

Využití proteinových biočipů v diagnostice ischemického poškození myokardu

Horáková L.¹, Pudil R.¹, Vašatová M.², Tichý M.²

¹ Interní kardiologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika

² Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika

SOUHRN

Cíl studie: Tato práce sleduje pacienty s akutním koronárním syndromem a k diagnostice akutního infarktu myokardu (AIM) využívá zcela nové technologie proteinových biočipů. Snahou je nejenom ohodnotit tuto novou možnost laboratorní diagnostiky AIM, ale také srovnání méně známých kardiomarkerů se standardními markery a posouzení jejich vztahu ke klinickým parametrům.

Materiál a metody: Do studie bylo celkem zařazeno 44 pacientů s diagnózou AIM a krevní odběry byly prováděny v den přijetí, za 24 hodin a poté čtvrtý nebo pátý den hospitalizace. Z kardiomarkerů byl testován panel Cardiac Array (cTnI, CK MB, myoglobin, CAIII, FABP a GPBB) na biočipovém analyzátoru The Evidence Investigator™ od firmy Randox (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie).

Výsledky: Naše práce potvrdila těsný vztah FABP a GPBB k AIM a na základě jejich dynamiky je můžeme považovat za časné kardiomarkery. Zároveň jsme zjistili, že FABP má, stejně jako standardní marker CKMB nebo TnI, také prognostický význam - vyšší hodnoty jsou spojené se systolickou dysfunkcí. Také jsme poukázali na možnost využití biočipového analyzátoru při diagnostice AIM, kdy za poměrně krátký časový úsek získáme výsledky několika analytů najednou, které nám tak podávají širší informace o probíhajícím AIM.

Závěr: Metoda proteinových biočipů představuje v diagnostice AIM nový efektivní přístup, který ale jistě ke svému rozšíření vyžaduje řadu dalších studií.

Klíčová slova: akutní infarkt myokardu, proteinový biočip, kardiální markery, systolická dysfunkce.

SUMMARY

Horakova L., Pudil R., Vasatova M., Tichy M.: Use of the protein biochip in the diagnosis of the myocardial ischemic damage.

Objective: This study observes patients with acute coronary syndromes. To the diagnosis of acute myocardial infarction (AIM) we use the new proteins biochip technologies. The aim of this study is to evaluate the new strategy of laboratory diagnostic method and to confront the less known's cardio markers with the standard markers and with the clinical parameters.

Material and methods: This study contains 44 patients with AIM and the blood samples were taken in the time of the admission, 24 hours later and then the fourth or fifth day of hospitalization. We tested the cardiac panel Cardiac Array (cTnI, CK MB, myoglobin, CAIII, FABP and GPBB) on the biochip analyser The Evidence Investigator™ from Randox (Randox Laboratories Ltd., United Kingdom).

Results: Our study confirms the close relationship between FABP and GPBB to AIM and we can consider these markers as early markers in the diagnosis of AIM. FABP has, as the standard markers CKMB or TnI, the prognostic value too (the higher values are associated with the systolic dysfunction). This study employs a new strategy of the biochip analyser in the diagnosis of AIM (in the same time we have the concentrations of more parameters and complex information about AIM).

Conclusion: This method presents new interesting multianalytes approach to the diagnosis of the AIM. But this method requires a lot of further studies to verify this technology.

Keywords: acute myocardial infarction, protein biochip, cardiac markers, systolic dysfunction.

Úvod

I v dnešní době patří akutní koronární syndromy mezi jedny z nejzávažnějších forem kardiovaskulárních onemocnění. K jejich diagnostice a bližší stratifikaci nám vedle anamnézy a EKG záznamu nepostradatelně slouží stanovení kardiomarkerů, které kromě přesného určení diagnózy, tj. zda jde o nestabilní anginu pectoris nebo akutní infarkt myokardu (AIM), stanoví i rozsah ischemie nebo nekrózy. O akutním infarktu myokardu mluvíme tehdy, jsou-li splněna kritéria pro AIM, která vychází z doporučení České kardiologické společnosti - Třetí

univerzální definice infarktu myokardu. To je, je-li průkaz nekrózy myokardu (vzestup TnT nad 99. percentil jeho koncentrace) a je-li přítomen alespoň jeden znak z následujících: symptomy ischemie, nové denivelace ST úseků nebo nově vzniklý blok levého Tawarova raménka, vznik patologického Q kmitu na EKG, ztráta viability nebo identifikace intrakoronární trombózy pomocí angiografie či autopsie a dojde-li k náhlé smrti s výše uvedenými znaky. V případě perkutánní koronární intervence se jedná o AIM při vzestupu TnT nad pětinašobek 99. percentilu URL, v případě koronárního bypassu musí dojít k vzestupu TnT o více než desetinásobek [1].

Každý ze standardně užívaných srdečních markerů má svou dynamiku a je tedy v séru detekován až s určitým časovým odstupem od vzniku vlastní ischemie. Pro to především u pacientů, kteří se sice dostaví časně, ale jejichž obtíže nejsou zcela specifické, může dojít k určitému časovému prodloužení, než je pacient odeslán do katetrizací laboratoře. Zároveň se objevují nové technologie proteinových biočipů, které nám umožňují rychle a přesně stanovit několik analytů najednou a my tak získáme komplexnější pohled na probíhající onemocnění.

V naší práci jsme touto novou metodou sledovali panel kardiálních markerů, který vedle standardně měřených markerů, jako jsou troponin I (Tnl), myoglobin (MYO), kreatinkináza – myokardiální frakce (CK MB), karboanhydráza III (CAIII, která naopak vylučuje postižení myokardu), vyhodnocuje také méně známé a zatím v rutinní praxi prakticky nepoužívané fatty acid binding protein (FABP) a BB izoenzym glykogenfosforylázy (GPBB).

Běžně používanými markery postižení kardiomyocytů jsou Tnl (ukazatel nekrózy myokardu) a stanovená koncentrace CK MB, která má k srdečnímu svalu mnohem větší specifitu než prostá kreatinkináza (CK). MYO stoupá časně od vzniku ischemie myokardu (již za 1-2 hodiny), ale nutno říci, že je markerem méně specifickým a obtíže při samotném stanovení postižení myokardu mohou nastat, přijde-li pacient již pozdě nebo má-li současně renální insuficienci či myopatii. Diagnostický význam MYO může naopak zvýšit poměr MYO/CAIII (zvýšuje senzitivitu i specifitu), což ve své studii potvrdil Vaananen a jeho kolektiv při srovnávání pacientů s AIM, s myopatiemi a po fyzické námaze [2]. Jiní autoři poukázali na význam poměru MYO/CAIII i u pacientů s recidivou AIM [2] nebo s renální insuficiencí [3].

GPBB je glykolytický enzym, který se vyskytuje ve třech izoformách: GPLL (liver isoform), GPMM (muscle isoform) a GPBB (brain isoform, který byl zjištěn jak v mozku, tak v myokardu) a který patří mezi časné markery postižení myokardu (vzestup již za 2 hodiny a za 5 hodin je detekovatelný u všech sledovaných pacientů) [4]. GPBB je považován nejenom za marker nekrózy myokardu, ale také ukazatel ischemického postižení [5]. Posledním sledovaným parametrem je FABP, který se vyskytuje v cytosolu řady buněk a opět v několika isoformách: L-FABP (liver), I-FABP (intestinal) a H-FABP (heart). FABP svou činností zasahuje do β -oxidace a v případě poškození (ischemie) se velmi časně uvolňuje extracelulárně [6, 7]. K vzestupu hladin dochází již za 1-2 hodiny od vzniku ischemie a za 24 hodin klesají k normálním hodnotám – FABP se tak stává nejenom markerem ischemie, ale podle řady studií je pro svou kinetiku považován i za ukazatele reinfarktu, efektu reperfuze nebo kardiovaskulárních rizik (následné srdeční selhávání, recidiva AIM) [8, 9].

Materiál a metody

Do naší studie bylo zařazeno celkem 44 pacientů s AIM s elevacemi ST úseků nebo obrazem bloku levého Tawarova raménka. Tento soubor tvořilo 30 (68,2%) mužů a 14 (31,8%) žen ve věkovém rozmezí 50-91 let a sle-

dovanými rizikovými faktory byly dyslipidémie (59,1%), kouření (38,6%) a obezita (40,9%). Mortalita v naší studii byla 2,27% (jeden pacient zemřel 2. den hospitalizace na tamponádu srdeční jako komplikaci rozsáhlého AIM).

Od každého pacienta byly získány 3 krevní vzorky – odběr 1 (doba přijetí), odběr 2 (za 24 hodin) a odběr 3 (čtvrtý nebo pátý den hospitalizace). Materiál byl získán z periferní žilní krve. Ke kontrole výsledků byl doplněn odběr periferní krve od zdravých dárců (odběr K). Následně byly krevní vzorky v laboratoři centrifugovány a získané sérum bylo uchováno při teplotě -70°C .

Pro analýzu získaných odběrů jsme použili novou technologii proteinových biočipů, která vychází z principů ELISA metody. Námi byl využit biočipový analyzátor The Evidence InvestigatorTM firmy Randox (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie) a testovaným panelem byl panel Cardiac Array [10, 5, 11], který již od výrobce obsahuje přesně definovaný soubor kardiomarkerů (Tnl, CK MB, MYO, CAIII, FABP a GPBB). Cut off hodnoty určené výrobcem jsou: CK-MB mass 3,9 $\mu\text{g/l}$, MYO 59,0 $\mu\text{g/l}$, GPBB 7,3 $\mu\text{g/l}$, cTnl 0,4 $\mu\text{g/l}$, and h-FABP 4,5 $\mu\text{g/l}$ (koeficient variability CKMB 3,9 $\mu\text{g/l}$ – 7,5 %, 30,9 $\mu\text{g/l}$ – 8,6 %; MYO 86,3 $\mu\text{g/l}$ – 13,5 %, 120,7 $\mu\text{g/l}$ – 15,6 %; GPBB 8,4 $\mu\text{g/l}$ – 6,6 %, 68,1 $\mu\text{g/l}$ – 7,9 %; FABP 3,2 $\mu\text{g/l}$ – 5,0 %, 43,8 $\mu\text{g/l}$ – 8,7 % [11].

Při statistické analýze byl využit statistický program MedCalc (MedCalc Software, Belgie). Naměřené hodnoty byly udávány jako minimální, maximální a medián. Pro statistické zpracování byl použit studentův nepárový t-test, metoda regresní analýzy, Mann-Whitney U test a Wilcoxonův test. Za statisticky významné byly považovány hodnoty s $p < 0,05$. Protokol studie byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Výsledky

Tnl a CK MB vykazovaly podobnou dynamiku, kdy maximální hodnoty byly naměřeny při druhém odběru, tj. za 24 hodin od přijetí, a při posledním měření se již postupně snižovaly (Obr. 1 a 2). Vzájemné porovnání kontrolních skupin s postupně odebranými krevními vzorky od jednotlivých pacientů a vzájemné porovnání jednotlivých odběrů mezi sebou bylo statisticky významné ($p < 0,001$), pouze při srovnání prvního a třetího odběru u parametru Tnl a prvního a druhého odběru u markeru CK MB mělo statistickou významnost nižší ($p < 0,05$).

Svým průběhem se dále podobaly markery GPBB, FABP a MYO, kdy byly nejvyšší hodnoty naměřeny již při prvním odběru a poté velmi rychle klesaly k téměř normálním hodnotám (Obr. 3, 4 a 5). Srovnání jednotlivých měření byla opět statisticky významná ($p < 0,001$), pouze u parametru GPBB byla mezi kontrolní skupinou a druhým a třetím odběrem statistická významnost nižší ($p < 0,01$).

U parametru CAIII došlo pouze k jeho nepatrnému vzestupu při prvním odběru a poté se hodnoty postupně snižovaly. Statisticky významné hodnoty byly naměřeny pouze při porovnání kontrolní skupiny s prvním a druhým odběrem (Obr. 6).

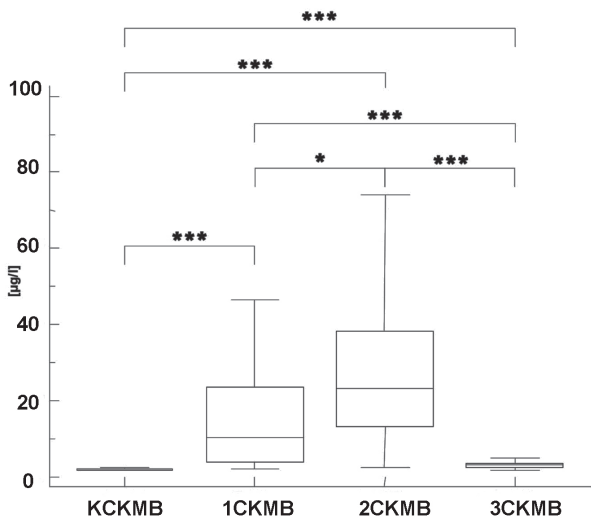


Fig. 1. CKMB concentrations in the control group (K) and in the infarct patients in the first day (1), second day (2) and after four or five days (3). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

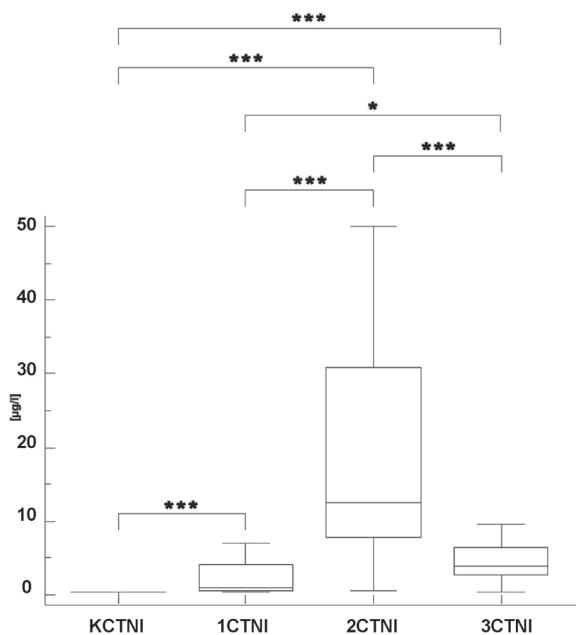


Fig. 2. Tnl concentrations in the control group (K) and in the infarct patients in the first day (1), second day (2) and after four or five days (3). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

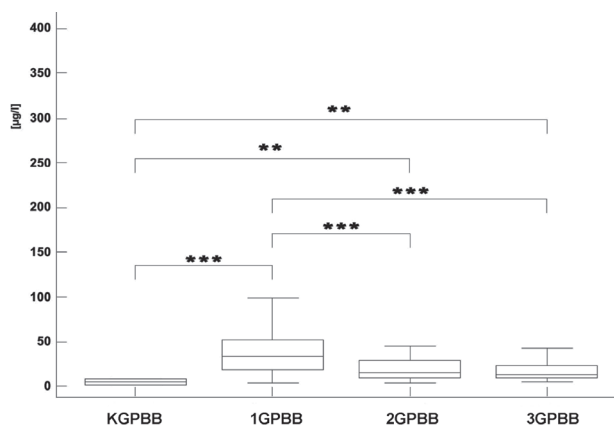


Fig. 3. GPBB concentrations in the control group (K) and in the infarct patients in the first day (1), second day (2) and after four or five days (3). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

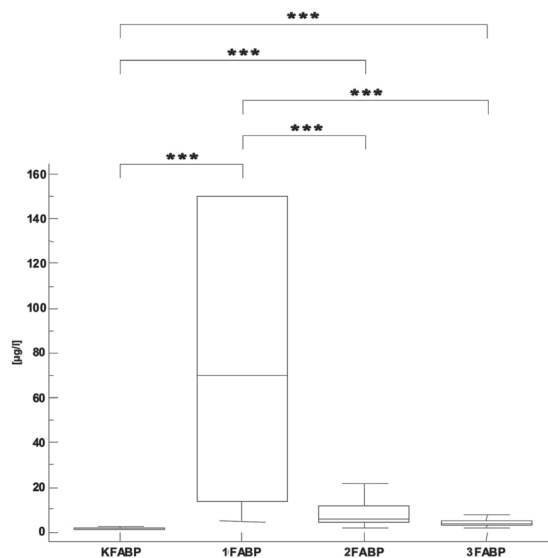


Fig. 4. FABP concentrations in the control group (K) and in the infarct patients in the first day (1), second day (2) and after four or five days (3). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

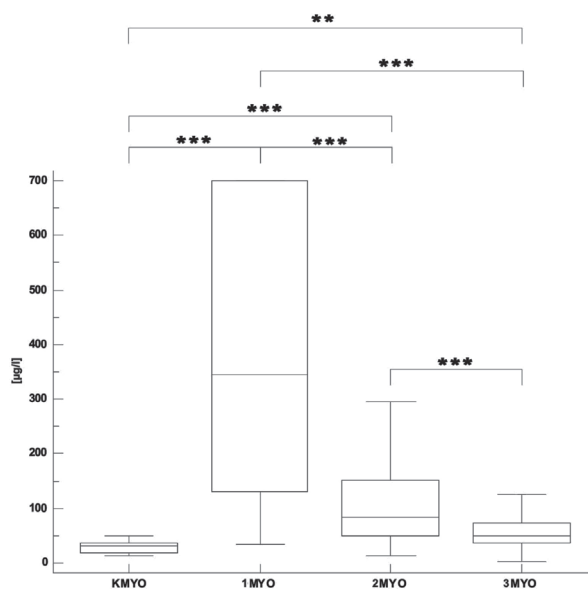


Fig. 5. MYO concentrations in the control group (K) and in the infarct patients in the first day (1), second day (2) and after four or five days (3). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

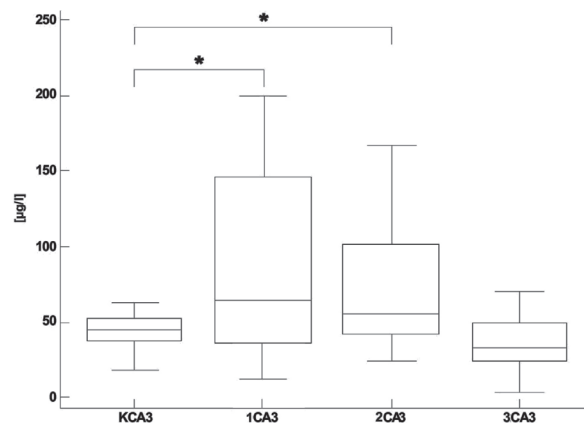


Fig. 6. CAIII concentrations in the control group (K) and in the infarct patients in the first day (1), second day (2) and after four or five days (3). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Diskuse a závěr

Všechny námi sledované parametry vykazovaly v průběhu prvních hodin od vzniku AIM dynamiku. K velmi časnému vzestupu hodnot docházelo u FABP a dále u GPBB a standardního markeru MYO. V případě FABP byly naměřeny max. hodnoty 150 µg/l (medián 69,91 µg/l) již velmi časně při prvním odběru prakticky u všech pacientů a při vzájemném porovnání mezi jednotlivými odběry byly vypočítané rozdíly vždy statisticky významné ($p < 0,001$, Obr. 4). Také GPBB dosahoval maximálních hodnot již v době přijetí (max. 230 µg/l, medián 33,3 µg/l) a v následujících odběrech poměrně rychle klesal k normě. Při vzájemném porovnání jednotlivých hodnot byly rozdíly statisticky významné ($p < 0,001$), pouze při srovnání kontrolního odběru s druhým a třetím odběrem byl zjištěný poměr o mírně nižší statistické významnosti ($p < 0,01$, Obr. 3). MYO prakticky kopíruje průběh FABP a naměřené hodnoty vykazují vysokou statistickou významnost (max. 700 µg/l, medián 346,1 µg/l, $p < 0,001$, Obr. 5). I když není orgánově specifický (hodnoty bývají zvýšené také při postižení kosterní svaloviny, u renální insuficience, aj.) můžeme specificitu MYO dále zvýšit stanovením poměru MYO/CAIII [10]. Výše zmíněné markery můžeme označit za velmi časně kardiomarkery, jejichž sérové hladiny stoupají do několika málo hodin od vzniku AIM.

Pozdějšími markery jsou Tnl a CK MB, které dosahují maxima až za 24 hodin od prvního odběru. Tnl vykazuje oproti výše zmíněným časným markerům pozvolnější vzestup a poté postupně klesá k normálním hodnotám (max. 50 µg/l, medián 12,55 µg/l, $p < 0,001$). CK MB dosahuje vrcholu také při odběru 1 (max. 100 µg/l, medián 23,19 µg/l, $p < 0,001$) a následně velmi prudce klesá k normě (Obr. 1). CAIII, přestože je typická spíše pro poškození kosterního svalstva, dosahovala v našem souboru pacientů maximálních hodnot při prvním odběru. Nutno ale podotknout, že nebyla u těchto pacientů hodnocena fyzická aktivita před vzniklým AIM, která by mohla být za vyšší hodnotu CAIII zodpovědná.

U výše zmíněných parametrů byl sledován i jejich možný prediktivní význam při stanovení systolické dysfunkce levé komory srdeční. Soubor pacientů byl rozdělen na skupinu pacientů se systolickou funkcí levé komory nad 40 % a rovnou nebo nižší 40 %. Metodou regresní analýzy byl statisticky významný vztah ($p < 0,001$) zjištěn při odběru 1 u markeru Tnl a FABP (Obr. 7), u parametru CK MB byla statistická významnost nižší ($p < 0,01$). Porovnání s ostatními parametry již byla statisticky nevýznamná.

Tato práce poukázala na nové markery, které je možno v séru bezpečně identifikovat již velmi časně od vzniku AIM a mohly by se tak stát cennou pomůckou především u pacientů přicházejících velmi časně od vzniku obtíží, které jsou ale ne zcela typické pro AIM, a kde by standardní markery jako Tnl a CK MB byly pro svou pozdní dynamiku ještě nízké. U markerů Tnl, FABP a CK MB byl potvrzen jejich prediktivní význam ke vzniku následné systolické dysfunkce. Tato práce

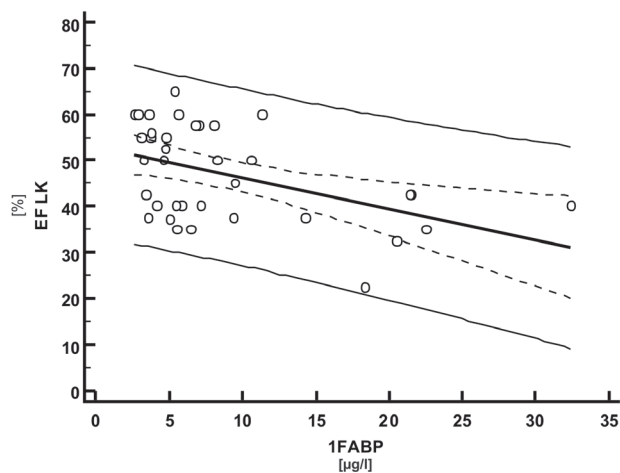


Fig. 7. The association between concentration of FABP and ejection fraction in the second measurement (ejection fraction EFLK, concentration of FABP in the second measurement A1FABP).

zároveň ukazuje novou a bezpečnou technologii stanovení markerů pomocí proteinových biočipů a možnost stanovit v jediném okamžiku z jednoho vzorku několik parametrů najednou a získat tak komplexnější pohled na dané postižení. Před tím, než by se ale tato metoda rozšířila do běžné praxe, bylo by nutné u všech testů provést jejich standardizaci prostřednictvím mezinárodního referenčního standardu. Nevýhodou této metody je v současné době nemožnost volného výběru stanovených markerů, statimových vyšetření a také omezená dostupnost.

Použité zkratky

AIM	akutní infarkt myokardu
CAIII	karboanhydráza III
CK MB	myokardiální MB frakce kreatinkinázy
FABP	fatty acid binding protein
GPBB	BB izoenzym glykogenfosforylázy
MYO	myoglobin
Tnl	troponin I

Literatura

1. **Vojáček, J. et al.** Third universal definition of myocardial infarction. *Cor ev Vasa*, 2013, vol. 55, p. 228-235.
2. **Vaananen, H. K. et al.** Serum carbonic anhydrase III and myoglobin concentrations in acute myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 1990, vol. 36, no. 4, p. 635-638.
3. **Beuerle, J. R. et al.** Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patients. *Clin. Chim. Acta*, 2000, 294, p. 115-128.
4. **Rabitzsch, G. et al.** Immunoassay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. *Clin. Chem.*, 1995, 41/7, p. 966-978.
5. **Ulrychová, M., Tichý, M., Horáček, J. M. et al.** Multianalytový přístup k diagnostice srdečních chorob technologií proteinových biočipů. *Čas. Lék. čes.*, 2009, 148, p. 591-596.

6. **Kim, K. S. et al.** Heart-type fatty acid-binding protein as an adjunct to cardiac Troponin-I for the diagnosis of myocardial infarction. *J. Korean Med. Sci.*, 2011, 26, p. 47-52.
7. **Cavus, U. et al.** Heart-type fatty acid binding protein can be a diagnostic marker in acute coronary syndromes. *Journal of the national medical association*, 2006, vol. 98, no. 7, p. 1067-1070.
8. **Ishii, J. et al.** Prognostic value of serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein relative to cardiac Troponin T on admission in the early hours of acute coronary syndrome. *Clin. Chem.*, 2005, p. 1397-1404.
9. **O'Donoghue, M. et al.** Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2006, 114, p. 550-557.
10. **Di Serio, F. et al.** Proteomic approach to the diagnosis of acute coronary syndrome: Preliminary results. *Clin. Chim. Acta*, 2005, 357, p. 226-235.
11. **Randox Laboratories, Ltd.** Evidence investigatorTM, Cardiac Array Cat No. EV3511, United Kingdom
Podporováno výzkumným projektem Prvouk P 37/03.
Do redakce došlo 1. 9. 2014

Adresa pro korespondenci
Prof. MUDr. Radek Pudil, Ph.D.,
I. interní kardiologická klinika LF UK
a FN Hradec Králové
Sokolská 581
Hradec Králové 500 02
email: radek.pudil@fnhk.cz