

# Stanovení kardiálních markerů technologií proteinových biočipů – multimarkerová strategie

M. Ulrychová, M. Tichý, J. M. Horáček, R. Pudil, L. Horáková

## ÚVOD

Diagnóza infarktu myokardu je někdy obtížná. Vychází z anamnézy, změn na EKG a stanovení specifických kardiomarkerů. V současné době máme k dispozici pestrou škálu parametrů určujících rozvoj a rozsah infarktu myokardu. Již standardně jsou stanovovány troponiny (cTnT nebo cTnI) prokazující nekrozu srdečního svalu. Velmi časným, ale mnohem méně specifickým markerem je myoglobin (MYO). Obtíže při jeho stanovení mohou nastat zvláště u pacientů, kteří přijdou velmi brzy od vzniku infarktu myokardu, příliš pozdě nebo trpí renální insuficiencí, popřípadě současným poškozením svalů. Specifickým parametrem přímo popisujícím poškození kardiomyocytů a doporučeným pro diagnostiku reinfarktu je CK-MB mass [1].

Nové ESC, ACCF, AHA a WHF publikovali univerzální definici infarktu myokardu, ve které je přesně dáno použití biochemických markerů poškození myokardu [2]. Pro časnou diagnostiku a stratifikaci rizika u pacientů s podezřením na akutní koronární syndrom je doporučována multimarkerová strategie.

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 glykogen fosforylázy (GPBB) [3] a srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (h-FABP) [4].

FABP je cytoplazmatický protein účastnící se oxidace mastných kyselin. Strukturálně není vázán v buňkách a je schopen se velmi rychle uvolnit do krve. Jeho hladina signifikantně roste 1-3 hodiny po počátku infarktu myokardu, vrcholu dosahuje okolo 6-8 hodiny a k normálu se vrací během 24-30 hodin. Jeho koncentrace je také vyšší během akutní ischemie. V lidském organismu bylo objeveno 9 subtypů FABP s různou tkáňovou lokalizací. Srdeční typ h-FABP může být použit jako časný diagnostický marker pro AIM s lepší senzitivitou a specifitou než myoglobin. Vzhledem k výrazně vyššímu zastoupení

h-FABP v srdečním než příčně-pruhovaném svalu se využívá poměru MYO/h-FABP k odlišení poškození myokardu od kosterního svalu [4,5,6]

Glykogen fosforyláza je dimerický glykogenolytický enzym složený ze dvou identických podjednotek: GPBB (brain), GPLL (liver) a GPMM (muscle). Izoenzym BB je hlavní formou tvořenou v mozku a myokardu. Mnohem nižší koncentrace se vyskytují v leukocytech, krevních destičkách, slezině, játrech, ledvinách a dalších orgánech. Během ischemie myokardu je stimulována enzymatická aktivita GPBB a dochází ke změnám v buněčné lokalizaci z formy vázané na sarkoplazmatické retikulum na volný cytosolový enzym. Koncentrace GPBB roste okolo 3 hodin po nástupu bolesti na hrudi a vrcholu dosahuje přibližně po 6 hodinách. Tento enzym je schopen indikovat jak nekrotické poškození buněk myokardu, tak pouze ischemické procesy [3].

Karboanhydráza III není typickým kardiálním markerem. Jedná se o enzym přítomný v kosterním svalstvu, přičemž v myokardu se nevyskytuje. Z tohoto důvodu kombinované určení sérové hladiny CA III a myoglobinu (poměr MYO/CAIII) zvyšuje diagnostickou specifitu a senzitivitu stanovení myoglobinu jako časného markeru pro AIM [7,8].

Současně s rozvojem nových biomarkerů dochází zároveň k rozvoji nových komerčně dodávaných diagnostických soustav založených na různých technologiích.

## MATERIÁL A METODY

Na základě doporučení se zaměřením na multianalytovou strategii jsme testovali technologii proteinových biočipů umožňující simultánní stanovení několika analytů z jednoho vzorku. Pro stanovení kardiálních markerů jsme použili přístroj Evidence Investigator TM (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie). Systém má proti klasickým imunochemickým technikám výhody zahrnující multiplexní přístup k analýze nebo redukci objemů vzorku a reagencií.

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

Pro stanovení kardiálních markerů byl použit diagnostický kit Cardiac Array, který obsahuje dobře známé kardiální markery rutinně používané v klinické praxi: CK-MB izoenzym kreatinkinázy mass (CKMB), myoglobin (MYO) a srdeční troponin I (cTnI) společně s novými analyty jako jsou BB izoenzym glykogenfosforylázy (GPBB), srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (H-FABP) či karboanhydráza III (CAIII).

Jako materiál první volby je výrobcem doporučeno sérum. Naměřené koncentrace kardiálních markerů jsou udávány v  $\mu\text{g/l}$ . Devítibodová kalibrační závislost sestavená výrobcem je součástí každého setu v podobě lyofilizovaných kalibrátorů a CD s daty o kalibrátorech. Rozsah měření pro jednotlivé parametry je: CKMB = 0,4-100  $\mu\text{g/l}$ , MYO = 1,8-700  $\mu\text{g/l}$ , GPBB = 1,97-290  $\mu\text{g/l}$ , H-FABP = 0,15-150  $\mu\text{g/l}$ , CA III = 0,2-200  $\mu\text{g/l}$  a cTnI = 0,18-50  $\mu\text{g/l}$ . Pro případy, kdy je nutné biologický materiál ředit, je potřeba použít speciální diluční roztok, který ovšem není součástí soupravy Cardiac Array.

## ANALYTICKÉ PARAMETRY SOUPRAVY

Vnitřní kontrola kvality je měřena na třech hladinách koncentrací pomocí kontrolních materiálů dodávaných výrobcem jako součást měřicího systému. Z výsledků měření kontrol kvality byla určena správnost (BIAS) a také mezilehlá přesnost měření (CV%) (Tabulka 1). Naměřené 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 %) než udává výrobce (8,8-9,5 %).

## SROVNÁNÍ METOD

Pro porovnání biočipové technologie Evidence Investigator s rutinně užívanými metodami byla měřena skupina vzorků s širokým rozsahem měřených hodnot. Vzorky byly vybrány jak ze skupin dárců krve, tak od pacientů s akutním infarktem myokardu ( $n=73$ ). Výsledky CKMB, MYO a cTnI získané analýzou na biočipech byly porovnány s odpovídajícími testy pro imunochemický analyzátor Elecsys 2010 (Roche). U kardiálních troponinů byla hodnocena pouze shoda výsledků z klinického pohledu, protože jsme měřili odlišné markery - cTn I (Evidence Investigator) a cTnT (Elecsys 2010). Ke zpracování dat byl použit statistický software MedCalc (Belgie).

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2). K hodnocení výsledků byla použita Passing-Bablokova regrese a Bland-Altmanova analýza. Výsledky měřené na obou systémech vykazovaly statisticky významné rozdíly. Rovnice regrese byly

následující: Elecsys = 1,4232 Evidence + 0,4320 pro myoglobin a Elecsys = 2,0656 Evidence + 0,0946 pro CKMB mass (Obrázek 1). Absolutní naměřené hodnoty jsou sice číselně nesrovnatelné, ale v rozlišení normálních a patologických koncentrací se metody poměrně shodují (z 94,5 % u CKMB mass a troponinů a z 90,4 % u MYO). Z klinického hlediska je důležité sledování kinetiky kardiálních markerů. Z našich výsledků vyplývá, že pro kardiologickou diagnostiku lze použít metody obě, ale nelze kombinovat výsledky měření z jednotlivých analyzátorů mezi sebou. Tomu také odpovídá skutečnost, že jsou rozdílné hodnoty cut off udávané jednotlivými výrobci (Elecsys: CKMB=6,8 $\mu\text{g/l}$ , MYO=72,0 $\mu\text{g/l}$  a Evidence Investigator: CKMB=3,9 $\mu\text{g/l}$ , MYO=59,0 $\mu\text{g/l}$ ).

## DÁRCI KRVE

Pro ověření referenčních mezí kardiálních markerů udávaných výrobcem pro Evidence Investigator jsme stanovili vzorky skupiny 28 dárců krve. Koncentrace jednotlivých analytů, které jsme naměřili v této skupině, přibližně odpovídají údajům o referenčních hodnotách výrobce (Tabulka 3).

## ZÁVĚR

Pro diagnostiku poškození myokardu existuje v dnešní době široké spektrum biochemických 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.

Multiplexní analýza systémem Evidence Investigator je vhodná zatím pro výzkumné účely. Nevýhodami tohoto poloautomatického systému zůstávají velký podíl manuální práce a nutnost sběru série vzorků. 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 však může být relativní nevýhodou nutnost zpracování celého měřeného 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: 176-179

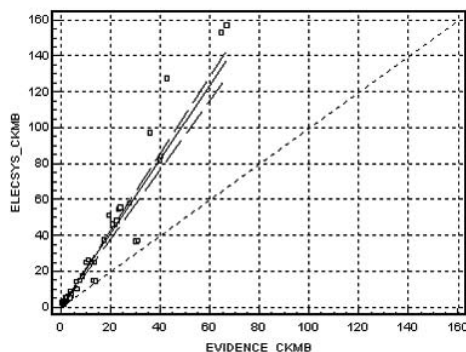
2. Thygesen, K., Albert, J.S., White, H.D.: Universal Definition of Myocardial Infarction. J. Am Coll Cardiol. 2007, 50: 2173-2195.
3. Mair, J.: Glycogen phosphorylase isoenzyme BB to diagnose ischemic myocardial damage. Clin. Chim. Acta 1998, 272: 79-86.
4. Pelters, M.M.A.L., Hermes, W.T., Blaty, J. F.C.: Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. Clin. Chim. Acta 2005, 352: 15-35.
5. Liao, J., Chan, C.P., Cheung, Y. et al.: Human Heart-type fatty acid-binding protein for on-site diagnosis of early acute myocardial infarction. Int J Cardiol. 2009, 133 (3): 420-423
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: 1245-1251.
7. Vuori, J., Huttunen, K., Vuotikka, P. et al.: The use of myoglobin / carbonic anhydrase III ratio as marker for myocardial damage in patients with renal failure. Clin Chim acta.1997, 265: 33-40.
8. Beuerle J.R., Azzazy H.M.E., Styba G. 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: 115-128.

*Práce byla podpořena výzkumnými záměry MZO 00179906 a MSM 002160817.*

**Tabulka 1: Výsledky hodnocení interní kontroly kvality pro Evidence Investigator Cardiac Array (Randox)**

		CKMB	MYO	GPBB	FABP	CA3	CTNI
koncentrace (µg/l)	kontrola 1	3.9	86.3	8.4	3.2	4.0	1.6
	kontrola 2	13.2	124.6	27.9	18.9	29.6	7.0
	kontrola 3	30.9	120.7	68.1	43.8	39.6	12.0
BIAS (%)	kontrola 1	2.0	-7.5	-8.8	-3.2	5.0	-9.1
	kontrola 2	2.8	-6.5	0.8	5.3	-6.0	3.0
	kontrola 3	3.6	-8.1	-1.7	-2.4	-9.9	0.4
CV (%)	kontrola 1	7.5	13.5	6.6	5.0	7.0	8.7
	kontrola 2	6.9	11.6	4.2	5.7	9.3	6.0
	kontrola 3	8.6	15.6	7.9	8.7	9.8	9.0

**Obrázek 1: Passing-Bablokova regrese CKMB Elecsys vs. Evidence Investigator**



**Tabulka 2: Porovnání biočipové technologie Evidence Investigator a rutinně používaného systému Elecsys 2010 (n=73)**

analyt	systém	koncentrace (µg/l)				shoda (%)
		průměr	SD	min	max	
CKMB	Elecsys 2010	20,6	33,4	1,2	156,9	94,5
	Evidence	9,7	14,3	0,4	66,7	
MYO	Elecsys 2010	112	129,4	29	854,9	90,4
	Evidence	78,7	90	15,5	614,3	

**Tabulka 3: Koncentrace kardiálních markerů ve skupině 28 dárců krve**

	koncentrace (µg/l)					
	CKMB	MYO	GPBB	FABP	CAIII	cTnI
průměr	2,1	39,4	4,3	2,4	23,8	<0,18
SD	1,4	18,3	2,4	1,1	13,5	
Cut off výrobce	3,9	59	7,3	4,5	55	0,4