

# Využití technologie proteinových biočipů pro stanovení kardiálních markerů u pacientů s akutním infarktem myokardu

Ulrychová M.<sup>1</sup>, Horáková L.<sup>2</sup>, Tichý M.<sup>1,3</sup>, Horáček J. M.<sup>3,4</sup>, Pudil R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>2</sup>I. interní klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice, Hradec Králové

<sup>3</sup>Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

<sup>4</sup>Oddělení klinické hematologie, II. interní klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice, Hradec Králové

## SOUHRN

**Cíl sdělení:** Byly sledovány analytické a klinické vlastnosti technologie proteinových biočipů pro imunochemická stanovení kardiálních markerů a jejich možné využití v diagnostice infarktu myokardu.

**Metodika:** Stanovení hladiny kardiálních markerů (CKMB, MYO, GPBB, H-FABP, CAIII a cTnI) bylo provedeno systémem Evidence Investigator (Randox). Pro jednotlivé kardiální markery stanovené panelem Cardiac Array byly hodnoceny analytické parametry testu. Kardiální markery byly stanoveny ve vzorcích sér 28 pacientů (21 mužů, 7 žen, věk 47–86 let) s diagnózou akutního infarktu myokardu.

**Výsledky a závěry:** Mezilehlá přesnost pro všechny analyty, kromě myoglobinu, je ve shodě s výrobcem (CV < 10%). H-FABP i GPBB jsou časnými markery akutního infarktu myokardu, přičemž H-FABP má pravděpodobně vyšší diagnostickou senzitivitu než myoglobin. Dá se očekávat, že stanovení kardiálních markerů proteinovými biočipy do budoucna najde své uplatnění v biochemické diagnostice poškození myokardu.

**Klíčová slova:** biočip, kardiální marker, infarkt myokardu, FABP, GPBB.

## SUMMARY

**Ulrychová M., Horáková L., Tichý M., Horáček J. M., Pudil R.: Use of protein biochip technology for determination of cardiac markers in patients with acute myocardial infarction diagnosis by protein biochip technology**

**Objective:** The analytical and clinical performance of protein biochip technology of immunochemical analysis of cardiac markers and their use in diagnosis of acute myocardial infarction were evaluated.

**Method:** Determination of concentration of cardiac markers (CKMB, MYO, GPBB, H-FABP, CAIII and cTnI) was performed by system Evidence Investigator (Randox). Analytical parameters of Cardiac array were tested. Markers of myocardial injury were determined in group of the 28 patients (21 men, 7 women, age 47–86 years) with acute myocardial infarction diagnosis.

**Results and conclusions:** Reproducibility of all tests agree with data of producer (CV < 10%), except myoglobin assay. New substances H-FABP and GPBB are promising early markers of acute myocardial infarction and diagnostic sensitivity of H-FABP would be better than myoglobin test. In future, determination of new cardiac markers by protein biochips technology probably will be used in cardiologic diagnosis.

**Key words:** biochip, cardiac marker, myocardial infarction, FABP, GPBB.

## Úvod

Pro diagnostiku poškození myokardu existuje v dnešní době široké spektrum biochemických markerů [1]. V první řadě jsou to srdeční troponiny pro průkaz nekrózy myokardu a stanovení myoglobinu a CKMB mass v diagnostice reinfarktu [2].

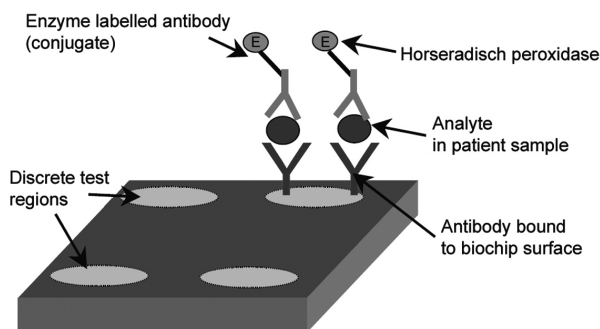
V posledních letech se rozšiřují poznatky o nových analytech, které by bylo možné využívat v kardiologické diagnostice, ale zatím nejsou součástí rutinní klinické praxe. Jde hlavně o BB izoenzym glykogenfosforylázy (GPBB) [3] a srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (H-FABP) [4]. Pro stanovení sérových koncentrací těchto nových kardiomarkerů byly vyvinuty komerčně dodávané diagnostické soustavy založené na imunochemickém principu. V naší práci se zabýváme aplikací nové technologie proteinových biočipů pro stanovení kardiálních markerů a jejich možným využitím v diagnostice infarktu myokardu.

Technologie mikročipů je prozatím využívána zejména při genomické a proteomické analýze. Použití čipů v klinické biochemii se ve světě zatím uplatňuje převážně v oblasti výzkumu a při toxikologickém screeningu. Využití systému Evidence Investigator (Randox) je v odborné literatuře popisováno jen sporadicky, publikovány jsou práce zabývající se simultánním stanovením kardiálních markerů [5, 6], tyroidních hormonů [7] nebo paralelním měřením solubilních adhezních molekul a cytokinů [8, 9].

## Materiál a metody

Systém Evidence Investigator™ firmy Randox (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie) pracuje s technologií proteinových biočipů umožňujících současné stanovení několika analytů z jednoho vzorku. Na přesně definovaných pozicích jsou na biočipu navázané

protilátky proti jednotlivým analytům. Měření kardiálních markerů je založeno na principu sendvičové enzymoimunoanalýzy (obr. 1). Pro detekci protilátek je využívána chemiluminiscenční reakce peroxidu s luminolem katalyzovaná křenuvou peroxidázou. Luminiscence je cíleně snímána z jednotlivých ploch na biočipu CCD kamerou. Zobrazovací technologie umožňuje kvantifikovat množství světla vycházejícího z jednotlivých reakčních ploch a software systému signály přepočítá na hodnotu koncentrací analytů ve vzorku.



**Fig. 1.** Principle of sandwich biochip assay (Evidence Investigator Operation Manual, Picture is published with the agreement of Randox company.)

Pro stanovení kardiálních markerů byl použit diagnostický panel Cardiac Array se spektrem analytů: CK-MB izoenzym kreatinkinázy (CKMB), myoglobin (MYO), BB izoenzym glykogenfosforylázy (GPBB), srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (H-FABP), karboanhydráza III (CAIII) a srdeční troponin I (cTnI). Podle firemních údajů vykazuje panel Cardiac Array 90% diagnostickou senzitivitu v prvních 3 hodinách od vzniku příznaků srdečního infarktu a 97% negativní prediktivní hodnotu.

Jako materiál první volby je výrobcem doporučeno sérum. Všechny koncentrace kardiálních markerů jsou udávány v  $\mu\text{g/l}$ . Devítibodová kalibrační závislost sestavená výrobcem je součástí každého setu. Rozsah měření pro jednotlivé analyty je následující: CKMB = 0,4–100  $\mu\text{g/l}$ , MYO = 1,8–700  $\mu\text{g/l}$ , GPBB = 1,97 až 290  $\mu\text{g/l}$ , H-FABP = 0,15–150  $\mu\text{g/l}$ , CAIII = 0,2–200  $\mu\text{g/l}$  a cTnI = 0,18–50  $\mu\text{g/l}$ .

Vnitřní kontrola kvality byla měřena na třech hladinách koncentrací pomocí kontrolních materiálů

dodávaných výrobcem jako součást měřicího systému. Vzorky rekonstituovaných kontrolních materiálů byly skladovány při  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu maximálně 14 dnů. Z naměřených výsledků kontroly kvality byla určena správnost (BIAS) a mezilehlá přesnost (Interassay CV) měření.

### Klinická studie

Pro ověření využitelnosti biočipových analýz panelu kardiálních markerů na přístroji Evidence Investigator (Randox) byla provedena předběžná klinická studie.

Byly použity vzorky sér 28 pacientů (21 mužů a 7 žen ve věku 47–86 let) s diagnózou akutního infarktu myokardu (AIM) odebraných ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Diagnóza byla určena podle doporučení České kardiologické společnosti a Evropské kardiologické společnosti. Všichni pacienti měli infarkt myokardu s elevacemi ST-segmentů, který byl léčen přímou koronární angioplastikou s implantací nitrokoronárního stentu. Diagnóza byla následně potvrzena na základě vzestupu hladiny markerů myokardiální nekrózy (cTnT nebo CKMB).

Od každého pacienta byly získány tři vzorky séra. První odběr byl proveden do 6 hodin od vzniku bolesti na hrudi, druhý odběr 24 hodin po prvním odběru a třetí 5. den od přijetí pacienta k hospitalizaci. Byla sledována kinetika analytů v průběhu patologického procesu a jeho léčby se zaměřením na nové markery ischemie a nekrózy myokardu, jako jsou GPBB a H-FABP. Pro ověření referenčních intervalů udávaných výrobcem jsme stanovili kardiální markery ze vzorků séra 28 dárců krve. Všechny krevní vzorky byly transportovány do laboratoře, centrifugovány 5 minut při 3500 ot./min. a sérum bylo skladováno při  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  do analýzy.

### Výsledky

Správnost a mezilehlá přesnost vypočtená z naměřených hodnot kontroly kvality je shrnuta v tabulce 1. Stanovené hodnoty jsou ve shodě s údaji výrobce ve všech parametrech kromě mezilehlé přesnosti u myoglobinu, kde jsme naměřili vyšší hodnoty variačního koeficientu 11,6–15,6 %.

**Table 1.** Clinical characteristics of study population

|                                   |           | CKMB | MYO   | GPBB | FABP | CAIII | cTnI |
|-----------------------------------|-----------|------|-------|------|------|-------|------|
| Concentration ( $\mu\text{g/l}$ ) | control 1 | 3.9  | 86.3  | 8.4  | 3.2  | 4.0   | 1.6  |
|                                   | control 2 | 13.2 | 124.6 | 27.9 | 18.9 | 29.6  | 7.0  |
|                                   | control 3 | 30.9 | 120.7 | 68.1 | 43.8 | 39.6  | 12.0 |
| BIAS (%)                          | control 1 | 2.0  | -7.5  | -8.8 | -3.2 | 5.0   | -9.1 |
|                                   | control 2 | 2.8  | -6.5  | 0.8  | 5.3  | -6.0  | 3.0  |
|                                   | control 3 | 3.6  | -8.1  | -1.7 | -2.4 | -9.9  | 0.4  |
| Interassay CV (%)                 | control 1 | 7.5  | 13.5  | 6.6  | 5.0  | 7.0   | 8.7  |
|                                   | control 2 | 6.9  | 11.6  | 4.2  | 5.7  | 9.3   | 6.0  |
|                                   | control 3 | 8.6  | 15.6  | 7.9  | 8.7  | 9.8   | 9.0  |

Pro ověření referenčních mezí udávaných výrobcem jsme stanovili hladiny kardiálních markerů u skupiny dárců krve (tab. 2). Koncentrace kardiomarkerů naměřených ve skupině pacientů s diagnózou akutního infarktu myokardu jsou uvedeny v tabulce 3.

**Table 2.** Concentration of cardiac markers in the group of blood donors

|         | CKMB<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | MYO<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | GPBB<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | FABP<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | CAIII<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | cTnI<br>( $\mu\text{g/l}$ ) |
|---------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Average | 2.1                         | 39.35                      | 4.34                        | 2.47                        | 23.84                        | < 0.18                      |
| Minimum | < 0.4                       | 16.81                      | < 1.97                      | 1.08                        | 10.98                        | < 0.18                      |
| Maximum | 6.78                        | 92.75                      | 10.66                       | 6.65                        | 72.62                        | 0.43                        |
| Cut off | 3.9                         | 59.0                       | 7.3                         | 4.5                         | 55.0                         | 0.4                         |

**Table 3.** Average concentration of cardiac markers in the group of patients with acute myocardial infarction

|              | CKMB<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | MYO<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | GPBB<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | FABP<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | CAIII<br>( $\mu\text{g/l}$ ) | cTnI<br>( $\mu\text{g/l}$ ) |
|--------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 0–6<br>hours | 17.7                        | 363.8                      | 46.7                        | 76.6                        | 95.7                         | 3.2                         |
| 24 hours     | 31.7                        | 97.8                       | 18.6                        | 8.4                         | 71.5                         | 18.1                        |
| 5 days       | 3.1                         | 58.9                       | 16.4                        | 3.9                         | 40.7                         | 4.5                         |

Protein vázající mastné kyseliny (FABP) je časným markerem infarktu myokardu a kinetika jeho vzestupu a poklesu se podobá křivce myoglobinu. U všech 28 pacientů byla při prvním odběru zvýšená koncentrace FABP a zároveň dosahovala maximální naměřené hodnoty. U myoglobinu byla při prvním odběru naměřena koncentrace nad cut-off u 25 pacientů (90 %). Lze tedy konstatovat, že FABP má při infarktu myokardu ve srovnání s myoglobinem vyšší diagnostickou senzitivitu.

K vzestupu koncentrace BB izoenzymu glykogenfosforylázy (GPBB) dochází rovněž velmi časně po vzniku AIM. Při prvním odběru byla hladina GPBB pozitivní u 25 pacientů a maximální naměřené hodnoty bylo dosaženo u 19 z nich. Koncentrace GPBB a cTnI se ale na rozdíl od FABP a myoglobinu navrácí k normálním hodnotám až po více než 4–5 dnech.

Karboanhydráza III byla zařazena do panelu kardiálních markerů k rozlišení poškození myokardu od kosterního svalstva. Podle našich výsledků však byly u několika pacientů naměřené hladiny karboanhydrázy III neočekávaně výrazně zvýšené.

## Diskuse

Na konci roku 2007 byla publikována nová univerzální definice infarktu myokardu [10], která jednoznačně vymezuje i využití biochemických markerů kardiálního poškození. Stanovení kardiálních troponinů je doporučeno na prvním místě. I když je stanovení cTnT před cTnI preferováno, protože je dobře standardizované, v Evropě vyšetřuje 51 % laboratoří cTnT a 49 % laboratoří cTnI [11]. CKMB má na rozdíl od troponinů nízkou orgánovou specifitu, vyskytuje se kromě myokardu i v kosterním

svalstvu, mozku, GIT, ledvinách a dalších orgánech. Jeho stanovení je doporučeno pro diagnostiku infarktu myokardu pouze v případě, že není možné stanovení troponinů. CKMB však díky své rychlé kinetice zůstává markerem první volby při diagnostice reinfarktu. Myoglobin je orgánově nespecifický, ale časný kardiomarker. Analýza myoglobinu hraje hlavní roli v časných hodinách po vzniku infarktu myokardu v době, kdy ještě nedošlo ke zvýšení troponinů. Pro vyloučení diagnózy akutního koronárního syndromu je významná vysoká negativní prediktivní hodnota analýzy myoglobinu, prakticky se ale přestal vyšetřovat [11].

Po shrnutí poznatků o kardiálních markerech, je možné říci, že v mnoha případech je pro pacienta výhodnější komplexní pohled na biochemii kardiálních markerů.

Biočipový analyzátor Evidence Investigator (Randox) je první analytický systém, který dovoluje simultánní stanovení klasických kardiomarkerů: troponinu I, myoglobinu a CKMB a nových molekul – GPBB, FABP a CAIII, které nejsou zatím v diagnostice AIM rutinně používané.

Klinická data ukazují, že FABP je v prvních hodinách po vzniku AIM lepším diagnostickým markerem než myoglobin. I když je FABP stejně jako myoglobin orgánově nespecifický, vyskytuje se v kosterním svalstvu v daleko menší míře než myoglobin. Jeho společné stanovení s myoglobinem zvyšuje diagnostickou specifitu testu. K odlišení léze myokardu od poškození kosterního svalstva je možné využít poměru myoglobin/FABP.

Karboanhydráza III je dalším markerem používaným k odlišení poškození myokardu od kosterního svaloviny. Je to cytoplazmatický protein, který se tvoří pouze ve svalech příčně pruhovaných a nikoli v myokardu. Dalo by se proto očekávat, že při AIM budou hladiny CAIII v normě. Naměřené výsledky ovšem ukazují, že se hladina CAIII u některých pacientů během AIM výrazně zvyšuje. Domníváme se, že tento vzestup může souviset s provedením kardiopulmonární resuscitace.

Stanovení GPBB u pacientů po AIM se nám jeví srovnatelné se stanovením myoglobinu, protože rychlost jeho vzestupu v prvních hodinách je srovnatelná.

Výsledky sledování analytických parametrů soupravy souhlasí s daty udávanými výrobcem, kromě hodnot naměřených pro myoglobin. U myoglobinu jsme naměřili hodnoty variačního koeficientu vyšší: 11,6–15,6 %. Reprodukovatelnost výsledků měření na systému Evidence Investigator rovněž hodnotí, podobně jako my, ve své publikaci Di Serio: CV(MYO) = 10,0–15,4 % a CV(CAIII) = 16,4–18,7 % [5]. Problémem při hodnocení kontroly kvality zůstávají krátké expirační doby kontrolního materiálu po rekonstituci a nízká stabilita analytů po zamražení.

Dalšími nevýhodami poloautomatického systému Evidence Investigator zůstávají velký podíl manuální práce a nemožnost provádění statimových vyšetření z důvodu potřeby nasbírání série vzorků. Z těchto příčin je tento systém pro měření kardiálních markerů vhodný k použití při výzkumných úkolech, ale do rutinní praxe se zatím příliš nehodí.

Firma již ale vyvinula automatický analyzátor, který umožňuje využívat technologii proteinových biočipů i pro statimová vyšetření. Závěrem je možné říci, že stanovení kardiálních markerů pomocí proteinových biočipů umožní komplexnější pohled na diagnostiku poškození myokardu. V některých situacích může být relativní nevýhodou nutnost zpracování celého měřného panelu bez možnosti výběru spektra analytů. Toto by mělo být v budoucnu vyřešeno úpravami panelu na žádost klinického pracoviště.

## Literatura

1. **Tichý, M., Gregor, J.** Přehled biochemických markerů poškození myokardu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2002, 10, s. 176–179.
2. **Friedecký, B., Engliš, M., Franeková, J. et al.** Doporučení České společnosti klinické biochemie ke stanovení biochemických markerů poškození myokardu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2008, 16, s. 50–55.
3. **Mair, J.** Glycogen phosphorylase isoenzyme BB to diagnose ischemic myocardial damage. *Clin. Chim. Acta*, 1998, 272, p. 79–86.
4. **Pelsers, M. M. A. L., Hermes, W. T., Blaty, J. F. C.** Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin. Chim. Acta*, 2005, 352, p. 15–35.
5. **Di Serio, F., Amodio, G., Ruggieri, E. et al.** Proteomic approach to the diagnosis of acute coronary syndrome: Preliminary results. *Clin. Chim. Acta*, 2005, 357, p. 226–235.
6. **Mion, M. M., Novello, E., Altinier, S. et al.** Analytical and clinical performance of a fully automated cardiac multi-markers strategy based on protein biochip microarray technology. *Clin. Biochem.*, 2007, 40, p. 1245–1251.
7. **Vávrová, J., Friedecký, B., Ulrychová, M. et al.** Měření tyreoidních hormonů v séru technikou microarray pomocí systému Randox Evidence Investigator. *Klin. Biochem. Metab.*, 2007, 15, s. 225–227.
8. **Kavsak, P. A., Ko, D. T., Newman, A. M., Palomaki, G. E. et al.** Risk Stratification for Heart Failure and Death in An Acute Coronary Syndrome Population Using Inflammatory Cytokines and N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 2112–2118.
9. **McAleer, D., McPhillips, F. M., Fitzgerald, S. P. et al.** Application of Evidence Investigator for the simultaneous measurement of soluble adhesion molecules: L-, P-, E- selectins, VCAM-1, ICAM-1 in a biochip platform. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2006, 27, p. 363–378.
10. **Thygesen, K., Albert, J. S., White, H. D.** Universal Definition of Myocardial Infarction. *J. Am Coll. Cardiol.*, 2007, 50, p. 2173–2195.
11. **Collinson, P., Pulkki, K., Suvisaari, J. et al.** How well do laboratories follow guidelines on cardiac markers? The Cardiac Marker Guideline Uptake in Europe Study. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 448–449.

Práce byla podpořena výzkumnými záměry MZO 00179906 a MSM 002160817.

Do redakce došlo 10. 7. 2008.

Adresa pro korespondenci:  
RNDr. Martina Ulrychová  
ÚKBD LF UK a FN  
Fakultní nemocnice  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: ulrycmar@fnhk.cz