

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И
КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Д-Р АДЕЛИНА ДИМИТРОВА ЦАКОВА

БИОМАРКЕРИ ЗА ДЕФИНИРАНЕ
СТРАТИФИКАЦИЯ И ПРОСЛЕДЯВАНЕ
НА ПЕРИПРОЦЕДУРНА НЕКРОЗА
СЛЕД ПЕРКУТАННА КОРОНАРНА
ИНТЕРВЕНЦИЯ (РСІ)

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
НАУЧНА И ОБРАЗОВАТЕЛНА СТЕПЕН
"ДОКТОР"

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:
ПРОФ. Д-Р ДОБРИН СВИНАРОВ, ДМ
ДОЦ. Д-Р ДОБРИН ВАСИЛЕВ, ДМН

СЪДЪРЖАНИЕ

СТРАНИЦА

1. ВЪВЕДЕНИЕ	4
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	56
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	58
4.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ	58
4.2. АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ	61
4.2.1. ВИСОКОЧУВСТВИТЕЛЕН ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД (ECLIA) ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪРДЕЧЕН ТРОПОНИН Т (hs TNT)	61
4.2.2. ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД (ECLIA) ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АСОЦИИРАН С БРЕМЕННОСТА ПЛАЗМЕН ПРОТЕИН А (PAPP-A)	68
4.2.3. ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД (ECLIA) ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА NT-proBNP	73
4.2.4. ВИСОКОЧУВСТВИТЕЛЕН ИМУНОТУРБИДИМЕТРИЧЕН МЕТОД, УСИЛЕН С ЧАСТИЦИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА С-РЕАКТИВЕН ПРОТЕИН (CRP hs)	79
4.2.5. СТАНДАРТИЗИРАН И ОПТИМИЗИРАН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КРЕАТИНКИНАЗА И ИМУНОИНХИБИЦИОНЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СК-МВ	84
4.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ	90
5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	92
5.1. ВЕРИФИЦИРАНЕ НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ	92
5.1.1. ВЕРИФИЦИРАНЕ НА ВИСОКОЧУВСТВИТЕЛЕН ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД (ECLIA) ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪРДЕЧЕН ТРОПОНИН Т (hs TNT)	93
5.1.2. ВЕРИФИЦИРАНЕ НА ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД (ECLIA) ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА NT-proBNP	100
5.1.3. ВЕРИФИЦИРАНЕ НА ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД (ECLIA) ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АСОЦИИРАН С БРЕМЕННОСТА ПЛАЗМЕН ПРОТЕИН А (PAPP-A)	105
5.2. КЛИНИЧНИ РЕЗУЛТАТИ	111
6. ИЗВОДИ	147
7. БИБЛИОГРАФИЯ	149

Списък на използваните съкращения :

- ВЛКК** – Вътрелабораторен качествен контрол
- ВОК** – Външна оценка на качеството
- ГРГ** – Горна референтна граница
- МИ** - Миокарден инфаркт
- ОКС** – Остър Коронарен Синдром
- СК**– Креатинкиназа
- СК-МВ** – Креатинкиназа - МВ
- COV (cut-off value)** - дискриминантна (клинично-значима) стойност
- CRP**- С-реактивен протеин
- cTnI** - Сърдечен тропонин I
- cTnT** – Сърдечен тропонин T
- ECLIA** – Електрохемилюминисцентен имунен анализ
- FABP** - Белтък, свързващ мастни киселини
- hs** - високочувствителен (анализ)
- IGF** – Инсулиноподобен растежен фактор
- IL-6** - Интерлевкин 6
- LoB** - Граница на сляпата проба (бланк)
- LoD** - Граница на откриване
- LoQ** - Граница на количествено определяне
- MCP-1** -Моноцитен хемотаксисен протеин-1
- MMPs** - Матриксни металопротеинази
- MPO** - Миелопероксидаза
- PAPP-A** - Асоцииран с бременността плазмен протеин А
- PIGF** - Плацентарен растежен фактор
- sCD40L** – разтворим CD40 лиганд
- TNF α** - Тумор-некротизиращ фактор алфа
- MACE** - Големи неблагоприятни сърдечни събития

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Сърдечните заболявания са най-честата причина за смърт в съвременните индустриално развити страни - над 17 милиона души годишно. Те са и основен фактор за инвалидизиране на населението и намаляване качеството на живот, което определя тяхната социална значимост.

България не прави изключение - между 60 и 70% от смъртността се дължи именно на сърдечно-съдовата патология като водещата роля принадлежи на коронарната болест на сърцето – заболяване със сложна патогенеза, хроничен ход и остро настъпващи усложнения.

Ролята на клиничната лаборатория е безспорна по отношение на коронарната патология във всички етапи – сърдечните маркери са в основата на диагностиката, терапията, рисковата стратификация и профилактиката при тези пациенти. Според приетата дефиниция на диагнозата „миокарден инфаркт“ сърдечният тропонин се признава като “златен биохимичен стандарт”, чието увеличение в серума се използва за откриване, мониториране и стратификация на риска от миокардно увреждане.

Едновременно с това мащабни клинични проучвания удостоверяват възможностите на нови класове биомаркери, които характеризират ОКС в преднекротичния стадий и имат потенциал за стратификация на риска и клинична прогноза. Клиничното приложение на комбинациите от биомаркери с реално изтегляне на лабораторната диагноза на ОКС в преднекротичен стадий, е една все по-реално изглеждаща цел.

Необходими са и нови маркери и схеми за рискова стратификация, за да може да се диференцират групите с най-висок риск и болните, които

биха имали полза от агресивна медикаментозна и интервенционална терапия.

Терапевтичното поведение при коронарна болест е сплав от 2 допълващи се подхода :

- Консервативен (медикаментозен)
- Инвазивен (интервенционален)

Инвазивният подход е представен от перкутанна коронарна интервенция (PCI) или байпас-хирургия (CABG).

Перкутанната коронарна интервенция (PCI) е най-често във вариант транслуменна (балонна) коронарна ангиопластика (PTCA) - инвазивен неоперативен метод, с който се възстановява проходимостта и кръвотока в засегнатия участък от коронарните артерии. Най-често дилатирането, което е в основата на метода, е съпроводено от поставянето на т.нар. стент - съдова протеза, подобна на тънка пружинка, изградена от преплетени по специален начин тънки нишки от специални сплави или биополимери. Той се имплантира върху съдовата стена на мястото на стенозата, поддържайки отворена артерията.

Сравнено с хирургичните интервенции като байпас-хирургията, балонната ангиопластика и имплантирането на съдови стентове е по-малко инвазивно, с по- малък риск и икономически изгодно. След кратък период може да се възстанови нормалната физическа активност.

Какви са недостатъците?

Тъй като стентът е чуждо тяло в коронарния съд, неговото поставяне води до микротравма на ендотела, разкъсване на подлежащата плака и експозиция на нейното ядро. Това, чрез включването на редица сложни механизми, може да доведе до активация на тромбоцитите и повишена вероятност от образуване на тромб - възможно е развитието на т.нар.

перипроцедурно увреждане до степен на некроза и оформяне на миокарден инфаркт тип 4а според Третата дефиниция на миокардния инфаркт от 2012г..

Проблем е и реакцията на организма към това чуждо тяло - имплантираният стент предизвиква миграция на гладкомускулни клетки към интимата на съда, неоинтимална хиперплазия, пролиферация и рестеноза – усложнение, срещано при около 30 % от болните с имплантирани предимно BMS („bare metal stents”), което може да доведе отново до високостепенно стеснение или дори запушване на лекувания съд с исхемични прояви до оформяне на некроза.

Стремежът на специалистите - кардиолози, работещи активно в областта на инвазивната кардиология, е свеждането до минимум на тези нежелани реакции. В резултат бяха разработени второ поколение - т.нар. „освобождаващи медикамент стентове“, където процесът на рестенозите е силно намален - 6-10 %. Поради забавеното покриване на стента с ендотел и възможността съдържимото на плаката по-дълго време да е в контакт с кръвния ток (което е предпоставка за образуване на тромби), при медикамент-излъчващите стентове се наблюдава по-висока честота на тромбозиране...

Усилията в тази насока продължават - разработват се нови поколения стентове, които да имат способността след известно време да се разтварят и абсорбират (т.нар. биополимерни скелета) като по този начин в кръвоносния съд няма чуждо тяло, към което организмът да реагира или да доведе до образуване на тромб. До момента данните от проучванията са оптимистични...

Настоящият дисертационен труд е опит на автора да даде своя принос по отношение на този актуален в съвременната инвазивна кардиология проблем – предотвратяване, своевременно диагностициране и

рискова стратификация на възникнали усложнения след перкутанна коронарна интервенция със стентиране с оглед подобряване на резултатите от лечението на тези пациенти.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР :

Коронарната болест е заболяване със сложна патогенеза, която обединява процесите на атеросклероза, възпаление, дестабилизация и руптура на плаката, намаляване на кръвотока с миокардна исхемия, прогресираща до развитието на миокардна некроза. Диагностиката на тези пациенти е комплексна – на базата на клиничната картина, ЕКГ-промените и промени в лабораторните показатели. Дори и в случаите когато има овладяване на състоянието им и стабилизиране, те остават с повишен риск за следващи исхемични събития поради нестабилността на плаките и активност на локалния възпалителен процес. Поради това е важно проследяването на различните групи сърдечни биомаркери, които да дадат информация за състоянието и рисковата стратификация на болните.
137,82,15,76, 207,2

През 2001г. работна група на Американския здравен институт стандартизира определението за биомаркер като “параметър, който може да бъде обективно измерен и е индикатор за нормален биологичен процес, патологичен процес или отговор към терапевтична интервенция”. Биомаркерът може да бъде измерен в биологична проба, може да бъде регистрирана стойност от апаратно изследване (ЕКГ, измерено арт. налягане и др.) или образно изследване (ехокардиограма, компютърна томограма и др.).

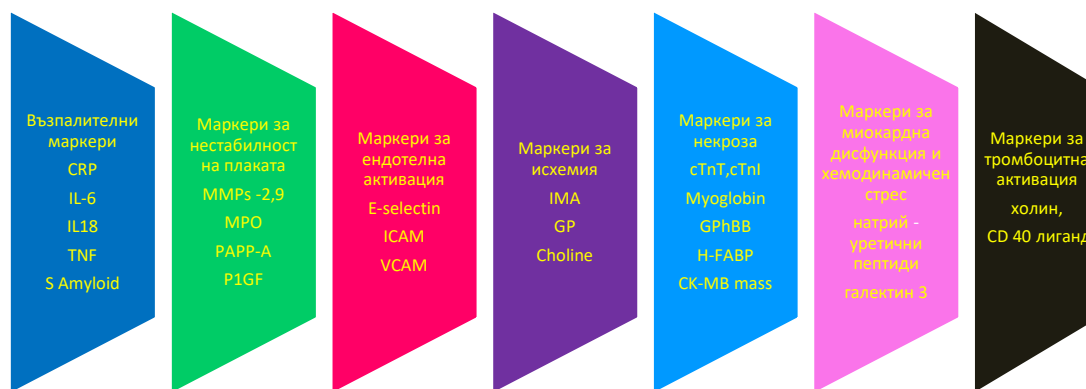
Биомаркерите могат да се класифицират в няколко групи :

- предшествувачи – отразяващи риска от развитие на дадена болест
- скринингови - маркери за субклинично изявена болест
- диагностични - потвърждаващи вече клинично проявена болест
- стадиращи – служещи за преценка тежестта и прогресията на заболяването

- прогностични – предсказващи маркери за протичането на заболяването, за евентуален повторен инцидент, отговор към терапия и проследяване на нейната ефективност. ²

По отношение на коронарната болест и ОКС, масово прилаганите биомаркери - главно маркери за некроза (сърдечно-специфични тропонини, СК-МВ, миоглобин и др.), регистрират финала на болестния процес. Мащабни клинични проучвания удостоверяват възможностите на нови класове биомаркери, които да дадат възможност за диагностика и характеристика на коронарната болест в преднекротичния стадий и съответно да улеснят стратификацията на риска и клинична прогноза. Тези ранни маркери се подреждат засега в няколко класа :

- маркери, показващи възпаление и инфилтрация на атеросклеротичната плака - С-реактивен протеин, миелопероксидаза, тумор-некротизиращ фактор алфа (TNF- α), интерлевкин 6 (IL-6), серумен амилоид
- маркери, показващи нестабилност на плаката - асоцииран с бременността плазмен белтък А(PAPP-A), плацентарен растежен фактор (PIGF), матриксни металопроотеинази (MMPs)-2,9
- маркери, показващи активация на тромбоцитите - серумен CD40 лиганд (sCD40L), серумен холин
- маркери за миокардна исхемия- исхемично модифициран албумин, серумен холин, свободни мастни киселини
- маркери за миокардна дисфункция и хемодинамичен стрес – натрий-уретични пептиди, адреномедулин, копептин, галектин-3



Фиг.1 Групи сърдечни биомаркери

Клинично приложение на комбинациите от биомаркери с реално изтегляне на лабораторната диагноза на ОКС в преднекротичен стадий е една все по-реално изглеждаща цел. Подбирането на комбинации от клинично и прогностично значими показатели изисква добро познаване и изхождане от патогенетичните механизми на исхемичната болест на сърцето и ОКС. Необходими са и нови маркери и схеми за рискова стратификация, за да може да се диференцират групите с най-висок риск и да се отделят болните, които биха имали полза от агресивна медикаментозна и интервенционална терапия.^{2,138,77,126}

Маркери за възпаление – възпалението е в основата на атеросклерозните промени и е логично маркерите за възпаление да представляват определен интерес за кардиолозите. Основно внимание при различните проучвания се отделя на С-реактивния протеин, но наред с него навлизат все повече в употреба и други, нови показатели от тази група.^{119,105,223}

С-реактивен протеин (CRP) е ранен острофазов маркер, който се произвежда в черния дроб и транскрипцията му се активира от IL-6. Молекулата му е пентамер – изградена от 5 идентични субединици, нековалентно свързани и формиращи дисковидна структура с радиална

симетрия и молекулна маса приблизително 115 кДа. Нови данни показват, че той се произвежда и в адипоцитите, и локално в атеросклеротичните плаки, особено в гладко-мускулните клетки (ГМК) и макрофагите, като играе директна роля в патофизиологията на атеросклерозата. CRP индуцира експресията на адхезионни молекули, стимулира експресията на почистващи рецептори и приема на LDL от макрофагите, улеснява трансформирането им в пенести клетки, допринася за плаковата нестабилност и има отношение към развитието на ендотелна дисфункция – понижава експресията и бионаличността на ендотелната NO-синтетаза.^{64,105,215,227,39,166,192}

Освен ролята му в атерогенезата, той е маркер за възпалителен отговор към исхемията и клетъчната некроза и се използва при оценката на ОКС. При пациенти с прясна миокардна некроза нивото му се повишава бързо, двукратно на всеки 8 часа с пик на 2-4 ден от началото на изява на симптоматиката. Понижава се бавно в следващите дни и седмици и достига изходни стойности след 2-4 седмици.^{113,227}

Определено внимание се отделя на С-реактивния протеин като рисков и стратификационен показател. В литературата има доста данни в тази насока, но все още не съществува абсолютен консенсус по отношение на оптималното ниво на CRP за използването му като фактор за рисковата стратификация при пациенти с ОКС - най-често се използват нива от 3,10 и 15 mg/L.^{156,227,169,223}

Получени са много данни от проучвания в подкрепата на връзката между концентрацията на CRP и риска от неблагоприятен изход в краткосрочен, среден и дългосрочен план при пациенти, преживели ОКС.^{64,38,105,156,31,227,223,217,29}

В проучването TIMI11A, включващо 437 пациенти с ОКС, е установен 10 пъти по-висок риск от настъпване на смърт към 14 ден при

пациенти с ниво на CRP > 15 mg/L в сравнение с пациентите с по-ниски нива, като от съществено значение е, че тази зависимост се наблюдава и при пациенти с негативни резултати за тропонин.¹¹⁶ Подобни резултати са получени и при оценка на риска за настъпване на повторен инцидент или смърт в 30-дневен и 6-месечен период в проучването CAPTURE като там са използвани като гранични стойности за CRP 10 mg/L.⁹⁵ В проучването FRISC⁵ е изследвана дългосрочната прогностична стойност на CRP. Получени са следните резултати:

3-годишна смъртност за хора с нива на hsCRP < 2 mg/L – 5,7%

3-годишна смъртност за хора с нива на hsCRP - 2-10 mg/L – 7,8%

3-годишна смъртност за хора с нива на hsCRP > 10 mg/L – 16,5%

Направените мултивариационни анализи доказват, че повишеното ниво на hsCRP > 10 mg/L е независим предиктор предимно по отношение на дългосрочния риск и смъртност.

Американската асоциация за сърдечни заболявания е определила рисковите групи, както следва: нисък риск: по-малко от 1.0 mg/L, среден риск: 1,0 - 3,0 mg/L и висок риск: над 3,0 mg/L. Препоръчва се извършване на поне две изследвания със определяне на средна стойност като оптималният вариант е повторното изследване през 2 седмици за да се осигури по-стабилна оценка на нивото на този маркер^{64,38,29,178,214,182,2}

Методи за определяне – в момента основно приложение намират високочувствителните методи за определяне на CRP. "Високочувствителен" означава, че концентрацията на CRP се определя с помощта на анализ, предназначен да измерва много ниски нива. Съществуващите методи понастоящем за определяне на CRP са три основни – имунонефелометричен, имунотурбидиметричен и имунохимичен („сандвичев тип“).¹⁹⁸

Маркери за нестабилност на плаката

Плазмен, асоцииран с бременността протеин А (РАРР-А) представлява гликопротеин с висока молекулна маса (≈ 200 kDa), който се отделя от различни клетки в организма – фибробласти, гладкомускулни клетки, полови жлези - обичайно се синтезира в големи количества от клетките на синцитиотрофобласта при бременност и се определя в рамките на скрининга за синдром на Даун.⁹⁹ В кръвния поток циркулира под формата на хетеротетрамерен комплекс, изграден от 2 субединици РАРР-А, ковалентно свързани с 2 субединици от проформата на еозинофилния базисен протеин (proMВР), негов ендogenous инхибитор.

При проучване функциите на РАРР-А е установено, че той се експресира в клетките на атеросклеротичните плаки и екстрацелуларния матрикс на ерозирани и руптурирани плаки, където изпълнява ролята на активатор на инсулино-подобният растежен фактор(IGF) – функционира като металопроотеиназа и го освобождава от свързващия го протеин като го привежда в активна форма.

IGF е проатерогенен фактор - нарушава стабилитета на плаките като изтънява фиброзната им шапка. Установени са значително повишени нива на РАРР-А в ерозирани и руптурирани плаки при пациенти с ОКС, докато експресията му в стабилните плаки е минимална.^{49,90,34,78,20,42,102}

Определянето на РАРР-А се оказва ценно за откриване на ОКС при пациенти без повишени концентрации на биомаркери на некроза като сTnI и сTnT. По този начин потенциално се идентифицират високо-рискови пациенти, чиито нестабилна клинична ситуация в противен случай може да остане недиагностицирана. При 136 пациенти със съмнение за ОКС, но с негативни стойности на тропонин първите 24 часа след приемането, Lung и сътр. намират повишени стойности за РАРР-А. Те го посочват като независим предиктор за бъдещи нежелани събития, както и нуждата от

прилагането при тези пациенти на PCI и аорто-коронарен байпас. Изчисленият коефициент за риск е 4.6 (95% CI, 1.8 –11.8).^{116,54,103,15}

Подобни резултати са изнесени и от Heeschen и сътр. Изследвани са 644 пациенти, преминали през Спешен център с оплаквания от сърдечна болка. Установени са сигнификантно повишени стойности при пациентите с ОКС – средна стойност 20,9 mIU/L докато при пациентите със стабилна ангина средната стойност е 8,7 mIU/L, а при тези без сърдечно заболяване – 5,2 mIU/L. Извършен е и рисков стратификационен анализ с използвано ниво от 12,6 mIU/L. Повишеното ниво на PAPP-A (> 12,6 mIU/L), установено при пациенти с ОКС, показва сигнификантно повишен риск за настъпване на МИ и/или смърт към 30-ия ден и 6-ия месец дори при негативен тест за тропонин – 16,9% за пациентите с повишени нива срещу 7,9% за тези с ниски нива.^{78,5}

Направени са и доста изследвания по отношение на кинетиката на този биомаркер. Моделите на освобождаване на PAPP-A са силно променливи - от 2 до 30 часа след появата на болка в гърдите⁵⁴. Предварителните резултати показват, че серумните PAPP-A концентрации чувствително отразяват промени в бъбречната функция (особено при диализирани пациенти) и корелират със серумния креатинин.^{116,54}

Установено е също, че циркулиращият при пациенти с ОКС PAPP-A се различава от този, изолиран при бременни. Активният PAPP-A при пациенти с коронарен синдром е предимно димерна форма – той се освобождава от връзките си с ргоМВР.⁵

Много важен е и материалът за изследване – пробата, подходяща за анализ е единствено серум. Високомолекулните хепарини взаимодействат с PAPP-A и могат да попречат на свързването на антителата с епитопите в молекулата му. ЕДТА също не е подходящ антикоагулант - PAPP-A съдържа в структурата си 16 атома цинк – тяхното свързване от ЕДТА

може да доведе до конформационни промени в структурата на PAPP-A и невъзможност за свързване с епитопите, необходими за изследването.¹²²

Изследването на PAPP-A се извършва най-често с електрохемилюминисцентен или хемилуминисцентен имунохимичен анализ – на „сандвичев” принцип, като методът е приложим на най-често използваните в клиничните лаборатории аналитични платформи. Горната референтна граница (95и-персентил) е 7,15 mU/L.¹²²

Миелопероксидаза (MPO) – тетрамерен хемпротеин с м.м.144 кД, изграден от леки и тежки вериги. Съхранява се в азурофилните гранули на полиморфонуклеарните левкоцити и макрофагите и катализира превръщането на хлорид и водороден пероксид в хипохлорид, които играе роля на микробициден агент. В условията на възпаление се освобождава в екстрацелуларната течност и попада в кръвообращението.^{49,90,15,204,5,6}

Има доста доказателства за проатерогенната функция на MPO:

- Участва в окислителното модифициране на LDL, увеличава поглъщането им от макрофагите и улеснява образуването на пенести клетки.
- Намалява поемането на излишен холестерол от HDL.
- Натрупва се в критичните лезионни зони като активира металопротеиназите и спомага за дестабилизацията и руптурирането на плаките.
- Консумира производеният от ендотела азотен окис и намалява неговия вазодилатативен ефект.^{49,90,15,175,91,5,6}

Две големи проучвания изследват възможностите на MPO за стратификация на риска. Серумната MPO е определена при 1090 пациенти, участващи в проучването CAPTURE като се оценява риска от развитие на

МИ и смърт за периодите на проследяване – 72 –ри час, 30-ти ден и 6-ти месец.

След 72 часа 14% от пациентите с високи серумни нива на МРО развиват МИ или смърт срещу 5,15% от пациентите с ниски стойности на МРО. Нещо повече – МРО идентифицира субгрупа пациенти с ниски стойности на тропонин Т <0.01 ng/ml и високи серумни нива на МРО >350 µg/L, които са с увеличен риск в сравнение с групата с ниски тропонинови нива и ниски стойности за МРО – риск 15,9% срещу 2% за втората група.^{49,90,15,128}

Второто проучване включва 604 пациенти, при които Brennan и сътр. оценяват плазмените нива на МРО като предиктор на риска за нежелани сърдечно-съдови събития на 30-ия ден и 6-тия месец. И при това проучване стойностите на миелопероксидазата предсказват риска от нежелани големи сърдечно-съдови събития, включително при пациенти, които са с негативни стойности за сърдечните тропонини, в отсъствието на миокардна некроза. Така, че този показател има тежест главно като маркер за нестабилност на плаката - визуализира състоянието на остро възпаление в коронарната циркулация, протичащо с неутрофилна и макрофагиална активация, което често предхожда миокардното увреждане, без обаче да е абсолютно специфичен за него.^{204,91,175,229,127}

Методите, с които понастоящем се изследва миелопероксидазата, са две групи: такива, които се базират на определяне на активност и методи, определящи маса. Методите, определящи активност, използват като субстрат водороденпероксид и о-дианизидин дихлорид. Определянето на маса обичайно се извършва с имунологични („сандвичев тип“ ELISA или EIA в автоматичен вариант на платформи на фирмите Abbot, Beckman-Coulter и др.), флуцитометрични или мас-спектрометрични методи.¹²²

Плацентарният инсулиноподобен растежен фактор (PIGF) е хетеродимерен 50-kDa протеин. Съществува в 2 форми - PIGF-1 и PIGF-2, които се различават по съдържанието на участък от 21 аминокиселини, вмъкнати в карбоксилния край на PIGF-2. Доста тъкани и органи имат възможност за отделянето му – щитовидна жлеза, плацента, бял дроб.

49,9,20,214

Не всичко по отношение на биологичните функции на PIGF е непълно изяснено, но е хвърлена доста светлина по отношение на неговото участие в процеса на атеросклероза - ролята му е да улеснява миграцията и натрупването на макрофаги в атеросклеротичните лезии, да стимулира пролиферацията и растежа на гладкомускулните клетки и продукцията на TNF α и моноцитен хемотаксисен протеин-1 (MCP-1) от макрофагите, да повишава отделянето на тъканен фактор и стимулира патологична ангиогенеза. Тези негови ефекти определят ролята му на един от първичните медиатори на възпалението и нестабилността на атеросклеротичната плака. Нещо повече – инхибирането на тези негови ефекти чрез блокирането на рецептора му Fit-1 подтиска еволюцията и нестабилността на плаките. Това обуславя не само приложението му с диагностична и прогностична цел, но и като таргет-маркер за противовъзпалителна терапия при пациенти с коронарна болест.^{214,124,5,6}

Нивата на PIGF в плазмата са използвани за оценка на риска от смърт или МИ в рамките на 30 дни в група от 1173 пациенти.¹⁶⁸ Пациентите с нива на PIGF > 27.0 ng /L имат значително повишен риск от нежелани реакции на 30-ия ден - 14,8% срещу 4,9% при групата с ниски стойности. Рисковото съотношение е 3.34 (95 % CI , 1.79-6.24) и е статистически значимо (p 0.001).⁹³ Същата група автори проучват и значението на показателя по отношение на дългосрочния риск. Неблагоприятните големи сърдечни събития при пациентите с повишени

нива са със значително по-голяма честота – 10,8% в сравнение с 3,2% при пациенти с ниски нива (hazard ratio 3.3) като смъртните случаи при тези с високи нива са 27,6% срещу 11,3% за пациенти с ниски нива на PIGF (hazard ratio 2,6).²¹⁴

Матриксни металопроотеинази (MMPs) са цинк-зависими ендопротеазни ензими, като от най-голямо значение за възпалителните процеси при сърдечни заболявания са MMP-2 и 9. Секретират се от множество клетки, участващи в процесите на атеросклероза – ендотелни, фибробласти, гладкомускулни, макрофаги. Повишената им активност е свързана с всички етапи на развитие на атеросклеротичната плака – от най-ранните стадии на клетъчна миграция и пролиферация до дестабилизирането на плаката и нейната руптура. Те регулират различни биологични процеси чрез активиране на медиатори като TNF α , растежни фактори и техните рецептори, плазминоген и неговите активатори и инхибитори.^{49,90,71,37,144,104,209,87}

Нивото на MMP-9 се повишава при пациенти с ОКС – 2-4 пъти над ГРГ като повишените нива се задържат в рамките на 1 седмица.^{140,127, 118,63}

Маркери за тромбоцитна активация

Серумен CD 40 лиганд - sCD40L

Руптурирането на атеросклеротичната плака и откриването на тромбогенни субстанции води до тромбоцитна активация. Активираните тромбоцити експресират на повърхността на мембраната си CD40L, който впоследствие може да се отцепи и да се превърне в серумна форма sCD40L. Този лиганд се свързва с CD40, експресиран от клетките на възпаление – моноцити и Т-лимфоцити, ендотелни и гладкомускулни клетки като играе ролята на техен активатор. Това свързване води до активиране на възпалителния процес като стимулира продукцията на

тъканни фактори - интерлевкини, TNF- α , интерферон, MCP-1, адхезионни молекули, матриксни металопротеинази и стимулира разграждането на фиброзната капсула на плаките.^{49,90,149,201,217}

Nerea Varo, Uwe Schönbeck и сътр. докладват резултати от проучването OPUS-TIMI16, които показват по-високи нива на пациентите с ОКС в сравнение с контроли. Проучена е и прогностичната значимост на sCD40L като е проследена преживяемост и риск от настъпване на нежелани големи сърдечни събития и смърт за период от 10 месеца. Установен е значително повишен риск за пациентите с повишени нива на sCD40L и тропонин - hazard ratios 12.1, 7.2, и 4.3 съответно за настъпване съответно на смърт, миокарден инфаркт или сърдечно увреждане.¹⁴⁹

Друг важен момент при определяне на предиктивната стойност на биомаркера е фактът, че намаляването на високи нива sCD40L чрез използване на медикаменти като антиагреганти, Пб/Ша -рецепторни антагонисти и статини може да доведе до подобряване на клиничните резултати и да намали значително риска от нежелани големи сърдечни събития и смърт. Въпреки това, все още не е напълно ясно дали sCD40L може да бъде използван като терапевтичен таргет при сърдечно-съдови заболявания. За изясняване на тези въпроси са необходими повече клинични изследвания в различни групи, с помощта на стандартизирани методи за измерване на sCD40L.^{217,84, 149,5}

Засега методът за определяне на биомаркера е имунохимичен „сандвичев тип“-ELISA (Bender MedSystems) с двойка антитела и колориметрична детекция на 650 nm със субстрат 3,3-5,5-тетраметилбензидин.

Маркери за некроза

Те са най-масово прилаганата група биомаркери. Ролята им е :

- Потвърждаване на диагнозата
- Проследяване на реперфузионната терапия и нейната ефективност
- Оценка размера на инфаркта
- Оценка на риска

Изисквания към тях:

- Да са специфични - локализирани почти изцяло в миокардната клетка, да са в ниски нива в кръвообръщението и да отсъстват при липса на миокардни увреждания. Да са специфични за необратимост на миокардното увреждане – да отдиференцират обратимо (исхемия) от необратимо (некроза) увреждане.
 - Да са с оптимална диагностична чувствителност, след инцидент да са бързо покачващи се и да има пряка зависимост между покачването, достигнатите плазмени нива и степента на миокардната увреда.
 - Да остават повишени достатъчно дълъг период и динамиката им да отразява добре промените, настъпили в миокарда вследствие на инцидента и проведеното лечение .
 - Да се определят лесно, бързо, за определянето им да се прилагат методи с висока аналитична надеждност, с лесно изпълнение.
- До тези изисквания за идеален маркер най-много се доближават сърдечните тропонини.²

Биомаркерите за некроза се смятат за най-важният от компонентите за поставяне на диагнозата миокарден инфаркт заедно с клиничната симптоматика, ЕКГ промените и данните от образни изследвания.

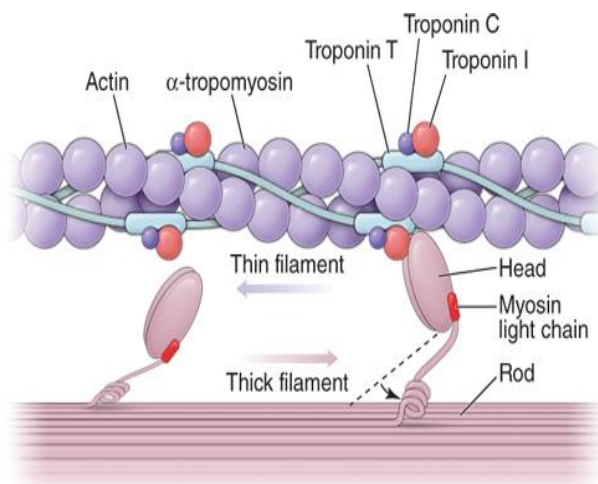
През 2000 г консенсусна група на Европейската кардиологична асоциация и Американския колеж по кардиология (ESC/ACC) предефинира критериите за поставяне на диагнозата „миокарден инфаркт“. Малко по-късно - през 2007 и 2012 година към нея бяха добавени някои

допълнителни критерии по настояване на Американската сърдечна асоциация (АНА). С тази дефиниция сърдечният тропонин се признава като “златен биохимичен стандарт”, чието увеличение в серума се използва за :

- откриване
- мониториране
- стратификация на риска от миокардно увреждане ^{165,185,208,180,188}

Тропонините са регулаторни структурни протеини, локализирани в тънките филаменти на напречно-набраздените мускули, където регулират калций-медираната мускулна контракция. Представяват белтъчен комплекс, изграден от 3 субединици:

- Тропонин С – калций-свързващ белтък с 4 свързващи места за калций, които се заемат по време на мускулна контракция
- Тропонин I – инхибира активността на акто-миозиновата АТФ-аза, като предотвратява мускулна контракция при липса или ниска калциева концентрация
- Тропонин Т – тропомиозин-свързващ белтък - свързва тропониновия комплекс към веригата на тропомиозина.



Интрацелуларно малка част от тропонините (около 6-8% за сТnТ, 2-4% за сТnI) е свободна, разтворена в цитозола. Останалата, преобладаваща част влиза в състава на тънките филаменти. ^{1,4,7,172}

Source: J.B. Halter, J.G. Ouslander, S. Studenski, K.P. High, S. Asthana, M.A. Supiano, C. Ritchie, W.R. Hazzard, N.F. Woolard: Hazzard's Geriatric Medicine and Gerontology, Seventh Edition, www.accessmedicine.com Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

След стимулиране за контракция, в клетката се повишава нивото на калциевите йони, които се свързват с тропонин С. Това променя конформацията на тропомиозина, откриват се свързващите места за актин и се осъществява напречно свързване, което води до съкращение на мускула. След реализирането му спада нивото на калциевите йони. Това стимулира тропонин I, блокиращ дейността на акто-миозиновата АТФ-аза, с което се предотвратява мускулна контракция докато нивото на калциевите йони е ниско.⁴

При изследването структурата на тропонина е установено, че тропонин Т и I имат различия в аминокиселинната си последователност и молекулно тегло в различните видове мускули. Тези различия се кодират от различни гени и се означават като изоформи. Изоформите могат да се диференцират имунологично, което позволява да бъдат определени само кардиалните - това повишава рязко специфичността на тези показатели. Кардиалната изоформа се отличава от другите две по наличието на посттранслационна опашка от 32 АК за Т и 11АК за тропонин I, която липсва при бавната и бърза скелетни форми.^{4,226,12,165,2}

Определянето им се извършва със сандвичев имунохимичен анализ с различна детекция. Едното антитяло е свързано с твърдата фаза - микрочастици, тубички, гнездо, а второто е конюгирано с детектиращия агент – ензим, флуоресциращо вещество, луминофор.

За определянето на cTnT се използва една двойка моноклонални антитела срещу 2 епитопа – аминокиселини на позиции 125-131 и на позиции 136-147, локализирани в централната му част.¹⁹⁸

Определянето на cTnI се характеризира с голямо разнообразие в използваните антитела, насочени спрямо различни епитопи, което създава проблеми със стандартизирането и определянето на референтните интервали. Освен това друго затрудняващо обстоятелство е фактът, че

докато тропонин Т се намира предимно в свободна форма, TnI се намира под няколко форми – като комплекс I-C-T, като бинарен комплекс I-C или като свободен TnI, като окислени, редуцирани, фосфорилирани форми.^{198,15,138,19,150}

Тестовите за определяне на тропонин бяха усъвършенствани – в момента е актуална класическата 4-тата генерация тестове за определяне на тропонин Т. От 2009 година се използва и най-новата разработка за неговия анализ – високочувствителният анализ - hs cTnT .

Той е с 5 пъти по-висока аналитична чувствителност в сравнение с класическата четвърта генерация. Това позволява определяне на много по-ниски нива с оглед откриване на ранно повишаване на нивото на тропонина над 3 ng/l, което с класическия тропонин не е възможно. Дори и повишавания на нивата, които не попадат в стойностите, дефинирани от 99 перцентил, са от значение тъй като те са важни за определяне на риска при тези пациенти – те са с повишен риск от настъпване на ОКС и нежелан изход.^{15,13,16,156,106,129,127,45,118,62}

Горната референтна граница при здрави лица за cTnT(99-ия перцентил) при изследване с класическия метод е 10 ng/l, докато за високочувствителния метод (hs cTnT) - 14 ng/l. Тъй като тези стойности са изключително ниски, за да се избегнат фалшиво положителни резултати поради сравнително високата неточност, се препоръчва определянето на стойността на 99-ия перцентил да бъде измервано при коефициент на вариация 10% според публикуваните препоръки на ESC/ACC през юли 2004г. Според тези препоръки между тази горна референтна граница и 30 ng/l (което е стойността, определена с 10% CV) се намира т.нар. сива зона и въз основа на опита на много проучвания е приета като разграничителна стойност за клинично положителен резултат (cut- off) 40 ng/l при

класическата 4 генерация и 27 ng/l за hs cTnT(за него стойността определена с 10% CV е 13 ng/l).

При cTnI референтните граници варират при различните производители заради проблемите със стандартизирането - използване на антитела срещу различни епитопи:

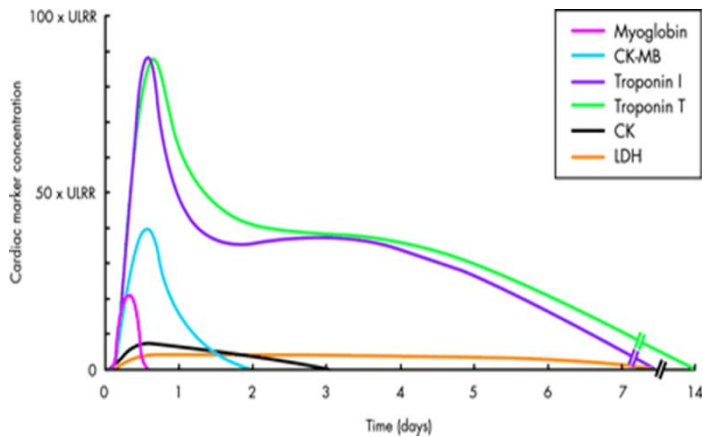
Система	hs cTn	LoD (ng/l)	99перцентил (ng/l)	10% CV (ng/l)	Маркиращи антитела	Детектиращи антитела
Abbott Architect	cTn I	<10	28	32	87-94;24-40	41-49
Beckman Coulter Access Accu	cTn I	10	40	60	41-49	24-40
BioMerieux Vidas Ultra	cTn I	10	10	0.11	41-49;22-29	87-91
Siemens Centaur Ultra	cTn I	6	40	30	41-49;87-91	27-40
Siemens Dimension RxL	cTn I	40	70	140	27-32	41-56
Roche Elecsys 2010/E170	cTn T	10	<10	30	125-131	136-147
Abbott AxSYM	cTn I	20	40	16	87-91;41-49	24-40

Таблица1.Разлики в характеристиките на методите за определяне на TnI⁷⁷

Освен класическите тестове има създадени и т.нар.бързи тестове (point of care) при леглото на болния, които са на имуноензимен и имунохроматографски принцип.

Изследването на тропонини при болни с ОКС е индикация клас I ниво на доказателственост А. Те са сравнително ранен маркер за миокардно увреждане – започват да се покачват след 4-6 час след началото

на гръдната болка, достигат максимум между 18-24 час и се задържат повишени около 4-7 (за Тп I) и 10-14 дни (за ТпТ). Степента на повишение се определя от размера, локализацията на некрозата и кръвния поток.
12,224,98,14,163,43,150



Фигура 2. Криви на динамиката на маркерите за некроза

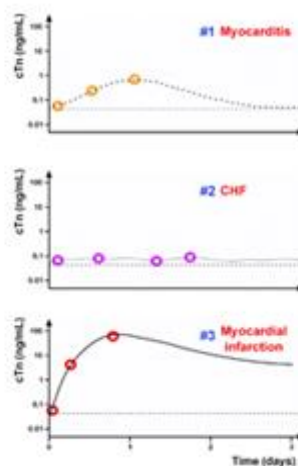
Тропонините имат висока диагностична чувствителност и специфичност по отношение диагностиката на миокарден инфаркт. Въпреки това са възможни и други причини, водещи до покачване на стойностите им:

- Приложение на симпатикомиметици – кокаин, катехоламини
- Белодробен тромбемболизъм, тежка белодробна хипертония
- Коронарен васкулит
- Персистираща тахикардия, брадикардия или сърдечен блок
- Екстремни упражнения за издръжливост
- Миокардит, бактериален ендокардит, сепсис
- Хипотиреоз
- Сърдечна травма – вкл. контузия, дефибрилация, сърдечна хирургия
- Метаболитни токсични причини – бъбречна недостатъчност, септичен шок

- Хипертрофична кардиомиопатия със левокамерна хипертрофия
- Остра неврологично заболяване, вкл. субарахноидален кръвоизлив, инсулт
- Застойна сърдечна недостатъчност - остра и хронична
- Аортна дисекация
- Рабдомиолиза
- Изгаряния, особено ако засягат > 25 на сто от повърхността на тялото
- Инфилтративни заболявания – амилоидоза, хемохроматоза, саркоидоза, склеродермия
- Лекарствена токсичност или токсини (т.е., адриамицин, 5-fluorouracil, херцептин, змийска отрова)

В тези случаи обаче кинетиката на тропонина е различна - това се вижда най-добре при проследяване на нивата му под формата на крива :

Troponin kinetics in the index cases.



Vinay S. Mahajan, and Petr Jarolim. *Circulation*. 2011;124:2350-2354



Copyright © American Heart Association, Inc. All rights reserved.

За да се подобри диагностичната надеждност се препоръчва изследването да не е еднократно, а серийно. Вземане на проби при постъпването и след това в един по-късен момент във времето, позволява изчисляване на промяната между две проби, известна като стойност

"делта". Ако тя е малка, се счита за продукт на аналитична или биологична вариация, докато по-големите промени отразяват продължаващото изтичане на тропонин от увредените клетки.

Доскоро като подходящ интервал за вземането на втората проба бе посочван 3-ия час от постъпването. С въвеждането на високочувствителните тропонини има възможност времето за получаване на втората стойност да бъде съкратено значително – на 1 час. Това е 1-часовия алгоритъм за потвърждаване или изключване на МИ (1-hour algorithm to rule-in and rule-out AMI) при пациенти без елевация на ST-сегмента, при които биохимичните маркери са решаващи за оформянето на диагнозата. Базисни тропонинови нива < 5 ng/l или между 5 и 12 ng/l, но с Δ стойност на 1 час < 3 ng/l изключват с висока вероятност диагнозата МИ. Обратно – базови нива > 52 ng/l или Δ стойност на 1 час > 5 ng/l потвърждават диагнозата.

Освен като диагностичен маркер тропонините служат и за оценка на реперфузионната терапия – при успех след тромболиза има покачване над 200 ng/l за час или над 7 пъти за първите 90 минути след тромболизата. Не на последно място това е най-често използвания показател за определяне размера на инфаркта при пациенти с ОКС със елевация. Смята се, че единичното измерване на нивото му на 72-96-ия час достоверно отразява размера на некротичната зона.^{12,224,98,14,163,43,19} Тази зависимост е потвърдена чрез сцинтиграфско определяне (SPECT) и чрез използване на контрастен ядрено-магнитен резонанс.¹⁶⁵

Тропонинът като важен фактор, отразяващ наличието на миокардна некроза, стратифицира и риска от смърт и повторен инфаркт като в това отношение ролята му е детайлно проучена. Повишеният тропонин (независимо дали е TnI или TnT) определя както висок ранен така и висок късен риск от смърт и нежелани големи сърдечни събития като съществува положителна корелация между нивата на тропонина и смъртността.^{118,139,231}

Тропонинът винаги трябва да се разглежда в контекста на клиничната картина и не е самостоятелен диагностичен и прогностичен маркер. Комбинацията от тропонин и ЕКГ е най-добрата комбинация от маркери на риска, достъпна още в първите 6 часа.
80,150,77,16,156,106,129,127,148,99,155,140,208,44,139,160,62

Високият риск, обусловен от повишен тропонин, може да бъде намален чрез агресивно антиагрегантно лечение с GPIIb/IIIa блокери, нискомолекулни хепарини и ранна инвазивна терапия.

Очевидно е, че стратификацията на риска ще има водещо значение при определяне на стратегията и терапията на болните с ОКС като данните от всички големи проведени проспективни проучвания - TIMI IIIb, GUSTO IIa, GUSTO IV ACS и FRISC показват пряка връзка между нивото на TnI или TnT и процентът на смъртност и нежелани сърдечни инциденти.
13,164,18,12,150,61,231,160,62

Данните показват, че при пациенти с висока вероятност за ОКС повишението на тропонина над долната граница на детекция, но под граничната (cut-off) стойност, определена от ESC/ACC, също е асоциирано с повишен риск от усложнения. В проучването TACTICS-TIMI18 пациентите с изходно ниво на TnI над 99 перцентил (10 ng/L), но под диагностичната стойност на ESC/ACC (40 ng/L) са с трикратно по-висок риск от настъпване на смърт или МИ.¹⁴⁰

Друго подобно проучване е докладвано от M.C. Kontos и сътр. То е обхваща 4123 пациенти с възможен ОКС без елевация на ST сегмента като пациентите са разпределени в 4 групи според пиковите нива на TnI – негативни, с ниско ниво, с умерено повишено ниво и високо ниво. При проследяване на 6-месечната преживяемост при категориите с ниско, умерено и високо ниво риска от настъпване на смърт е съответно 2,2; 3,0 и 7%, а от миокарден инфаркт – съответно 1,1; 15 и 72%.⁹⁶

Изоензим MB на креатинкиназата (СК-МВ)

Той също е част от маркерите за некроза и значението му е добре познато и проучено. При пациенти с ОКС има характерна динамика - повишава се след 4-6-ия час, достига максимум на 12-24-ия час и се нормализира след 24-48 часа.^{226,137,82}

След налагането на сърдечния тропонин като златен стандарт за миокардна некроза неговото определяне придоби малко по-различно диагностично значение – главно при съмнение за реинфаркт - тропонините показват по-дълго време повишени нива и не са подходящи, докато СК-МВ се нормализира бързо и при повторен инцидент показва отново покачващи се стойности.^{15,76,9,14,43,16}

Определянето му се извършва със сандвичев имунохимичен анализ (определяне на маса в тегловни единици) с различна детекция – най-често ECLIA или CLIA.⁸

Референтни граници:

При изследване на здрави лица средните докладвани стойности са били под 1 ng/ml. При изследване на пациенти със сърдечни заболявания, но без инфаркт на миокарда средната докладвана стойност е около 1,5 ng/ml, а тези с миокарден инфаркт стойността е достигала до 145 ng/ml при средна стойност 25 ng/ml.

Смята се, че стойности $> 5,0$ ng/ml са суспектни за инфаркт.

Определянето на активност не се препоръчва поради това, че имуноинхибиционния метод не е достатъчно чувствителен да измери ниските концентрации на СК-МВ. Резултатът сериозно се повлиява от

наличието на макро-креатинкиназа и при повишени нива на СК-ВВ, който нормално отсъства от серума.^{19,77,16,156,204}

Друг недостатък на СК –МВ е фактът, че обичайно дори здравите лица имат измерими нива на този ензим в кръвта, дължащи се на мускулно-скелетния метаболизъм. Затова за диагностични цели освобождаването на СК-МВ трябва значително да надвишава базалните му нива (над 5 пъти), което понижава неговата диагностична чувствителност в сравнение с тропонините, чието базално ниво на практика е нула.^{204,45,118,139}

За по-висока кардиоспецифичност се използва изчисляване на СК-МВ индекс по формулата :

$$\text{СК-МВ индекс} = \frac{\text{СК-МВ}}{\text{Обща СК}} \times 100\%$$

СК-МВ индекс > 25%, обичайно се асоциира с миокардно увреждане.
^{16,156,204}

Миоглобин

Нискомолекулен (м.м. 17800 д.) кислород - свързващ хем-протеин в скелетната мускулатура и миокард. Функцията му е транспорт на кислород интрацелуларно. Миоглобинът е локализиран в цитоплазмата - поради тази локализация и ниското си молекулно тегло излиза лесно и рано при клетъчно увреждане. Освобождава се само при некроза. Има много кратък полуживот – до 20 мин. - нивото му бързо се променя.^{226,137,172,15,30}

При ОМИ започва да се покачва на 1-2 час, достига максимум на 6-9 час и се връща към нормата след 24-36 часа.

Лесно се определя – има имунотурбидиметричен и имунонефелометричен анализ, който е адаптиран към почти всички по-масово застъпени в клиничните лаборатории аналитични платформи..^{15, 98,43}

Референтен интервал :

серум, плазма - $< 70 \mu\text{g} / \text{l}$;урина - $< 17 \mu\text{g} / \text{g}$ креатинин

При инфаркт стойностите надминават $600 - 1000 \mu\text{g} / \text{l}$. Използва се и като маркер за преценка ефективността от тромболитична терапия – при успешна реперфузия се наблюдава бърз и стръмен пик – “ефект на отмиване” – покачването е над $150 \mu\text{g} / \text{l}$ за час или 4-кратно повишение за 90 минути след тромболизата. При тези пациенти нормализирането е след 10-20 часа, при липса на тромболиза – след 24-36 часа.

Проблем при него е ниската диагностична специфичност – аминокиселинните последователности в скелетни мускули и миокард са идентични като съдържанието му в скелетните мускули е високо – съответно се повишава при миокардно, но и при мускулно увреждане. Освен това се елиминира през бъбреците и при бъбречно увреждане нивото му се покачва.^{226,77,116}

С цел повишаване на диагностичната специфичност се препоръчва успоредно определяне на карбоанхидраза III (СА III) - един нискомолекулен белтък с подобно поведение, локализиран изцяло в скелетните мускули. Следи се съотношението му с миоглобина. При мускулни увреди се освобождава в съотношение 3:1 към миоглобина. И серумното ниво на миоглобина и това на СА III са повишени при пациенти с невромускулни увреди и при тежки физически натоварвания на здрави хора. При пациенти с МИ нивото на миоглобина е сигнификантно повишено без съпътстващо повишение на нивото на СА III. Има създаден имунофлуориметричен анализ за определянето на СА III.^{227,100,174}

Гликогенфосфоорилаза

Ензим, димерен протеин, катализиращ разграждането на гликогена в саркоплазматичния ретикулум и подаването на субстрат за гликолизата.

Има три изоензима- ВВ – в мозък и миокард; ММ – в скелетна мускулатура и LL – в черен дроб.

Изследва се с със “сандвичев” имуноанализ в серум или плазма, има и бързи тестове.

Референтен интервал - $< 7 \mu\text{g/l}$

Нивата му се повишават рано - на 2-3 час, като се нормализира след 2-3 дни. Този маркер се използва обаче основно в кардиохирургията поради един сериозен недостатък - прекалено чувствителен е, реагира на исхемия и се позитивира при стабилна стенокардия.^{225,137,82}

Изоформи на СК-МВ

Това са варианти на СК-МВ, които се получават *in vivo* чрез ензимна хидролиза под действието на ензима карбоксипептидаза. Този ензим отцепва С-терминална аминокиселина – лизин от субединица М и превръща тъканната изоформа СК-МВ₂ в серумна СК-МВ₁ като този промяна води и до промяна в електричния заряд.

Нормално съотношението между двете изоформи е ~ 1 . При ОМИ поради освобождаването на големи количества тъканна форма съотношението се повишава над 1.5 - 2. Това се установява рано - 1-1,5 часа след началото на гръдната болка и предшества повишението на СК-МВ с около 4 часа.^{226,207}

Определянето на изоформите става чрез високоволтова електрофореза, но има и бързи анализи (РОСТ).

Белтък, свързващ мастни киселини (FABP)

Нискомолекулен цитоплазматичен белтък, който играе важна роля в липидния метаболизъм - специфично и обратимо свързва дълговерижни мастните киселини и осигурява цитозолния им транспорт. Освен в

миокарда се намира и в черния дроб, бъбреци, скелетни мускули, мозък и черва. Миокардът и скелетните мускули съдържат една и съща изоформа (H-FABP), но той има много по-добра органна специфичност от миоглобина тъй като концентрацията му в скелетните мускули е ниска – едва 10-30% от съдържанието в миокарда.^{226,137,82,2,3}

Покачва се рано след миокардна увреда – измерими концентрации се установяват 2-3 час подобно на миоглобина, нормализира се след 18 – 30 часа при лица с нормална бъбречна функция. Филтрира се в урината и може да се определя в нея. Определя се в серум и плазма. Има създадени и бързи тестове.^{3,5,32,154,101,34,23}

Референтни стойности - $< 5 \mu\text{g} / \text{l}$ в серум

Недостатък на този показател по отношение на неговото определяне е факта, че все още не е автоматизиран за най-често използваните апарати. Все още има сравнително малко на брой проучвания и засега е един от обещаващите кандидат – маркери.^{193,54}

Според едно от тях, проведено от O'Donoghue M, de Lemos JA, Morrow DA и сътр., нивата на H-FABP са силен предиктор по отношение на настъпването на големи сърдечни събития (смърт, миокарден инфаркт и сърдечна недостатъчност), което те доказват при проследяване на пациенти с прекаран остър коронарен синдром за период от 10 месеца.¹⁵⁴ След разделянето на проследените пациенти в квартали спрямо измерените нива е установено, че пациентите от най-високия квартил са със смъртност 6,59 пъти по-висока, отколкото на пациентите в най-ниския квартил. При добавянето на тропонин е изолирана група със отрицателни стойности за тропонин, но с ниво на H-FABP $> 5,8 \mu\text{g}/\text{l}$, която е с 5 пъти увеличен риск от смърт. Ако тропонинът е с позитивна стойност и H-FABP $> 5,8 \mu\text{g}/\text{l}$ риска се покачва 8 пъти.¹⁵⁴

Маркери за хемодинамично обременяване и стрес

Натрий-уретични пептиди

Група пептиди, илюстриращи ендокринната функция на сърцето. Антагонисти на ренин–ангиотензин–алдостероновата система - имат вазодилатиращ ефект, усилват натрийурезата и подтискат секрецията на алдостерон като участват пряко в регулацията на течностите, натриевия баланс и кръвното налягане, инхибират съдовото и сърдечното ремоделиране (цитопротективен ефект), на ниво нервна система подтискат симпатиковата активност, инхибират жаждата и апетитът за прием на сол.



Фигура 3.Ефекти и връзка между натрийуретични пептиди и системата РАА.

Основните представители са :

ANP – цикличен пептид, изграден от 28 аминокиселини (АК). Синтезира се от предсърдните кардиомиоцитите в отговор на разтягане на сърдечната стена и се складира под формата на гранули, от където се освобождава при стимул пулсово.

BNP – цикличен пептид, съставен от 32 аминокиселинни остатъка. Отделя се кардиомиоцитите на сърдечните предсърдия и на сърдечните камери. За разлика от ANP почти не се складира, а се синтезира *de novo*, като основния стимул отново е разтягането на сърдечната стена.

CNP – цикличен пептид, съставен от 22 аминокиселинни остатъка. Продуцира се от съдовите ендотелни клетки и сърдечните фибробласти. Действа предимно като автокринен и паракринен фактор, участващ в регулацията на съдовия тонус и клетъчния растеж. Неговото определяне засега е с неясно клинично значение.^{225,137,82,15,76,34,23}

Основен обект на интерес е BNP. Той се синтезира като голяма молекула - pro-BNP, изграден от 134 АК, но много бързо се разцепва на хидрофобен сигнален пептид от 26 АК и pro-BNP със 108 АК.

В неговата структура има оформени 2 фрагмента – N-терминален фрагмент (1-76) и C-терминален фрагмент (77-108) като този участък съдържа пръстеновидна структура, формирана с помощта на дисулфидни връзки между цистеинови остатъци на 86 и 102 позиция. Тя е абсолютно необходима за свързване с рецепторите и осъществяване на биологична активност. Молекулата претърпява и посттранслационни промени, включващи гликозилиране в средния регион (36-71), богат на серинови и треонинови радикали.

Pro-BNP се разделя ензимно под влияние на протеолитичния ензим фурин на още 2 части – активен хормон BNP, представляващ C-терминалния край на pro-BNP (77-108 АК) и N-терминалния край (1-76 АК) - т.нар. NT-pro-BNP.

Полуживотът на BNP е около 20-25 минути, а на NT-pro-BNP – до 90 минути. В циркулация натрийуретичните пептиди не се свързват с

плазмени протеини и са изцяло свободна фракция. Известни са три рецептора, чрез които реализират ефектите си – тип А и В, чрез които се реализират почти всичките им биологични ефекти – отваряне на йонни каналчета, активиране и инхибиране на протеинкинази и фосфодиестерази; и тип С, който е отговорен основно за техния клирънс.
226,137,82,15,76,48,49,92,126,123,2,3

Клирънса на тези пептиди се извършва по три механизма :

- ендоцитоза – използват се рецептори – лиганди на повърхността на прицелната клетка, които вкарват пептидите чрез ендоцитоза, последвана от сливане с лизозомите и разграждане.
- ензимно разграждане в кръвта от неутрални ендопептидази (DPP-4 и неприлизин – има афинитет към активният хормон BNP и участва в неговото разграждане, но няма отношение към NT-pro-BNP !)
- бъбречна филтрация – около 55-65% се елиминират през бъбреците; освен това 20-25% се елиминират през черния дроб, а 10-15% - през мускулно-скелетната тъкан.

Биологична вариация – и двата показателя показват ясна възрастова и полова зависимост – след 60 годишна възраст и то в женски пол има отчетливо по-високи нива. Влияние оказва и състоянието на бъбречната функция – при пациенти с бъбречни нарушения нивата са по-високи. Затлъстяването е фактор, който понижава стойностите за двата пептида като се смята, че адипоцитите разполагат с повече С-рецептори, влияещи на очистването им. И двата показателя показват много висока биологична вариация - до 50 % и не се препоръчва използването им като скринингови показатели.^{123,126}

Изследванията на натрийуретичните пептиди и интересите на търговските фирми, разработващи китове за изследването им, са насочени

и към активните им части – BNP, и към неактивните им фрагменти - NT-pro-BNP поради тяхната стабилност и по-дълъг полуживот.

Методът за определяне на NT-pro-BNP е сандвичев имунохимичен анализ най-често с електрохемилюминисцентен или луминисцентен завършек

Референтни граници са възрастово и полово зависими:

< 75 год. - < 125 pg /mL или 14.75 pmol/L

>75год. - < 450 pg /mL или 53.1 pmol/L

(фактори за преизчисляване: pmol/L x 8.457 = pg/mL; pg/mL x 0.118 = pmol/L)

Клинично-значима (cut-off) стойност:

Множество проучвания подкрепят определения праг за клинично значим резултат за NT-pro BNP от 400 pg/mL.

Стойности на NT-pro BNP < 450 pg/mL при млади пациенти и < 900 pg/mL при пациенти над 75 години изключват с голяма сигурност сърдечна дисфункция при пациенти със симптоми, които могат да се дължат на сърдечна недостатъчност - напр. диспнея.

За определянето на BNP също най-често се използва сандвичев тип имунохимичен анализ с директна хемилуминисценция като при него има изискване към материала за изследване – подходящ материал е единствено ЕДТА плазма.

Референтните граници също са възрастово и полово зависими.

< 45г. – 11.9 (2 - 33.3 pg/mL)

45-54г. – 15.6 (2 – 46.7 pg/mL)

55-64г. – 19.5 (2 – 53.2 pg/mL)

65-74г. – 28.3 (2 – 72.3 pg/mL)

> 75г. – 60.3 (2 - 176 pg/mL)

Клинично-значима (cut-off) стойност: за доказване на сърдечно увреждане използваната стойност е 100 pg/mL, а за стратифициране и определяне на риска от смърт и нежелани големи сърдечни събития при пациенти с ОКС се предпочита cut-off-стойност 80 pg/mL.

Повишени нива на тези пептиди са установени при пациенти с хронични сърдечни увреждания – главно вродена дилатативна кардиомиопатия, клапни заболявания, исхемична болест на сърцето. Счита се, че те са главен показател, отразяващ наличието на левокамерна дисфункция и се използват за мониторинг и за оценка на успеха от лечението при тези пациенти. ^{46,79,186,123, 83,51}

При изследване на пациенти със сърдечни заболявания са докладвани измерени средни нива 505 pg/mL като получените резултати са били в диапазона от 40 до 1873 pg/mL.

Установена е добра корелация между стойностите на BNP и класифицирането на пациентите със сърдечна недостатъчност по класификацията на Сърдечната Асоциация в Ню Йорк [NYHA] в клас I-IV. NT-pro BNP и BNP нивата се повишават двукратно с нарастване номерата на класовете и отразяват сериозността на сърдечното нарушение. ⁴⁸

Тестовете BNP и NT-proBNP са предназначени също за стратификация на риска при пациенти с остър сърдечен синдром - публикувани са резултати от няколко ретроспективни проучвания по отношение нивата на двата показателя и стратифицирането на риска.

В проучването ENTIRE TIMI 23 са проследявани нивата на BNP при 438 пациенти с ОКС в продължение на 18 месеца. Пациентите са разпределени в квартали като пациентите от 4-ти квартал с повишени нива на натрийуретични пептиди (>32 pg/ml) са с 11 пъти по-висок риск от

смърт за 30-дневния период – 17,4% при пациентите с повишени стойности срещу 1,8% при пациенти с ниски нива – изчисленият рисков коефициент е 11,5.¹²⁸

Базисните нива на BNP при пациентите със смъртен изход до 30-ия ден са били средно 89 pg/mL срещу средна стойност от 15 pg/mL при преживялите 30 дневния период¹²⁸

Omland и сътр., докладват резултати от проучването TIMI 11B, в което са включени 681 пациенти, на които е определяно ниво на NT-proBNP и са проследени за смъртност в рамките на 6 седмици. При пациентите, починали през този период са установени повишени нива - 299 pmol/L средно срещу 138 pmol/L при преживелите този период.^{157,158}

De Lemos и сътр., докладват резултати от проучването OPUS-TIMI 16, където са проследени 1698 пациенти с ОКС и изследвани нива на BNP. При 10- месечното им проследяване е установен рисков коефициент 12.5 за смъртност в най-високия квантил с патологични стойности спрямо по-ниските квантили⁴⁸

Morrow и сътр. докладват данни от проучването TACTICS-TIMI18, при което са проследени 1676 пациенти с определяне на BNP в рамките на 6 месеца. Повишеният риск от смърт на 7 ден при пациентите с високи нива е 2.5% срещу 0.7% при тези с ниски стойности. На 6-ият месец съответните коефициенти са 8.4% срещу 1.8% при пациентите с нива под BNP 80 pg/ml¹⁴².

В рамките на проучване, включващо 755 пациенти, на които е определян NT-proBNP, Jernberg и сътр. са проследили смъртността за период от 4 години и докладват рисков коефициент за смърт 26.6 при пациентите с най-високи стойности спрямо тези от най-ниския квантил.^{88,87}

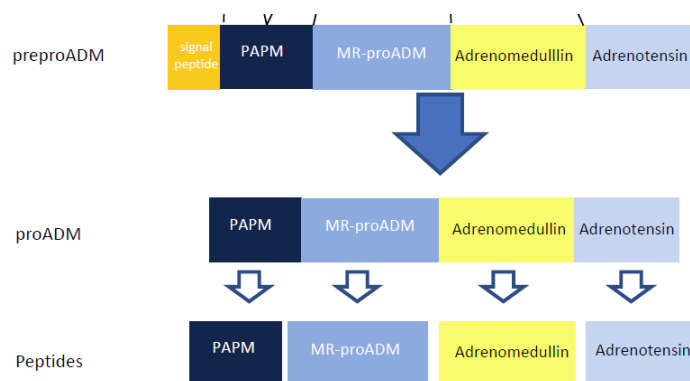
Подобни резултати са докладвани и от другите големи проучвания - FRISC II, GUSTO IV, PRISM и др.^{119,191,92, 128,46,79,70,83}

През 2015 година обаче бяха изнесени интересни данни от проучването PARADIGM HF - голямо, многоцентрово проучване, обхващащо над 8000 пациенти, изследващо ефектите на нов клас антихипертензивни средства – ангиотензин-рецепторните неприлизинови инхибитори. Прилагането на този тип медикаменти промени до голяма степен ролята на натриуретичните пептиди като сърдечни маркери – според данните от него BNP е подходящ главно за диагностика, но не за мониторинг и стратификация (нивата му се променят неспецифично заради прилагането на неприлизиновите инхибитори) докато NT-proBNP е подходящ за диагностика, мониторинг и стратификация на риска при пациенти със сърдечна недостатъчност – той не се повлиява от неприлизин и прилагането на инхибиторите му.^{26,27}

Други, сравнително нови показатели от тази група са адреномедулин и копептин.

Адреномедулин

Нов, вазоактивен пептид, изолиран през 1993г. Секретира се в култури от клетки на надбъбречната медула, гломерулни мезангиални клетки, сърдечни миоцити и фибробласти и съдови ендотелни и гладкомускулни клетки, но освен това и в клетките на храносмилателната, респираторната и ендокринна системи.^{62,81} Синтезира се като голяма прекурсорна молекула – препроадреномедулин, състоящ се от 185 АК. Той се разцепва на сигнален пептид и проадреномедулин, съдържащ 3 фрагмента – PAMP(N-терминален пептид), MR-proADM и активен адреномедулин.^{72,2,210}



Фигура 4. Препроадреномедулин ²¹⁰

Биологично активната част (Адреномедулин) е трудно измерима в плазма поради свързването си с фактор Н на комплемента и бързо елиминиране. Най-стабилен е средният сегмент (MR-proADM), който се секретира в еквимоларни количества с активната фракция.

Секрецията му се стимулира от цитокини като TNF- α , - β , IL-1 α , хормони – стероиди, тироксин, катехоламини, брадикинин. ^{153,179,40,34}

Адреномедулинът има мощен вазодилатативен ефект като понижава артериалното налягане чрез понижаване на съдовата резистентност. Коронарната вазодилатация в отговор на адреномедулин преминава чрез свързването му със специфични рецептори в ендотелните клетки и освобождаване на азотен оксид и/или вазоактивни простагландини.

Има и изразен антипролиферативен ефект върху съдовите гладкомускулни клетки, предотвратява хипертрофията на кардиомиоцитите и пролиферацията на сърдечни фибробласти. ^{90,145,135,2} На ниво надбъбречни жлези подтиска секрецията на алдостерон, а на ниво панкреас – инсулиновата секреция. ^{72,55,71}

За определянето му има разработен метод – сандвичев имуноанализ с двойка антитела с хемилуминисцентна детекция, като второто антитяло е маркирано с детектиращият агент – метил-акридинов естер. ¹³⁵

При пациенти с остри коронарни синдроми плазменото ниво на MR-proADM е изследвано като прогностичен маркер в сравнение с натрийуретичните пептиди в няколко проучвания.

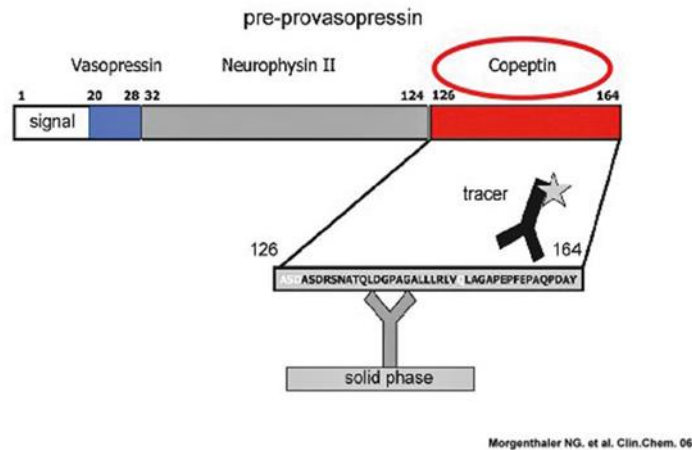
В проучването LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide), плазмените нива на MR-proADM и NT-proBNP са изследвани при 983 пациенти след преживян миокарден инфаркт на 3-5 ден от началото на острата симптоматика и са проследени за период между 1 и 2 години.⁵⁰ Плазмените нива на MR-proADM при пациентите с МИ са сигнификантно повишени, същата тенденция е налице и при починалите и рехоспитализираните пациенти в сравнение с преживелите инцидента. Площта под ROC-кривата за MR-proADM и NT-proBNP поотделно е 0,77 и 0,79, но при съчетаването им се покачва на 0,84.⁵⁰

Второто голямо проучване, докладвано от Dhillon и сътр. обхваща 745 пациенти с МИ без ST-елевация, проследени за период 760 дни.

Нивата на MR-pro-ADM са били сигнификантно повишени при пациентите, при които са наблюдавани неблагоприятни сърдечни събития (MACE). Ниво на MR-proADM >1,11 nmol/l при хоспитализация идентифицира пациентите с най-висок риск за настъпване на смърт и с най-голяма полза от агресивна терапевтична интервенция.²²²

Копептин

Това е нов маркер от тази група, който също набира бързо популярност. Представлява *C-терминалния участък на прекурсорната молекула на вазопресин*. Тази прекурсорна молекула се означава като препровазопресин и се състои от 164 АК. Под действието на ензими от него се отделя сигнален пептид, неврофизин, копептин и активен вазопресин.^{100,93,133,94,2}



Фигура 5. Принцип на определяне на копептин ¹³⁴

Измерването на биологично активната част от молекулата (вазопресин) е възможно технически – има описан метод, но рядко се използва в практиката поради няколко причини.

На първо място трудностите идват от факта, че над 90 % от вазопресиновите молекули са свързани с тромбоцитите в циркулация – това води до отчитането на по-ниски стойности в плазмата, а при съхраняване - до сериозна вариация в нивото на вазопресина.

След секретирането си активният хормон бързо се елиминира – има плазмен полуживот от 25 минути. Освен това е изключително нестабилен, дори и при

-20°C .^{216,155} Поради много ниското си молекулно тегло той може да се определя само с конкурентен имуноанализ, изискващ предварителни дълготраещи екстракционни процедури.

За разлика от вазопресина копептинът е изключително *стабилен* – доказаната стабилност за серум и ЕДТА-, хепаринова- и цитратна плазма е 7 дни на стайна температура и 14 дни в хладилник.¹³³ Не се изискват екстракционни процедури, което прави анализа по-бърз и лесен. Отговаря

на промените в осмолалитета с промяна в кинетиката подобно на вазопресина и двата маркера като цяло показват добра корелация.

Методът за определянето му е *сандвичев имуноанализ с хемилуминисцентна детекция*.

Определените референтни стойности за копептин са получени при изследването на 359 здрави доброволци - средната получена стойност е 4.2 pmol/L (1.7 pmol/L - 11.25 pmol/L).¹³⁴

Нежелани влияния върху нивата на копептин оказват някои медикаменти (стероиди). Освен това нивата на копептин са зависими от бъбречната функция и при пациенти с бъбречни увреждания също се наблюдават неспецифично повишени нива.¹⁷⁷

Правени са няколко проучвания по отношение ролята на копептин в диагностиката на ОКС.^{93,97,124,134}

При проучването LAMP Khan¹⁰⁰ и сътр. проследяват 980 пациенти с прекаран ОМИ за период от 342 дни като е изследвано прогностичното значение на копептин самостоятелно и в комбинация с NT-proBNP. Починалите пациенти са показали значително по-високи нива в сравнение с преживелите инцидента като е отчетена разлика при пациентите с различни форми на ОКС - пациентите със STEMI са били с по-високи нива спрямо тези с NSTEMI . При използването на логистичен регресионен анализ копептин и NT-proBNP са независими сигнификантни предиктори за настъпване на смърт или сърдечно увреждане в рамките на 60 дни като площта под ROC-кривата за двата показателя поотделно е сходна - 0,75 и 0,76, но при съчетаването им се покачва на 0,84. Използването на мултимаркерния подход е позволило изолирането на групата пациенти с най-висок риск от неблагоприятен изход – това са

пациентите с нива на копептин над 7 pmol/L, при които стойността на NT-proBNP е над 900 pg/ml.¹⁰⁰

Подобни резултати са изнесени и от Adriaan A. Voors и сътр.²¹⁶, получени от проследяването на 224 пациенти – част от проучването OPTIMAAL, проведено в Норвегия.

Tobias Reichlin и сътр.¹⁷⁷ изследват потенциалната роля на копептин при 487 пациенти, преминаващи през интензивно отделение със симптоми, съмнителни за ОМИ. Получените резултати показват, че нивата на копептин са сигнификантно повишени при пациентите с ОКС, сравнени с пациентите с други диагнози. Копептинът е сигнификантно висок при пациенти с ОКС, дошли рано след появата на симптомите в спешното отделение, при още негативни нива на тропонин Т и при тези пациенти има реална полза от изследването му. Комбинацията от тропонин и копептин формира резултат с много добра аналитична надеждност по отношение диагностиката на ОКС - AUC 0.97 като алгоритъмът, базиран на комбинацията от тропонин и копептин изключва ОКС при постъпването със чувствителност 98.8% и специфичност 99.7%.

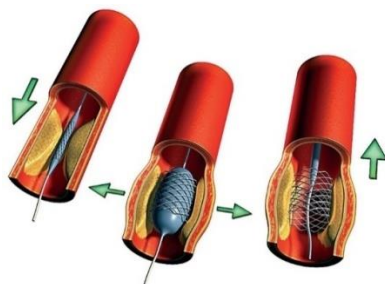
Друг важен въпрос по отношение на коронарната патология е терапевтичното поведение. На практика то представлява сплав от два, взаимно допълващи се подхода – *медикаментозен* (консервативен) и *инвазивен* (интервенционално лечение), представен от перкутанна коронарна интервенция (PCI) или хирургично лечение – аорто-коронарен байпас(CABG).

Перкутанна коронарна интервенция е инвазивен неоперативен метод за реваскуларизация - чрез него се възстановява проходимостта и кръвотока на засегнатия участък от коронарните артерии. Представен е от няколко метода – предимно се прилага РТСА(балонна ангиопластика) с

или без поставяне на стент, но може да включва и други процедури - коронарна атеректомия (ротационна, лазерна, орбитална и дирекционна), брахитерапия и др.

При РТСА катетър с поставен в него балон се въвежда перкутанно - по артериален път през a.femoralis или a.radialis - до мястото на стеснение на коронарната артерия. Балончето на върха на катетъра се раздува със специална инфлационна спринцовка, дилатира се артериалната стена, подобрява се кръвотока в засегнатата артерия, след което балонът отново се свива и изважда. Най-често дилатирането се комбинира с поставяне на т.нар. стент от вътрешната стена на сърдечната артерия, на мястото където тя е стеснена или запушена, като се възстановява кръвотока в този участък и нормалното кръвоснабдяване на сърдечния мускул.¹⁶²

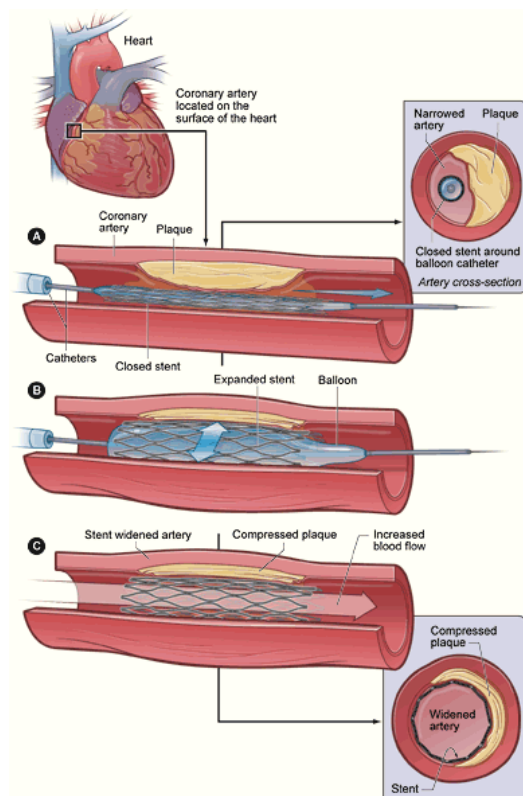
Коронарният стент представлява съдова протеза, изградена от преплетени по специален начин тънки нишки от специални метални сплави (тантал, кобалт, хром, платина, магнезий...) или биополимери. Той е фабрично монтиран в свито състояние върху малък балон, чрез който също по артериален път се вкарва на мястото на стеснението или запушването на сърдечната артерия. Чрез раздуването на балона стентът се имплантира върху съдовата стена на мястото на стенозата, след което балонът се свива и извежда от тялото на пациента. Стентът остава, поддържайки отворена артерията.



Фиг.6 Коронарен стент.

Сравнено с хирургичните интервенции (байпас-хирургията) балонната ангиопластика и имплантирането на съдови стентове е по-малко инвазивна

процедура, с по-малък риск и икономически по-изгодна. След кратък период може да се възстанови нормалната физическа активност. Стентовете могат да бъдат поставяни не само в коронарните съдове на сърцето, но също така и в периферни артерии – на долните крайници, на каротидните артерии на шията. Целта е същата – да подържат в отворено, нестеснено състояние съответния съд и да се облекчи състоянието на болния.



Фигура 7. Ефектът от поставянето на стент

Какви са недостатъците?

Поставянето на стент може да доведе до микротравма на съда, нарушаване целостта на ендотела, разкъсване на подлежащата плака и експозиция на нейното ядро. Това, чрез включването на редица сложни механизми би могло да предизвика вазоспазъм, активация на тромбоцитите и да повиши вероятността от образуване на тромб на това

място, както и дистална микроемболизация от съдържимото на плаката – възможно е развитието на т.нар. остро перипроцедурно увреждане, което може да достигне до степен на некроза.

Друг възможен проблем е реакцията на организма към това чуждо тяло - имплантирания в съда стент предизвиква миграция на гладкомускулни клетки от медиата към интимата на съда (неоинтимална хиперплазия). Процесът е бавен – развива се за около 13 месеца. Последващата пролиферация води до рестеноза – високостепенно стеснение или дори запушване на лекувания съд.^{63,74,40} Рестенози се наблюдават при около 20 % от болните с имплантирани първо поколение стентове (т.нар. „bare metal stents”- BMS) .

Това доведе до разработването на т.нар. „освобождаващи медикамент стентове (“drug-eluting stents” – DES), в които чрез различни технологии към основната матрица на обикновен стент е добавен специален полимер-носител на медикаменти - цитостатици (paclitaxel и sirolimus – в първо поколение и zotarolimus /ZES/и everolimus /EES/ във второ поколение). Този медикамент се излъчва бавно след поставянето на стента в съда и намалява значително вероятността от развитие на рестеноза.²⁰³ При медикамент излъчващите стентове рестенозите са в рамките на 6-10 % .

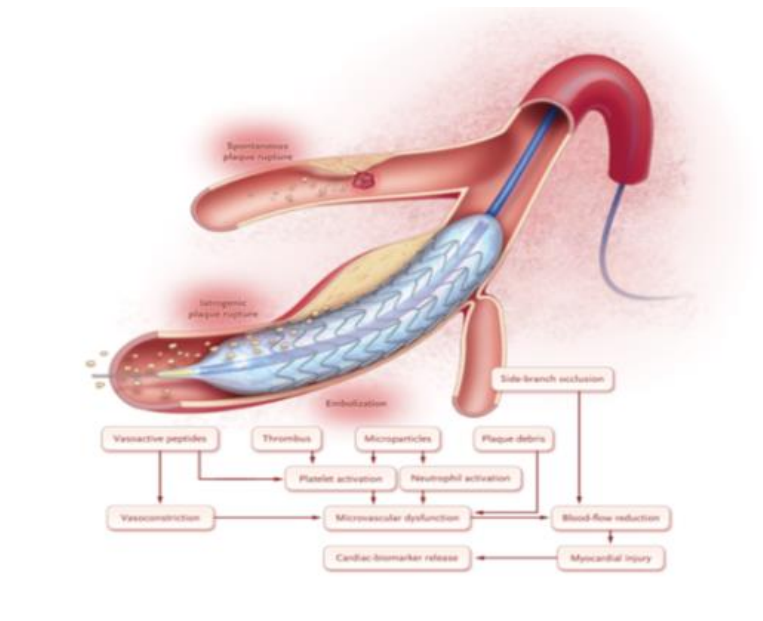
Поради индуцираното (вероятно от полимера-носител на основния медикамент) хронично възпаление, както и поради възможността по-дълго време съдържимото на плаката да е в контакт с кръвния ток (поради забавеното покриване на стента с ендотел) при медикамент-излъчващите стентове се наблюдава по-висока честота на тромбозиране.^{108,203,52} Медикамент–излъчващите стентове от втора генерация, с усъвършенстването на технологиите на покритие, имат значително по-ниска тромбогенност и инфламаторен потенциал, поради което и честотата

на „ин-стент тромбозата“ е значително по-ниска (практически идентична с тази на обикновените метални стентове^{116,148}.

Новото предизвикателство е разработването на стентове, изградени от биополимери, които имат способността след известно време да се разтварят и абсорбират. Наричат ги *биорезорбируеми скелета*, за да се отличават от постоянните импланти, каквито са стентовете. По този начин в кръвоносния съд не остава чуждо тяло, към което организмът да реагира или да доведе до образуване на тромб.¹⁰⁸ До момента данните от проучванията показват клинична еквивалентност на биорезорбируемите скелета с второ поколение медикамент-излъчващи стентове при пациенти със стабилна коронарна болест.⁵² Бъдещето ще покаже дали тези импланти биха могли трайно да ги заместят във всички форми на интервенционално лечение на ИБС.

За сега обаче усилията са насочени към по-реално изглеждащата цел - проучването на неблагоприятните ефекти – перипроцедурните увреди, към изясняване на механизмите на тяхното възникване, съответно към възможните пътища за тяхното предотвратяване и рисковата стратификация на болните, преминали PCI.

След PCI 20% - 50% от пациентите показват повишени нива на маркерите за некроза – сърдечните тропонини, СК-МВ и обща СК.^{221,173,147,146,197,88,56,179,184} Точните патогенетични механизми все още не са напълно изяснени – предполага се развитие на миокардна исхемия и некроза поради продължителна балонна инфлация, преходно остро запушване, дистална емболизация или оклузия на страничен клон^{109,159,63,74,40,209,35,184}.



фигура 8. Патогенетични механизми за перипроцедурна некроза на миокарда

Перипроцедурната некроза след PCI е дефинирана като МИ тип 4a и тип 4b в Универсалната дефиниция на МИ, приета през 2007 година. Според тази дефиниция основание за подобна диагноза са покачването на маркерите за некроза – тропонин и СК-МВ над 3 пъти над горна референтна граница (ГРГ). Повишаването на маркерите за некроза в рамките на 1-3 пъти над ГРГ се смята за белег за перипроцедурно увреждане, но не за миокарден инфаркт. Маркерите се изследват непосредствено след процедурата, на 6-12 и 18-24 час. Дефиницията засяга само пациентите с нормални изходни нива на маркерите за некроза. При пациенти с повишени изходни нива интерпретацията е трудна.^{63,35,172,199,222} Интересен е фактът, че в съображенията първоначално не влизат клинични симптоми и ЕКГ промени – за разлика от диагнозата на класическия спонтанен миокарден инфаркт.

За тип 4b се уточнява единствено, че тромбозата трябва да бъде доказана ангиографски или на аутопсия.

Според доста последващи мултианализи обаче появата на Q –вълна е мощен независим предиктор за вътреболничната и дългосрочната смъртност. Пролонгираните симптоми на исхемия (над 20 минути) с поява на исхемични промени в ЕКГ – елевация на ST-сегмента или нова Q–вълна, съчетани с покачване на маркерите за некроза над 3 пъти над ГРГ или покачване за първите 24-часа с повече от 50 % от изходните нива се приемат като по-адекватни критерии от клиницистите.^{23,174,199,222}

Спорове има и по отношение на степента на повишение на маркерите. Според повечето проведени проучвания като значимо покачване се приемат стойности над 3-5 пъти, според други – над 8 или над 10 пъти над ГРГ.^{10,147,197,220,175,104,174}

Всички тези причини станаха повод за Третата дефиниция, която бе приета от European Society of Cardiology (ESC), American College of Cardiology Foundation (ACCF), American Heart Association (AHA) и World Heart Federation (WHF) през 2012 година.^{199,222,112}

Според тази Трета дефиниция, МИ се дефинира като клетъчна смърт на миокардните клетки в резултат на пролонгирана исхемия. Настъпването на клетъчна смърт е процес, който изисква определен период от време – най-малко 20 минути, като завършването на процеса е в зависимост от наличието на колатерално кръвообращение, продължителност на коронарната оклузия, чувствителност на миокардните клетки на исхемия, нужди от кислород и вещества. Миокардното увреждане се открива чрез покачване на чувствителните и специфични маркери за некроза.^{199,222,112}

Според тази дефиниция се различават няколко типа миокарден инфаркт в зависимост от патогенетичните причини за възникването му:

Тип 1 – спонтанен (класически) МИ – резултат от усложнения на атеросклеротична плака – руптура, улцерация, ерозия, дисекация – с резултат тромбоза на една или повече коронарни артерии, водеща до

намаляване или прекъсване на кръвния поток, снабдяващ съответния миокарден участък или до дистална тромботична емболизация с последваща миоцитна некроза.

Тип 2 – вторичен МИ вследствие на исхемичен дисбаланс - некротата на миокарда настъпва вследствие на причини, водещи до дисбаланс между снабдяването на миокарда с кислород и нуждите му – например при тежка ендотелна дисфункция, коронарен спазъм, директен токсичен ефект на високи циркулиращи нива на катехоламини, тахи-/брадиаритмии, тежка анемия, респираторни увреждания, тежка хипо- или хипертензия със или без лява вентрикуларна сърдечна недостатъчност.

Тип 3 – МИ, водещ до смърт при липса на биомаркери, с които да бъде доказан – когато настъпи смърт със симптоми на МИ, с поява на ЕКГ промени – елевация/депресия на ST-сегмента, поява на исхемична Q-вълна или ляв бедрен блок, но смъртта е настъпила преди да са взети сърдечни биомаркери за некроза или преди да има промяна в техните нива.

Тип 4a – МИ след PCI (перкутанна коронарна интервенция) – дефинира се при покачване на стойностите на сърдечния тропонин след PCI над 5 пъти над 99 перцентил (горна референтна граница) при пациенти с нормални базисни нива или покачване с над 20% от изходните нива в рамките на следващите 48 часа - ако нивата са били извън нормалните, но са стабилизирани или падащи.

В добавка се изисква наличието на клинични симптоми, предполагащи миокардна исхемия; нови ЕКГ промени - елевация/депресия на ST-сегмента, поява на исхемична Q-вълна или ляв бедрен блок ; доказана ангиографски загуба на проходимост на голяма коронарна артерия или страничен клон, персистиращ намален кръвоток, пълна оклузия или емболизация; установяване с помощта на образни техники

(ЯМР и др.) нова загуба на жизнеспособен миокард или нова поява на участък в миокарда с нарушен контрактилитет.

В случаите, когато покачването на сърдечния тропонин е по-малко от 5 пъти над 99 персентил или липсват исхемични, ангиографски или образни промени, се използва термина „миокардна увреда“.

Тип 4b – подтип МИ в резултат на тромбоза след стентирание – МИ се асоциира със тромбоза след поставяне на стент, установена с ангиография или на аутопсия със симптоми на миокардна исхемия или качване/спадане на сърдечните маркери за некроза с поне 1 стойност над 99 персентил. В документа се посочва, че в зависимост от времето на поява на МИ спрямо момента на поставяне на стента, той се определя като “ранен“ (до 30 дни) и “късен“ (31 ден до 1 година).

Тип 4c – МИ при клинична изява на рестеноза над 50% след балонна ангиопластика или стентирание - това е вече официално приет нов подтип на тип 4. Около 40-60 % от рестенозите се изявяват с ОКС и повишение на сърдечния тропонин.

Тип 5 – МИ, последващ CABG (Coronary artery bypass grafting) – той се доказва с покачване над 10 пъти над 99 персентил при пациенти с нормални изходни нива, съчетано с ЕКГ исхемични промени, с промени в резултатите от ангиографските или образни техники .

Тази дефиниция обаче не удовлетворява всички клиницисти. Повечето от проучванията, направени по отношение на перипроцедурната некроза, използват като основен маркер СК-МВ. Основните възражения са, че има по-добро съответствие между промените в нивата на СК-МВ и резултатите от образните техники. Според тях е необходимо достигането на много по-високи нива на високочувствителните тропонини като съответствие на покачването на СК-МВ- ако критерия е 3- или 5-кратно

покачване, това води до хипердиагностика – диагностицира се перипроцедурна некроза, която с образните техники не се установява. Разбира се, значение има и фактът, че СК-МВ е доста по-добре познат и проучен, с него са направени голям брой масивни проучвания и има доста повече данни в литературата. 173,147,155,152,184,142,78,

През 2013 година експертна група на Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI) изработи своя, нова дефиниция на 4 тип, която се различава от Третата универсална дефиниция :

	Трета универсална дефиниция	SCAI
Клинични симптоми на исхемия	≥ 20 min	-
Време за измерване на биомаркерите	Преди процедурата и 3-6 час	Два пъти за първите 24 ч, след това след 8–12 h ако няма симптоми или ангиографски усложнения и не е необходимо ако ЕКГ е нормално на 1–4 ч
Избор на биомаркер	hs cTNT	СК-МВ
Изходни нива	<99-ия перцентил и стабилни или падащи	стабилни или падащи
Нива на покачване на маркерите	>5 x > 99-ия перцентил за първите 48ч или >20% ако базалните нива са повишени	Покачване на СК-МВ над 10 пъти над горната граница на нормата или тропонин - покачване над 70 пъти над горна граница на нормата.
Асоциирани находки: Исхемични ST промени	ST \downarrow 0.5 mm	Нова елевация или депресия
Нова Q вълна , Ляв Бедрен Блок	да	да
Ангиографски усложнения	да	не
Миокардна увреда	Биомаркер <5 x > 99ия перцентил със наличието на останалите критерии или >5 x > 99ия перцентил в отсъствието на исхемия, ангиографски или образни находки	-

Таблица2. Разлики между 3^{-та} универсална дефиниция и SCAI по отношение на критериите за диагностициране на 4^{-ти} тип миокарден инфаркт

В обобщение на изнесените данни може да се направи следното заключение - в настоящия момент абсолютен консенсус по отношение на тип 4а МИ няма, което прави въпроса интересен и актуален. Няма съмнения по отношение на това, че hs cTNT е по-чувствителния и специфичен маркер. Въпросът по-скоро е какво е подходящото ниво и какво е значението му по отношение на рисковата стратификация на тези пациенти.^{10,146,197, 175,104,151,152,53,228}

И в момента са в ход доста проучвания на тази тема, като резултатите не са еднозначни. Някои от тях откриват сигнификантна асоциация между повишеното тропониново ниво и изхода само при повишение над 5 пъти и повече над горната граница^{88,56,174,184} според други автори асоциацията няма такава сигнификантност^{197,148}.

Друго проучване показва асоциация между нивата на CRP и повишеното постпроцедурно тропониново ниво.²⁰⁹ Хипотезата за участието на системното възпаление в процеса на перипроцедурна некроза бе потвърдена и от ниската честота на повишаване на тропониновото ниво след PCI при пациенти, премедикирани с аторвастатин, който сигнификантно редуцира нивата на CRP.^{103,201,151} Това добавя нови аспекти по отношение на терапевтичното поведение при тези пациенти по отношение на подготовката им за процедурата и в последващия период.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ:

Да се проучи честотата на перипроцедурната некроза след PCI и да се изясни значението на сърдечните биомаркери като предиктори на перипроцедурни усложнения. Въз основа на получените данни, да се изработи алгоритъм, позволяващ идентифицирането на високо-рискови пациенти.

За постигането на тази цел е необходимо изпълнението на следните

ЗАДАЧИ:

- A. Верифициране на основните аналитични характеристики на високо-чувствителния имунохимичен метод (ECLIA) за определяне на cTNT като „златен стандарт“ за миокардна некроза и на нововъведените имунохимични методи за определяне на PAPP-A и NT-pro BNP.
- B. Да се извърши сравнително проспективно проучване на плазмените нива на сърдечните маркери cTnT, CKMB, CK, NTproBNP, PAPP-A и CRP при пациенти с перипроцедурно повишение на маркерите за миокардна некроза за период от 1 година.
- C. Да се проучи корелационната зависимост между исхемичните промени в интракоронарната ЕКГ и нивата на сърдечните маркери при тези пациенти.
- D. Да се определи честота на перипроцедурната мионекроза, оценена чрез нивото на следпроцедурен тропонин, с изолиране на предиктори.

- Е. Да се оцени комбинираната честота на смърт и големи неблагоприятни сърдечни събития (МАСЕ) с извеждане на предиктори за смъртност.
- Ф. Получените резултати да се използват за създаване на алгоритъм за определяне на високо-рискните пациенти за възникване на перипроцедурни усложнения

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:

4.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ:

Основната клиничната група лица са пациенти включени в проект, реализиран в Клиниката по кардиология - Отделение по инвазивна кардиология и КЛКФ – Отделение по клинична лаборатория, на тема „ПРОУЧВАНЕ НА ПЕРИПРОЦЕДУРНАТА МИОНЕКРОЗА И ВЪЗМОЖНОСТТА ЗА ПРЕДСКАЗВАНЕТО ѝ ЧРЕЗ ИНТРАКОРОНАРНА ЕЛЕКТРОКАРДИОГРАФИЯ И ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЪРДЕЧНИ МАРКЕРИ”..

Критерии за включване на пациентите в групата са:

1. Пациенти на възраст над 18 години със сигнификантни стенози в мястото на отделяне на странични клони с референтен размер над 1.0 мм, както и бифуркационни стенози от всички типове по класификацията на Медина, с изключение на тип 001.
2. Пациенти със стабилна (клас >1) и нестабилна стенокардия.
3. Възможност за приемане на клопидогрел/тикагрелор/празугрел минимум 12 месеца.
4. Креатинин < 200 $\mu\text{mol/L}$
5. Левокамерна фракция на изтласкване над 35%
6. Очаквана продължителност на живота над 1 година.

Критерии за изключване:

1. STEMI
2. Голяма извитост на проксималния от стенозата сегмент.
3. Голяма калцификация в проксималния сегмент.
4. Невъзможност за пълна предилатация на главния съд.
5. Пълен ЛББ или ДББ, както и случаите на предсърдно мъждене / трептене непозволяващи ясно идентифициране на PR сегмента.

Пациентската група е представена от 103 пациенти с комплексни (82%) и некомплексни коронарни лезии. Комплексни лезии са тези с дължина >20mm, калцифицирани (тип В/С лезия) или бифуркационни.

Интракоронарна ЕКГ (icECG) е записвано от главния съд, а в случаите на бифуркационни лезии – от страната на засегнатия участък.

Пробите за изследване на биохимични маркери (hs cTNT, СКМВ, СК, NTproBNP, PAPP-A, hs CRP) са взети преди процедурата и на 12-24 час след провеждането ѝ.

Изисквания към пробата за изследване, подготовка и съхраняване:

Като биологичен материал се използва серум, свободен от хемолиза, отделен от венозно взета кръв с вакутейнер със сепарационен гел. Пробите са транспортирани до 1 час от получаването им. Центрофугирани са на 4000 об./мин. за 10 мин. Серумите са изследвани веднага или съхранявани във фризер на – 20°C. Размразявани са еднократно.

Проведени са 5-кратни проследявания за наблюдавания период от 18 месеца (на 1-ия, 6-ия, 9-ия, 12-ия и 18 месец) като е отбелязвана преживяемостта и честотата на големите неблагоприятни сърдечни събития – повторна хоспитализация поради сърдечна недостатъчност, остър коронарен синдром, необходимост от повторна интервенция или смърт.

Проследяванията са извършени с периодични прегледи, включващи клинични, лабораторни и ЕКГ изследвания и хоспитализации при необходимост както и чрез контакти с пациентите и близките и от тяхна медицинска документация - епикризи, смъртни актове и други.

Демографските характеристики са представени в таблица 3:

<i>Променлива</i>	<i>Комплексни</i>	<i>Некомплексни</i>	<i>p</i>
<i>Пол, % мъже</i>	64	61	n.s.
<i>Възраст, години</i>	67±9	68±9	n.s.
<i>Хипертония, %</i>	100	100	n.s.
<i>Дислипидемия, %</i>	90	100	.073
<i>Диабет, %</i>	41	32	n.s.
<i>Пушачи, %</i>	81	85	n.s.
<i>Фамилна история за ранна атеросклеротична болест, %</i>	55	63	n.s.
<i>Тумори, %</i>	8	16	n.s.
<i>COPD, %</i>	10	10	n.s.
<i>Бъбречни увреди, %</i>	27	29	n.s.
<i>Прекаран МИ, %</i>	18	13	n.s.
<i>Предишни PCI, %</i>	42	42	n.s.
<i>PAD (периферна съдова болест), %</i>	10	10	n.s.
<i>Каротидна артериална болест %</i>	6	3	n.s.
<i>Мозъчно-съдова болест, %</i>	15	16	n.s.
<i>ASA (аспирин)</i>	96	100	n.s.
<i>Storidogrel и др. блокери на АДФ рецептор P2Y12, %</i>	97	100	n.s.
<i>Бета блокер, %</i>	79	87	n.s.
<i>ACE инхибитори, %</i>	57	55	n.s.
<i>Ангиотензин рецепторните блокери (ARB), %</i>	32	35	n.s.
<i>Калциеви антагонисти, %</i>	46	42	n.s.
<i>Орални антикоагуланти, %</i>	17	19	n.s.
<i>Статини, %</i>	90	90	n.s.

Таблица 3. Демографски характеристики на пациентските групи.

Обобщено – пациентската група има типичните характеристики на такава със стабилна коронарна болест с относително висок процент пациенти с диабет и нисък процент с предишен прекаран МИ. По отношение на рисковите фактори пациентите с комплексни лезии (CP) спрямо тези с некомплексни (NCP) имат почти идентичен профил.

Разликите са само в анатомичните характеристики на засягането от коронарната артериална болест.

Пациентите в голямата си част са приемали статини. Практически всички пациенти са били и на двойна антиромбоцитна терапия, включваща аспирин и Clopidogrel или други АДФ-рецепторни инхибитори.

4.2 АНАЛИЧНИ МЕТОДИ

4.2.1. hs cTNT (Високо-чувствителен сърдечен тропонин Т)

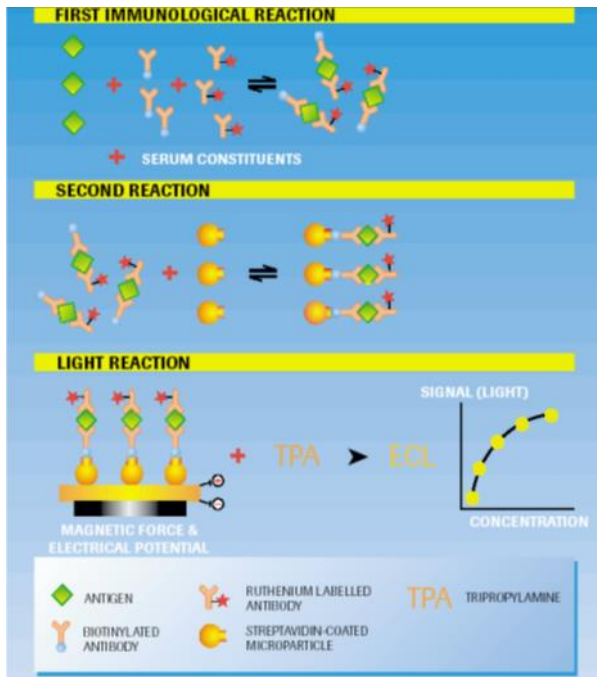
Roche Diagnostics

Elecsys 2010

Принцип на метода: Имунохимичен метод на сандвичев принцип с електрохимична детекция (ECLIA).

Моноклонално cTNT-специфично антитяло, свързано с биотин и моноклонално cTNT-специфично антитяло, белязано с рутениев комплекс, реагират с антигена (cTNT) от пробата и образуват „сандвичев“ комплекс .

След добавянето на покрити със стрептавидин микрочастици, комплексът се прикрепва на повърхността им чрез взаимодействието на биотина и стрептавидина. Микрочастиците се улавят чрез магнит на повърхността на електрода. Прилагането на напрежение индуцира хемилуминисцентната емисия, която се измерва. Количеството излъчена светлина е правопрпорционално на количеството антиген в пробата.



Фигура 9. Принцип на определяне на TnT

Реактиви и работа с тях: те са във *фабрично подготвени, готови за употреба* модули, които не могат да се разделят. *Цялата информация, необходима за правилното извършване на процедурата се разчита чрез баркода на съответния реактив.*

Съхранение и годност : 2-8 °C.

Калибрация -резултатите се определят чрез калибрационна крива, специфична за всеки лот №, изготвена от производителя чрез използване на вътрешен стандарт. В лабораторията се извършва верификация със два калибратора с обявени стойности. Калибраторите съдържат рекомбинантен човешки тропонин Т в два концентрационни диапазона - ~ 20 ng/L(0,020 ng /ml и 5200 ng/L(5,20 ng /ml) в човешки серумен матрикс.

Калибраторите са лиофилизирани и се разтварят с 1 мл дестилирана вода като са готови за употреба след 15 минути престой на стайна температура след внимателно размесване. Готовият, разтворен калибратор е годен при престой в хладилник (2-8⁰C) за период от 2 седмици; 3 месеца при съхранение на -20⁰C (замразен във фризера- допустимо е само еднократно размразяване) или 5 часа на стайна температура.

Честота на калибрация: Трябва да се извършва калибрация за всяка партида пресен реактив. Подновяването на калибрацията се препоръчва както следва:

- след 1 месец (28 дни) - когато се използва една и съща партида реактив
- при прилагането на реактив с нов лот №
- според изискванията – например при установяване на резултати извън зададените граници при извършване на качествен контрол

Качествен контрол

За качествен контрол се използва PreciControl Troponin 1&2. Контролите за различните концентрации трябва да се извършват поне веднъж на 24 часа когато тестът се използва и след всяка калибрация. Контролните интервали и граници трябва да се адаптират към индивидуалните изисквания на всяка лаборатория. Получените стойности трябва да попадат в дефинираните граници. Всяка лаборатория трябва да установи коригиращи действия, ако стойностите попадат извън границите.

Изчисление: Анализаторът изчислява автоматично концентрацията на тропонин Т във всяка проба (в ng/L или по избор в ng/ml).

Ограничения - интерференция

Анализът не се влияе от :

- иктер (билирубин < 428 $\mu\text{mol/L}$ или < 25 mg/dL),
- хемолиза (Hb < 0.016 mmol/L или < 0.1 g/dL);
- липемия (Интралипид < 1 500 mg/dL)
- биотин < 82 nmol/L или < 20 ng/mL -при пациенти на лечение с биотин във високи дози (напр. > 5 mg/ден) не трябва да се вземат проби за изследване в рамките на поне 8 часа след последния прием на биотин.

- не се наблюдава интерференция от ревматоидни фактори в концентрация до 1 500 IU/mL.
- извършени са ин витро изследвания с 52 често използвани лекарствени препарата. Не е установена интерференция с теста.

Граници и обхвати

Обхват на измерване

3-10 000 ng/L или 0,003 – 10 ng/ml, дефинирани от границата на бланк и максимума на еталонната крива .

Долни граници на измерване

Граница на бланк = 3 ng/L (0,003 ng/ml)

Граница на откриване = 5 ng/L (0,005 ng /ml)

Граница на количествено определяне = 13 ng/L (0,013 ng /ml)

Границите на бланк и на откриване, са определени в съответствие с изискванията на *CLSI (Институт за Клинични и Лабораторни Стандарти) - EP15-A2*.

Границата на бланк (LOB) е стойността на 95тия перцентил от $n \geq 60$ измервания на проби, несъдържащи изследвания показател в няколко независими серии. Тя съответства на концентрацията, под която пробите, несъдържащи изследвания показател са открити с вероятност от 95 %.

Границата на откриване (LOD) се определя според границата на бланк и стандартното отклонение на проби с ниска концентрация. Границата на откриване отговаря на най-ниската концентрация на показателя, която може да се открие с вероятност от 95 %.

Границата на количествено определяне (LLQ) е най-ниската концентрация на показателя, която може да бъде измерена с междинна

невъзпроизводимост $CV \leq 10\%$ (10 независими серии; 1 серия на ден).
 Определена е като се използват проби с ниска концентрация на тропонин Т.

Референтни интервали - определени са от производителя чрез изследвания на 533 здрави доброволци - горната референтна граница (99-ти перцентил) за hs cTNT е 14 ng/L.

Най-ниската концентрация със CV, по-малък от или равен на 10% (LoQ) в теста Elecsys hs Troponin T, е 13 ng/L.

Невъзпроизводимост

Прецизността е определена, използвайки реактиви Elecsys, проби и контроли в протокол EP5-A2 на CLSI (Институт за Клинични и Лабораторни Стандарти): 2 пъти на ден в двойни определения, всяко в продължение на 21 дни ($n = 84$).

Анализатори Elecsys 2010 и cobas e 411					
Проба	Mean ng/L	Повторяемост		Междинна прецизност	
		SD ng/L	CV%	SD ng/L	CV%
Човешки серум 1	7.5	0.4	5.6	1.1	15.0
Човешки серум 2	13.5	0.4	3.0	0.7	5.2
Човешки серум 3	24.0	0.6	2.4	0.8	3.1
Човешки серум 4	300	2.7	0.9	3.8	1.3
Човешки серум 5	894	7.4	0.8	13.5	1.5
Човешки серум 6	2 665	24.1	0.9	37.5	1.4
Човешки серум 7	9 044	63.5	0.7	115	1.3
PreciControl TN1	2,79	0,7	2,6	1,0	3,4
PreciControl TN2	2 049	33.9	1.7	40.7	2.0

Таблица 4. Определяне на невъзпроизводимост на метода на определяне hsTnT(данни на производител)

Метод на сравнение

Сравнение на теста Elecsys Troponin T hs (анализатор MODULAR ANALYTICS E170; y) с теста Elecsys Troponin T hs STAT (анализатор Elecsys 2010; x), използвайки клинични проби, дава следните корелации:

Брой измерени проби: 142

Passing/Bablok Линейна регресия

$$y = 0.99x + 0.47 \quad y = 1.02x - 14$$

$$r = 0.951 \quad r = 0.999$$

Концентрациите на пробите са между 3 и 8 100 ng/L.

Диагностична чувствителност и специфичност

Един клиничен център в Германия, един център в Индия, един център в Швейцария и два центъра в САЩ и 507 пациенти са участвали в определяне на диагностичната чувствителност и специфичност. Пациентите са диагностицирани за остър MI, съгласно критерии, дефинирани съвместно от ESC/ACCF/АНА/WHF- чрез стойности на сърдечен тропонин над 99-ия перцентил с 10 % CV, наличие на болки в гърдите и ECG промени. Чувствителността и специфичността на високо-чувствителния тропонин Т, са изчислени при 99-ия перцентил - 0,014 ng/mL при 10% CV.

Чувствителност %	N	95 % доверителен интервал (%)	Специфичност %	N	95 % доверителен интервал (%)
100	112/112	97-100	75	297/395	71-79

Таблица 5. Определяне на диагностична чувствителност и специфичност.

Направено е и сравнение на чувствителността и специфичността при 99-ия перцентил на теста Elecsys Troponin T hs с 10 % CV и теста Elecsys Troponin 4-та ген. (0.03 ng/mL) като изчислението е направено за различните времеви периоди след приемането в болница:

Изминало време след приемане (часове)	Тест генерация Тропонин Т	Чувствителност %	N	95 % доверителен интервал (%)	Специфичност %	N	95 % доверителен интервал (%)
0	4та ген.	71	40/56	58-83	99	142/143	96-100
	Troponin T hs	93	52/56	83-98	76	109/143	68-83
0-3	4та ген.	81	75/93	71-88	99	356/359	98-100
	Troponin T hs	98	91/93	93-100	79	282/359	74-83
3-6	4та ген.	83	53/64	71-91	100	300/301	98-100
	Troponin T hs	100	64/64	94-100	77	232/301	72-82
6-9	4та ген.	86	42/49	73-94	99	201/203	97-100
	Troponin T hs	98	48/49	89-100	76	155/203	70-82
9-12	4та ген.	83	15/18	59-96	100	43/43	92-100
	Troponin T hs	94	17/18	73-100	72	31/43	56-85
> 12	4та ген.	83	25/30	65-94	98	56/57	91-100
	Troponin T hs	100	30/30	88-100	60	34/57	46-72

Таблица 6. Сравнение на диагностична чувствителност и специфичност между 4-та генерация класически тест и hsTnT.

4.2.2. PAPP-A (Асоцииран с бременността плазмен протеин А)

Roche Diagnostics

Elecsys 2010

Принцип на метода: Имунохимичен метод на сандвичев принцип с електрохимична детекция (ECLIA).

Моноклонално PAPP-A-специфично антитяло, свързано с биотин и моноклонално PAPP-A-специфично антитяло, белязано с рутений комплекс, реагират с антигена (PAPP-A) от пробата и образуват сандвичев комплекс.

След добавянето на покрити със стрептавидин микрочастици, комплексът се прикрепва на повърхността им чрез взаимодействието на биотина и стрептавидина. Микрочастиците се улавят чрез магнит на повърхността на електрода. Прилагането на напрежение индуцира хемилуминисцентната емисия, която се измерва. Количеството излъчена светлина е правопрпорционално на количеството антиген в пробата.

Реактиви и работа с тях: реактивите са във *фабрично подготвени, готови за употреба* модули, които не могат да се разделят. *Цялата информация, необходима за правилното извършване на процедурата се разчита чрез баркода на съответния реактив.*

Съхранение: 2-8 °C. Годност: неотворени, при 2-8 °C - до изтичане на посочения срок на годност; след отваряне при 2-8 °C - 4 седмици; в анализаторите - 3 седмици.

Проследимост: Тестът Elecsys PAPP-A е стандартизиран спрямо СЗО стандарт IRP 78/610.

Калибрация - резултатите се определят чрез калибрационна крива, специфична за всеки лот №, изготвена от производител чрез използване

на вътрешен стандарт. В лабораторията се извършва верификация със два калибратора с обявени стойности. Те съдържат човешки серумен матрикс с добавен PAPP-A от човешка плацента в два концентрационни обхвата – 75 mIU/L и 2470 mIU/L. Точните специфични за партидата стойности на калибратора са кодирани в баркода и са принтирани в приложената (или достъпна в електронна форма) листовка с баркод на калибраторите.

Калибраторите се разтварят с 1 мл дестилирана вода като са готови за употреба след 15 минути престой на стайна температура след внимателно размесване. Готовият, разтворен калибратор е годен при престой в хладилник (2-8⁰C) за период от 2 седмици; 3 месеца при съхранение на -20⁰C (замразен във фризер, като е допустимо само еднократно размразяване) или 5 часа на стайна температура.

Честота на калибрация: Трябва да се извършва калибрация за всяка партида реактив. Подновяването на калибрацията се препоръчва както следва:

- след 1 месец (28 дни) - когато се използва една и съща партида реактив
- нова партида реактив
- според изискванията - например при установяване на резултати извън зададените граници при извършване на качествен контрол

Качествен контрол

За качествен контрол се използва PreciControl Maternal Care 1, 2, & 3.

Контролите за различните концентрации трябва да се извършват поне веднъж на 24 часа когато тестът се използва и след всяка калибрация. Контролните интервали и граници трябва да се адаптират към

индивидуалните изисквания на всяка лаборатория. Получените стойности трябва да попадат в дефинираните граници. Всяка лаборатория трябва да установи коригиращи действия, ако стойностите попадат извън границите.

Изчисление: Анализаторът изчислява автоматично концентрацията на RAPP-A във всяка проба ((в mIU/L, IU/L или mIU/mL).

Фактори за преобразуване:

$mIU/mL \times 1\,000 = mIU/L$; $mIU/mL \times 1 = IU/L$; $IU/L \times 1\,000 = mIU/L$

Ограничения - интерференция

Анализът не се влияе от :

- иктер (билирубин $< 205 \mu\text{mol/L}$ или $< 12 \text{ mg/dL}$),
- хемолиза (Hb $< 0.621 \text{ mmol/L}$ или $< 1.0 \text{ g/dL}$),
- липемия (Интралипид $< 1\,500 \text{ mg/dL}$)
- биотин $< 123 \text{ pmol/L}$ или $< 30 \text{ ng/mL}$ - при пациенти на лечение с биотин във високи дози (напр. $>5 \text{ mg/ден}$) не трябва да се вземат проби за изследване в рамките на поне 8 часа след последния прием на биотин.
- не се наблюдава интерференция от ревматоидни фактори в концентрация до $1\,000 \text{ IU/mL}$.
- извършени са ин витро изследвания с 18 често използвани лекарствени препарати. Не е установена интерференция с теста

Граници и обхвати

Обхват на измерване

4-10 000 mIU/L, дефинирани от границата на бланк и максимума на еталонната крива .

Долна граница на откриване: $< 4 \text{ mIU/L}$

Границата на откриване представлява най-ниското измеримо ниво на показателя, което може да се отличи от нула. Изчислява се като стойността, намираща се на две стандартни отклонения над тази на най-ниския стандарт (главен калибратор, стандарт $1 + 2 SD$, изследване за повторяемостта, $n = 21$).

Референтни граници: При мъже и небременни жени нивата на PAPPA обичайно са $< 1 \text{ mIU/L}$.

В изследвания, извършени с теста Elecsys PAPPA при анализ на проби от 500 здрави донори, които не са бременни (изследване на Roche № R04P026) е получен като резултат горна референтна граница (95-ти перцентил):

$< 7.15 \text{ mIU/L}$

Невъзпроизводимост

Невъзпроизводимостта е определена, използвайки реактиви Elecsys, сборен човешки серум и контроли в променен протокол (EP5-A) на CLSI (Институт за клинични и лабораторни стандарти): 6 пъти дневно, в продължение на 10 дни ($n = 60$). Получени са следните резултати:

Анализатори Elecsys 2010 и cobas e 411					
		Повторяемост		Междинна прецизност	
Проба	X (mIU/L)	SD (mIU/L)	CV%	SD (mIU/L)	CV%
Човешки серум 1	283	6.7	2.4	6.6	2.3
Човешки серум 2	521	11.5	2.2	11.5	2.2
Човешки серум 3	4 181	87.1	2.1	94.7	2.3
PCc Maternal Care 1	6 630	111	1.7	133	2.0
PCc Maternal Care 2	3 361	55.0	1.6	58.7	1.8
PCc Maternal Care 3	144	1.60	1.1	1.6	1.1

Таблица 7. Изследване на невъзпроизводимост на метода за определяне на PAPP-A.

Метод на сравнение

Сравнение на теста Elecsys PAPP-A (y) с PAPP-A тест от търговската мрежа (x), използвайки клинични проби, дава следните корелации:

Брой измерени проби: 627

Passing/Bablok Линейна
регресия

$$y = 0.968x - 4.90 \qquad y = 0.988x - 64.9$$

$$\tau = 0.918 \qquad r = 0.987$$

Концентрациите на пробите са между припл. 150 и припл. 10 000 mIU/L.

4.2.3. NTproBNP II (N-terminal pro B-type natriuretic peptide)

Roche Diagnostics

Elecsys 2010

Принцип на метода: Имунохимичен метод на сандвичев принцип с електрохимична детекция (ECLIA). Моноклонално NT-proBNP-специфично антитяло, свързано с биотин и моноклонално NT-proBNP-специфично антитяло, белязано с рутениев комплекс, реагират с антигена (NT-proBNP) от пробата и образуват сандвичев комплекс .

След добавянето на покрити със стрептавидин микрочастици, комплексът се прикрепва на повърхността им чрез взаимодействието на биотина и стрептавидина. Микрочастиците се улавят чрез магнит на повърхността на електрода. Прилагането на напрежение индуцира хемилуминисцентната емисия, която се измерва. Количеството излъчена светлина е право пропорционално на количеството антиген в пробата.

Реактиви и работа с тях: реактивите са във *фабрично подготвени, готови за употреба* модули, които не могат да се разделят. *Цялата информация, необходима за правилното извършване на процедурата се разчита чрез баркода на съответния реактив.*

Съхранение : 2-8 °C. Годност: неотворени, при 2-8 °C - до изтичане на посочения срок на годност; след отваряне при 2-8 °C - 12 седмици; в анализаторите - 8 седмици.

Калибрация - резултатите се определят чрез калибрационна крива, специфична за всеки лот №, изготвена от производителя чрез използване на вътрешен стандарт. В лабораторията се извършва верификация със два калибратора с обявени стойности. ProBNP II CalSet съдържа лиофилизиран конски серумен матрикс с добавен синтетичен

NT-proBNP (1-76) в два концентрационни обхвата - 16 pmol/L и 340 pmol/L. Точните специфични за партидата стойности на калибратора са кодирани в баркода и са принтирани в приложената (или достъпна в електронна форма) листовка с баркод на калибраторите.

Калибраторите са лиофилизирани и се разтварят с 1 мл дестилирана вода като са готови за употреба след 15 минути престой на стайна температура след внимателно размесване. Готовият, разтворен калибратор е годен при престой в хладилник (2-8⁰C) за период от 2 седмици; 3 месеца при съхранение на -20⁰C (замразен във фризер, като е допустимо само еднократно размразяване) или 5 часа на стайна температура.

Честота на калибрация: Трябва да се извършва калибрация за всяка партида пресен реактив (т. е. не повече от 24 часа от регистрирането на кита в анализатора).

Подновяването на калибрацията се препоръчва както следва:

- след 1 месец (28 дни) - когато се използва една и съща партида реактив
- при прилагането на реактив с нов лот-номер
- според изискванията - например при установяване на резултати извън зададените граници при извършване на качествен контрол.

Качествен контрол

За качествен контрол се използва Elecsys PreciControl Cardiac II 1 & 2. Контролите за различните концентрации трябва да се извършват поне веднъж на 24 часа (когато тестът се използва) и след всяка калибрация. Контролните интервали и граници трябва да се адаптират към индивидуалните изисквания на всяка лаборатория. Получените стойности трябва да попадат в дефинираните граници. Всяка

лаборатория трябва да установи коригиращи действия, ако стойностите попадат извън границите.

Изчисление: Анализаторът изчислява автоматично концентрацията на изследвания показател във всяка проба ((в pmol/L или pg/mL).

Фактори за преобразуване: pmol/L x 8.457 = pg/mL ; pg/mL x 0.118 = pmol/L

Ограничения - интерференция

Анализът не се влияе от :

- иктер (билирубин < 428 $\mu\text{mol/L}$ или < 25 mg/dL),
- хемолиза (Hb < 0.621 mmol/L или < 1.0 g/dL),
- липемия (Интралипид < 1 500 mg/dL)
- биотин < 123 nmol/L или < 30 ng/mL - при пациенти на лечение с биотин във високи дози (напр.>5 mg/ден), не трябва да се вземат проби за изследване в рамките на поне 8 часа след последния прием на биотин.
- не се наблюдава интерференция от ревматоидни фактори в концентрация до 1 500 IU/mL.
- извършени са ин витро изследвания с 51 често използвани лекарствени препарата. Не е установена интерференция с теста.

Граници и обхвати

Обхват на измерване

5-35000 pg/mL или 0.6-4130 pmol/L (дефинирани от долния праг на детекция и максимума на еталонната крива).

Долна граница на откриване (LOD) - 5 pg/mL (0.6 pmol/L)

Долният праг на детекция представлява най-ниското измеримо ниво на изследвания показател, което може да се отличи от нула.

Референтни стойности

Референтна група: концентрацията на NT-proBNP е определена в проби от 1981 донори на кръв на възраст между 18 и 65, както и 283 възрастни пациенти между 50 и 90, и двете популации без сърдечен риск, симптоми или анамнеза за сърдечно заболяване. Описателната статистика за концентрациите на NT-proBNP (pg/mL) в референтната група, са показани в следната таблица:

<i>Обща група</i>						
<i>Възраст(години)</i>	18-44	45-54	55-64	65-74	≥75	Тотални
<i>N</i>	1323	408	398	102	33	2264
<i>Средни стойности</i>	20.4	30.7	47.3	85.1	174	27.9
<i>95ти персентил</i>	97.3	121	198	285	526	149
<i>97.5ти персентил</i>	115	172	263	349	738	196
<i>мъже</i>						
<i>Възраст(години)</i>	18-44	45-54	55-64	65-74	≥75	Тотални
<i>N</i>	815	278	259	61	13	1426
<i>Средни стойности</i>	20.0	21.6	37.7	83.9	151	20.0
<i>95ти персентил</i>	62.9	83.9	161	241	486	113
<i>97.5ти персентил</i>	85.8	121	210	376	486	169
<i>жени</i>						
<i>Възраст(години)</i>	18-44	45-54	55-64	65-74	≥75	Тотални
<i>N</i>	508	130	139	41	20	838
<i>Средни стойности</i>	37.1	55.4	79.6	85.2	191	47.8
<i>95ти персентил</i>	116	169	247	285	738	177
<i>97.5ти персентил</i>	130	249	287	301	738	254

Таблица 8. Изследване на невъзпроизводимост на метода за определяне на NT-proBNP.

Клинично-значима (cut-off) стойност:

Множество проучвания подкрепят cut-off за общата група за NT-proBNP 125 pg/mL (14.75 pmol/L). Стойности на NT-proBNP <125 pg/mL, изключват сърдечна дисфункция с голяма сигурност при пациенти със симптоми за сърдечна недостатъчност напр. диспнея. Стойности на NT-proBNP > 125 pg/mL, могат да са признак за сърдечна дисфункция и се свързват с повишен риск от сърдечни усложнения. Трябва обаче да се прецизират използваните cut-off стойности и до се подберат оптимално като се има предвид възрастовата и половата зависимост.

Категория	Оптимална COV pg/mL	Чувствителност %	Специфичност %	PPV %	NPV %	Точност %
<i>Cut-point на включване</i>						
< 50 години (n = 184)	450	97	93	79	99	94
50-75 год. (n = 537)	900	90	82	83	88	85
> 75 години (n = 535)	1800	85	73	92	55	83
<i>Cut-point на изключване</i>						
Всички пациенти	300	99	60	77	98	83

Таблица 9. Определяне на чувствителност и специфичност на cut-off стойностите за NT-proBNP.

Невъзпроизводимост:

Невъзпроизводимостта е определена, използвайки реактиви Elecsys, проби и контроли в променен протокол (EP5-A) на CLSI (Институт за Клинични и Лабораторни Стандарти; бивш NCCLS): 6 пъти дневно в продължение на 10 дни (n = 60). Получени са следните резултати:

Анализатори Elecsys 2010 и cobas e 411					
		Вътресерийна прецизност		Тотална прецизност	
Проба	mean (pg/mL)	SD (pg/mL)	CV%	SD (pg/mL)	CV%
Човешки серум 1	44.0	1.84	4.2	2.02	4.6
Човешки серум 2	126	3.06	2.4	3.23	2.6
Човешки серум 3	2410	31.7	1.3	44.2	1.8
Човешки серум 4	33606	922	2.7	1288	3.8
PC Cardiac II 1	82.0	2.11	2.58	2.27	2.8
PC Cardiac II 2	2318	27.3	1.18	36.6	1.6

Таблица 10. Определяне на невъзпроизводимост на метода за определяне на NT-proBNP

Сравнението на тест Elecsys proBNP II (y) с предлаган в търговската мрежа метод proBNP (x), използвайки клинични проби, дава следните корелации (pg/mL):

Брой измерени проби: 2133

Passing/Bablok

Линейна

регресия

$$y = 0.977x + 1.89$$

$$y = 0.999x - 13.36$$

$$\tau = 0.946$$

$$r = 0.996$$

Концентрациите на пробите са между 5 и 30022 pg/mL (0.6 и 3543 pmol/L).

4.2.4.hs CRP (High Sensitive C-Reactive Protein)

Roche Diagnostics

Cobas Integra 400 +

Принцип на метода: Високочувствителният тест за определяне на CRP на принципа на имунологична аглутинация - имунотурбидиметричен тест, усилен с частици.

Човешки CRP аглутиниращ с латексови частици, обвити в моноклонални анти-CRP антитела. Преципитатът се определя турбидиметрично. Дължината на вълната, на която се извършва измерването, е 546 nm, посоката на реакцията е нарастване ; единиците, в които се измерва са тегловни - mg/L.

Реактиви - реактивите са във фабрично подготвени, готови за употреба, в касети - модули, които не могат да се разделят.

Съхранение: 2-8 °C. Годност: неотворени, при 2-8 °C - до изтичане на посочения срок на годност; след отваряне и поставяне в анализаторите - 4 седмици- на 2-8 °C - 12 седмици

Проследимост: Този метод е стандартизиран спрямо първичният стандарт на IRMM (Институт за референтни материали и измервания) и Bureau Communautaire de Référence (Community Bureau of References) BCR470 (или още Certified Reference Material 470 (CRM 470)). Този референтен стандарт е приет през 1993 от US Food and Drug Administration (FDA) като RPPHS (Reference Preparation for Proteins in Human Serum).

Калибрация - анализът изисква построяването на 6-точкова калибрационна крива. За построяването ѝ се използват два стандарта - S₁: H₂O и S₂: C.f.a.s. Proteins.

C.f.a.s. Proteins е течен, готов за употреба калибратор на базата на човешки серум с химически добавки. Концентрациите на калибраторните компоненти са специфични за партидата. Точните стойности на калибратора са кодирани в приложените листовки с баркод на калибраторите за анализаторите Roche/Hitachi MODULAR и COBAS INTEGRA. Прицелните стойности на калибратора са определени чрез използване на вторичен стандарт, проследим до международен стандарт от по-висок метрологичен клас – първичен стандарт.

Съхраняване и годност на калибраторите–неотворените опаковки C.f.a.s. Proteins се съхраняват при 2-8 °C и са годни до изтичане на посочения срок на годност; след отваряне и съхраняване при 2-8 °C - 4 седмици при условие, че накапването на калибратора се извърши без микробно замърсяване, напр. чрез изливане.

Честота на калибрация: трябва да се извършва калибрация след смяна на партидата на реактива или съгласно изискванията на контролните процедури - напр. при установяване на резултати извън зададените граници при извършване на качествен контрол.

Качествен контрол - използва се Precinorm Protein. В допълнение може да се използва и друг подходящ контролен материал. Контролите за различните концентрации трябва да се извършват поне веднъж на 24 часа (когато тестът се използва) и след всяка калибрация. Контролните интервали и граници трябва да се адаптират към индивидуалните

изисквания на всяка лаборатория. Получените стойности трябва да попадат в дефинираните граници. Всяка лаборатория трябва да установи коригиращи действия, ако стойностите попадат извън границите.

Ограничения - интерференции

Анализът не се влияе от :

- иктер (билирубин < 60 mg/dL или 1026 μ mol/L),
- хемолиза (Hb < 0.621 mmol/L или < 1.0 g/dL),
- липемия (Интралипид < 1 500 mg/dL)
- не се наблюдава интерференция от ревматоидни фактори в концентрация до 1 200 IU/mL.
- извършени са ин витро изследвания с често използвани лекарствени препарати. Не е открита интерференция при терапевтични концентрации. Възможно е получаването на значително намалени стойности на CRP от проби, взети от пациенти, третирани с карбоксипеницилини.

Граници и обхвати

Обхват на измерване - 0.15-20.0 mg/L

Долна граница на откриване на теста - 0.15 mg/L

Долната граница на откриване представлява най-ниското измеримо ниво на аналит, което може да се отличи от нула. Изчислява се като стойност, лежаща 3 стандартни отклонения над това на най-ниския стандарт (стандарт 1 + 3 SD, повтораемост n = 21).

Функционална чувствителност - 0.3 mg/L

Функционалната чувствителност е най-ниската концентрация на CRP, която може да бъде измерена с възпроизводимост с междутестови коефициент на вариация <10 %.

Референтни граници

Консенсусен референтен интервал за възрастни:

< 5.0 mg/L или < 0.5 mg/dL

CDC/АНА препоръчва следните hsCRP cut-off точки (терцили) за оценка на кардио-васкуларния риск (ниво на hsCRP /mg/L/ - относителен риск):

< 1.0 – нисък; 1.0-3.0 – среден ; > 3.0 - висок

5-95 % референтни интервали на новородени и деца:

Новородени (0-3 седмици): 0.1-4.1 mg/L (0.95-39.0 nmol/L)

Деца (2 месеца-15 години): 0.1-2.8 mg/L (0.95-26.7 nmol/L)

Невъзпроизводимост

Невъзпроизводимостта е определена, използвайки човешки проби и контроли във вътрешен протокол с повтаряемост (n = 21) и междинна прецизност (3 аликвота на серия, 1 серия на ден, 21 дни). Получени са следните резултати:

<i>Повторяемост</i>	Средна стойност mg/L	SD mg/L	CV %
<i>Precinorm Protein</i>	9.00	0.10	1.2
<i>CRP T Control N</i>	4.34	0.04	1.0
<i>Човешки серум 1</i>	15.9	0.1	0.4
<i>Човешки серум 2</i>	0.54	0.01	1.6
<i>Прецизност</i>	Средна стойност mg/L	SD mg/L	CV %
<i>Precinorm Protein</i>	9.06	0.11	1.3
<i>CRP T Control N</i>	4.28	0.11	2.6
<i>Човешки серум 3</i>	13.3	0.3	2.1
<i>Човешки серум 4</i>	0.53	0.05	8.4

Таблица 11. Изследване на невъзпроизводимост на метода за определяне на CRP (hs)

Стойности на CRP за човешки серумни и плазмени проби, получени в анализатор Roche/Hitachi cobas c 501 (y), са сравнени с тези, определени със съответния реактив в анализатор Roche/Hitachi 917 (x).

Брой измерени проби (n) = 192

Passing/Bablok

$$y = 0.992x + 0.254 \text{ mg/L}$$

$$\tau = 0.944$$

Линейна регресия

$$y = 0.946x + 0.514 \text{ mg/L}$$

$$r = 0.996$$

Концентрациите на пробите са били между 0.500 и 19.7 mg/L (4.76 и 188 nmol/L, 0.050 и 1.97 mg/dL).

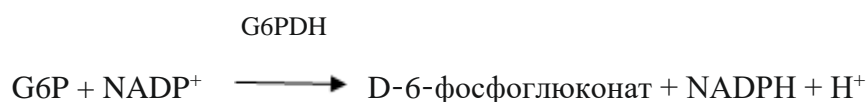
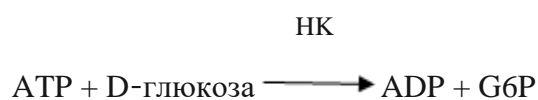
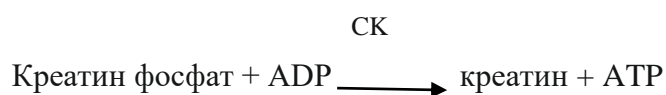
4.2.5.СК (Креатинкиназа) и МВ изоензим

Roche Diagnostics

Cobas Integra 400 +

Принцип на метода: тристъпален стандартизиран и оптимизиран съгласно препоръките на Международната федерация за клинична химия (IFCC) и Немското общество за клинична химия (DGKC) UV тест :

СК се активира от N-ацетилцистеин (NAC). В аналитичното стъпало активираната СК катализира дефосфорилирането на креатинфосфат до получаването на креатин и АТР. Във втората реакция, катализирана от хексокиназа (НК), глюкоза се фосфорилира от получения АТР до образуването на D-глюкоза-6-фосфат (G6P). В индикаторното стъпало глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (G6PDH) катализира оксидирането на G-6P от NADP^+ до образуването на 6-фосфоглюконат и NADPH.



Скоростта на образуване на NADPH е право пропорционална на каталитичната активност на СК. Определя се чрез измерване нарастването на абсорбцията на 340 нм .

Имуноинхибиционен метод за определяне на изоензим МВ : с помощта на специфични антитела насочени срещу субединицата М на СК-МВ активността на тази субединица в пробата се инхибира. Останалата креатинкиназна активност (съответстващи на половината активност на СК-МВ) е за сметка на субединицата В и тя се определя по общия метод за определяне на активността на СК. Тъй като СК-ВВ изоензим рядко се появява в серума и каталитичната активност на СК-М и СК-В субединици почти не се различават, каталитичната активност на СКМВ изоензим може да бъде изчислена като активността на СК-В се измери и се умножи резултата по две.

Работа с реактивите: реактивите са във фабрично подготвени, готови за употреба модули, които не могат да се разделят.

Съхранение: 2-8 °С. Годност: неотворени, при 2-8 °С - до изтичане на посочения срок на годност; след отваряне и поставяне в анализаторите - 8 седмици.

Проследимост: Този метод е стандартизиран спрямо оригиналната референтна

процедура на IFCC. Същото се отнася и до метода за определяне на СК-МВ със добавянето на антитела.

Калибрация- анализа изисква построяването на 2-точкова калибрационна крива. За построяването ѝ се използват два стандарта - S₁: H₂O и S₂: C.f.a.s (Calibrator for automated systems) или C.f.a.s СК-МВ. C.f.a.s. е лиофилизиран калибратор на базата на човешки серум с химически добавки и материал с биологичен произход – за креатинкиназа биологичната добавка е с произход от заешки мускул.

Концентрациите и активността на калибраторните компоненти са специфични за партидата. Точните стойности на калибратора са кодирани в приложените листовки с баркод на калибраторите за анализаторите Roche/Hitachi MODULAR COBAS INTEGRA и cobas c 111.

Приготвянето на калибратора изисква разтварянето на лиофилизата с 3.0 mL дестилирана/дейонизирана вода. Изчаква се пълното разтваряне на съдържанието - за около 30 минути.

Съхраняване и годност на калибраторите– неотворените опаковки C.f.a.s. се съхраняват при 2-8 °C и са годни до изтичане на посочения срок на годност; след отваряне и съхраняване при 2-8 °C - 2 дни; при - 20 °C - 4 седмици (с еднократно размразяване).

Честота на калибрация: трябва да се извършва калибрация след смяна на партидата на реактива или съгласно изискванията на контролните процедури – например при установяване на резултати извън зададените граници при извършване на качествен контрол

Качествен контрол - използва се Precinorm U и Precipath U. В допълнение може да се използва и друг подходящ контролен материал.

Контролите за различните концентрации трябва да се извършват поне веднъж на 24 часа, когато тестът се използва, веднъж за всеки кит реактиви и след всяка калибрация. Контролните интервали и граници трябва да се адаптират към индивидуалните изисквания на всяка лаборатория. Получените стойности трябва да попадат в дефинираните граници. Всяка лаборатория трябва да установи коригиращи действия, ако стойностите попадат извън границите.

Изчисление : системите Roche/Hitachi cobas с изчисляват автоматично активността на изследвания показател във всяка проба.

Фактор за превръщане: $U/L \times 0.0167 = \mu\text{kat/L}$

Ограничения - интерференции

Анализът не се влияе от :

- иктер (билирубин $< 60 \text{ mg/dL}$ или $1026 \mu\text{mol/L}$.),
- хемолиза (Hb $< 0.124 \text{ mmol/L}$ или $< 0.200 \text{ g/dL}$),
- липемия (Интралипид $< 1\,000 \text{ mg/dL}$)
- не се наблюдава интерференция от ревматоидни фактори в концентрация до $1\,200 \text{ IU/mL}$.
- извършени са ин витро изследвания с често използвани лекарствени препарати. Не е открита интерференция при терапевтични концентрации.

Граници и обхвати

Обхват на измерване - $7\text{-}2000 \text{ U/L}$ за обща активност и $3\text{-}2000 \text{ U/L}$ за МВ-фракцията.

Долна граница на откриване на теста

7 U/L за обща активност и 3 U/L за МВ.

Референтен интервал

Консенсусен референтен интервал за възрастни:

Мъже - < 190 U/L

Жени - < 170 U/L

СК-МВ > 24 U/L

Активността на СК-МВ представлява 6-25 % от общата СК активност

Невъзпроизводимост

Невъзпроизводимостта е определена, използвайки човешки проби и контроли във вътрешен протокол с повторемост (n = 21) и междинна прецизност (3 аликвота на серия, 1 серия на ден, 21 дни). Получени са следните резултати:

<i>Повторемост</i>	Средна стойност U/L	SD U/L	CV%
<i>Precinorm U</i>	174	1	0.5
<i>Precipath U</i>	390	2	0.5
<i>Човешки серум 1</i>	49.1	1.1	2.3
<i>Човешки серум 2</i>	702	5	0.7
<i>Прецизност</i>	Средна стойност U/L	SD U/L	CV %
<i>Precinorm U</i>	164	3	1.8
<i>Precipath U</i>	350	6	1.8
<i>Човешки серум 3</i>	90.3	3.0	3.3
<i>Човешки серум 4</i>	309	8	2.5

Таблица 12.Изследване на невъзпроизводимост за СК (данни на производител)

Стойности на креатинкиназа за човешки серумни и плазмени проби, получени в анализатор Roche/Hitachi cobas c 501 (y), са сравнени с тези, определени, използвайки съответния реактив в анализатор Roche/Hitachi 917 (x).

За обща активност на СК:

Брой измерени проби (n) = 252

Passing/Bablok

Линейна регресия

$$y = 1.000x + 7.618 \text{ U/L}$$

$$y = 0.998x + 6.272 \text{ U/L}$$

$$\tau = 0.957$$

$$r = 0.997$$

Активността на пробите е била между 19.0 и 1817 U/L.

За СК-МВ

Брой измерени проби (n) = 117

Passing/Bablok

Линейна регресия

$$y = 1.016x + 3.75 \text{ U/L}$$

$$y = 1.011x + 4.26 \text{ U/L}$$

$$\tau = 0.897$$

$$r = 1.000$$

Активността на пробите е била между 5.0 и 1967 U/L.

4.3. Статистически методи:

Получените данни са обработени със статистически със пакет SPSS19.

1. Изследваните параметри са представени като средна стойност, плюс-минус едно стандартно отклонение; ако разпределението на параметъра не е нормално, е дадена медиана с интерквартилен обхват.
2. Всички данни са тествани за нормално разпределение с тестовете на Колмогоров – Смирнов и Шапиро – Уилк.
3. Студент t-тестът, е използван в зависимост от проследявания (съответно сравняван) параметър при Гаусово разпределение на данните. Ман – Уитни или Уилкоксон знаковият тест е използван тогава когато данните не са били с правилно разпределение.
4. Интервалните и номиналните данни са представени като проценти или отношения.
5. Тестът хи-квадрат е използван за сравнение на честоти и проценти, като при очакван бой единици в клетка под 5 е използван тест на Фишер.
6. При наличие на повече от две групи в даден параметър е направен дисперсионен анализ - едностранен ANOVA тест.
7. Осъществени са корелационен анализ за извеждане на предикторите на смъртност, общо количество сърдечни неблагоприятни събития и честота на перипроцедурна мионекроза (съгласно Третата дефиниция на миокардния инфаркт).

8. За определяне на клиничните предиктори на изброените крайни показатели е направен множествен регресионен анализ, с последователна елиминация назад, с критерий за влизане в модела $p < 0.1$, оставане в модела при $p < 0.05$ – логистичен или Кокс регресионен анализ при наличие на регистрирано време за даден показател.
9. Receiver-operator-curve (ROC) анализ е направен за идентифициране на критичните стойности за предиктори, както и за определяне на чувствителността и специфичността на дадена стойност.
10. За оценка влиянието на даден параметър върху преживяемостта се построиха Каплан – Майер криви на преживяемостта с лог – ранг тест за оценка на статистическата разлика.
11. За ниво на сигнификантност е прието $p < 0.05$.

Статистически план:

Работната хипотеза на изследването е, че новите предложени маркери (NT proBNP, PAPPА, hsCRP) както и традиционно използваните маркери за миокардна некроза (сТnТ, СК, СКМВ) могат да се използват за предсказване на исхемия (установена на базата на интракоронарна ECG), следпроцедурна мионекроза (на основа на следпроцедурно повишаване на сТnТ над 5 пъти над горната референтна граница), краткосрочната и дългосрочната смъртност - всички те като последица от коронарна болест.

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

5.1.ВЕРИФИЦИРАНЕ НА ОСНОВНИТЕ АНАЛИТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ

Съгласно препоръките на CLSI (Институтът за клинични и лабораторни стандарти на САЩ) аналитичните характеристики на всички методи преди клиничното им приложение следва да бъдат експериментално потвърдени чрез изследване и предоставяне на обективни доказателства. Тези изисквания са посочени в два документа – EP05-A2 и EP15-A2.

CLSI EP15-A2(2005) е програма, предназначена за верифициране на методи, при които се използва аналитична платформа и реактиви на производител. Според документа минималните изисквания за верификация включват експериментална потвърждаване на следните ключови характеристики:

- аналитичен обхват (линейност)
- невъзпроизводимост
- недостоверност
- верифициране на референтни интервали

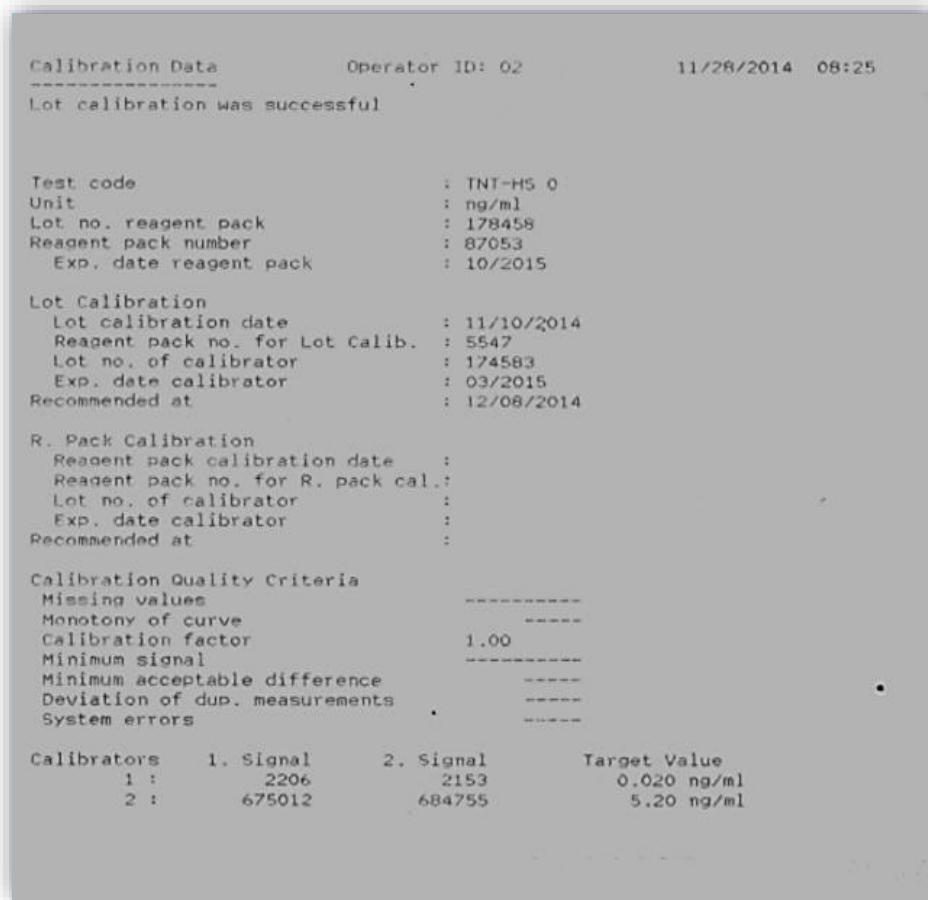
5.1.1. ВЕРИФИЦИРАНЕ НА ВИСОКОЧУВСТВИТЕЛЕН ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД С ЕЛЕКТРОХИМИЧНА ДЕТЕКЦИЯ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪРДЕЧЕН ТРОПОНИН Т

При започване на процедурата по верификация на метода е необходимо верифициране на калибрационната крива. Тя е специфична за всеки лот № , изготвена е от производител чрез използване на вътрешен стандарт.

В лабораторията се извършва верификация с два калибратора с обявени стойности. Те съдържат рекомбинантен човешки тропонин Т в два концентрационни диапазона (~ 20 ng/L и 5200 ng/L) в човешки серумен матрикс. Прицелните им стойности са определени чрез използване на условен стандарт на фирмата-производител, който не е проследим до стандарт от по-висок клас.

Съществува първичен референтен материал (SRM 2921) – произведен от HyTest Ltd - Troponin I-T-C Complex, избран от ААСС и предлаган от National Institute of Standards and Technology, но няма данни използвания стандарт от производителя да има проследимост до него.

Обявеният линеен обхват на метода е от 3-10 000 ng/L и е потвърден от нашите изследвания.



Фиг.10 Калибрация на метода за определяне на TnT_{hs}

Невъзпроизводимост на резултатите

За оценката на невъзпроизводимост бяха използвани контролни серуми от човешки произход в две концентрационни нива – PreciControl_{hs} TnT - lot № 172968 - level 1& 2.

Невъзпроизводимост в серия

По препоръка на CLSI тя бе определена в две концентрационни нива като в продължение на 5 дни са изследвани двойни проби за всеки материал. Резултатите са в таблица 13:

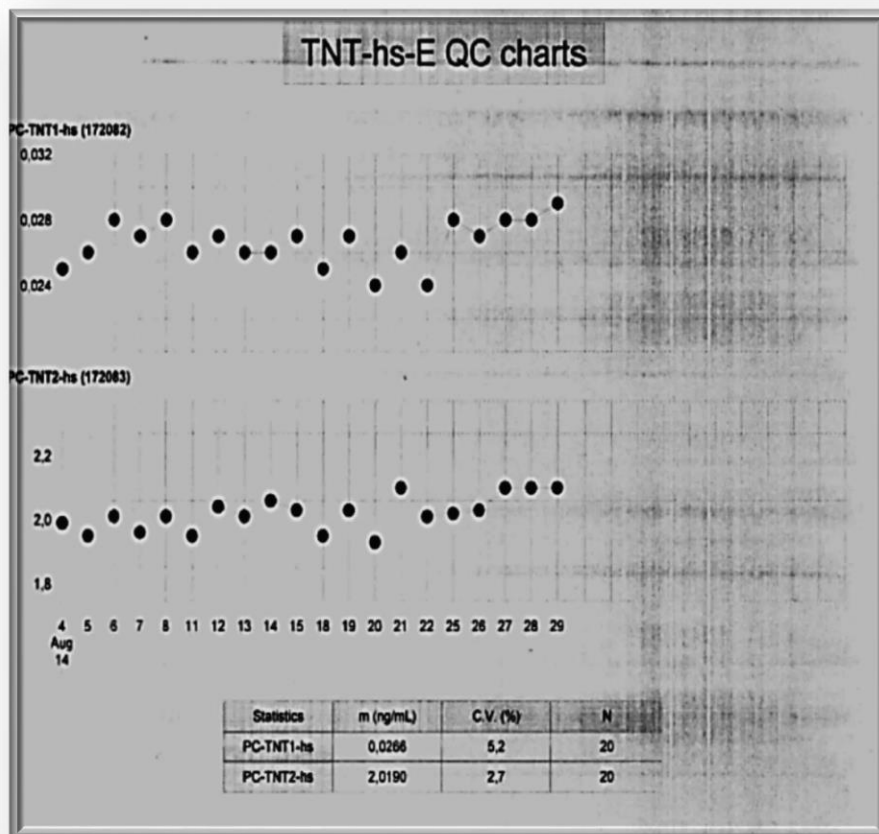
	1 проба	2 проба	разлика	SD	CV
<i>PC TNT1</i> №172968 0,025 ng/ml	0,026	0,027	0,001		
	0,028	0,027	0,001		
	0,027	0,027	0		
	0,028	0,027	0,001		
	0,026	0,027	0,001		
	$\bar{x} = 0,027$		0,001	0,000894	0,36 %
	1 проба	2 проба	разлика	SD	CV
<i>PC TNT2</i> 2,08 ng/ml	1,95	1,97	0,02		
	2,01	2,05	0,04		
	1,96	1,96	0		
	2,01	2,02	0,01		
	1,95	1,92	0,03		
	$\bar{x} = 1,98$		0,02	0,0085	0,43%

Табл.13 Невъзпроизводимост в серия- TnT hs (наши резултати)

Оценката на невъзпроизводимостта във време - направена е с помощта на посочените контролни серуми за период от 20 дни. Резултатите са представени в таблица 14 и графично като данни от ВЛКК чрез програмата MEDLAB QC (фиг.11) :

	N	Прицелна стойност (ng/ml)	Средна стойност (ng/ml)	CV%
<i>QC₁ - PC- TNT₁-hs (172968)</i>	20	0,025	0,0026	5,2%
<i>QC₂ - PC- TNT₂-hs (172968)</i>	20	2,08	2,0190	2,7%

Табл.14 Невъзпроизводимост във време - TnT hs (наши резултати)



Фигура 11. Невъзпроизводимост във време - ТпТ hs – резултати от ВЛКК (наши резултати)

Недостоверност - за оценка на недостоверността се използват 2 подхода:

- Използване на сравнителна процедура с пациентски проби, изследвани с референтен метод (или с друг рутинен метод с висока аналитична надеждност) и с изследвания аналитичен метод. Извършва се корелационен и регресионен анализ.
- С контролни материали с обявена прицелна стойност и допустими интервали в поне две нива - всеки контролен материал се изследва в двойни проби в продължение на 5 дни. Определя се

отклонението на средната аритметична стойност, получена в лабораторията, от обявената стойност на производителя - $d\%$ (bias) като мярка за недостоверност.

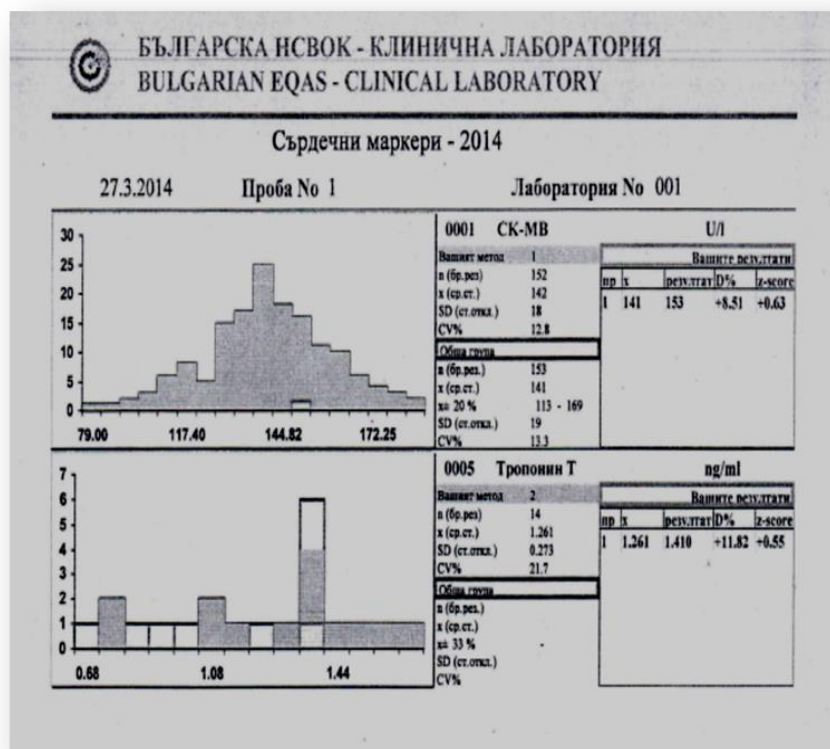
Оценката на недостоверност бе направена чрез използване на втория подход – изследвани са петкратно в двойни проби двете нива на PC- TnT (lot № 172968) level 1 със средна стойност 0,025 ng/ml и доверителен интервал 0.018 – 0.031 ng/ml и level 2 със средна стойност 2,08 ng/ml и доверителен интервал 1.77 – 2.39 ng/ml. Получените резултати са представени в таблица 15:

	Прицелна стойност ng/ml	Средна стойност ng/ml	Bias	Bias d %
<i>PC TNT1</i> <i>№172968</i>	0,025	0,027	0,002	8,0%
<i>PC TNT2</i> <i>№172968</i>	2,08	1,98	-0,1	- 4,8%

Табл.15 Недостоверност - TnT hs (наши резултати)

Получените от нас средни аритметични стойности попадат в доверителните интервали на производителя и се отклоняват в допустими граници.

Резултати от ВОК – лабораторията участва във система за ВОК .



Фигура 12. Резултати от ВОК .

Верификация на референтните интервали – съгласно препоръките на CLSI референтните интервали, посочени от производителя, също подлежат на верификация.

Тя се извършва с изследване на 20 здрави лица – мъже и жени. Ако не повече от 2 резултата са извън референтните интервали на производителя, се приема, че те са верифицирани и могат да се прилагат за клинични цели. Ако над 3 резултата са извън тях, се препоръчва лабораторията да изработи собствени референтни граници.

За потвърждаване на референтните стойности на производителя бяха подбрани 20 мъже и 20 жени на възраст от 20 до 56 години с верифицирано състояние на здраве, установено с клиничен преглед и извършен пакет от лабораторни изследвания. Данните от производителя и получените от нас резултати са показани на следващата таблица 16 :

<i>Данни на производител</i>	TnT hs (ECLIA)
<i>Автори, цитирани от производителя:</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 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;59:607-609. 2. Kampmann M, Rauscher T, Müller-Bardorff M, Münch M, Klein G, Katus H. Clinical Evaluation of Troponin T and CK-MB Mass on the Elecsys 2010 analyzer. Poster presented at Medlab 97, 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry, August 17-22, 1997, Basel, Switzerland.
<i>Брой изследвани лица</i>	533 души
<i>Референтен интервал</i>	< 0.014 ng/ml (99-ти перцентил)
<i>Наши данни</i>	
<i>Брой изследвани лица</i>	40
<i>Референтен интервал</i>	< 0.003 – 0.014 ng/ml

Табл.16 Верифициране на референтен интервал - TnT hs

Получените от нас резултати потвърждават референтния интервал на производителя.

5.1.2. ВЕРИФИЦИРАНЕ НА ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД С ЕЛЕКТРОХИМИЧНА ДЕТЕКЦИЯ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА NTproBNP

При започване на процедурата по верификация на метода първата стъпка е верифициране на калибрационната крива. Тя е специфична за всеки лот №, изготвена е от производителя чрез използване на вътрешен стандарт.

В лабораторията се извършва верификация с два калибратора с обявени стойности. Те съдържат лиофилизиран конски серумен матрикс с добавен синтетичен NT-proBNP в два концентрационни обхвата – 16 и 340 pmol/L. Прицелните им стойности са определени чрез използване на условен стандарт, който не е проследим до стандарт от по-висок клас.

Засега не е създаден първичен референтен стандарт - NIST си сътрудничи с IFCC по отношение стандартизацията на сърдечни маркери BNP и NT-proBNP. Първоначалните очаквания този проект да се окаже лесно осъществим, не се оправдаха - изследванията показват, че и двете молекули BNP и NT-proBNP са гликозилирани, със сложен пространствен строеж. Поради това създаването на такъв стандарт засега е във фокуса на текущите научни изследвания.

Линейният обхват на калибрационната крива е 5-35000 pg/mL или 0.6-4130 pmol/L, дефинирани от долния праг на детекция и максимума на еталонната крива. Нашите изследвания го потвърдиха.

Calibration Data		Operator ID: 02	11/28/2014 08:30

Lot calibration was successful			
Test code	:	PRO-BNP 1	
Unit	:	pmol/l	
Lot no. reagent pack	:	170574	
Reagent pack number	:	123894	
Exp. date reagent pack	:	04/2014	
Lot Calibration			
Lot calibration date	:	04/04/2014	
Reagent pack no. for Lot Calib.	:	123894	
Lot no. of calibrator	:	172615	
Exp. date calibrator	:	05/2014	
Recommended at	:	05/02/2014	
R. Pack Calibration			
Reagent pack calibration date	:	04/04/2014	
Reagent pack no. for R. pack cal.	:	123894	
Lot no. of calibrator	:	172615	
Exp. date calibrator	:	05/2014	
Recommended at	:	04/11/2014	
Calibration Quality Criteria			
Missing values	:	-----	
Monotony of curve	:	-----	
Calibration factor	:	1.00	
Minimum signal	:	-----	
Minimum acceptable difference	:	-----	
Deviation of dup. measurements	:	-----	
System errors	:	-----	
Calibrators			
	1. Signal	2. Signal	Target Value
1 :	3037	2975	16.67 pmol/l
2 :	52725	52679	340.5 pmol/l

Фигура 13. Калибрация на метода за определяне на NT-proBNP

Невъзпроизводимост на резултатите

За оценката на невъзпроизводимост бяха използване контролни серуми от човешки произход в две концентрационни нива – Preci Control Cardiac II - lot № 172342 - level 1 & level 2.

Невъзпроизводимост в серия

По препоръка на CLSI тя бе определена в две концентрационни нива като в продължение на 5 дни са изследвани двойни проби за всеки материал. Резултатите са отразени в таблица 17 :

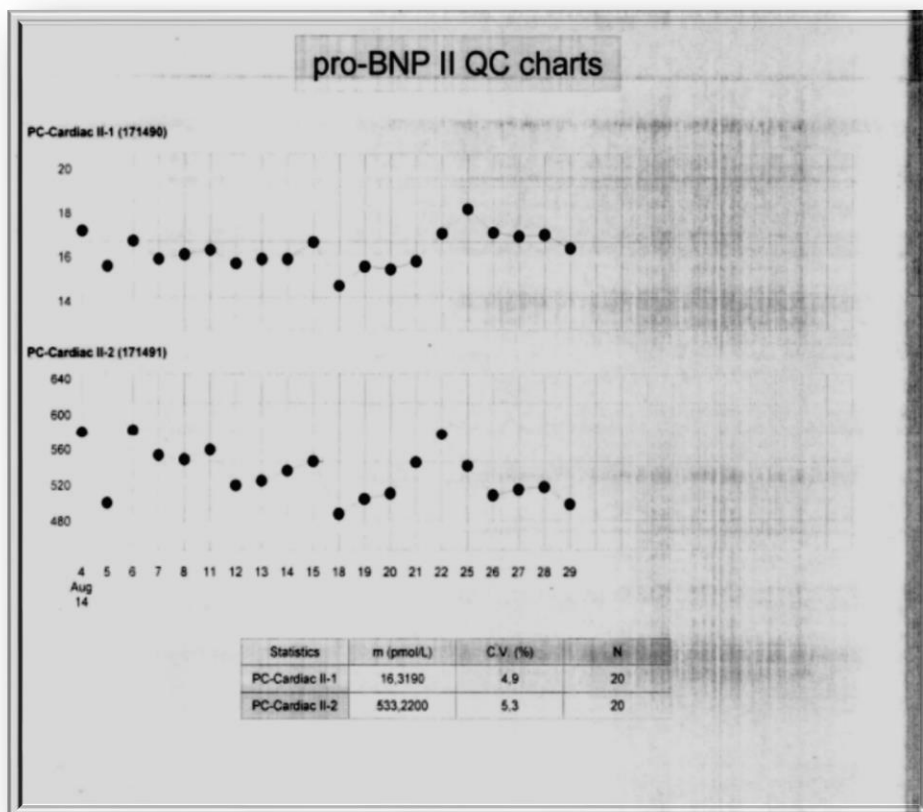
	1 проба	2 проба	разлика	SD	CV
<i>PC Cardiac II</i> <i>№172342</i> <i>16.7 pmol/L</i>	15.61	15.48	0.13		
	16.74	16.64	0.1		
	15.92	16.19	0.27		
	16.12	16.05	0.07		
	16.32	16.78	0.46		
	$\bar{x} = 16,18$		0.206	0.0921	0.56%
<i>PC Cardiac II</i> <i>№172342</i> <i>547 pmol/L</i>	500.3	520.3	20		
	582.5	567.1	15.4		
	553.4	556.8	3.4		
	548.8	552.9	4.1		
	559.8	552.3	7.5		
	$\bar{x} = 549,42$		10.08	4.84	0.88%

Табл.17. Невъзпроизводимост в серия - proBNP II

Оценката на невъзпроизводимостта във време - направена е с помощта на посочените контролни серуми за период от 20 дни. Резултатите са представени обобщено на таблица 18 и графично като данни от ВЛКК чрез програмата MEDLAB QC (фиг-14):

	N	Прицелна стойност	Средна стойност pmol/L)	CV %
<i>QC₁ - PC Cardiac II</i> <i>№172342</i>	20	16.7 13.7 – 19.7	16.31	4.9%
<i>QC₂ - PC Cardiac II</i> <i>№172342</i>	20	547 449 - 645	533.22	5.3%

Табл.18. Невъзпроизводимост във време - proBNP II



Фигура 14. Резултати от ВЛКК за определяне на NT-proBNP

Недостовърност - за оценката на недостовърност бяха изследвани петкратно в двойни проби двете нива на Preci Control Cardiac II - lot № 172342 - level 1 със средна стойност 16.7 и доверителен интервал 13.7 – 19.7 & level 2 със средна стойност 547 и доверителен интервал 449 - 645. Резултатите са представени в таблица 19:

	Прицелна стойност	Средна стойност	Bias	Bias d %
<i>PC Cardiac II №172342</i>	16.7 13.7 – 19.7	16.184	-0.51	-3.10%
<i>PC Cardiac II №172342</i>	547 449 - 645	549.42	2.42	0.44%

Табл.19 Недостовърност - proBNP II

Получените от нас средни аритметични стойности попадат в доверителните интервали на производителя и се отклоняват в допустими граници.

Верификация на референтните интервали – съгласно препоръките на CLSI бяха определени са нивата на NTproBNP в серуми от 20 здрави мъже и 20 здрави жени на възраст от 20 до 56 години. Получените резултати са показани на следващата таблица 20:

<i>Данни на производител</i>	proBNP II (ECLIA)
<i>Автори, цитирани от производителя:</i>	Albers S, et al. Clin Chem Lab Med 2006; 44(1):80-85. Januzzi JL, et al. European Heart Journal Advance Accesspublished November 17, 2005.
<i>Брой изследвани лица</i>	1981 души
<i>Референтен интервал</i>	< 17.5 pmol/L
<i>Наши данни:</i>	
<i>Брой изследвани лица</i>	40
<i>Референтен интервал</i>	1.1 – 10.39 pmol/L

Табл.20 Верифициране на референтен интервал - proBNP II

Получените от нас резултати попадат в референтния интервал на производителя и го потвърждават.

5.1.3. ИМУНОХИМИЧЕН МЕТОД С ЕЛЕКТРОХИМИЧНА ДЕТЕКЦИЯ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА PAPP-A

При започване на процедурата по верификация на метода е необходимо верифициране на калибрационната крива. Тя е специфична за всеки лот №, изготвена е от фирмата – производител чрез използване на вътрешен стандарт.

В лабораторията се извършва верификация с 2 калибратора с обявени стойности. Съдържанието им е лиофилизиран човешки серум с добавен PAPP-A от човешка плацента в два концентрационни обхвата - 75 mIU/L и 2500 mIU/L в човешки серумен матрикс. Прицелните им стойности са определени чрез използване на вторичен стандарт на производителя, проследим до първичен референтен материал като е използвана платформата Kryptor (BRAHMS). Съществуващият първичен референтен материал IRP 78/610 for Free Beta hCG and PAPP-A (WHO International Laboratory for Biological Standards, Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark) е създаден през 1983г.

```

Lot calibration was successful

Test code           : PAPP-A 0
Unit                : mIU/l
Lot no. reagent pack : 173095
Reagent pack number : 2877
Exp. date reagent pack : 10/2014

Lot Calibration
Lot calibration date : 06/27/2014
Reagent pack no. for Lot Calib. : 2877
Lot no. of calibrator : 172371
Exp. date calibrator : 08/2014
Recommended at      : 07/25/2014

R. Pack Calibration
Reagent pack calibration date : 06/27/2014
Reagent pack no. for R. pack cal.: 2877
Lot no. of calibrator : 172371
Exp. date calibrator : 08/2014
Recommended at      : 07/04/2014

Calibration Quality Criteria
Missing values           -----
Monotony of curve       -----
Calibration factor      1.00
Minimum signal          -----
Minimum acceptable difference -----
Deviation of dup. measurements -----
System errors           -----

Calibrators   1. Signal   2. Signal   Target Value
1 :           6868      6799        74.90 mIU/l
2 :          204251    217315       2470 mIU/l

```

Фигура 15. Калибрация на метода за определяне на PAPPА

Обявеният линеен обхват на метода е от 4-10 000 mIU/L и е потвърден от нашите изследвания.

Невъзпроизводимост на резултатите

За оценката на невъзпроизводимост бяха използване контролни серуми от човешки произход в три концентрационни нива – PreciControl Maternal Care 1, 2 & 3 - lot № 173842.

Невъзпроизводимост в серия

По препоръка на CLSI тя бе определена в три концентрационни нива като в продължение на 5 дни са изследвани двойни проби за всеки материал. Резултатите са отразени в в таблица 21:

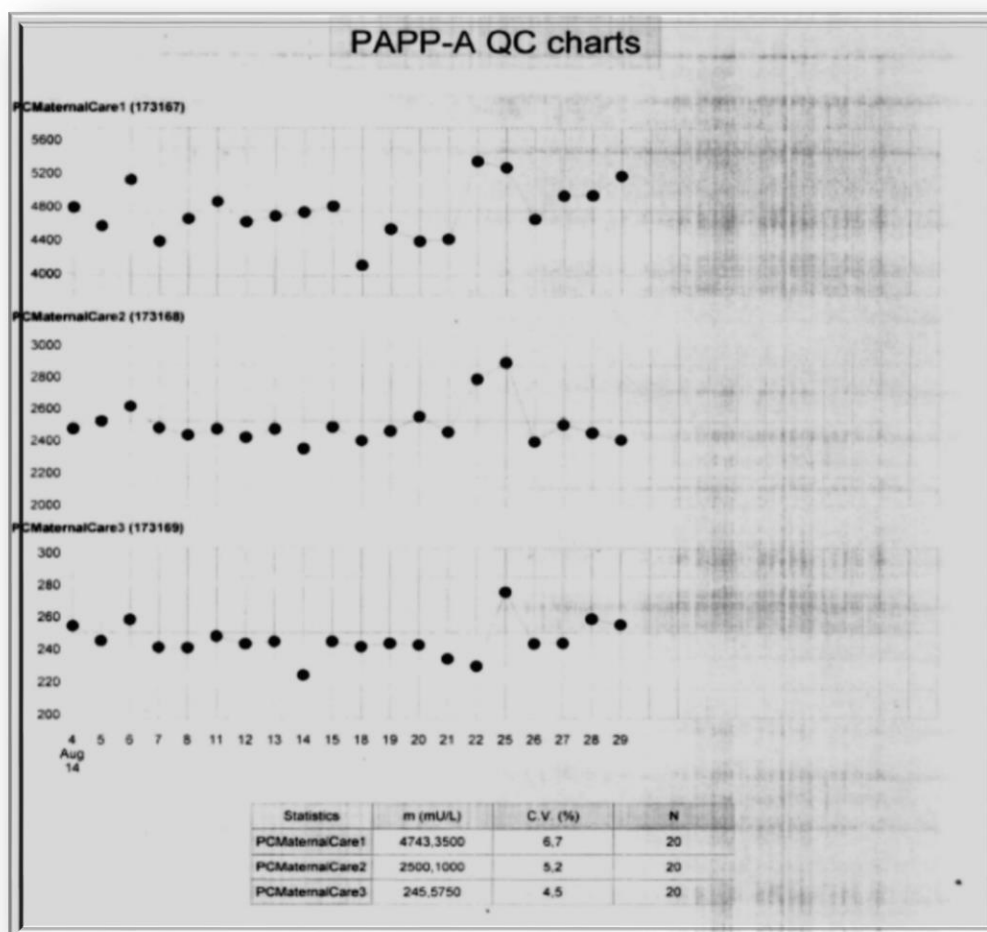
	1 проба	2 проба	разлика	SD	CV
<i>PC Maternal Care 1</i> <i>lot № 173842</i> 4740 mIU/L	4565	4579	14		
	5121	4807	314		
	4381	4463	82		
	4653	4675	22		
	4858	4668	190		
	$\bar{x} = 4677,7$		124.4	55.63	1.19%
<i>PC Maternal Care 2</i> <i>lot № 173842</i> 2520 mIU/L	2341	2535	194		
	2614	2403	211		
	2478	2319	159		
	2435	2543	108		
	2472	2414	58		
	$\bar{x} = 2455$		146	65.29	2.60%
<i>PC Maternal Care 3</i> <i>lot № 173842</i> 250 mIU/L	245.1	245.8	0.7		
	258.3	247.7	10.6		
	241	242.2	1.2		
	240.8	254.3	13.5		
	248	240.3	7.7		
	$\bar{x} = 246,35$		6.74	3.014	1.20%

Табл.21. Невъзпроизводимост във серия - PAPP-A

Оценката на невъзпроизводимостта във време - направена е с помощта на посочените контролни серуми за период от 20 дни. Резултатите са представени графично като данни от ВЛКК чрез програмата MEDLAB QC на фигура 16 и обобщено на таблица 22:

lot № 173842	N	Value mIU/L	Mean. mIU/L	CV
QC ₁ - PC Maternal Care 1	20	4740 3745-5735	4743.35	6.7 %
QC ₂ - PC Maternal Care 2	20	2520 1991-3049	2500.1	5.2 %
QC ₃ - PC Maternal Care 3	20	250 198-303	245.57	4.5 %

Табл.22 Невъзпроизводимост във време- PAPP-A



Фигура 16. Резултати от ВЛКК – метод за определяне на PAPP-A

Недостоверност - за оценка на недостоверността са изследвани петкратно в двойни проби трите нива на PC Maternal Care - lot № 173842 - level 1 със средна стойност 4740 mIU/L и доверителен интервал 3745-5735 mIU/L & level 2 със средна стойност 2520 mIU/L и доверителен интервал 1991-3049 mIU/L & level 3 със средна стойност 250 mIU/L и доверителен интервал 198-303 mIU/L. Определено бе отклонението на средната аритметична стойност, получена в лабораторията, от обявената стойност на производителя - d%(bias) като мярка за недостоверност.

Резултатите са представени в таблица 23:

<i>lot №173842</i>	Прицелна стойност	Средна стойност	Bias	Bias d %
<i>PC Maternal Care 1</i>	4740 3745-5735	4677	-59.00	-1.24%
<i>PC Maternal Care 2</i>	2520 1991-3049	2455.3	-64.60	-2.56%
<i>PC Maternal Care 3</i>	250 198-303	246.3	-3.68	-1.47%

Табл.23 Недостоверност - PAPP-A

Получените от нас средни аритметични стойности попадат в доверителните интервали на производителя и се отклоняват в допустими граници.

Верификация на референтните интервали – съгласно препоръките на CLSI бяха подбрани 20 здрави мъже и 20 здрави небременни жени на възраст от 20 до 56 години. Изследвани са нивата на PAPP-A - получените резултати са показани на таблица 24 като те попадат в интервала на производителя и го потвърждават.

<i>Данни на производител</i>	PAPP-A (ECLIA)
	Собствено изследване на производителя № R04P026
<i>Брой изследвани лица:</i>	500 души
<i>Референтен интервал</i>	< 7,15 mIU/L (95-ти перцентил)
<i>Наши данни</i>	
<i>Брой изследвани лица</i>	40
<i>Референтен интервал</i>	4,0 – 7,06 mIU/L

Табл.24 Верифициране на референтен интервал - PAPP-A

5.2 КЛИНИЧНИ РЕЗУЛТАТИ:

Ангиографски и процедурни характеристики

Основните ангиографски характеристики на двете групи пациенти – с комплексни и некомплексни лезии – са показани на таблица 25:

<i>Променлива</i>	Комплексни	Некомплексни	p
<i>MV RVD, mm</i>	3.43±.30	3.16±.42	0.001
<i>MV %DS pre, %</i>	54±27	73±15	0.001
<i>MV %DS post, %</i>	2±5	2±5	n.s.
<i>MB RVD, mm</i>	3.10±.28	3.09±.31	n.s.
<i>MB %DS pre, %</i>	67±18	75±11	0.053
<i>MB %DS post, %</i>	0±3	0±2	n.s.
<i>SB RVD, mm</i>	2.35±.33		n.s.
<i>SB %DS pre, %</i>	45±26		n.s.
<i>SB %DS post, %</i>	49±28		n.s.
<i>BARI risk score</i>	51±16	41±19	0.009
<i>APPROACH risk score</i>	50±16	40±19	0.008
<i>SYNTAX risk score</i>	12±13	7±4	0.019
<i>Многоклонова болест, %</i>	53	58	n.s.

Таблица 25. Ангиографски характеристики на пациентските групи.

Легенда: RVD – референтен диаметър на съда; MV - основен съд, проксимален сегмент, MB - основен клон, дистален сегмент, SB - страничен клон,% DS - диаметър на стеноза mm (в проценти)

В обобщен вид - очаквано групата с некомплексни лезии има по-нисък индекс на сложност на коронарната артериална болест - по-ниски рискови индекси SYNTAX SCORE, BARI и APPROACH.

Финалният ангиографски резултат е практически еднакъв при двете групи. Това, заедно с факта, че рисковите профили на двете групи са

сходни, обяснява защо сама по себе си комплексността на лезиите не е предиктор за крайния изход, специално при определянето на смъртността в средносрочен аспект.

Основните процедурни характеристики са изведени в таблица 26:

<i>Променлива</i>	Комплексни	Некомплексни	p
<i>Диаметър на стент проксимален, mm</i>	3.25±.35	3.21±.39	n.s.
<i>Диаметър на стент, дистален, mm</i>	3.05±.35	3.12±.39	n.s.
<i>Дължина на стент, mm</i>	33±19	27±15	n.s.
<i>Налягане при имплантиране на стента, atm.</i>	13±2	14±2	n.s.
<i>Постдилатация, %</i>	51	29	0.037
<i>Контраст, ml</i>	285±103	250±63	0.040
<i>Процедурно време, min</i>	77±30	53±19	0.001
<i>Време за флуороскопия, min</i>	20±12	16±10	0.047
<i>Запушване на вторичен клон, %</i>	6	3	n.s.

Таблица 26. Процедурни характеристики

Както се вижда пациентите с комплексни лезии имат по-дълготраещи и технически по трудни за изпълнение процедури - повече време за процедурата, по-голям обем контраст, повече време за флуороскопия както и нужда от постдилатация като разликите са статистически значими.

Промените в биохимичните маркери при двете групи пациенти са отразени на таблица 27.

Променлива	Комплексни	Некомплексни	P
СК ₁	121±81	164±154	0.066
СК ₂	134±102	160±145	n.s.
СКМВ ₁	19±21	20±15	n.s.
СКМВ ₂	18±8	20±13	n.s.
Tn T ₁	.022±.064	.040±.118	n.s.
Tn T ₂	.063±.079	.069±.181	n.s.
NTproBNP ₁	76±128	73±111	n.s.
NTproBNP ₂	87±147	74±116	n.s.
PAPPA ₁	5.63±2.63	7.40±6.57	n.s.
PAPPA ₂	6.59±3.67	7.49±6.57	n.s.
hsCRP ₁	6.24±16.60	4.70±5.66	n.s.
hsCRP ₂	7.49±14.54	5.59±4.43	n.s.
ΔСК	13±95	03±64	0.088
ΔСК%	31±114	4±31	0.065
ΔСКМВ	1±22	1±5	n.s.
ΔСКМВ%	12±52	10±31	n.s.
ΔTn	.046±.085	.029±.127	n.s.
ΔTn%	792±180	219±298	0.012
ΔNTproBNP	11±50	1±25	n.s.
ΔNTproBNP%	47±112	23±53	n.s.
ΔPAPPA	.96±2.48	.09±2.24	0.086
ΔPAPPA%	18±36	8±22	n.s.
ΔhsCRP	1.26±7.22	.89±4.12	n.s.
ΔhsCRP%	92±246	51±124	n.s.

Таблица 27. Стойности на биохимичните сърдечни маркери преди и след PCI.

Легенда: СК – креатинфосфокиназа, СКМВ – МВ фракция на СК, Tn – тропонин,

ΔСК = СК₂ – СК₁ – процедурна промяна в СК, в абсолютни единици

ΔСК% = [(ΔСК/СК₁) – 1]x100 – процентна процедурна промяна в СК, в проценти

Същата формула е използвана за изчисляване на абсолютните и относителни промени в ензимите и останалите белтъчни маркери след интервенцията.

При статистическият анализ на биохимичните маркери в групата като цяло се наблюдава очаквано статистически значима промяна в стойностите на hs cTNT ($+0.037 \pm 0.094$, $p < 0.001$) както и в концентрацията на PAPPА ($+0.70 \pm 2.44$, $p = 0.004$); има силна тенденция за значимо покачване на концентрациите на NTproBNP и hsCRP ($p = 0.060$ и 0.072), но без те да достигат статистическа значимост.

Това означава, че PCI сам по себе си, без значение дали пациентите са с комплексни или некомплексни лезии, индуцира малки (но винаги статистически значими) покачвания на тропонина както и покачва риска от дестабилизация на плаките.

При сравнение на комплексните с некомплексни пациенти се установява, че промяната в основният маркерите за некроза - Δ cTnT% е значимо по-висока в първата група, което означава повече исхемия по време на процедурата и по-честа миокардна некроза следпроцедурно за групата с комплексни лезии.

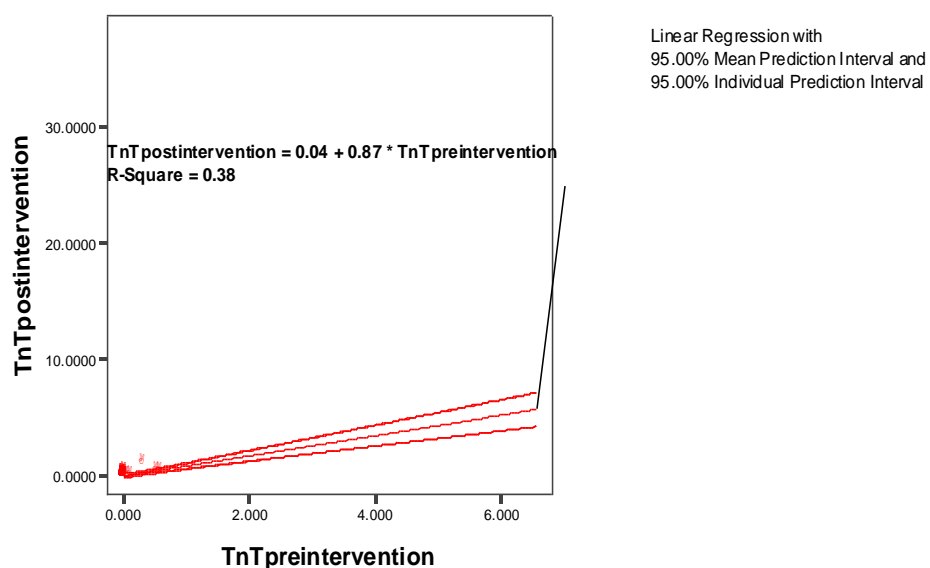
Маркерни взаимоотношения:

Съществува статистически значима висока до много висока положителна корелация на почти всички маркери (с изключение на СКМВ) преди и след PCI (таблица 28) – по-високите базисни нива на всички маркери са свързани и с по-високи нива след процедурата. Корелационните взаимоотношения между маркерите са интересни и са отразени на таблица 28. Извършен е и линейно-регресионен анализ на

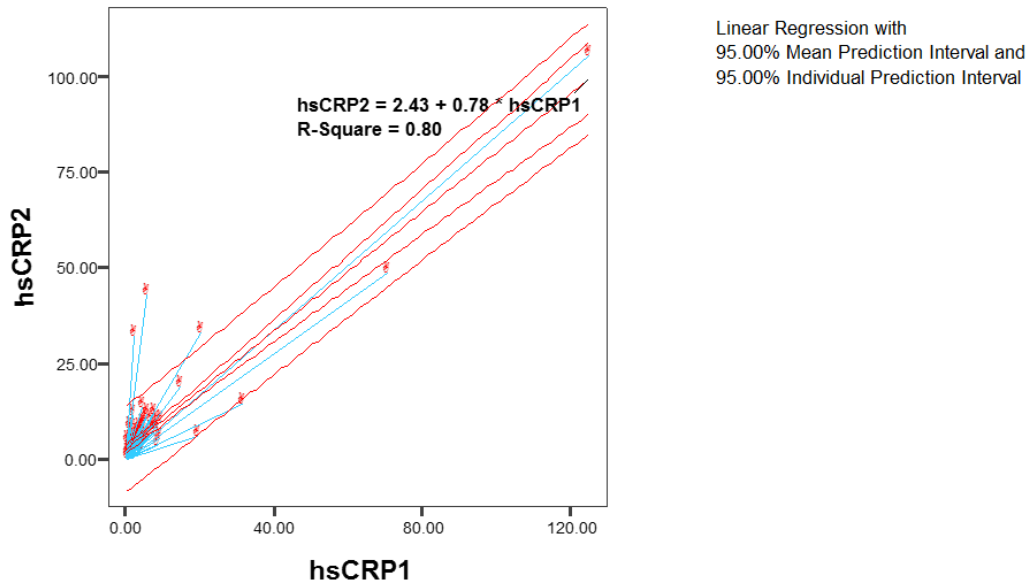
тези отношения като резултатите от него са изведени като фигури 17,18 19,20,21,22,23 и 24.

Таблица 28. Двойки биохимични маркери преди и след РСІ със статистически значима корелация.

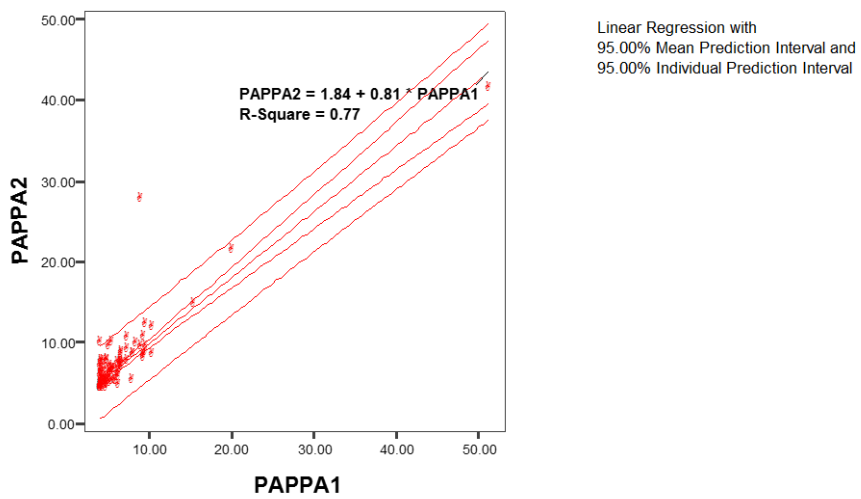
	Двойки маркери	N	Коефициент на корелация	Ниво на значимост
1	cTnT ₁ /cTnT ₂	101	0.616	0.000
2	CPK ₁ /CPK ₂	101	0.709	0.000
3	CKMB ₁ /CKMB ₂	99	0.357	0.000
4	NTproBNP ₁ /NTproBNP ₂	103	0.950	0.000
5	PAPP-A ₁ /PAPP-A ₂	103	0.880	0.000
6	CRP ₁ /CRP ₂	103	0.892	0.000



Фигура 17...Линейна регресия между базовите и постпроцедурните нива на тропонин Т



Фигура 18...Линейна регресия между базовите и следпроцедурните нива за CRP



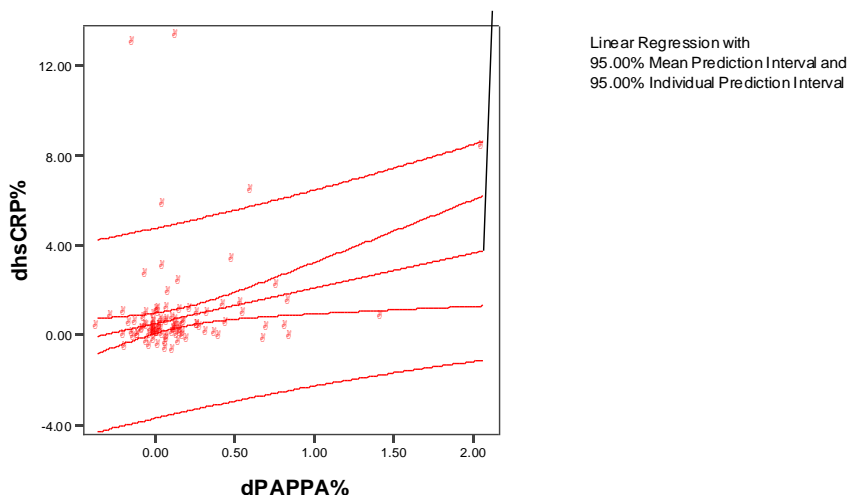
Фигура 19. Линейна регресия между базовите и следпроцедурните нива на PAPP-A

Интересни са и следващите междумаркерни корелации :

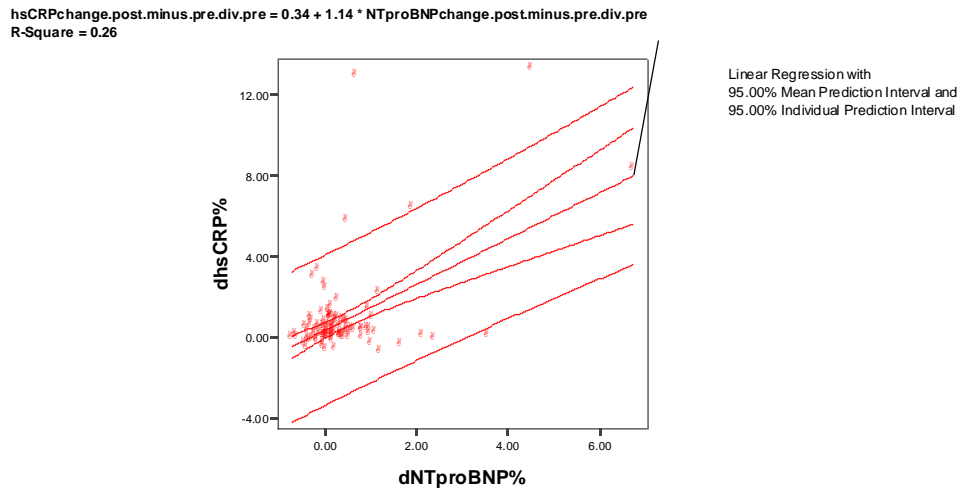
hsCRP - има положителна корелация със следпроцедурните стойности на тропонин T/TnT₂/ ($r = 0.269$, $p = 0.006$ за базовите стойности на CRP и $r = 0.186$, $p = 0.060$ за след PCI), но не и с базовите стойности на hs cTnT₁. Това може да се интерпретира като възникване на възпаление от самата интервенция.

- Δ hsCRP и Δ hsCRP % корелират слабо до умерено положително с NTproBNP₂ стойностите ($r = 0.217$, $p = 0.028$ и $r = 0.214$, $p = 0.030$), което ни позволява да направим асоциацията, че възпалителните маркери са в синхрон с левокамерната дисфункция, изразена чрез увеличение на NTproBNP след PCI.

hsCRPchange.post.minus.pre.div.pre = 0.56 + 1.56 * PAPPACHange.post.minus.pre.div.pre
R-Square = 0.06

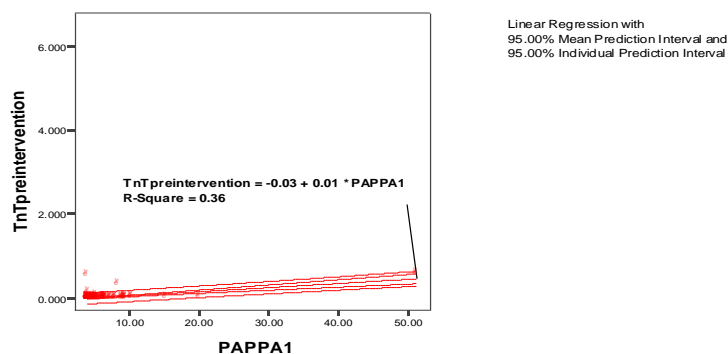


Фигура 20. Линейна регресия между средната промяна(Δ) на CRP и PAPPa%



Фигура 21. Линейна регресия между средната промяна(Δ) на CRP и NTproBNP %

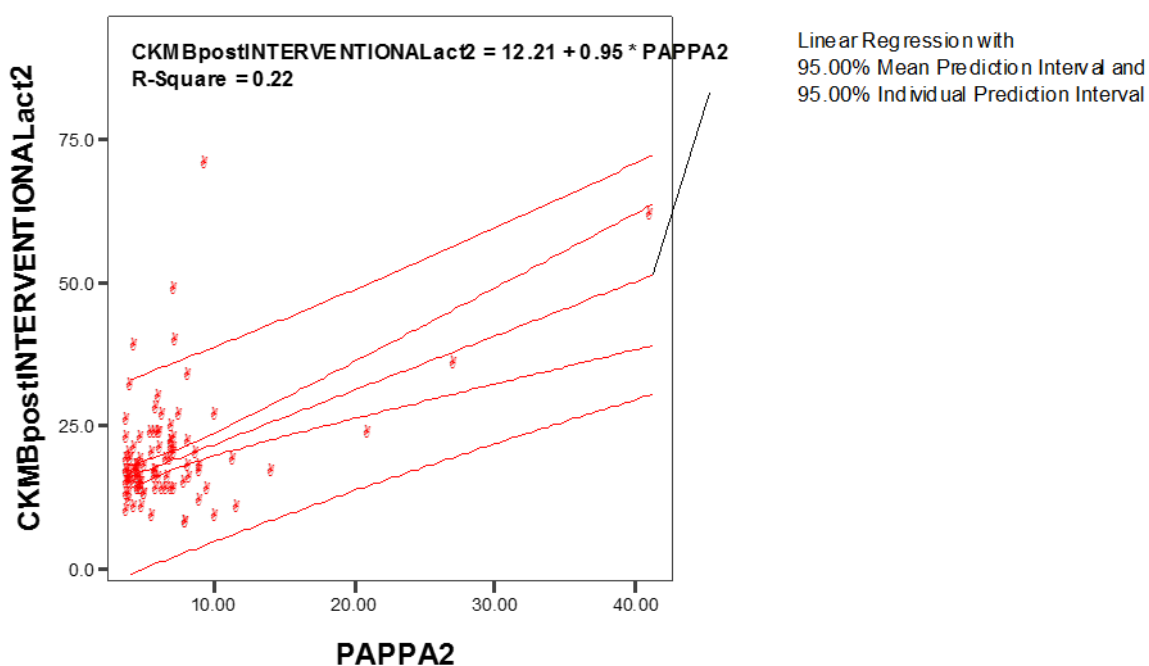
- PAPP-A - базисните стойности /PAPP-A₁/ показват значителна положителна корелация с базовите стойности на тропонин /hs cTnT₁/ ($r = 0.600$, $p = 0.001$, фигура 22), умерена положителна корелация с СК₁ и СКМВ₁ ($r^2 = 0.263$, $p = 0.007$ и съответно $r = 0.302$, $p = 0.002$) както и с постпроцедурните им нива, като корелацията е по-добра с постпроцедурните СКМВ₂ стойности, отколкото с hs cTnT₂ ($r = 0.426$, $p < 0.001$ срещу $r = 0.285$, $p = 0.004$).



Фигура 22. Линейна регресия между базовите нива на PAPP₁ и hs cTnT₁

Първоначалните стойности на PAPP-A не корелират нито с предварителните, нито с постпроцедурните стойности за NTproBNP и hsCRP; нямаше връзка и с промените им (делта-стойностите).

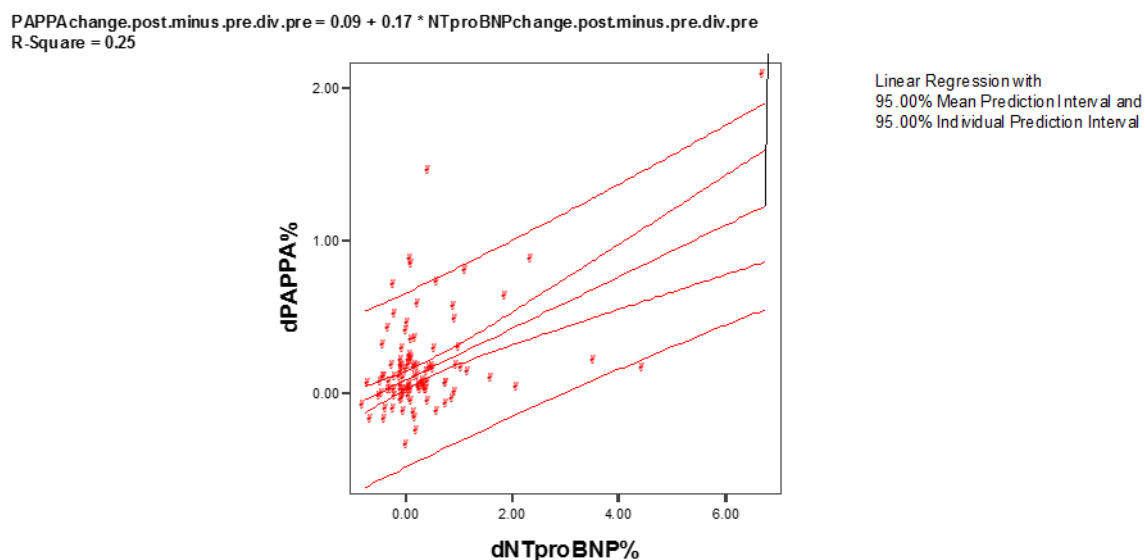
Стойностите на PAPP-A след PCI /PAPP-A₂/ показват също умерена положителна корелация с базовите стойности на hs cTnT₁ и отново корелират по-добре (значително положително) със СКМВ₂, отколкото с hs cTnT₂ ($r = 0.473$, $p < 0.001$ срещу $r = 0.342$, $p = 0.002$).



Фигура 23. Линејна регресија меѓу постпроцедурните нива на PAPP-A и СК-МВ

PAPP-A₂ корелира обаче значително с Δ NTproBNP и Δ PAPPA ($p < .001$ и за двата), но не и с промените в hsCRP.

Интересно е да се отбележи, че има положителна корелация и между Δ PAPPA% с промяната на тропониновите нива $|\Delta$ TnT/ като абсолютни стойности и в проценти ($r = 0.278$, $p = 0.002$).



Фигура 24. Линейна регресия между средната промяна (Δ) на PAPPA и NTproBNP (в%)

- NTproBNP – базисните-NTproBNP₁ и постпроцедурните-NTproBNP₂-стойности корелират значимо с базисните и постпроцедурните стойности

на hs cTnT_{1,2}/ ($p < 0.001$), което потвърждава тесната връзка между миокардната некроза и левокамерната дисфункция.

- Промяната в общата СК / Δ СК/ и СКМВ фракция / Δ СКМВ/ корелира умерено до значимо положително с Δ NTproBNP%, Δ РАРРА% and Δ hsCRP% (с коефициенти на корелация r между 0.278 и 0.512, при $p < 0.05$). Това вероятно се обяснява с факта, че повишаването на СК и СКМВ отразява реалната некроза на миокардните клетки, която индуцира възпалителен отговор.

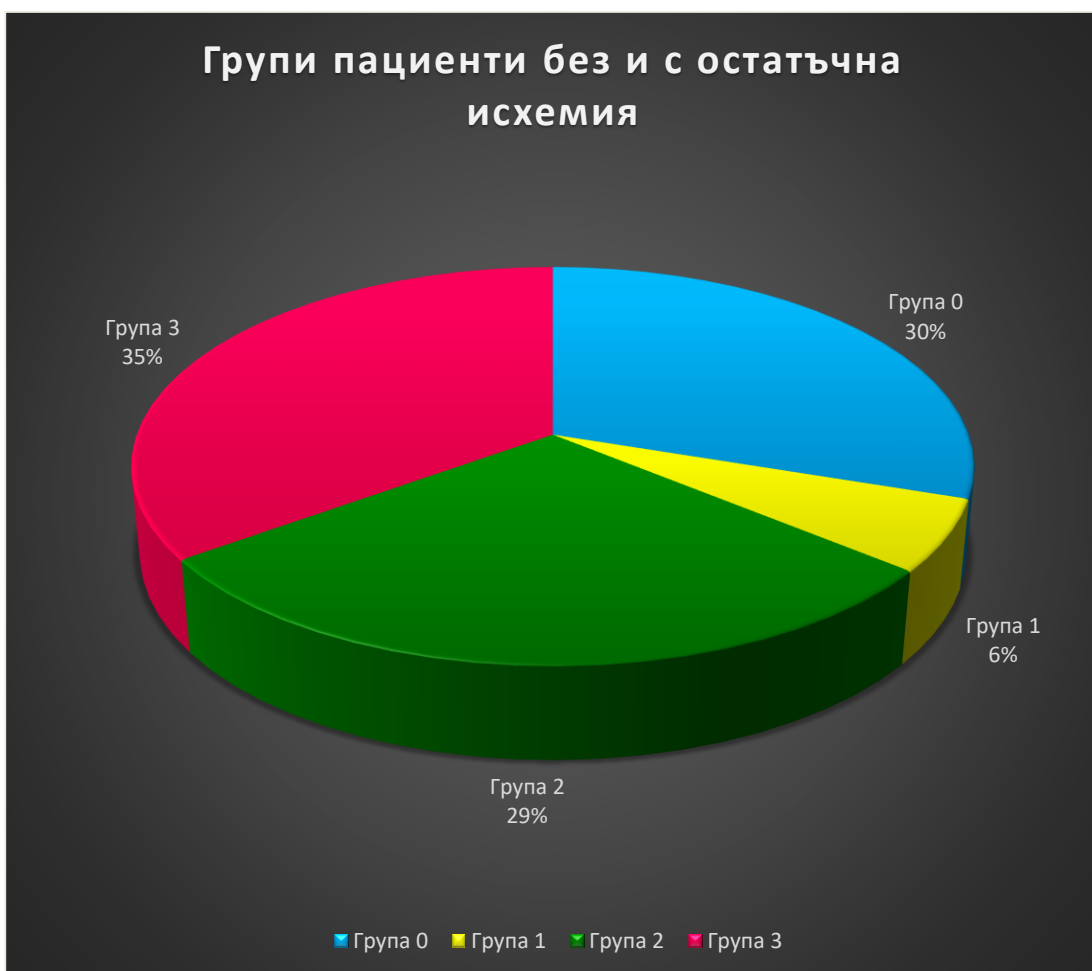
II. Извеждане на предиктори на исхемия и изясняване на връзката между промените в биохимичните маркери и промените в icЕКГ

Промените в интракоронарната електрокардиограма (icECG) могат да бъдат разделени според региона, където се наблюдават промените.

- **Група 0** - тези без промени в icECG в края на PCI
- **Група 1** - тези с промени (елевация на ST-сегмента повече от 1 мм) върху крайната icECG от региона на страничен клон
- **Група 2** - тези с промени (устойчива ST-сегментна елевация над 1 мм) на крайния icECG от региона на главния клон
- **Група 3** - тези с промени (персистираща ST-сегментна елевация над 1 мм) върху крайната icECG от участъци, кръвоснабдявани от основните и странични съдове.

От общо 103 души пациентска група - 72 пациенти (70%) са имали поне една остатъчна исхемична промяна на крайния icECG .

- 31 (30%) не са имали промени - група 0;
- 6 (6 %) са имали промени в регион на страничен клон, група 1
- 30 (29%) - промени в областта на главен съдов регион (група 2)
- 36 (35%) - промени в главни и странични клонове (група 3)



Диаграма 1.Разпределение на групите пациенти без и със остатъчна исхемия

Клиничните, ангиографски и процедурни характеристики на четирите групи са представени на таблици 29, 30 и 31.

<i>Променлива</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>p</i>
<i>Пол, % мъже</i>	58	50	63	69	n.s.
<i>Възраст, години</i>	67±9	68±6	68±9	66±10	n.s.
<i>Хипертония, %</i>	100	100	100	100	n.s.
<i>Дислипидемия, %</i>	87	100	100	92	n.s.
<i>Диабет, %</i>	45	50	40	29	n.s.
<i>Пушене, %</i>	100	50	58	85	0.020
<i>Фамилна история за ранна атеросклеротична болест %</i>	62	100	60	92	n.s.
<i>Тумори %</i>	10	0	20	6	n.s.
<i>ХОББ %</i>	6	33	10	8	n.s.
<i>Бъбречни увреди %</i>	29	17	33	23	n.s.
<i>Прекаран МИ, %</i>	13	50	17	14	n.s.
<i>Предишна PCI, %</i>	52	67	37	33	n.s.
<i>PAD (периферна артериална болест), %</i>	16	0	7	8	n.s.
<i>Каротидна артериална болест %</i>	3	17	3	6	n.s.
<i>Мозъчно-съдова болест, %</i>	10	17	17	19	n.s.

Таблица 29. Клинични характеристики на 4-те групи пациенти с финални исхемични промени в icECG

Както се вижда от таблицата, няма съществена разлика между основния рисков профил на групите.

Table 30. Ангиографски характеристики

Променлива	0	1	2	3	p
<i>MV RVD, mm</i>	3.31±.46	3.46±.33	3.25±.36	3.44±.32	n.s.
<i>MV %DS pre, %</i>	67±19	44±25	60±27	54±28	0.076
<i>MV %DS post, %</i>	2±5	0±0	1±3	3±7	n.s.
<i>MB RVD, mm</i>	3.02±.24	3.13±.31	3.08±.29	3.11±.32	n.s.
<i>MB %DS pre, %</i>	71±10	64±20	77±9	65±23	0.087
<i>MB %DS post, %</i>	0±0	0±0	1±3	1±4	n.s.
<i>SB RVD, mm</i>	2.37±.88	2.54±.40	2.20±.31	2.37±.34	n.s.
<i>SB %DS pre, %</i>	50±25	52±30	26±23	47±25	0.043
<i>SB %DS post, %</i>	53±30	23±28	53±24	48±28	0.125
<i>BARI risk score</i>	47±16	46±12	44±17	51±18	n.s.
<i>APPROACH score</i>	46±16	47±15	44±17	51±18	n.s.
<i>SYNTAX score</i>	9±4	11±4	8±4	14±18	0.113
<i>Многоклонова болест, %</i>	61	17	43	64	0.078
<i>Запушване на вторичен клон %</i>	3	0	0	11	n.s.

Налагат се няколко важни изводи, свързани с ангиографските характеристики - повишената сложност на лезията, изразена като по-високи рискови индекси SYNTAX, BARI и APPROACH както и наличието на многоклоново засягане води до по-честа и по-широко разпространена остатъчна исхемия в края на PCI - всички рискови резултати са по-високи в група 3 и в същата група честотата на запушване на вторични малки клони е най-висока.

<i>Променлива</i>	0	1	2	3	p
<i>Диаметър на стент проксимален, mm</i>	3.23±.38	3.5±.47	3.16±.29	3.26±.37	n.s.
<i>Диаметър на стент, дистален, mm</i>	3.09±.39	3.06±.31	3.00±.33	3.11±.37	n.s.
<i>Дължина на стент, mm</i>	31±18	44±27	30±19	30±16	n.s.
<i>Налягане при имплантиране на стента, atm.</i>	13±2	13±1	14±2	13±2	n.s.
<i>Постдилатация, %</i>	42	67	40	47	n.s.
<i>Контраст, ml</i>	251±85	400±100	262±68	287±105	0.006
<i>Процедурно време, min</i>	66±26	105±66	61±22	77±25	0.005
<i>Време за флуороскопия, min</i>	17±4	26±20	16±5	17±7	0.001

Таблица 31. Процедурни характеристики.

Има ясен градиент в сложността на процедурите при пациентите без промени в ST-сегмента на icECG и тези, при които има промени в главни и странични клонове – те са с по-дълготраещи процедури, при тях се използва по-голямо количество контраст и е необходимо повече време за флуороскопия. Очевидно включването на страничните клонове в лезиите увеличава сложността на процедурата.

<i>Променлива</i>	0	1	2	3	P
<i>CK₁</i>	119±65	122±104	135±109	147±140	n.s.
<i>CK₂</i>	122±66	119±105	143±108	163±157	n.s.
<i>CKMB₁</i>	16±5	44±70	18±12	18±11	0.012
<i>CKMB₂</i>	17±5	19±11	20±11	19±12	n.s.
<i>TnT₁</i>	.029±.096	.026±.046	.031±.107	.023±.053	n.s.
<i>TnT₂</i>	.049±.073	.097±.088	.043±.066	.094±.177	n.s.
<i>NTproBNP₁</i>	46±68	75±79	123±192	59±76	0.077
<i>NTproBNP₂</i>	51±77	79± 64	129± 209	73± 106	n.s.
<i>PAPPA₁</i>	6.11± 4.96	4.73± 1.26	7.07± 8.71	5.69± 1.53	n.s.
<i>PAPPA₂</i>	6.97± 4.96	6.09± 1.77	7.47± 6.84	6.39± 1.99	n.s.
<i>hsCRP₁</i>	7.36± 13.49	2.84± 1.84	3.84± 2.69	6.51± 20.45	n.s.
<i>hsCRP₂</i>	7.14± 9.87	4.57± 2.04	6.45± 7.93	7.53± 17.61	n.s.
<i>ΔCK</i>	4±67	3±149	8±96	15±85	n.s.
<i>ΔCK%</i>	13±69	47±189	16±76	33±114	n.s.
<i>ΔCKMB</i>	1±5	-30±78	2±6	1±8	0.002
<i>ΔCKMB%</i>	8±28	12±123	15±34	10±52	0.002
<i>ΔTnT</i>	.020±.063	.068±.104	.011±.049	.079±.139	0.019
<i>ΔTnT%</i>	480±1352	1446±2335	304±457	869±2035	n.s.
<i>ΔNTproBNP</i>	4±26	4±17	6±56	14±48	n.s.
<i>ΔNTproBNP%</i>	49±135	21±24	29±64	45±93	n.s.
<i>ΔPAPPA</i>	.87±3.41	1.37±.93	.40±2.36	.69±1.55	n.s.
<i>ΔPAPPA%</i>	14±40	29±19	16±27	14±32	n.s.
<i>ΔhsCRP</i>	-.22±6.59	1.73±1.76	2.61±6.90	1.02±6.30	n.s.
<i>ΔhsCRP%</i>	56±179	105±117	63±131	111±302	n.s.

Таблица 32. Промените в биохимичните маркери при различните исхемични групи:

Налагат се и няколко важни заключения по отношение на биохимичните маркери при 4-те групи пациенти (отразени в табл.32) :

- Всички пациенти с промени в ST-сегмента в края на PCI имат по-високи СКМВ и NTproBNP в началото на PCI. Комбинацията от тези маркери може да бъде клиничен предупредителен знак за процедурни проблеми. Възможно е тези пациенти да имат скрита дисфункция на лявата камера, която се влошава по време на интервенцията.
- Промените в hs cTNT и СКМВ са по-високи при комбинираната 3 група и група 1 с остатъчна исхемия от страничен клон. Това означава, че включването на страничните клонове е показател за по-висок от обичайния риск за постпроцедурни усложнения.

При многовариантен регресионен анализ (с характеристиките на модела: $-2LL = 93.517$, C & S $R^2 = 0.246$, Nagelkerke $R^2 = 0.348$, H & L тест $p = 0.439$), с променливи, включващи предишни PCI, прием на калциеви антагонисти, NTproBNP₂, Δ hsCRP%, MVQRS final (финален QRS-комплекс от основния съд), MVinitial%DS (начален диаметър на стенозата в основен клон) са идентифицирани 4 независими предиктори за исхемия:

1. NTproBNP₂ – OR=1.007, CI 1.000-1.013, p=0.039
2. Прием на калциеви антагонисти – OR=5.978, CI 1.967-18.178, p=0.002
3. MV QRS final – OR=0.294, CI 0.098-0.884, p=0.029
(диаметър на стенозата в главен съд в началото)
4. MV initial %DS – OR=0.971, CI 0.946-0.997, p=0.031
(ширина на QRS комплекс от регион на главен съд)

III. Извеждане на маркери, предсказващи следпроцедурна мионекроза (съгласно Трета дефиниция на миокарден инфаркт)

Приемаме за критерий за значима мионекроза според Третата дефиниция на инфаркт на миокарда тип 4а нарастване на тропонина повече от 5 пъти над горна референтна граница (при изходни нива в референтния обхват) или повишение с над 20% при повишени, но стабилизирани или падащи изходни нива.

От изследваните 103 души 91 са имали повишаване на hs cTnT след процедурата.

При 17 пациенти (17%) това повишение е над 5 пъти над ГРГ.



Диаграма 2. Пациентски групи без и с покачване на тропонин след PCI

При интерпретацията на резултатите пациентите бяха разделени на 2 групи :

- с клинично значимо покачване на hs cTnT до степен на некроза (> 5 пъти над ГРГ)
- с покачване < 5 пъти над ГРГ, при които се приема наличие на перипроцедурна увреда.

Различните характеристики на двете групи са отразени на таблици 33,34,35 и 36.

Променлива	TnT>5xГРГ	TnT<5xГРГ	p
Пол, % мъже	65	63	n.s.
Възраст, години	66± 11	67± 9	n.s.
Хипертония, %	100	100	n.s.
Дислипидемия, %	100	92	0.007
Диабет, %	18	42	0.034
Пушене, %	89	80	n.s.
Фамилна история за ранна атеросклеротична болест, %	67	55	n.s.
Тумори, %	12	11	n.s.
ХОББ, %	12	10	n.s.
Бъбречни увреди%	24	29	n.s.
Преживян МИ, %	24	16	n.s.
Предидшна PCI, %	47	42	n.s.
PAD (периферна артериална болест), %	6	11	n.s.
Каротидна артериална болест, %	6	5	n.s.
Мозъчно-съдова болест %	24	14	n.s.

Таблица 33. Клинични характеристики на пациентските групи с повишен hs cTnT

Има значителна разлика в честотата на дислипидемия - общото съдържание на холестерол в групата с мионекроза срещу тази без мионекроза е 7.74 ± 11.06 срещу 4.88 ± 1.39 , $p = 0.050$.

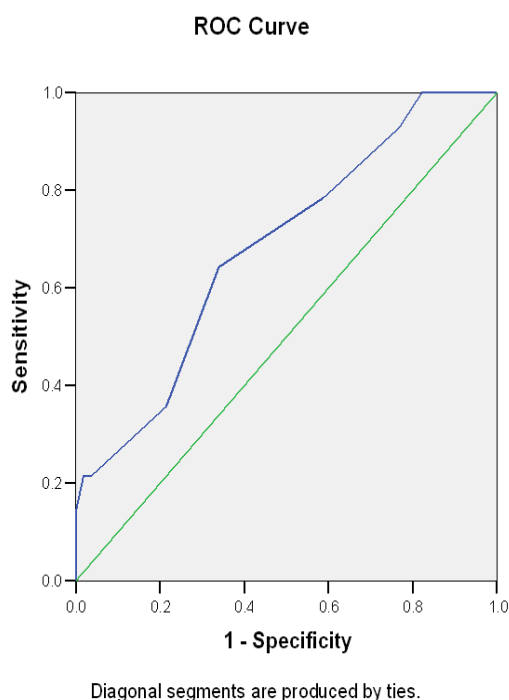
<i>Променлива</i>	Tn>5xUNL	Tn<5xUNL	p
<i>MV RVD, mm</i>	3.45±.36	3.33±.37	n.s.
<i>MV %DS pre, %</i>	60±26	60±25	n.s.
<i>MV %DS post, %</i>	1±5	2±5	n.s.
<i>MB RVD, mm</i>	3.09±.35	3.09±.28	n.s.
<i>MB %DS pre, %</i>	73±9	69±19	n.s.
<i>MB %DS post, %</i>	1±3	1±3	n.s.
<i>SB RVD, mm</i>	2.32±.30	2.35±.34	n.s.
<i>SB %DS pre, %</i>	54±24	42±27	0.099
<i>SB%DS, постпроцедурно</i>	78±18	61±28	0.036
<i>SB %DS постпроцедурно (в %)</i>	37±27	52±28	0.080
<i>BARI risk score</i>	51±17	47±17	n.s.
<i>APPROACH risk score</i>	52±18	46±17	n.s.
<i>SYNTAX risk score</i>	13±5	10±2	0.05
<i>Многоклонова болест, %</i>	82	49	0.005
<i>Запушен вторичен клон, %</i>	6	5	n.s.
<i>Брой засегнати съдове</i>	2.24±.49	1.62±.38	0.002

Таблица 34. Ангиографски характеристики

Както се вижда от таблицата, пациентите с по-тежка коронарна болест (по-висок процент и по-голям брой засегнати съдове) получават по-често мионекроза. Забелязано е, че включването на странични клонове и размера на лезиите там, се свързва с по-честа мионекроза, като обичайно се измерва по-висок диаметър на стенозите в страничните клонове, непосредствено след имплантирането на стента.

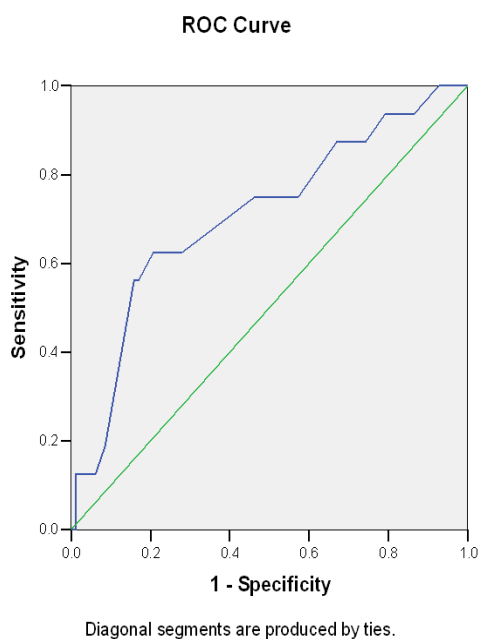
Извършен бе ROC анализ за идентифициране на граничните стойности за SB%DS (диаметър на стенозата в страничен клон) след стентирание и SYNTAX SCORE за прогнозиране на значимо нарастване на hs cTnT след процедурата:

1. SB%DS (диаметър на стенозата в страничния клон) след стентирание е със значителен предсказващ ефект за мионекроза - $AUC = 0.682$, $p = 0.036$, граница $> 75\%$ DS, чувствителност 64%, специфичност 64% (фигура 25).



Фигура 25. ROC-анализ на SB%DS (диаметър на стенозата в страничния клон)

2. SYNTAX score е значителен предиктор за мионекроза - AUC = 0.708, $p = 0.009$, cut-off value (гранична стойност) > 12, чувствителност 63%, специфичност 83% (фигура 26).



Фигура 26. ROC-анализ на SYNTAX score

Променлива	TnT>5xUNL	TnT<5xUNL	p
Диаметър на стент проксимален, mm	3.38±.46	3.21±.34	n.s.
Диаметър на стент, дистален, mm	3.13±.39	3.06±.36	n.s.
Дължина на стент, mm	41±25	29±16	0.013
Налягане при имплантиране на стента, atm.	14±2	14±2	n.s.
Постдилатация, %	76	38	0.014
Контраст, ml	324±115	265±87	0.015
Процедурно време, min	94±35	65±25	0.005
Време за флуороскопия, min	13.45±28.9	20.6±12.69	0.019

Таблица 35. Процедурни характеристики

Биха могли да се направят няколко бележки по отношение на процедурните характеристики :

- Дължината на стента е значителен предиктор на постпроцедурната мионекроза. При на ROC- анализ се определи гранична стойност от 40 мм, въпреки че тестът не достига статистическа значимост ($p = 0.068$).
- Постдилатацията е ясно свързана с по-високите нива на hs cTnT. Това повдига въпроса за техниката на имплантиране и евентуално - необходимостта от подготовка на лезиите като възможна стратегия за намаляване на перипродуктурната мионекроза.
- Мионекрозата очевидно е свързана с по-сложни процедури, демонстрирани с по-голяма продължителност, по-дълго време за флуороскопия и по-голям контрастен обем.

При анализа на биохимични маркери в двете групи са установиха статистически значими разлики в биомаркерите дза некроза, дестабилизация на плаките, хемодинамичен стрес и левокамерна дисфункция. Промените в биохимичните маркери при пациентите с мионекроза и перипроцедурна увреда са отразени на таблица 36:

<i>Променлива</i>	Tn>5xUNL	Tn<5xUNL	p
СК ₁	191±206	123±75	0.021
СК ₂	256±183	118±82	0.007
СКМВ ₁	34±44	16±5	0.001
СКМВ ₂	31±16	16±5	0.002
TnT ₁	.098±.192	.013±.016	0.088
TnT ₂	.241±.214	.029±.026	0.001
NTproBNP ₁	86±89	74±130	n.s.
NTproBNP ₂	121±139	76±139	n.s.
PAPPA ₁	9.45±11.47	5.53±1.97	0.004
PAPPA ₂	11.18±9.88	5.97±1.96	0.045
hsCRP ₁	8.46±16.69	5.32±13.87	n.s.
hsCRP ₂	10.79±13.65	6.23±12.21	n.s.
ΔСК	65±140	-5±65	0.002
ΔСК%	99±140	0±51	0.001
ΔСКМВ	-3±44	0±4	n.s.
ΔСКМВ%	45±80	0±31	0.037
ΔTnT	.143±.196	.020±.043	n.s.
ΔTnT%	184±2156	368±1249	n.s.
ΔNTproBNP	35±67	3±37	0.005
ΔNTproBNP%	110±196	26±57	0.001
ΔPAPPA	1.73±5.22	.43±1.20	0.043
ΔPAPPA%	33±52	10±23	0.005
ΔhsCRP	2.33±9.80	.91±5.65	n.s.
ΔhsCRP%	165±359	63±176	0.082

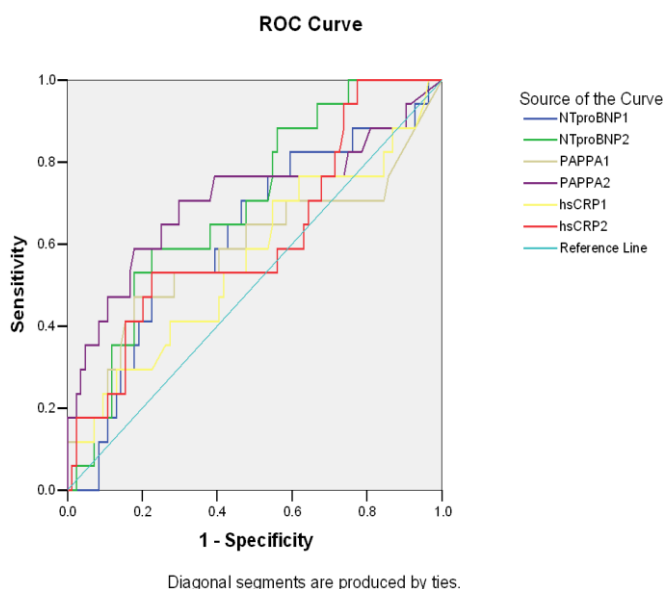
Таблица 36. Биохимични маркери в групите със значима и незначима мионекроза

Съществува съгласувана промяна във всички маркери за мионекроза – има статистически значима разлика по отношение на абсолютните и делта стойностите на маркерите за некроза при групите със и без значима мионекроза. Промените в PAPPА, NTproBNP и CRP са в синхрон с увеличението на hs cTNT.

За да се идентифицират предикторите сред биохимичните маркери извършихме ROC анализ на абсолютни стойности (табл. 37,38, фиг.27, 28)

Променлива	Площ AUC	Стандартна грешка (a)	Значимост (b)	95% Доверителен интервал	
				Долна граница	Горна граница
<i>NTproBNP₁</i>	0.618	0.075	0.127	0.470	0.765
<i>NTproBNP₂</i>	0.694	0.064	0.012	0.567	0.820
<i>PAPPА₁</i>	0.587	0.090	0.260	0.410	0.764
<i>PAPPА₂</i>	0.707	0.083	0.007	0.545	0.870
<i>hsCRP₁</i>	0.561	0.082	0.432	0.400	0.721

Табл. 37 – множествен ROC анализ с AUC и нива на значимост за отделните маркери



Фигура 27..ROC анализ за идентифициране на значими предиктори за мионекроза

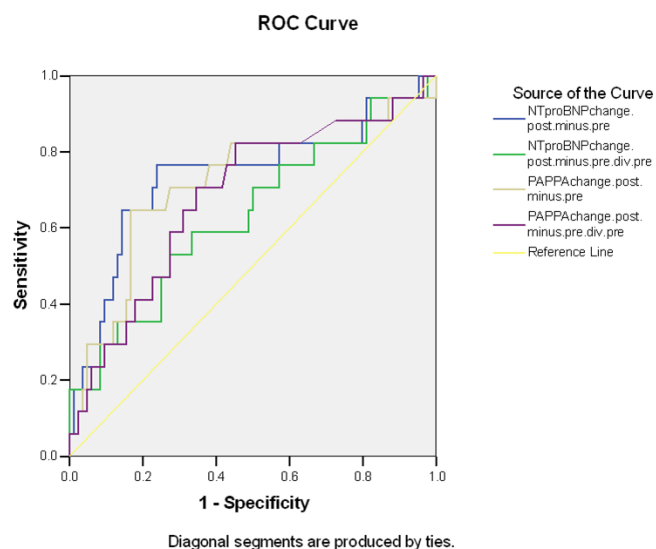
От ROC анализа се идентифицират два статистически значими показателя :

1. NTproBNP₂ - AUC = 0.694, p = 0.012, COV 75 pmol/L, чувствителност 57%, специфичност 82%
2. PAPPА₂ - AUC = 0.707, p = 0.007, COV 6.67 mIU/L, чувствителност 71%, специфичност 72%.

Беше направен ROC анализ и на делта стойностите :

Променлива	Площ	Станд. грешка(a)	Значимост (b)	95% Доверителен интервал	
				Долна граница	Горна граница
Δ NTproBNP	0.738	0.077	0.002	0.587	0.889
Δ NTproBNP%	0.633	0.079	0.085	0.478	0.788
Δ PAPPА	0.722	0.076	0.004	0.574	0.871
Δ PAPPА%	0.683	0.074	0.018	0.538	0.828

Таблица 38. ROC анализ на делта стойностите на маркерите-предиктори за некроза



Фигура 28. ROC анализ на Δ стойностите на маркерите-предиктори за мионекроза

От горната таблица за делта-стойностите можем да изведем още 3 предиктори за постпроцедурна мионекроза:

1. $\Delta\text{NTproBNP}$ - $\text{AUC} = 0.738$, $p = 0.002$, $\text{COV} = 16.5 \text{ pmol/L}$, чувствителност 65%, специфичност 86%
2. ΔPAPPA - $\text{AUC} = 0.722$, $p = 0.004$, $\text{COV} = 1.05 \text{ mIU/L}$, чувствителност 65%, специфичност 84%
3. $\Delta\text{PAPPA}\%$ - $\text{AUC} = 0.683$, $p = 0.018$, $\text{COV} = 15\%$, чувствителност 59%, специфичност 74%

Беше извършен множествен логистичен регресионен анализ с включени променливи: следдилатиране на основен съд, брой на съдовете, въввлечени в заболяването, дължина на стента, PAPPA_2 , $\Delta\text{NTproBNP}$ и $\Delta\text{NTproBNP}\%$.

С прилагане на метода на пропорционален риск (hazard ratio) и определяне на рискови коефициенти (OR) бяха идентифицирани 3 независими предиктори:

- Постдилатиране на основният съд - $\text{OR} = 0.5$, $\text{CI} 0.007 - 0.340$, $p = 0.002$
- Многоклонова болест - $\text{OR} = 3.853$, $\text{CI} 1.425 - 10.419$, $p = 0.004$
- PAPPA_2 - $\text{OR} = 1.422$, $\text{CI} 1.120 - 1.807$. $p = 0.007$

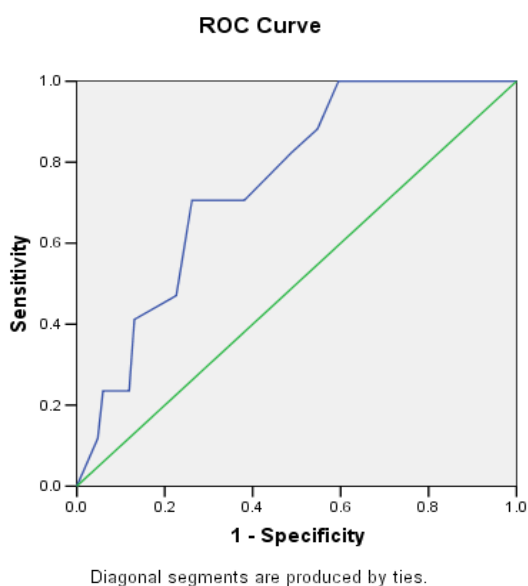
С участието на тези 3 независими предиктора ние конструирахме предсказващ алгоритъм **PNP (Postdilatation-NVD-PAPPA)** за постпроцедурна миокардна некроза. На базата на предсказващата сила на

отделните показатели и определените рискови коефициенти (OR) са определени следните съотношения между показателите:

- 8 дяла за наличие на многоклонова болест
- 3 дяла за стойности на PAPPA следпроцедурно > 6.67 mIU/L
- 1 дял за прилагане на постдилатация след процедурата

На различните нива пропорционален риск с използване на т.н. статистическо число на Wald се приписват точкови стойности, отговарящи на статистическата сила на предсказване на използваната променлива – точковият резултат за алгоритъма варира между 6-28 точки.

Направеният ROC-анализ за определяне на критични стойности е показан на фигура 29 :



Фигура 29. ROC-анализ на PNP алгоритъм

PNP - AUC=0.752, $p=0.001$; COV>17 точки - чувствителност - 71% ; специфичност -74%.

В групата пациенти с PNP >17 честотата на перипроцедурната некроза е била **35,3%**, докато в групата с PNP < 17 тя е била само **7,5%** като разликата е статистически значима (p<0,001)

III. Определяне честотата на смърт и MACE с определяне на предиктори за смъртност

Смъртността е била **6%** (n = 6/103) за период от 18 ± 8 месеца.

Общата MACE честота е **11%** (n = 11/103).

Честотата на повторните инциденти вследствие на рестенози (TLR), ангина или новопоявила се сърдечна недостатъчност (A&NOCHF) и спонтанни инфаркти на миокарда (MI) са регистрирани само при пациенти с коронарни бифуркационни лезии - TLR 6% (n = 4/70), A & NOCHF 19% (n = 13/70), MI 3 % (N = 2/71).



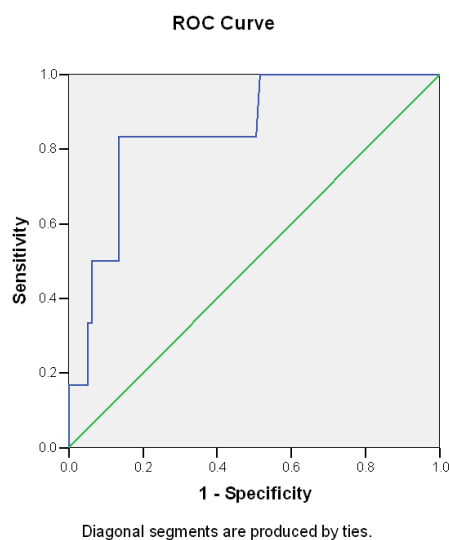
Диаграма 3. Смъртност и MACE

С помощта на корелационен и регресионен анализ бяха изолирани предиктори за смъртност с определяне на граничните им стойности чрез ROC анализ и анализ на 18 месечната смъртност в групите със стойности над и под критичните. Откриха се два параметъра от групата на биохимичните маркери – PAPPA₁ и PAPPA₂.

PAPPA₁ - AUC = 0.841, p = 0.005, COV > 5.300 mIU/L, чувствителност 100%, специфичност 63%;

18- мес. смъртност при PAPPA₁ > 5.300 срещу тези с нива <5.300 :
12.2% срещу 1.6%, p = 0.025

PAPPA₂ е значителен предиктор на смъртността - AUC = 0.851, p = 0.004, COV > 8.330 mIU/L, чувствителност 83%, специфичност 87% (фигура 30)
18 м.смъртност при PAPPA₂ > 8,330 mIU/L срещу PAPPA₂ < 8,330 mIU/ L:
23,5% срещу 2,3%, p = 0.001



Фигура 30. ROC- крива на PAPPA₂ като предиктор на смъртност.

Други важни предиктори за смъртност са :

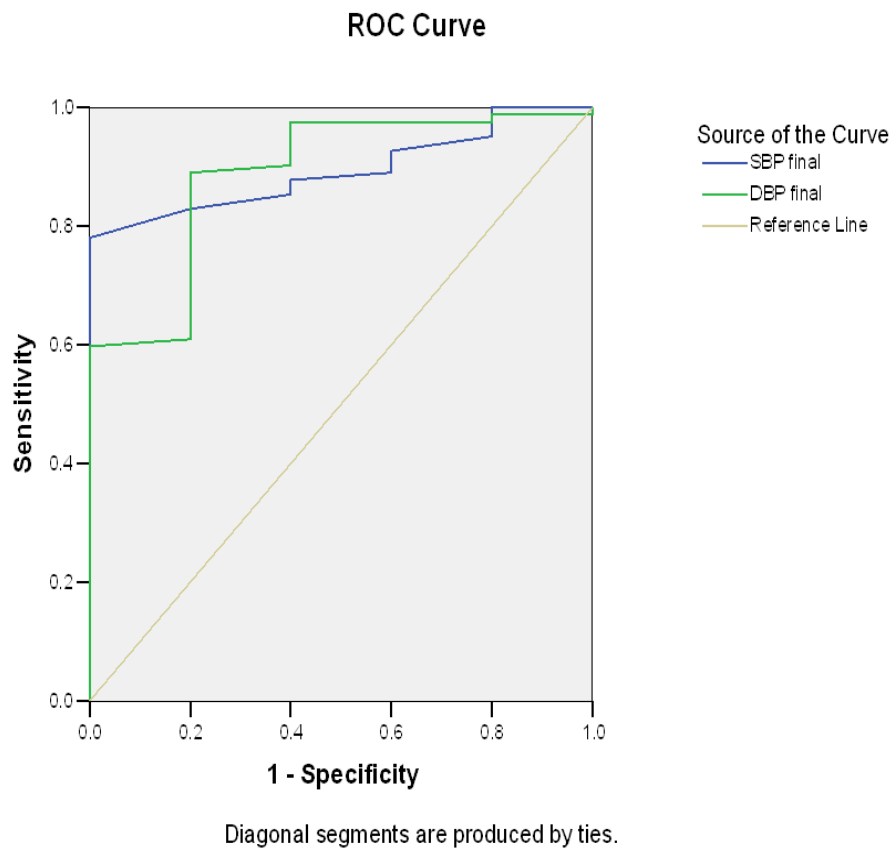
1. hs cTnT₁ - AUC = 0.754, p = 0.037, COV>0.032 ng/ml, чувствителност 67%, специфичност 94%
18- м. смъртност при hs cTnT₁ >0 .032 ng/ml спрямо нива < 0.032 ng/ml
28.6% срещу 4.2%, p = 0.008

2. NTproBNP₁ - AUC = 0.742, p =0 .047, COV> 128 pmol/L, чувствителност 67%, специфичност 86%.
18- м. смъртност - NTproBNP₁> 128 pmol/L спрямо тези с <128 pmol/ l
23,2% срещу 3,4%.

3. Двоен продукт (DP - произведението между систолното артериално налягане и сърдечната честота - директен показател за миокардната кислородна консумация) - AUC = 0.810, p = 0.021, COV> 8850, чувствителност 72%, специфичност 80%;
18 мес. смъртност - DP> 8850 срещу DP <8850
1.7% срещу 14.8%, p = 0.015

4. SBP - AUC = 0.894, p = 0.003, COV>120 mmHg, чувствителност 83%, специфичност 100%;
18-мес. смъртност - SBP> 120 срещу SBP <120
0% срещу 5,7% p <0.001

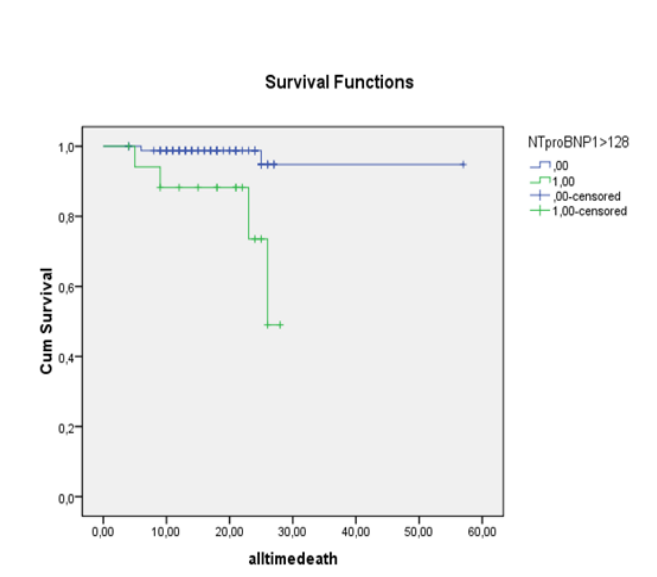
5. DBP - AUC = 0.888, p = 0.004, COV>71 mmHg, чувствителност 90%, специфичност 80%
18 мес. смъртност - (DBP> 71 срещу DBP <71mmHg)
1.4% срещу 28.6%



Фигура 31. ROC-криви на SBP и DBP като предиктори за смъртност

За оценка влиянието на отделните параметри върху преживяемостта се построиха Каплан – Майер криви на прживяемостта с лог – ранг тест за оценка на статистическата разлика. От анализа се установи статистическа значимост на 4 параметъра:

1. NTproBNP₁

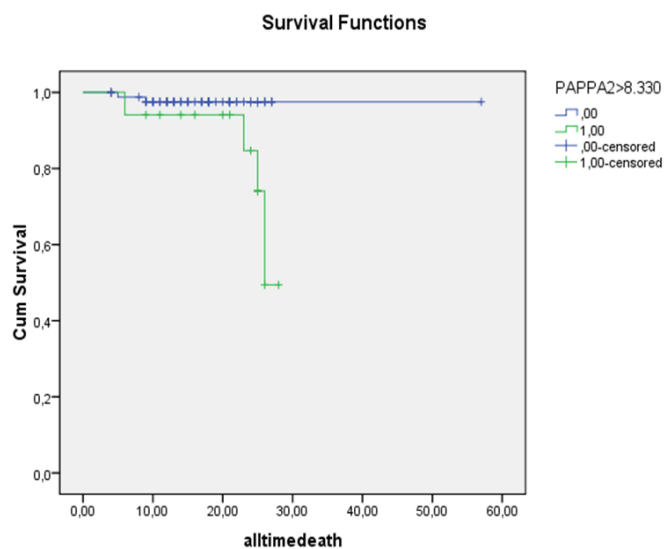


Фиг.32. Каплан-Майер крива на преживаемост за NTproBNP₁

Цялостно сравнение			
	Chi-Square	df	
Log Rank (Mantel-Cox)	10,095	1	0,001

Обобщена обработка				
NTproBNP ₁ > 128 pmol/L	Общо(N)	Събития (N)	Цензурирани (преживели)	
			N	Проценти
0,00	85	2	83	97,6%
1,00	18	4	14	77,8%
Общо	103	6	97	94,2%

2.PAPPA₂

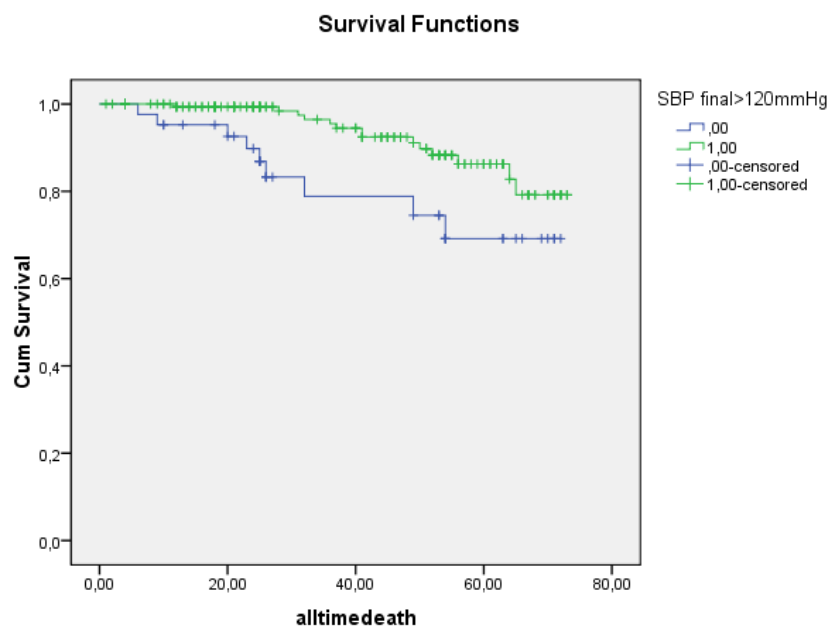


Фиг.33. Каплан-Майер крива на преживяемост за PAPPA₂

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7,191	1	0,007
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7,191	1	0,007

Обобщена обработка				
PAPPA ₂ >.8.330 mIU/L	Общо (N)	Събития (N)	Цензурирани (преживели)	
			N	Проценти
,00	86	2	84	97,7%
1,00	17	4	13	76,5%
Overall	103	6	97	94,2%

3.SBP final (Систолно кръвно налагане в края на процедурата)

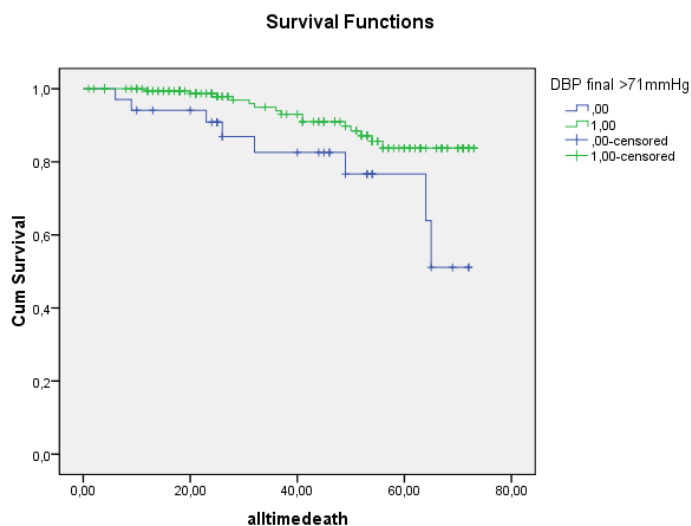


Фиг.34. Каплан-Майер крива на преживяемост за SBP final

Цялостно сравнение			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,250	1	0,012

Обобщена обработка				
SBP.final >120 mm Hg	Общо(N)	Събития (N)	Цензурирани (преживели)	
			N	Процент
0,00	45	9	36	80,0%
1,00	180	14	166	92,2%
Overall	225	23	202	89,8%

4. DBP (Диастолично кръвно налягане в края на процедурата)



Фиг.35 Каплан-Майер крива на преживяемост за DBP

Цялостно сравнение			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5,788	1	0,016

Обобщена обработка				
DBP.final. >71 mm Hg	Общо(N)	Събития (N)	Цензурирани (преживели)	
			N	Процент
0,00	36	8	28	77,8%
1,00	189	15	174	92,1%
Overall	225	23	202	89,8%

Анализът на данните по отношение на смъртността и преживяемостта показва, че стойностите на RAPPa преди и след PCI, са предиктори за смъртност. Те корелират със стойностите на тропонина, който е маркер от най-висок клас по отношение стратификацията на риска.

VI. ИЗВОДИ

- I. Верификацията на преднекротични и некротични маркери отговаря на международните критерии, доказва постигането на декларираните аналитични характеристики и гарантира високата диагностична надеждност на клиничното проучване.
- II. Сравнителното проспективно проучване на преднекротични и некротични сърдечни маркери показва три важни зависимости:
 - a) след PCI винаги се наблюдава повишаване на hsTNT и RAPPA;
 - b) при комплексни лезии повишението винаги е по-голямо;
 - c) по-високите базисни нива са свързани и с по-високи нива следпроцедурно.
- III. Установената високостепенна положителна корелационна зависимост между промените в интракоронарната ЕКГ и нивата на изследваните сърдечни маркери показва, че при пациентите с потезка коронарна болест и повишена сложност на лезията получените исхемични промени се регистрират надеждно с лабораторни показатели. Всички пациенти с ST-промени в края на PCI имат по-високи СКМВ и NTproBNP предпроцедурно - стойността на тези маркери е предупредителен знак за процедурни и постпроцедурни проблеми. Рискът за постпроцедурни усложнения се повишава при комбинирани лезии и остатъчна исхемия от страничен клон и това повишение се регистрира от промени в стойностите на hsTNT и СКМВ.
- IV. Честотата на перипроцедурната некроза, определена чрез сигнификантно повишение на hsTNT, е 15% и тя може да се предскаже надеждно с лабораторните показатели NTproBNP₂ и RAPPA₂.
- V. Честотата на смъртност е 6%, а честотата на големите неблагоприятни сърдечни събития -11%. Като предиктори за

средносрочна смъртност достигнаха статистическа значимост биохимичните маркери PAPPА, hsTNT и NTproBNP, изследвани предпроцедурно и PAPPА, изследван постпроцедурно. За първи път се установява, че стойностите на PAPPА, както преди, така и след PCI, са предиктори за смъртност.

- VI. Създаден е предсказващ алгоритъм PNP (Postdilatation-NVD-PAPPА) за откриване на високорискови пациенти, заплашени от перипроцедурни усложнения, включващ три показателя - наличие на многоклонова болест, следпроцедурни нива на PAPPА > 6.67 mIU/L и следдилатиране на основен съд - в съотношение 8:3:1. Точковата оценка на алгоритъма варира между 6 и 28 с критична стойност 17, над която честотата на перипроцедурната некроза е пет пъти по-висока.

Библиография:

1. Томов И., Гочева Н., Паскалева И., Ганев В.- **Кардиология том II**, изд.Знание ЕООД 2007г.
2. Георгиева Ж. **Сърдечно-съдови биомаркери** изд. Арабилис, 2012г.
3. Данев Ст., Паскалева И. **Сърдечни биомаркери при остър коронарен синдром - лабораторна диагноза** - В.- (Кръстев З., Шипков Т.р ред.) Клинична лаборатория и клинична медицина, Мединфо ЕООД, стр. 245-264. 2017г.
4. Дишлянова Б., Цакова А. **Тропонините – нови биохимични маркери при миокардни увреждания** Медицински преглед, 39, 2003, № 2;34-39
5. Паскалева, И. и др. **Приложение на бърз тест за качествено определяне на h-FABP IV** национална конференция по клинична лаборатория, 5-7 юни 2008. – Сборник резюмета, стр.43.
6. Денчев С. **Ендотелна функция и дисфункция** , Българска кардиология, брой 1/2006 г.; 5-11
7. Трендафилова Е. **Стратификация на риска при остър коронарен синдром** Българска кардиология, брой 1/2009 г; 34-39
8. Хафида Е., Денчев С., Търновска-Къдрева Р., Еленкова А. **Нестабилна ангина пекторис - възможности за прогноза** Българска кардиология, брой 1/2008 г
9. **ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction** - Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction) *Developed in Collaboration With the Canadian Cardiovascular Society* *Circulation*. 2004;110:588-636
10. Aggarwal A., Dai D., Rumsfeld J.S., Klein L.W., Roe M.T. **Incidence and predictors of stroke associated with percutaneous coronary intervention**. *Am J Cardiol*. 2009 Aug 1;104(3):349-53.
11. Alpert J.S., Thygesen K., Antman E., Bassand J.P.. **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.
12. Apple F. S., Murakami M., Panteghini M., Christenson R.H., Dati F., Mair J., Wu A. H.B., on behalf of the IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage: **International Survey on the Use of Cardiac Markers** *Clinical Chemistry* 47, No. 3, 2001
13. Apple F. S., Wu A.H.B. **Myocardial Infarction Redefined: Role of Cardiac Troponin Testing** *Clinical Chemistry* 47, No. 3, 2001 377-379
14. Apple F. S., Wu A.H.B., Jaffe A. S., Panteghini M., Christenson R. H. **National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: Analytical Issues for Biomarkers of Heart Failure** *Circulation*. 2007;116:e95-e98;
15. Apple F. S., Wu A.H.B., Mair J., Ravkilde J., Panteghini M. et al., on behalf of the Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC **Future Biomarkers for Detection of**

Ischemia and Risk Stratification in Acute Coronary Syndrome *Clinical Chemistry* 51:5 810–824 (2005)

16. Apple F.S., Murakami M.M. **Cardiac troponin and creatine kinase MB monitoring during in-hospital myocardial reinfarction.** *Clin Chem* 2005; 51:460–3.
17. Apple F.S., Murakami M.M.. **Serum 99th percentile reference cutoffs for seven cardiac troponin assays.** *Clin Chem* . 2004 Aug; 50 (8):
18. Apple F.S., Parvin C.A., Buechler K.F., Christenson R.H., Wu A.H.B., Jaffe A.S. **Validation of the 99th percentile cutoff independent of assay imprecision (CV)for cardiac troponin monitoring for ruling out myocardial infarction.** *Clin Chem* 2005;51:2198–200.
19. Apple F.S., Quist H.E., Doyle P.J., Otto A.P., Murakami M.M. **Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations.** *Clin Chem* 2003;49:1331– 6.
20. Apple F.S., Wu A.H., Mair J., Ravkilde J., Panteghini M., Tate J., et al. **Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome.** *Clin Chem* 2005;51:810 –24.
21. Apple F.S., Wu A.H.B., Jaffe A.S. **European Society of Cardiology and American College of Cardiology guidelines for redefinition of myocardial infarction: how to use existing assays clinically and for clinical trials.** *Am Heart J* 2002;144:981– 6.
22. Autiero M., Luttun A., Tjwa M., Carmeliet P. **Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders** *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1: 1356–1370
23. Babu G. G., Walker J. M., Yellon D.M., Hausenloy D.J. **Peri-procedural myocardial injury during percutaneous coronary intervention: an important target for cardioprotection** *European Heart Journal* October 29, 2010
24. Baiju R., Viswanathan S., Kumar S. K. K. **Cardiac troponin T estimation post elective stent implantation and prediction of early and late outcomes** *International Journal of Research in Medical Sciences* 2017 May;5(5):1888-1892
25. Baldus S., Heeschen C., Meinertz T., Zeiher A. M., Eiserich J.P., Münzel T., Simoons M.L., Hamm C.W. on behalf of the **CAPTURE Investigators Myeloperoxidase Serum Levels Predict Risk in Patients With Acute Coronary Syndromes** *Circulation*. 2003;108:1440-1445;
26. Bayes-Genis A., Barallat J., Galan A., et al. **Multimarker Strategy for Heart Failure Prognostication. Value of Neurohormonal Biomarkers : Nephilysin vs NTproBNP.** *Rev.Esp.Cardiol.*2015;68(12); 107 5- 1084.
27. Bayes-Genis A., **Nephilysin in Heart Failure** *JACC:Heart Failure* vol.3, №8 , 2015;637 - 640
28. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, et al. **Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes.** *N Engl J ed* 2001;345:1022–9.
29. Benamer H., Steg P. G., Benessiano J., Vicaut E. et al. **Comparison of the prognostic value of C-Reactive protein and troponin I in patients with unstable angina pectoris** *American Journal of Cardiology* Volume 82, Issue 7 , Pages 845-850, October 1998

30. Beuerlea J. R., Azzazyb H.M.E, Stybac G., Duha S., Christenson R. H **Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patients** Clinica Chimica Acta Volume 294, Issues 1–2, April 2000, Pages 115–128
31. Biasucci L.M., Liuzzo G., Grillo R. L., Caligiuri G., Rebuzzi A.G., Buffon A., Summaria F., Ginnetti F., Fadda G., Maseri A., **Elevated Levels of C-Reactive Protein at Discharge in Patients With Unstable Angina Predict Recurrent Instability** Circulation. 1999;99:855-860
32. Body R. **Towards evidence based emergency medicine: Heart Fatty Acid binding protein for rapid diagnosis of acute myocardial infarction in the emergency department.** Emerg Med J 2009, 26:519-522.
33. Bogaty P., Brophy J.M., Boyer L., Simard S., Joseph L., Bertrand F., Dagenais G.R., **Fluctuating Inflammatory Markers in Patients With Stable Ischemic Heart Disease** Archives of Internal Medicine. 2005;165:221-226
34. Bolognese L., Ducci K., Angioli P., Falsini G., Liistro F. **Elevations in Troponin I After Percutaneous Coronary Interventions Are Associated With Abnormal Tissue-Level Perfusion in High-Risk Patients With Non –ST-Segment– Elevation Acute Coronary Syndromes** Circulation. 2004;110:1592-1597;
35. Bolognese L., Falsini G., Liistro Francesco., Angioli P. **Myocardial damage during percutaneous interventions for non-ST-elevation acute coronary syndromes** European Heart Journal Supplements (2005) 7 (Supplement K), K15–K18
36. Brener S.J. **Should We Measure Biomarkers for Myonecrosis Before and After PCI?** Journal of the American College of Cardiology Volume 68, Issue 21, November 2016
37. Brennan M.L., Penn M. S., Van Lente F., et al., **Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain** N Engl J Med 2003;349:1595-1604
38. Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, et al. **Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies.** Circulation 2002; 105: 2019-2023
39. Calabró P., Willerson J. T., Yeh Edward T.H. **Inflammatory Cytokines Stimulated C-Reactive Protein Production by Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells** Circulation. 2003;108:1930-1932;
40. Califf R. M., Abdelmeguid A.E., Kuntz R. E., et al. **Myonecrosis After Revascularization Procedures,** JACC Vol. 31, No. 2 February 1998:241–51
41. Christenson R.H., Duh S.H., Sanhai W.R., Wu A.H., Holtman V., Painter P., et al. **Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study.** Clin Chem 2001;47:464 –70.
42. Clark I.M., Swingle T.E., Sampieri C.L., Edwards D.R. **The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 40 (2008) 1362–1378
43. **Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, 2nd ed.** CLSI document C28–A2. 2000.
44. Cockburn J.I., Behan M., de Belder A., Clayton T., Stables R., Oldroyd K., Curzen N., Hildick-Smith D. **Use of troponin to diagnose periprocedural myocardial infarction: effect on**

- composite endpoints in the British Bifurcation Coronary Study (BBC ONE).** *Heart*. 2012 Oct;98(19):1431-5
45. Collinson. P.O. **Troponin T or troponin I or CK-MB (or none?)**. *Eur Heart J*. 1998 Nov;19 Suppl N:N16-24.
 46. Daniels L.B., Maisel A.S., **Natriuretic Peptides** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 50, No. 25, 2007
 47. Davis G.K. **Role of cardiac troponin testing in percutaneous transluminal coronary angioplasty** *Scand J Clin Lab Invest*. 2003;63(3):167-74..
 48. De Lemos J.A., McGuire D.K., Drazner M.H. **B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease.** *Lancet* 2003;362:316 –22.
 49. De Lemos J.A., Morrow D.A. **Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: ready for clinical application?** *Circulation* 2002;106:2868 –70.
 50. Dhillon O. S., Khan S. Q., Narayan H. K., Ng K.H., Struck J., Quinn P. A., Morgenthaler N.G. et al. **Prognostic Value of Mid-Regional Pro-Adrenomedullin Levels Taken on Admission and Discharge in Non-ST-Elevation Myocardial Infarction The LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) II Study** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 56, No. 2, 2010
 51. Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., Garcia-Gonzalez M., et al. **Circulating pregnancy-associated plasma protein A is not an early marker of acute myocardial infarction.** *Clin Biochem* 2005;38:180–2.
 52. Doostzadeh J., Clark L.N., Bezenek S., Pierson W., Sood P.R., Sudhir K. **Recent progress in percutaneous coronary intervention: evolution of the drug-eluting stents, focus on the XIENCE V drug-eluting stent.** *Coron Artery Dis*. 2010 Jan;21(1):46-56.
 53. Duk-Woo Park, Young-Hak Kim, Sung-Cheol Yun, Jung-Min Ahn, Jong-Young Lee, Won-Jang Kim, Soo-Jin Kang, Seung-Whan Lee, Cheol Whan Lee, Seong-Wook Park, Seung-Jung Park **Frequency, causes, predictors, and clinical significance of peri-procedural myocardial infarction following percutaneous coronary intervention** *European Heart Journal* (2013) 34, 1662–1669
 54. Ecollan P., Collet J.-P., Boon G., et al. **Pre-hospital detection of acute myocardial infarction with ultra-rapid human fatty acid-binding protein (H-FABP) immunoassay** *International Journal of Cardiology* Volume 119, Issue 3, 31 July 2007, Pages 349–354
 55. Eto T. **A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin n-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides.** *Peptides* 2001; 22: 1693–1711.
 56. Feldman D.N., Minutello R.M., Bergman G., et al. **Relation of troponin I levels following nonemergent percutaneous coronary intervention to short-and long-term outcomes.** *Am J Cardiol*. 2009;104:1210–1215.
 57. Ferreira R.M., de Souza e Silva N. A., Alvares Salis L.H., Ferreira Salles E. **Percutaneous Coronary Interventions and Post-Procedural Enzyme Elevation** *International Cardiovascular Forum Journal* 9 (2016); 54-55 DOI: 10.17987/icfj.v9i0.374

58. Fuchs S., Stabile E., Kinnaird T. D., Mintz G.S., Gruberg L. **Stroke Complicating Percutaneous Coronary Interventions Incidence, Predictors, and Prognostic Implications** *Circulation*. 2002;106:86-91
59. Fuchs S., Kornovski R., Mehran R. et al. **Prognostic value of cardiac troponin I levels following catheter-based coronary intervention** *J Am Coll Cardiol*. 2000;85:1077-82.
60. Goldberg R. J., Currie K., White K.i et al. **Six-month outcomes in a multinational registry of patients hospitalized with an acute coronary syndrome (the Global Registry of Acute Coronary Events [GRACE])**. *Am J Cardiol*. 2004 Feb 1;93(3):288-93.
61. **Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology** June 2007 *European Heart Journal* (2007) 28, 1598–1660
62. Hamm C.W., Giannitsis E., Katus H.A. **Cardiac Troponin Elevations in Patients Without Acute Coronary Syndrome** *Circulation*. 2002;106:2871-2872
63. Hanna E. B., Hennebry T.A. **Periprocedural Myocardial Infarction: Review and Classification** *Clinical Cardiology* 2010 Aug;33(8):476-83
64. Haverkate F., Thompson S.G., Pyke S.D., Gallimore J.R., Pepys M.B. **Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina**. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997; 349: 462-466
65. Hay D.L. & Smith D.M. **Adrenomedullin receptors: molecular identity and function**. *Peptides* 2001 22 1753–1763.
66. Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C.W., et al. **Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes**. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:229–37.
67. Heeschen C., Dimmeler S., Fichtlscherer S., Hamm C.W. et al. for the CAPTURE Investigators : **Prognostic Value of Placental Growth Factor in Patients With Acute Chest Pain** *JAMA*, January 28, 2004—Vol 291, No. 4 435
68. Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C.W. et al. for the CAPTURE Study Investigators : **Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Levels in Patients With Acute Coronary Syndromes Comparison With Markers of Systemic Inflammation, Platelet Activation, and Myocardial Necrosis** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 45, No. 2, 2005
69. Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C.W., van den Brand M.J., Boersma E., Zeiher A.M., et al. **Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes**. *N Engl J Med* 2003;348:1104 –11. *e374* *Circulation* April 3, 2007
70. Heeschen C., Hamm Christian .W., Mitrovic V., Lantelme N., White H. D. for the Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Investigators : **N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Levels for Dynamic Risk Stratification of Patients With Acute Coronary Syndromes** *Circulation*. 2004;110:3206-3212;
71. Hinson J.P., Kapa S., Smith D.M. **Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide**. *Endocr Rev* 2000; 21: 138–167.
72. Hoi Kin Wong, Tommy Tsang Cheung and Bernard M Y Cheung **Cardiovascular Adrenomedullin and cardiovascular diseases** *Disease Journal of the Royal Society of Medicine* 2012;1:14.

73. Hoole S.P., Heck P.M., Sharples L., et al. **Cardiac remote ischemic preconditioning in coronary stenting (CRISP Stent) study.** *Circulation.* 2009;119:820–827.
74. Hueb W., Gersh B.J., Rezende P.C., et al. **MASS-V Study Group. Hypotheses, rationale, design, and methods for prognostic evaluation of cardiac biomarker elevation after percutaneous and surgical revascularization in the absence of manifest myocardial infarction.** A comparative analysis of biomarkers and cardiac magnetic resonance. **The MASS-V Trial.** *BMC Cardiovasc Disord.* 2012 Aug 16;12:65
75. Iliodromitis E. K., Kyrzopoulos S., Paraskevaidis I. A., Kolocassides K. G., Adamopoulos S., Karavolias G., Kremastinos D T. **Increased C reactive protein and cardiac enzyme levels after coronary stent implantation. Is there protection by remote ischaemic preconditioning?** *Heart* 2006;92:1821–1826.
76. Jaffe A. S., Babuin L., Apple F.S. **Biomarkers in Acute Cardiac Disease The Present and the Future.** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 48, No. 1, 2006
77. Jaffe A.S, Katus H. **Acute coronary syndrome biomarkers: the need for more adequate reporting.** *Circulation* 2004;110:104–6.
78. Jaffe A.S., Apple F.S., Lindahl B., Mueller C., Katus H.A. **Why all the struggle about CK-MB and PCI?** *European Heart Journal* (2012) 33, 1046–1048
79. James S. K., Lindahl B., Siegbahn A., et al. **N-Terminal Pro–Brain Natriuretic Peptide and Other Risk Markers for the Separate Prediction of Mortality and Subsequent Myocardial Infarction in Patients With Unstable Coronary Artery Disease A Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV Substudy** *Circulation.* 2003;108:275-281;
80. James S., Armstrong P., Califf R., Simoons M. L, Venge P., Wallentin L., Lindahl B. **Troponin t levels and risk of 30-day outcomes in patients with the acute coronary syndrome: prospective verification in the Gusto-iv trial** *The American Journal of Medicine* Volume 115, Issue 3, Pages 178–184, August 15, 2003
81. Jang S.-W., Seung K.-B., Park H.-J., Park C.-S., Kim D.-B. **Elevated Troponin I after Implantation of Drug-Eluting Stents: Incidence, Predictors, and Prognostic Value,** *Korean Circ J* 2008;38:12-16
82. Januzzi J.L.Jr. **Cardiac Biomarkers in Clinical Practice.** Jones at Bartlett Publishers Sudbury ,MA, 2011
83. Januzzi J.L.Jr., Camargo C.A., Anwaruddin S., et al. **The N-terminal Pro-BNP Investigation of Dyspnea in the Emergency department (PRIDE) study** Jeremias A., Kleiman N.S., Nassif D., Hsieh W.H., Pencina M., Maresh K., Parikh M., Cutlip D.E., Waksman R., Goldberg S., Berger P.B., Cohen D.J.: **Evaluation of Drug Eluting Stents and Ischemic Events (EVENT) Registry Investigators. Prevalence and prognostic significance of preprocedural cardiac troponin elevation among patients with stable coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention: results from the evaluation of drug eluting stents and ischemic events registry.** *Circulation.* 2008 Aug 5;118(6):632-8.
85. Jernberg T., Lindhal B. **A combination of troponinT and 12-lead electrocardiography: a valuable tool for early prediction of long-term mortality in patients with chest pain without ST-segment elevation** *Am Heart J* 2002;144: 804-810

86. Jernberg T., Lindahl B., Siegbahn A., Andren B., Frostfeldt G., Lagerqvist B., et al. **N-terminal pro-brain natriuretic peptide in relation to inflammation, myocardial necrosis, and the effect of an invasive strategy in unstable coronary artery disease.** *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1909
87. Jernberg T., Stridsberg M., Venge P., Lindahl B. **N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation.** *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:437– 45.
88. Johansen O., Brekke M., Strømme J. H., Valen V., Seljeflot I., Skjæggestad Ø., Arnesen H. **Myocardial damage during percutaneous transluminal coronary angioplasty as evidenced by troponin T measurements** *European Heart Journal* (1998) 19, 112–117
89. Jones C. B., Sane D. C., Herrington D.M. **Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome** *Cardiovascular Research* 59 (2003) 812–823
90. Juan Cosin-Sales, Michael Christiansen, Paul Kaminski; Claus OxvigMichael T. Overgaard, Della Cole, David W. Holt, Juan Carlos Kaski, **Pregnancy-Associated Plasma Protein A and Its Endogenous Inhibitor, the Proform of Eosinophil Major Basic Protein (proMBP), Are Related to Complex Stenosis Morphology in Patients With Stable Angina Pectoris** *Circulation*. 2004;109:1724-1728;
91. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. **Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes.** *J Am Coll Cardiol*. 1998 Aug;32(2):368-72.
92. Kasap S., Gönenç A., Şener D.E., Hisar İ. **Serum Cardiac Markers in Patients with Acute Myocardial Infarction: Oxidative Stress, C-Reactive Protein and N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide** *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 41, 50–57, July 2007
93. Katan M., Christ-Crain M. **The stress hormone copeptin: a new prognostic biomarker in acute illness** *Swiss Medical Weekly* 2010;140:w13101
94. Katan M., Müller B., Christ-Crain M. **Copeptin: a new and promising diagnostic and prognostic marker** *Critical Care* 2008, 12:117
95. Kato J, Kitamura K, Uemura T, Kuwasako K, Kita T, Kangawa K & Eto T. **Plasma levels of adrenomedullin and atrial and brain natriuretic peptides in the general population: their relations to age and pulse pressure.** *Hypertension Research* 2002 25 887–889 1369–1375.
96. Kawamura A, Lombardi DA, Tilem ME, Gossman DE, Piemonte TC, Nesto RW. **Stroke complicating percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction.** *Circ J*. 2007 Sep;71(9):1370-5.
97. Keller T., Tzikas S., Zeller T., et al **Copeptin Improves Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 55, No. 19, 2010
98. Kemp M., Donovan J., Higham H. and Hooper J. **Biochemical markers of myocardial injury** *British Journal of Anaesthesia* 93 (1): 63±73 (2004)
99. Khan A., Sharif M.S, Phil M., Khan Dilshad F. A., **Diagnostic Performance of High-Sensitivity Troponin T, Myeloperoxidase, and Pregnancy-Associated Plasma Protein A Assays for Triage of Patients with Acute Myocardial Infarction** *Korean J Lab Med* 2011;31:172-178
100. Khan S. Q., Dhillon O.S., O'Brien R.J., Struck J., Quinn P. A., Phil M., Morgenthaler N.G. et al. **C-Terminal Provasopressin (Copeptin) as a Novel and Prognostic Marker in Acute Myocardial**

- Infarction Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide (LAMP) Study** *Circulation*. 2007;115:2103-2110;
101. Kilcullen N, Viswanathan K, Das R, Morrell C, Farrin A, Barth JH, Hall AS: **Heart-type fatty acid-binding protein predicts long-term mortality after acute coronary syndrome and identifies high-risk patients across the range of troponin values.** *J Am Coll Cardiol* 2007, 50:2061-2067.
 102. Kinlay S., Schwartz G.G., Olsson A.G., Rifai N., Leslie S.J. et al. for the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators : **High-Dose Atorvastatin Enhances the Decline in Inflammatory Markers in Patients With Acute Coronary Syndromes in the MIRACL Study** *Circulation*. 2003;108:1560-1566;
 103. Kizera R., Muttireb M.R., Matthaib W.H. et al. **Role of cardiac troponin T in the long-term risk stratification of patients undergoing percutaneous coronary intervention** *European Heart Journal* (2003) 24, 1314–1322
 104. Kleiman N. S. **Measuring Troponin Elevation After Percutaneous Coronary Intervention: Ready for Prime Time?** *Journal of the American College of Cardiology*, Volume 48, Issue 9, 7 November 2006, Pages1771-1773
 105. Koenig W., **C-reactive protein and cardiovascular risk.** *Clin Chem* 2001; 47: 9-10
 106. Kontos M.C., Shah R., Fritz L.M., Anderson F. P., Tatum J.L. Ornato J.P., Jesse R. L., **Acute Coronary Syndromes : Implication of Different Cardiac Troponin I Levels for Clinical Outcomes and Prognosis of Acute Chest Pain Patients** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 43, No. 6, 2004
 107. Kusumoto A., Miyata M., Kubozono T., Ikeda Y., Shinsato T., et al. **Highly sensitive cardiac troponin T in heart failure: Comparison with echocardiographic parameters and natriuretic peptides** *Journal of Cardiology* (2012) 59, 202—208
 108. Lafont A., Durand E. **A.R.T.: concept of a bioresorbable stent without drug elution.** *EuroIntervention*. 2009 Dec 15;5 Suppl F:F83-7..
 109. Lam M.K., Tandjung K., Sen H., Basalus M.W., et al. **Coronary artery dominance and the risk of adverse clinical events following percutaneous coronary intervention: insights from the prospective, randomised TWENTE trial.** *EuroIntervention*. 2014 Feb 28
 110. Laterza O.F., Cameron S.J., Chappell D., et al. **Evaluation of pregnancy-associated plasma protein A as a prognostic indicator in acute coronary syndrome patients.** *Clin Chim Acta* 2004;348:163–9.
 111. Lenderink T., Heeschen C., Fichtlscherer S et al. for the CAPTURE Investigators **Elevated Placental Growth Factor Levels Are Associated With Adverse Outcomes at Four-Year Follow-Up in Patients With Acute Coronary Syndromes** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 47, No. 2, 2006
 112. Leonardi S., Thomas L., Neely M.L., Tricoci P. et al. **Comparison of the Prognosis of Spontaneous and Percutaneous Coronary Intervention–Related Myocardial Infarction** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 60, No. 22, 2012
 113. Lewandrowski K., Chen A., Januzzi J., **Cardiac Markers for Myocardial Infarction** *Am J Clin Pathol* 2002;118 (Suppl 1):S93-S99
 114. Libby P. **Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes** *Circulation*. 2001;104:365-372

- 115.Libby P., Ridker P.M., Maseri A. **Inflammation and Atherosclerosis** *Circulation*. 2002;105:1135-1143
- 116.Libby P., Theroux P. **Pathophysiology of Coronary Artery Disease** *Circulation*. 2005;111:3481-3488
- 117.Lim H. S., Blann A.D., Lip G.Y.H. **Soluble CD40 Ligand, Soluble P-Selectin, Interleukin-6, and Tissue Factor in Diabetes Mellitus Relationships to Cardiovascular Disease and Risk Factor Intervention** *Circulation*. 2004;109:2524-2528;
- 118.Lin J. C., Apple F. S., Murakami M.M., Luepker R.V. **Rates of Positive Cardiac Troponin I and Creatine Kinase MB Mass among Patients Hospitalized for Suspected Acute Coronary Syndromes** *Clinical Chemistry* 50:2 333–338 (2004)
- 119.Lindahl B., Toss H., Siegbahn A., Venge P., Wallentin L.. **Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group.** *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. N Engl J Med* 2000; 343: 1139-47
- 120.Little W.C., Constantinescu M., Applegate R.J., et al. **Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease?** *Circulation* 1988;78:1157–66.
- 121.Loeb H. S., Liu J.C. **Frequency, Risk Factors, and Effect on Long-Term Survival of Increased Troponin I Following Uncomplicated Elective Percutaneous Coronary Intervention** *Clin. Cardiol.* 33, 12, 40– E44 (2010)
- 122.Lund J., Qin ., Ilva T., Pettersson K., Voipio-Pulkki L.M., Porela P., Pulkki K. **Circulating Pregnancy-Associated Plasma Protein A Predicts Outcome in Patients With Acute Coronary Syndrome but No Troponin I Elevation** *Circulation*. 2003;108:1924-1926;
- 123.Maisel A., Mueller C., Adams K. Jr., Anker St. D., et al. **Review State of the art: Using natriuretic peptide levels in clinical practice** *European Journal of Heart Failure* 10 (2008) 824–839
- 124.Maisel A., Xue Y., Shah K., Mueller C., et al. **Increased 90-Day Mortality in Patients With Acute Heart Failure With Elevated Copeptin Secondary Results From the Biomarkers in Acute Heart Failure (BACH) Study** *Circ Heart Fail.* 2011;4:613-620;
- 125.Mandadi V. R., DeVoe M. C., Ambrose J.A., Demail M., Prakash A. M., Varshneya N. et al. **Predictors of troponin elevation after percutaneous coronary intervention** *American Journal of Cardiology* Volume 93, Issue 6, Pages 747–750, March 15, 2004
- 126.Marcovina S. M., Crea F., Davignon J., Kaski J. C., Koenig W., Landmesser U., Pieri P. L., Schulz-Menger J., Shaw L.J., Sobesky J. **Biochemical and bioimaging markers for risk assessment and diagnosis in major cardiovascular diseases: a road to integration of complementary diagnostic tools** *Journal of Internal Medicine* 261; 214–234 2007
- 127.McCann C. J., Glover B. M., Menown I.B.A., Moore M.J., McEneny J., Owens C.G., Smith B., Sharpe P.C., Young I.S., Adgey J.A. **Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T** *European Heart Journal* (2008) 29, 2843–2850
- 128.Mega J. L., Morrow D. A., de Lemos J. A., Sabatine M.S. et al. **B-Type Natriuretic Peptide at Presentation and Prognosis in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction An ENTIRE–TIMI-23 Substudy** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 44, No. 2, 2004

129. Meune C., Balmelli C., Freidank H., Winkler K. et al. **High-Sensitivity Cardiac Troponin in the Distinction of Acute Myocardial Infarction From Acute Cardiac Noncoronary Artery Disease** *Circulation*. 2012;126:31-40;
130. Meuwese M. C., Stoes E.S. G., Hazen S. L., et al. **Serum Myeloperoxidase Levels Are Associated With the Future Risk of Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Individuals The EPIC-Norfolk Prospective Population Study** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 50, No. 2, 2007
131. Miller W.L., Garratt K.N., Burritt M.F., Lennon R. J., Reeder G. S., Jaffe A.S. **Baseline troponin level: key to understanding the importance of post-PCI troponin elevations** *Oxford Journals Medicine & Health European Heart Journal* Volume 27, Issue 9 Pp. 1061-1069
132. Miller W.L., Garratt K.N., Burritt M.F., Reeder G.S., Jaffe A.S.. **Timing of peak troponin T and creatine kinase-MB elevations after percutaneous coronary intervention.** *Chest*. 2004 Jan;125(1):275-80.
133. Morgenthaler N.G., Struck J., Jochberger S., Dünser M.W.. **Copeptin: clinical use of a new biomarker.** *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 43–49 [PubMed]
134. Morgenthaler Nils G., Struck J Alonso., C., Bergmann A. **Assay for the Measurement of Copeptin, a Stable Peptide Derived from the Precursor of Vasopressin** *Clinical Chemistry* 52:1112–119 (2006)
135. Morgenthaler Nils G., Struck J Alonso., C., Bergmann A. **Measurement of Midregional Proadrenomedullin in Plasma with an Immunoluminometric Assay** *Clinical Chemistry* October 2005 vol. 51 no. 10 1823-1829
136. Morrow D. A., Rifai N., Antman E. M., Weiner D. L., McCabe C. H., Cannon C. P., Braunwald E. **C-Reactive Protein Is a Potent Predictor of Mortality Independently of and in Combination With Troponin T in Acute Coronary Syndromes: A TIMI 11A Substudy** , *Journal of the American College of Cardiology* Volume 31, Issue 7, June 1998, Pages 1460–1465
137. Morrow D.A. **Cardiovascular Biomarkers: Pathophysiology and Disease Management** Humana Press Inc 2006, Totowa, New Jersey 07512
138. Morrow D.A., Braunwald E. **Future of biomarkers in acute coronary syndromes: moving toward a multimarker strategy.** *Circulation* 2003;
139. Morrow D.A., Cannon C.P., Jesse R.L., Newby L. K., Ravkilde J., Storrow A. B., Wu A.H.B., Christenson R.H. **National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical Characteristics and Utilization of Biochemical Markers in Acute Coronary Syndromes** **NACB WRITING GROUP MEMBERS** *Clinical Chemistry* 53:4 552–574 (2007)
140. Morrow D.A., Cannon C.P., Rifai N., Frey M.G., Braunwald E, et al. **Ability of minor elevation of troponins I and T to Predict Benefit from an Early Invasive Strategy in Patients with Unstable Angina and Non-ST-elevation Myocardial Infarction** **TACTICS-TIMI 18.** *JAMA*. 2001 Nov 21;2001-vol.286(19):2405-12.
141. Morrow D.A., de Lemos J.A., Sabatine M.S., Antman E.M.. **The search for a biomarker of cardiac ischemia.** *Clin Chem* 2003;49:537–9.
142. Morrow D.A., de Lemos J.A., Sabatine M.S., Murphy S.A., Demopoulos L., Di Battiste P., et al. **Evaluation of B-type natriuretic peptide for risk assessment in unstable angina/non-ST elevation MI: BNP and prognosis in TACTICS-TIMI 18.** *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1264 –72.

143. Moussa I., Klein L.W., Shah B., et al. **Consideration of a New Definition of Clinically Relevant Myocardial Infarction after Coronary Revascularization.** *J Am Coll Cardiol* 2013; 62:1563-1570. Supplemental
144. Moussa I.D., Klein L.W., Shah B., Mehran R., et al. **Consideration of a New Definition of Clinically Relevant Myocardial Infarction After Coronary Revascularization An Expert Consensus Document From the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI)** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 62, No. 17, 2013
145. Nagaya N., Mori H., Murakami S., Kangawa K., Kitamura S. **Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. Review:** *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2005 288 R1432–R1437.
146. Nageh T., Sherwood R. A., Harris B. M., Thomas M.R. **Cardiac troponin I for risk stratification following percutaneous coronary artery intervention in acute coronary syndromes** *Catheterization and Cardiovascular Interventions* Volume 55, Issue 1, pages 37–42, January 2002
147. Nageh T., Sherwood R.A., Harris B.M., Byrne J.A., Thomas M.R. **Cardiac troponin T and I and creatine kinase-MB as markers of myocardial injury and predictors of outcome following percutaneous coronary intervention.** *Int J Cardiol.* 2003 Dec; 92 (2-3): 285-93.
148. Natarjan M.K., Kreatsoulas C., Velianou J.L., Mehta S.R., Pericak D., Goodhard D.M. **Incidence, predictors and clinical significance of troponin I elevation without CK elevation following percutaneous coronary intervention** *J Am Coll Cardiol.* 2004 ;93(6):750-53.
149. Neuhold S., Huelsmann M., Strunk G. et al. **Comparison of Copeptin, B-Type Natriuretic Peptide, and Amino-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Patients With Chronic Heart Failure Prediction of Death at Different Stages of the Disease** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 52, No. 4, 2008
150. Newby L.K., Christenson R.H., Ohman E.M., Armstrong P.W., Thompson T.D., Lee K.L., et al. **Value of serial troponin T measures for early and late risk stratification in patients with acute coronary syndromes. The GUSTO-IIa Investigators.** *Circulation* 1998;98:1853–9.
151. Nienhuis M. B., Ottervanger J. P., Bilo H. J.G., Dikkeschei B.D., Zijlstra F. **Prognostic value of troponin after elective percutaneous coronary intervention: A meta-analysis** *Catheterization and Cardiovascular Interventions* Volume 71, Issue 3, pages 318–324, 15 February 2008
152. Nienhuis M. B., Ottervanger J. P., Dikkeschei B., et al. **Prognostic importance of troponin T and creatine kinase after elective angioplasty** *International Journal of Cardiology* Volume 120, Issue 2, Pages 242–247, August 21, 2007
153. Nishikimi T., Horio T., Sasaki T., Yoshihara F., Takishita S., Miyata A., Matsuo H., Kangawa K. **Cardiac production and secretion of adrenomedullin are increased in heart failure.** *Hypertension* 1997
154. O'Donoghue M., de Lemos J.A., Morrow D.A., Murphy S.A., Buross J.L., Cannon C.P., Sabatine M.S. **Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes.** *Circulation* 2006, 114:550-557.
155. Okmen E., Kasikcioglu H., Sanli A., Uyarel H., Cam N. **Correlations between cardiac troponin I, cardiac troponin T, and creatine phosphokinase MB elevation following successful percutaneous coronary intervention and prognostic value of each marker.** *J Invasive Cardiol* 2005 Feb; 17 (2): 63-7.

156. Oltrona L., Ottani F., Galvani M. **Clinical significance of a single measurement of troponin-I and C-reactive protein at admission in 1773 consecutive patients with acute coronary syndromes.** Am Heart J 2004; 148:405–15.
157. Omland T., de Lemos J.A., Morrow D.A., Antman E.M., Cannon C.P., Hall C, et al. **Prognostic value of N-terminal pro-atrial and pro-brain natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes.** Am J Cardiol 2002;89:463–5.
158. Omland T., Persson A., Ng L., O'Brien R., Karlsson T., Herlitz J., et al. **N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes.** Circulation 2002;106:2913– 8.
159. O'Sullivan C.J., Windecker S. **Peri-procedural myocardial infarction: time for re-evaluation of its definition and use as an endpoint in coronary stent trials.** Heart. 2012 Oct;98(19):1397-9.
160. Ottani F., Galvani M., Nicolini F.A., Ferrini D., Pozzati A., Di Pasquale G., Jaffe Allan S. **Elevated cardiac troponin levels predict the risk of adverse outcome in patients with acute coronary syndromes** American Heart Journal Volume 140, Issue 6 , Pages 917-927, December 2000
161. Palmerini T., Biondi-Zoccai G., Della Riva D., Mariani A., Genereux P., Branzi A., Stone G.W. **Stent thrombosis with drug-eluting stents: is the paradigm shifting?** Journal of the American College of Cardiology 2013 Nov 19;62(21):1915-21.
162. Palmerini T., Biondi-Zoccai G., Della Riva D., Mariani A., Sabaté M., Smits P.C., Kaiser C., D'Ascenzo F., Frati G., Mancone M., Genereux P., Stone G.W. **Clinical outcomes with bioabsorbable polymer- versus durable polymer-based drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis.** Journal of the American College of Cardiology 2014 Feb 4;63(4):299-307.
163. Panteghini M. **Standardization of cardiac troponin I measurements: The way forward?** Clin Chem 2005;51: 1594 –7.
164. Panteghini M., Pagani F., Yeo K-T.J., Apple F.S., Christenson R.H., Dati F. et al. **Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations.** Clin Chem 2004;50:327–32.
165. Panteghini M., Cuccia C., Bonetti G., Glubbini R. **Single point cardiac troponin T at coronary care unit discharge after myocardial infarction correlates with infarct size and ejection fraction** Clin.Chem 2002;48:1432-1436
166. Pasceri V., Chang J., Willerson J.T., Yeh E. T. H. **Modulation of C-Reactive Protein–Mediated Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induction in Human Endothelial Cells by Anti-Atherosclerosis Drugs** Circulation. 2001;103:2531-2534
167. Pasceri V., Patti G., Nuska A., Pristipino C., Richichi G., Di Sciascio G. **Randomized trial of atorvastatin for reduction of myocardial damage during coronary intervention: results from ARMYDA study.** Circulation. 2004;110:674-678.
168. Peacock F., Morris D.L., Anwaruddin S., Christenson R.H., Collinson P.O., Goodacre S.W., et al. **Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department.** Am Heart J 2006;152:253– 62.
169. Pearson T. A., Mensah G.A., Hong Y., Smith S.C.Jr. **CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease Application to Clinical and Public Health Practice Overview** Circulation. 2004;110:e543-e544

170. Pearson T.A., et al. **Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association** *Circulation*. 2003;107:499-511
171. Prasad A., Gersh B.J., Bertrand M.E., et al. **Prognostic significance of periprocedural versus spontaneously occurring myocardial infarction after percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndromes. An analysis from the ACUITY (Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy) trial.** *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:477-486.
172. Prasad A., Herrmann J., **Myocardial Infarction Due to Percutaneous Coronary Intervention** *N Engl J Med* 2011;364:453-64
173. Prasad A., Rihal C. S., Lennon Ryan J., et al. **Trends in Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention for Chronic Total Occlusions: A 25-Year Experience From the Mayo Clinic** *Journal of the American College of Cardiology* Volume 49, Issue 15, 17 April 2007, Pages 1611-1618
174. Prasad A., Rihal C.S., Lennon R.J., et al. **Significance of periprocedural myonecrosis on outcomes after percutaneous coronary intervention: an analysis of preintervention and postintervention troponin T levels in 5487 patients.** *Circ Cardiovasc Interv*. 2008;1: 10-19.
175. Prasad A., Singh M., Lerman A., Lennon R. J., Holmes D. R. Jr, Rihal C. S., **Isolated Elevation in Troponin T After Percutaneous Coronary Intervention Is Associated With Higher Long-Term Mortality** *Journal of the American College of Cardiology* Volume 48, Issue 9, 7 November 2006, Pages 1765-1770
176. Prasad, A., Herrmann J. **Myocardial Infarction Due to Percutaneous Coronary Intervention** *N Engl J Med* 2011; 364:453-464
177. Reichlin T., Hochholzer W., Stelzig C. et al. **Incremental Value of Copeptin for Rapid Rule Out of Acute Myocardial Infarction** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 54, No. 1, 2009
178. Reiter M., Twerenbold R., Reichlin T. et al. **Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays** *European Heart Journal* (2011) 32, 1379-1389
179. Ricciardi M. J., Wu E., Davidson C. J., Choi K.M., Klocke F. J., Bonow R.O, **Visualization of Discrete Microinfarction After Percutaneous Coronary Intervention Associated With Mild Creatine Kinase-MB Elevation** *Circulation*. 2001;103:2780-2783
180. Ricciardi M.J., Davidson C.J., Gubernikoff G., Beohar N., Eckman L.J., Parker M.A., Bonow R.O.. **Troponin I elevation and cardiac events after percutaneous coronary intervention.** *Am Heart J*. 2003 Mar;145(3):522-8.
181. Richards M., Lainchbury J.G, Nicholls M. G., **Unsatisfactory redefinition of myocardial infarction** *The Lancet*, Volume 357, Issue 9269, Pages 1635 - 1636, 26 May 2001
182. Ridker P.M., Paynter N. P., Rifai N., Gaziano J. M., Cook N. R. **C-Reactive Protein and Parental History Improve Global Cardiovascular Risk Prediction: The Reynolds Risk Score for Men** *Circulation*. 2008;118:2243-2251;
183. Risinger G.M.Jr., Hunt T. S., Updike D. L., Bullen E.C. and Howard E.W. **Matrix Metalloproteinase-2 Expression by Vascular Smooth Muscle Cells Is Mediated by Both**

Stimulatory and Inhibitory Signals in Response to Growth Factors Journal of Biological Chemistry 2006;281:25915-25925

184. Roe M.T., Mahaffey K.W., Kilaru R. et al. **Creatine kinase-MB elevation after percutaneous coronary intervention predicts adverse outcomes in patients with acute coronary syndromes.** Eur Heart J. 2004;25:313–321.
185. Roger V. L., Killian J. M., Weston S. A., Jaffe A.S., Kors J., Santrach P. J., Tunstall-Pedoe H., Jacobsen S. J. **Redefinition of Myocardial Infarction: Prospective Evaluation in the Community** Circulation. 2006;114:790-797;
186. Saadeddin S.M., Habbab M.A., Sobki S.H., Ferns G.A. **Association of systematic inflammatory state with troponin T elevation after elective uncomplicated percutaneous coronary intervention** Am J Cardiol 2002;89(8):981-983
187. Sabatine M S., Morrow D.A., de Lemos J. A., et al. **Multimarker Approach to Risk Stratification in Non-ST Elevation Acute Coronary Syndrome Simultaneous Assessment of Troponin I, C-Reactive Protein, and B-Type Natriuretic Peptide** Circulation. 2002;105:1760-1763;
188. Salomaa V., Koukkunen H., Ketonen M., Immonen-Räihä P., Kärjä-Koskenkari P., Mustonen J., Lehto S., Torppa J., Lehtonen A., Tuomilehto J., Kesäniemi Y.A., Pyörälä K. **A new definition for myocardial infarction: what difference does it make?.** European Heart Journal (2005) 26, 1719–1725
189. Schaub N., Reichlin T., Meune C., et al. **Markers of Plaque Instability in the Early Diagnosis and Risk Stratification of Acute Myocardial Infarction** Clinical Chemistry 58:1 ; 246–256 (2012)
190. Schönbeck U., Varo N., Libby P., Buring J., Ridker P.M. **Soluble CD40L and Cardiovascular Risk in Women** Circulation. 2001;104:2266-2268
191. Seino Y., Ogawa A., Yamashita T., Fukushima M., Ogata K., Fukumoto H., Takano T. **Application of NT-proBNP and BNP measurements in cardiac care: a more discerning marker for the detection and evaluation of heart failure** The European Journal of Heart Failure 6 (2004) 295–300
192. Tanaka A., Shimada K., Sano T. et al. **Multiple Plaque Rupture and C-Reactive Protein in Acute Myocardial Infarction** J Am Coll Cardiol. 2005;45(10):1594-1599.
193. Tanaka T., Sohmiya K., Kitaura Y. et al. **Clinical Evaluation of Point-of-Care-Testing of Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-FABP) for the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction** a Journal of Immunoassay and Immunochemistry Volume 27, Issue 3, 2006, 225-238
194. Tardiff B. E., Califf R. M., Tchong J. E., **Clinical Outcomes After Detection of Elevated Cardiac Enzymes in Patients Undergoing Percutaneous Intervention** JACC Vol. 33, No. 1 January 1999:88–96
195. Tayebjee M. H., Lip G.Y.H., Tan K. T., Patel J.V., Hughes E.A., MacFadyen Robert J. **Plasma Matrix Metalloproteinase-9, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2, and CD40 Ligand Levels in Patients With Stable Coronary Artery Disease** The American Journal of Cardiology Volume 96, Issue 3, 1 August 2005, Pages 339–345
196. Tayebjee M.H., Nadar S., Blann A.D., Gareth Beevers D., MacFadyen R.J., Lip G.Y. **Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment : A substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)** American Journal of Hypertension 2004 Volume 17, Issue 9Pp. 764-769

197. Testa L., Van Gaal W.J., Biondi Zoccai G.G.L., Agostoni P., Latini R.A., Bedogni F., Porto I., Banning A.P. **Myocardial infarction after percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of troponin elevation applying the new universal definition** QJM: An International Journal of Medicine Volume 102, Issue 6 Pp. 369 - 378
198. Thomas L. **Labor und Diagnose** 6 Auflage, TH-Books, 2005, 121-155
199. Thygesen K., Alpert J. S., Jaffe A. S., Simoons M. L., Chaitman B. R., White H. D.: the Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction **Third Universal Definition of Myocardial Infarction** Journal of the American College of Cardiology Vol. 60, No. 16, 2012
200. Thygesen K., Alpert J. S., Jaffe A.S., Simoons M.L., Chaitman B.R., White H.D. : the Writing Group on behalf of the Joint **ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction Third Universal Definition of Myocardial Infarction** Circulation. 2012;126:2020-2035;
201. Thygesen K., Alpert J. S., White H.D. on behalf of the **Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction Universal definition of myocardial infarction** European Heart Journal (2007) 28, 2525–2538
202. Topol E. J., Teirstein P. S. **Textbook of Interventional Cardiology 7-Edition**, 2016, Elsevier ;482-491
203. Townsend J.C., Rideout P., Steinberg D.H. **Everolimus-eluting stents in interventional cardiology**. Vasc Health Risk Manag. 2012;8:393-404
204. Trevelyan J., Needham E.W.A, Smith S.C.H., Mattu R.K, **Impact of the recommendations for the redefinition of myocardial infarction on diagnosis and prognosis in an unselected United Kingdom cohort with suspected cardiac chest pain** The American Journal of Cardiology Volume 93, Issue 7, 1 April 2004, Pages 817–821
205. Tricoci P., Leonardi S. **Determining Myocardial Infarction After PCI: CK-MB, Troponin, Both or Neither?** Journal of the American College of Cardiology Oct 10, 2013
206. Tricoci P., Leonardi S., White J., White H. D., Armstrong P.W. et al. **Cardiac Troponin After Percutaneous Coronary Intervention and 1-Year Mortality in Non–ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome Using Systematic Evaluation of Biomarker Trends** Journal of the American College of Cardiology Vol. 62, No. 3, 2013
207. Tsimikas S. **Oxidative Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Cardiovascular Disease** The American Journal of Cardiology Volume 98, Issue 11, Supplement 1, 4 December 2006, Pages S9–S17
208. Tunstall-Pedoea H. **Redefinition of myocardial infarction by a consensus dissenter** J Am Coll Cardiol. 2001;37(5):1472-1473.
209. Uetani T., Amano T., Kumagai S. **Intracoronary Electrocardiogram Recording With a Bare-Wire System Perioperative ST-Segment Elevation in the Intracoronary Electrocardiogram Is Associated With Myocardial Injury After Elective Coronary Stent Implantation** JACC: Cardiovascular Interventions VOL. 2, NO. 2, 2009
210. Valenzuela-Sánchez F., Valenzuela-Méndez B., Rodríguez-Gutiérrez. J.F., Estella-García Á., González-García M.Á. **New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure** Annals of Translational Medicine Vol 4, No 17 :329 (September 2016)

211. Van de Werf F., Ardissino D., Betriu A. et al. **Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation** The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology, *European Heart Journal* (2003) 24, 28–66
212. Varo N., de Lemos J.A., Libby P., Morrow D.A., et al. **Soluble CD40L: Risk Prediction After Acute Coronary Syndromes** *Circulation*. 2003;108:1049-1052;
213. Vasan R. S., Sullivan L. M., Roubenoff R. et al. **Inflammatory Markers and Risk of Heart Failure in Elderly Subjects Without Prior Myocardial Infarction: The Framingham Heart Study** *Circulation* 2003;107;1486-1491
214. Vaughan D. E. **Plasminogen Activator Inhibitor-1 and the Calculus of Mortality After Myocardial Infarction** *Circulation*. 2003;108:376-377
215. Venugopal S.K., Devaraj S., Yuhanna I., Shaul P., Jialal I. **Demonstration That C-Reactive Protein Decreases eNOS Expression and Bioactivity in Human Aortic Endothelial Cells** *Circulation*. 2002;106:1439-1441;
216. Voors A. A., von Haehling S., Anker S. D., Hillege H.L., et al. for the OPTIMAAL Investigators; **C-terminal proavopressin (copeptin) is a strong prognostic marker in patients with heart failure after an acute myocardial infarction: results from the OPTIMAAL study** *European Heart Journal* (2009) 30, 1187–1194
217. Vranckx P., Farooq V., Garg S., Van Es G.A., Silber S., Windecker S., Stone G.W., Serruys P.W. **Different cardiac biomarkers to detect peri-procedural myocardial infarction in contemporary coronary stent trials: impact on outcome reporting.** *Heart*. 2012 Oct;98(19):1424-30
218. Vuotikka P., Uusimaaemail P., Niemelä M., et al. **Serum myoglobin/carbonic anhydrase III ratio as a marker of reperfusion after myocardial infarction** *International Journal of Cardiology* Volume 91, Issues 2-3, Pages 137–144, October 2003
219. Wald N.J., Watt H.C., Hackshaw A.K. **Integrated screening for Down’s syndrome based on tests performed during the first and second trimesters.** *N Engl J Med* 1999;341:461–7.
220. Warren J., Cantor L., Newby K., Christenson R.H. et al. for the SYMPHONY and 2-nd SYMPHONY Cardiac Markers Substudy Investigators **Prognostic Significance of Elevated Troponin I After Percutaneous Coronary Intervention** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 39, No. 11, 2002
221. Werner N., Bauer T., Hochadel M., et al. **Incidence and Clinical Impact of Stroke Complicating Percutaneous Coronary Intervention Results of the Euro Heart Survey Percutaneous Coronary Interventions Registry** *Circ Cardiovasc Interv*. 2013;6:362-369;
222. White H., **Avatar of the Universal Definition of Periprocedural Myocardial Infarction** *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 62, No. 17, 2013
223. Willerson J.T., Ridker P.M. **Inflammation as a Cardiovascular Risk Factor** *Circulation*. 2004;109:II-2-II-10
224. Wu A. H.B., Apple F. S., Gibler W. B., Jesse R. L., Warshaw M. M., Valdes R. Jr. **National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: Recommendations for the Use of Cardiac Markers in Coronary Artery Diseases.** *Clinical Chemistry* 45:7 1104–1121 (1999) NACB

225. Wu A.H.B., Packer M., Smith A., Bijou R., Fink F., Mair J. et al. **Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study.** *Clin Chem* 2004;50:867-73.
226. Wu, A. H. **Cardiac Markers**, Totoma, N. J., Humana Press, 1998, 3-21; 193-229; 259-281
227. Yeh E.T.H., Willerson J. T. **Coming of Age of C-Reactive Protein Using Inflammation Markers in Cardiology** *Circulation*. 2003;107:370-371
228. Zhang R., Brennan M.L., Fu X., Aviles R.J., Pearce G.L., Penn M.S., Topol E.J., Sprecher D.L., Hazen S.L. **Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease.** *JAMA*. 2001 Nov 7;286(17):2136-42.
229. Zimarino M., Affinito V. **The prognosis of periprocedural myocardial infarction after percutaneous coronary interventions** *Cardiovasc Revasc Med*. 2013 Jan-Feb;14(1):
230. Zimarino M., Cicchitti V., Genovesi E., Rotondo D., De Caterina R. **Isolated troponin increase after percutaneous coronary interventions: does it have prognostic relevance?** *Atherosclerosis*. 2012 Apr;221(2):297-302
231. Zimmerman J., Fromm R., Meyer D., Boudreaux A., Wun C. C., Smalling R., Davis B., Habib G., Roberts R. **Diagnostic Marker Cooperative Study for the Diagnosis of Myocardial Infarction** *Circulation*. 1999;99:1671-1677