soons JBJ. Post-synthetic changes in creatine kinase isozyme. *Clin Chim Acta* 1978; 86: 323-7.
48. Secchiero S, Altinier S, Zaninotto M, Lachin M, Plebani M. Evaluation of a new automated system for the determination of CK-MB isoforms. *J Clin Lab Anal* 1995; 9: 359-65.
49. Suzuki T, Shiraishi T, Tomita K, Totani M, Murachi T. Monoclonal antibody inhibiting creatine kinase MM3 but not isoform MM1. *Clin Chem* 1990; 36: 153-6.
50. Wu AHB. Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease [Review]. *Clin Chem* 1989; 35: 7-13.
51. Puelo PR, Guadagno PA, Roberts R, Perryman MB. Sensitive, rapid assay of subforms of creatine kinase MB in plasma. *Clin Chem* 1989; 35: 1452-5.
52. Puelo PR, Guadagno PA, Roberts R. Early diagnosis of acute myocardial infarction based on an assay for subforms of creatine kinase-MB. *Circulation* 1990; 82: 759-64.
53. Armbruster DA. The genesis and clinical significance of creatine kinase isoform [Review]. *Lab Med* 1991; 22: 325-34.
54. Moss DW, Henderson AR. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994, 735-896.
55. Rej R. A. Aminotransferases in disease. *Clin Lab Med* 1989; 9: 667-87.
56. Rabitzsch G, Mair J, Lechleitner R, et al. Immuno-enzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. *Clin Chem* 1995; 41: 966-78.
57. Plebani M, Zaninotto M. Diagnostic strategies using myoglobin measurement in myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 69-77.
58. Mair J, Puschendorf B, Michel G. Clinical significance of cardiac contractile proteins for the diagnosis of myocardial injury. *Adv Clin Chem* 1994; 31: 63-98.
59. Apple FS, Sharkey SW, Falafati A, et al. Assessment of left ventricular function using serum cardiac troponin I measurements following myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 59-67.
60. Aranega AE, Reina A, Velez C, Alvarez L, Melguizo C, Arange A. Circulating alpha-actin in angina pectoris. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 15-22.
61. Carville DGM, Dimitrijević N, Walsh M, Digirolamo T, Brill EM, Drew N, Gargan PE. Thrombus precursor protein (TpP): marker of thrombosis early in the pathogenesis of myocardial infarction. *Clin Chem* 1996; 42: 1537-41.
62. Roos W, Eymann E, Symannek M, Duppenhaler J, Wodzig KWH, Pelsers M, Glatz JFC. Monoclonal antibodies to human heart fatty-acid binding protein. *J Immunol Meth* 1995; 183: 149-153.
63. van Nieuwenhoven FA, Kleine AH, Wodzig KWH, Hermens WT, Kragten HA, Maessen JG, Punt Cd, van Dieijen MP, van der Vusse GJ, Glatz JFC. Discrimination between myocardial and skeletal muscle injury by assessment of the plasma ratio of myoglobin over fatty acid-binding protein. *Circulation* 1995; 92: 2848-54.
64. Majkić-Singh, N. Enzimi kod srčanih oboljenja. *Klinička enzimologija, AID Praktikum*, Beograd, 1993; 228-54.
65. Henderson AR. The use of biochemical markers in ischaemic heart disease: Prefactory remarks. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 3-9.
66. Rabitzsch G, Mair J, Lechleitner P et al. Isoenzyme BB of glycogen phosphorylase b and myocardial infarction (letter). *Lancet* 1993; 341: 1032-3.
67. Mair J, Artner-Dworzak E, Lechleitner P, Morass B, Smidt J, Wagner I, et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction by a newly developed rapid immunoturbidimetric assay for myoglobin. *Br Heart J* 1992; 68: 462-8.
68. Larue C, Calzolari C, Bertinchant JP, Leclercq F, Grolleau R, Pau B. Cardiac-specific immunoenzymometric assay of troponin I in the early phase of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1993; 39: 972-9.
69. Majkić-Singh, N. Biohemijski parametri za dijagnostikovanje infarkta miokarda. *Infarm* 1998; 4: 18-19.
70. Majkić-Singh, N. Novi biohemijski markeri oštećenja miokarda. *Arhiv za farmaciju* 1998; 5: 577.

Rad primljen: 15. 09. 2003.

Prihvaćen za štampu: 05. 11. 2003.