

2. Olinescu R., Greabu M. Mecanisme de apărare ale organismului împotriva poluării chimice, Ed.Tehnică, 1990.
3. Olinescu R. Radicalii liberi în fiziopatologia umană. Ed.Tehnică, București, 1994.
4. Rahman I., Kode A., Biswas SK. Assay for cantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nat.Protoc 2006;1(6):3159-65.
5. Thurnan D.I. Free Radicals, Oxidant Stress and Drugs Action, edit.Evans C.R., Richelieu Press, 1988, p.169-178.
6. Л.С.Колесниченко, В.И.Кулинский, В.В.Шпрах, В.В.Бардымов и др. Система глутатиона эритроцитов и плазмы крови при инсультах и дисциркуляторной энцефалопатии. Биомед. химия, 2007, том 53, вып. 4, с 454-460.
7. В.И.Кулинский, З.А.Леонова, Л.С.Колесниченко, И.В.Малов, Ю.А.Данилов. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах. Биомед. химия, 2007, том 53, вып.1, с 91-98.
8. В.И.Кулинский, А.В.Щерватых, А.А.Большешапов, В.И.Бахтаирова и др.Система глутатиона эритроцитов и плазмы при язвенной болезни. Биомед. химия, 2008, том 54, вып 5, с 607-613.

## **ENZIMELE: MARKERI BIOCHIMICI AI INFARCTULUI MIOCARDIC**

**Renata Racila, Tatiana Timercan**

Catedra de Biochimie USMF „N.Testemițanu”

### **Summary**

#### *Enzymes-biochemical markers of myocardial infarction*

Myocardial infarction is a major medico-social problem in practical medicine. Troponynes, glycogen-phosphorilases, creatine-phosphokinases, Ca-ATP-ases are all enzymes and biochemical markers detected in blood in case of myocardial infarction. This fact is important to know so that a rapid reperfusion of the affected area could be achieved and an early administration of a proper treatment could be initiated.

**Key words:** myocardial infarction, enzymes, marker.

### **Actualitatea**

Infarctul miocardic acut (IMA) constituie o problemă majoră medico-socială, deosebit de actuală, în pofida realizărilor obținute în diagnostic, tratament, profilaxie și reabilitare. Actualitatea IMA este determinată de nivelul înalt și creșterea continuă a incidenței, invalidizării și letalității premature, în special printre persoanele de vîrstă tînăra (8).

Elementul caracteristic al IMA este necroza miocardică prin moartea celulară, consecință a ischemiei prelungite. În jurul necrozei există o zonă variabilă de ischemie, de miocard siderat amenințat de necroză, dar încă reversibil. Microscopic si macroscopic, IMA se clasifică în: microscopice (focale); mici (<10% din VS); medii (10 – 30%) și întinse (>30 % din VS).

La majoritatea bolnavilor mecanismul este următorul: apariția unei plăci aterosclerotice vulnerabile, cu ruptura acesteia la stenoze mai reduse și cu asocierea unei tromboze care duce la ocluzia lumenului.

### **Aspecte biochimice**

În miocard decurg cu o intensitate înaltă reacțiile ciclului acizilor tricarboxilici și de oxidare a acizilor grași. Tot odată glicoliza are o intensitate redusă.

Miocardul conține în cantități mari creatinkinază, care joacă rolul decisiv in transportul energiei de la mitocondrii spre miofibrile; 45% de creatinkinază sunt localizate pe suprafața internă a membranei externe a mitocondriilor. Se întîlnesc toate tipurile de izoenzime a creatinkinazei, din ele 40% din activitatea totală revin izoenzimei MM, 50% din care sunt legate de miofibrile.

Izoenzimele MB și BB se găsesc în citozol în stare dizolvată și la lezarea celulei nimeresc în spațiul extracelular. Miocardul, spre deosebire de mușchii scheletali, utilizează ca sursă de energie concomitent cu glucoza cantități mari de acizi grași, acid lactic și corpi cetonici. La efort rata acidului lactic în metabolism crește, pe când rata celorlalte substraturi devine relativ scăzută. Pentru glucoză în aceste condiții ea alcătuiește 1-2%. Datorită acestui fapt partea majoră de acid lactic, ce se formează în mușchi în timpul efortului, se supune oxidării. Acest proces poate fi majorat prin antrenament. Utilizarea substraturilor diferite, ca metodă de adaptare a miocardului la efort, este asigurată de varietatea lor.

În miocard, mesager secund energetic care asigură contracția servește ATP. Conținutul nucleotidelor adenilice alcătuiește aproximativ 8  $\mu\text{mol}$  la 1gr de masă uscată, din această cantitate 80% - ATP, 13% - ADP, 7% - AMP. Coeficientul ATP/ADP constituie 6,3. Între ATP și șuntul creatinfosfaților sunt legături strânse.

În cazul unor contracții cardiace ritmice în lanțul respirator nu se determină oscilații mari, cu toate că la studierea ciclurilor separate s-a demonstrat, că în cazul contracției există o diferență de la 60 până la 250ms între scăderea raportului ATP/ADP și trecerea mitocondriilor la un nivel mai înalt al metabolismului. Această contradicție este lămurită de transportul energiei cu ajutorul creatinfosfatului. Refosforilarea ADP-ului sintetizat pe miofibrile se efectuează de către creatinfosfat cu ajutorul creatinkinazei. Refosforilarea creatinei decurge cu ajutorul ATP sintetizat în mitocondrii. Echilibrul dinamic format între sinteza ATP în mitocondrii, șuntul creatinfosfatului și utilizarea ATP în miofibrile la antrenarea creatinkinazei se deplasează spre membrana mitocondrială. În spațiul intermembranar există echilibru între [ADP-Mg] și [CFC-ATP-Mg]. La ieșire creatina imediat se supune fosforilării cu eliberare de [ADP-Mg].

AMP ciclic are rol de mesager secund al mesajului hormonal în metabolismul miocardului. Influențează asupra contracției prin activarea proteinkinazelor și repartizarea  $\text{Ca}^{2+}$  între miofibrile și RE. Prin activarea fosforilazei din glicogen se eliberează glucoza. Acest mecanism are importanță majoră pentru menținerea șuntului de substraturi în caz de infarct miocardic.(11)

În normă, în miocard mai funcționează pompe și enzime precum: *pompa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza plasmalemală,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza din membrana RS, pompa de  $\text{Ca}^{2+}$  a reticulului sarcoplasmatic (RS), etc.*(6,10)

În patologie poate fi depistată în sânge și urină activitatea crescută a enzimelor miocardice. Prezența lor în aceste medii e argumentată de necroza celulei, însoțită de trecerea enzimelor intracelulare în spațiul extracelular. Aceste enzime sunt numite markeri biochimici ai necrozei cu rolul următor:

1. confirmarea IMA, precizarea diagnosticului;
2. realizează o diferențiere între IM acut și unul vechi sau subacut;
3. se apreciază dimensiunea IMA;
4. monitorizează evoluția, eficacitatea reperfuziei;
5. stratificarea riscului în sindroamele coronariene acute.

**Criteriile unui marker biochimic ideal sunt:**

-specificitate și sensibilitate maximă pentru necroză de miocard;

-atingerea indicelui nivelului diagnostic în sânge într-un timp scurt de la debutul semnelor clinice ale IM;

-menținerea indicelui nivelului diagnostic în sânge timp de câteva zile.

În prezent nu avem markeri biochimici care corespund întocmai criteriilor date, de aceea pentru diagnosticul IM se recomandă analiza în paralel a markerilor „precoce” și „tardivi”. Markerul precoce al IM atinge nivelul diagnostic în sânge în primele ore ale bolii, cel tardiv - atinge nivelul diagnostic peste 6-9 ore, dar posedă specificitate ridicată pentru necroza de miocard.

Markerii care realizează în mare parte aceste obiective sunt: Tn, mioglobina și CK-MB.

Moleculele markerilor se împart, după compartimentarea în cardiomiocite, în două grupe: proteine legate structural și proteine nelegate structural.

### **Markerii se pot grupa în trei categorii.**

1. markeri citosolici: creatinkinaza, izoenzima CK-MB. lactic-dehidrogenaza, mioglobina, proteina legată de acid gras, glicogen fosforilaza-izofoma BB (GPBB).

2. markeri citosolici și structurali: TnT-5% citosolic și 94% structural; TnI-3% citosolic și 97% structural.

3. markeri structurali: miozină LC, miozină HC și actină.

### **Markerii citosolici**

*Troponinele T și I* - sunt markeri citosolici și structurali. Tn T este prezentă 6% în citosol și 94% în structuri, iar Tn I se află 3% în citosol și 97% în filamentele contractile.

Tn T și I nu sunt libere în plasmă. Apariția lor în plasmă indică o distrugere a miocitelor. Timpul de înjumătățire în ser a Tn T este de 2 ore.

În IMA, Tn T și I cresc semnificativ la 3-4, ore inițial mai mult componenta citosolică. Eliberarea Tn din zona de necroză continuă zile și săptămâni.

Creșterea Tn T are un mod bifazic, mai puțin evident la Tn I. La un interval de o oră după reperfuzie, Tn T și I cresc din nou.

Tn sunt specifice pentru necroza miocardică și nu cresc în afectarea mușchilor scheletici și în celelalte boli notate la CK-MB.

Tn T este mai sensibilă decât Tn I și nu are dificultăți de standardizare.

Strip test permite o determinare vizuală calitativă și prin citire, cantitativă. În determinare sunt folosiți anticorpi monoclonali și policlonali.

Momentul determinărilor este la internare și la 12 ore. Se recomandă și determinări la 6 ore. Dacă acestea sunt negative, se exclude IMA. O creștere a TnT  $> 0,4 \text{ mcg} \times \text{L}^{-1}$  indică necroză cară și risc crescut, iar o valoare  $> 0,1 \text{ mcg} \times \text{L}^{-1}$  indică leziuni reduse și un grad de risc în timp; valori  $< 0,1 \text{ mcg/L}^{-1}$  au risc redus și sunt indicate testele de stres. Valori de TnT  $> 0,2 \text{ mcg} \times \text{L}^{-1}$  indică IMA la 12 ore, iar valori TnT  $< 0,1 \text{ mcg} \times \text{L}^{-1}$  indică leziuni minore. Actualmente, troponinele reprezintă „Standardul de aur” în diagnosticul IMA.

*Mioglobina serică* - mioglobina este o proteină din structura mușchiului cardiac și a celui scheletic. Are o greutate moleculară de 17800 D. Este eliberată rapid în ser și eliminată prin urină în infarctul miocardic. Mioglobina serică nu este specifică pentru mușchiul cardiac. În IMA începe să crească în ser la o oră. Nivelul minim de anormalitate este de peste  $100-120 \text{ mcg} \times \text{L}^{-1}$ , cu un vârf la 178 de minute și de  $107 \text{ mcg} \times \text{L}^{-1}$  în alt studiu. La 3-5 ore se atinge un maximum, cu scădere spre normal la 7 ore. Dacă la 5 ore nivelul în ser al mioglobinei este sub limita inferioară, se poate exclude necroza miocardică. După o reperfuzie reușită prin trombolitice sau PTCA, nivelul mioglobinei crește la valori cuprinse între 500 și  $5000 \text{ mcg/L}^{-9}$ , iar la o reperfuzie nereușită valoarea medie este sub  $200 \text{ mcg.L}^{-1}$ .(9)

Mioglobina serică este cel mai util marker pentru diagnosticul IMA precoce, în special în condițiile în care examenul ECG nu oferă date clare.

Dezavantajul acestui marker este lipsa de specificitate și intervalul de 7-8 ore pentru evidențierea acestuia. Combinarea mioglobinei, marker rapid, cu CK-MB, marker tardiv constituie o strategie bună deoarece cuprinde intervalul primelor 24 de ore și permite a stabili nu numai diagnosticul ci și întinderea IMA cu o mai bună apreciere a riscului imediat și a celui tardiv.

Dacă s-a exclus IMA, ulterior se va putea aplica un test de stres care este util diagnosticului și scurtează durata de spitalizare.

*Aspartat aminotransferaza (AST)* sau *trans-aminoza glutamic oxalocetică (TGO)* - un marker frecvent folosit în multe spitale.

În multe țări nu mai este utilizat din 1998, din cauza unei sensibilități reduse și a unei lipse de specificitate. Este crescut în multe boli: boli hepatice, insuficiență cardiacă, embolie pulmonară, boli musculare scheletice etc.

Creșterea activității plasmatice corelează cu dimensiunea infarctului. Apare după 12 ore de la debut, cu un vârf la 24-36 de ore și o scădere la 72 de ore. Acest marker este util în spitalele ce nu pot folosi noile tehnici pentru markerii mai des utilizați: CK-MB și troponinele.

Este utilă pentru confirmarea diagnosticului de necroză, dar nu și pentru decizii de revascularizare. Limita superioară a normei este de 8-20 U sau 40 unități Carmen. La necroza miocardică este o creștere peste 404 U1. sau 80 U Carmen.(7)

*Lactic dehidrogenaza (LDH)* - este o enzimă care crește în IMA după 24 ore de la debut. Atinge un platou la 48-72 de ore și se menține până la 7-14 zile. Este utilă în diagnosticul IMA la bolnavii ce se internează târziu. Nu este un marker specific. Crește și în alte condiții patologice, șoc, hemoliză, embolii pulmonare, boli renale, boli hepatice, leucemie, anemii, boli ale musculaturii scheletului. Valorile normale ale LDH sunt de 45-90 U.

Izoenzima LDH<sub>1</sub> este eliberată mai mult de miocard, creșterea ei fiind mai legată de necroză. Valorile normale ale LDH<sub>1</sub> sunt de 0,45-0,74 ng/ml.

*Glicogenfosforilaza BB* - este o izoenzimă-marker pentru necroza miocardică și pentru ischemie. Apare în sânge precoce și are o durată relativ scurtă. Această enzimă are rol în activarea glicogenolizei în miocardul ischemic. Apar multe rezultate fals pozitive la boli musculare scheletice (67%) și la boli hepatice (46%). Nu are o utilizare largă în diagnosticul IMA.

ASAT, LDH și glicogenfosforilaza nu mai sunt folosite în practica centrelor cu dotare modernă.(7)

*Creatinfosforilaza (CK)*. CK nu este utilă în diagnosticul IMA în primele ore, pentru adoptarea deciziilor terapeutice. Creșterea enzimei are loc după 6 ore, atinge un vârf la 24 de ore, cu scădere spre normal la 72 de ore. Determinările utile sunt la 8 ore și la 24 de ore. Valorile normale ale CK sunt: la bărbați de 12-80 U, iar la femei de 10-55 U.

În caz de reperfuzie cu succes, vârful de creștere a CK apare mai timpuriu.

Este mai utilă dozarea CK pentru confirmarea diagnosticului, pentru determinarea dimensiunilor infarctului și pentru evaluarea riscului. Creșterea CK are loc mult mai târziu pentru a fi luată decizia de revascularizație prin agenți litici.

Se notează o creștere a CK și în alte afecțiuni: embolii pulmonare, afecțiuni ale mușchilor scheletici, diabet zaharat, alcoolism, etc. Dozarea CK totală nu este recomandată pentru diagnosticul de rutină al IMA, deoarece acesta crește și în alte boli.

CK are 2150 de enzime MM și MBB, cu două variante MMB1 și MBB2. Forma MBB2 apare mai repede în sânge; o creștere peste 1 U/L și un raport al lor ar fi semnificativ pentru IMA, iar un raport peste > 3,8 ar fi un indiciu de reperfuzie reușită CK-MB realizează diagnosticul de IMA mai timpuriu și dă, la 7-8 ore, un răspuns clar privind prezența sau absența IMA. Dozările sunt efectuate la prezentarea pacientului, la 6, 9 și la 12 ore și ulterior, dacă este nevoie. Valoarea de prag a CK-MB este de 2 mcg x L<sup>-1</sup> sau de 4,3 mcg x L<sup>-1</sup> (7). Însă, în multe afecțiuni cardiace dispensabile de necroza miocardului, cât și într-o serie de patologii extracardiace, testele respective, atât CFK-MB cât și troponina, pot apare „fals-pozitive” sau „fals-negative”, inclusiv în cazurile de infarct miocardic (2).

#### **Alți factori biochimici legați de necroză**

*Fibrinogenul* este crescut în IMA și în celelalte sindroame coronariene acute. Creșterea fibrinogenului reprezintă un factor de risc important pentru evenimente coronariene.

*Proteina C reactivă* - este o proteină de fază acută a sindroamelor coronariene acute, în primul rând în IMA. Prezența este un factor de risc pentru evenimente coronariene viitoare printr-un proces inflamator (6,12).

*Amiloidul A seric* - este o proteină de fază acută ce crește în sindroamele coronariene acute și constituie un factor de risc al mortalității. O creștere la 6,28 mg/dl determină creșterea mortalității.

#### **Noutatea științifică**

Pentru prima dată, utilizând anticorpi monoclonali către Ca<sup>2+</sup>-ATP -aza RS cardiac, s-a elaborat un nou procedeu diagnostic și s-a validat un nou biomarker al IMA - **Ca<sup>2+</sup>-ATP -aza RS**.

Ca<sup>2+</sup>-ATP -aza RS, spre deosebire de troponine, nu are stoc intraplasmatic, de aceea nu poate fi identificată la indivizii sănătoși. Ea nu poate apărea nici în permeabilizarea sarcolemei

prin impact ischemic ușor, asociat cu tulburări funcționale reversibile, deci prezența ei în sânge pune în evidență faptul incontestabil al necrozei miocardice.

Contrar troponinelor,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza RS nu ar trebui să fie găsită în sânge în alte patologii somatice și, asemenea CFK-MB, ea nu realizează cross-reacții cu forma I a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP -azei mușchilor scheletici.

### Valoarea practică

Procedeu de determinare a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-azei RS poate fi utilizat în diagnosticul IMA, iar apariția în sânge a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-azei RS poate servi drept marker al IMA.

1. Utilizând anticorpi monoclonali specifici către  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza RS, s-a elaborat, în baza principiului ELISA, un procedeu de identificare a acestei proteine în serul sangvin al pacienților cu IMA.

2.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza RS, determinată prin intermediul acestui procedeu, își face apariția în sânge la aproximativ 4-6 ore de la debutul infarctului miocardic acut și dispare la 5-6 zile după eveniment.

3. La pacienții cu sindrom coronarian acut, cu injurii musculare severe și la cei supuși hemodializei,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza RS nu se identifică în sânge, fapt ce semnifică specificitatea acestui marker pentru diagnosticul necrozei miocardice.

4. La pacienții cu IMA asociat de prezența factorilor de risc major (hipercolesterolemia, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat) sporul cantitativ al  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-azei RS în sânge este mai substanțial, fapt ce ar fi determinat de expansiunea zonei de necroză a miocardului (2,3).

Tabel 1. Markerii moleculari utilizați sau propuși pentru utilizare în diagnosticarea infarctului miocardic acut și dinamica lor (10)

Marker	CM(D)	Limitele în norma	Până la creșterea inițială (ore)	Durata pînă la atingerea concentrației maxime	Durata pînă la revenirea la valoarea normală	Modul comun de determinare
hFABP	14.000-15.000		1.5	5-10 h	24 h	la internare apoi la 4 h
Mioglobina	17.800	<90 ng/ml	1-4	6-7 h	24 h	Frecvența, 1-2h după durerea toracică
cTnI	23.500	<0,5ng/ml	3-12	24 h	5-10 zile	o data min. 12h după durerea toracică
cTnT	33.500	<0,1 ng/ml	3-12	12 h-2 zile	5-14 zile	o data min. 12h după durerea toracică
CK-MB	86.000	10-25 ME/l	3-12	24 h	48-72 h	la fiecare 12hx3 după durerea toracică
CK-MM izoforma tisulara	86.000	<2,6ME/l	1-6	12 h	38 h	60-90 min. după durerea toracică
CK-MB izoforma tisulara	86.000	<2,6ME/l	2-6	18 h	nu se stie	60-90 min. după durerea toracică
Enolaza	90.000		6-10	24 h	48 h	la fiecare 12hx3
LDH <sub>1</sub> /LDH <sub>2</sub>	135.000	14-36% 0,45-0,74	10	24-48 h	10-14 h	o data min. 24h după durerea toracică
AST		10-30 ME/l	6-8	24-36h	5-6 zile	o data min. 24h după durerea toracică

În pofida autenticității diagnosticului IMA prin estimarea troponinelor, a anticorpilor către miozină etc, metoda de determinare serică a RS-Ca-ATP-azei în aprecierea alterărilor ischemice ale cordului poate fi justificată prin două entități semnificative:

- nu se identifică la persoanele sănătoase;
- oferă posibilitatea de diagnostic a reinfarctului (5).

În diagnosticarea IM, în afară de aspectul biochimic se ține cont de înca două criterii: tabloul clinic și ECG. Cu părere de rău, în diagnosticul și tratamentul infarctului miocardic rămân nesoluționate un șir de probleme. Deși în ultimii ani letalitatea spitalicească s-a redus cu aproape două treimi, mortalitatea globală prin infarct miocardic rămâne înaltă (1).

### **Concluzii**

Infarctul miocardic acut este o maladie care poate afecta oricare locuitor al Republicii Moldova. Acesta este determinat de nouă factori tradiționali cunoscuți în întreaga lume (risc 91%): fumatul, raportul anormal Apo B/Apo A-1, diabetul, tensiunea arterială mărită, stres, obezitate, mod de viață pasiv, consum minim de fructe și legume, abuzul de alcool (4).

Cea mai eficientă modalitate de a preveni atit orice maladie cât și infarctul miocardic este profilaxia. În cazul nostru ea include măsuri precum - controlul principalilor factori de risc.

Este important ca in caz de declanșare a IM să putem depista la timp prezența acestuia. Drept markeri biochimici servesc enzimele implicate în procesele metabolice, fapt ce argumentează nemijlocita cunoastere a lor (creatinfosfokinaza, Ca<sup>2+</sup>-ATP -aza RS, LDH, AST, troponinele, etc.).

### **Bibliografie**

1. **Grosu A.**, Infarctul miocardic acut: managementul la etapa medicinei bazate pe dovezi, Curierul Medical, nr.1, 2005
2. **Ciobanu Lucia**, Ca<sup>2+</sup>-ATP –aza – un marker biologic în diagnosticul infarctului miocardic acut, IMSP Institut de Cardiologie mun. Chisinau, 2009
3. **Ciobanu Lucia**, Determinarea biomarkerilor de citoliză miocardică - o oportunitate pentru diagnosticul rapid al infarctului miocardic acut. //Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale, 2008, nr.4.
4. **Грацанский Н.А.**, Риск инфаркта миокарда определяется девятью хорошо известными (традиционными) факторами, причем одинаково во всем мире, Кардиология, 2004, Т44, н 10.
5. **Popovici N., Sirbu S., Cobet V.**, Determinarea serică a Ca<sup>2+</sup>-ATP – azei în deagnosticul infarctului miocardic acut, Arta Medica, nr. 5, 2004.
6. **Costin Carp**, Tratat de cardiologie, Vol.1, 2002, Bucuresti, Editura Medicala Natională.
7. **Costin Carp**, Tratat de cardiologie, Vol.2, 2003, Bucuresti, Editura Medicala Natională.
8. **Morrow DB, Rifai N, Antman EM**, et al. Serum Amyloid A Predicts Early Mortality in Acute Coronary Syndromes: A TIME II A Substudy. J Am Coll Cardiol 2000.
9. **Braunwald**, Heart Disease, Tratat de boli cardiovasculare, Vol. 1, 2000.
10. **Braunwald**, Heart Disease, Tratat de boli cardiovasculare, Vol. 2, 2000.
11. **Havercate F, Thompson SG**, Pyke SDL et al. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. Lancet, 1997.
12. [http://www.sanatate.ro/aspectul\\_biochimic\\_al\\_infarctului\\_miocardic](http://www.sanatate.ro/aspectul_biochimic_al_infarctului_miocardic)