

Biochimica dei marcatori di lesione miocardica

Franca Pagani

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1 Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia

In termini generali sono da considerare marcatori di danno cellulare quelle molecole presenti nelle cellule che, liberate nel circolo sanguigno a causa di una lesione cellulare di qualsiasi natura, possono essere dosate nel siero o nel plasma.

Il marcatore ideale di danno miocardico dovrebbe: essere contenuto unicamente nella cellula miocardica, in tale condizione si otterrebbe una specificità diagnostica assoluta per il danno cardiaco; essere presente in elevata concentrazione nel muscolo cardiaco, ad ottenere un'elevata sensibilità; essere rilasciato dal muscolo cardiaco danneggiato rapidamente (diagnosi precoce), in maniera completa e in quantità proporzionale al danno miocardico (valutazione dell'estensione del danno); essere rilevabile in circolo per molte ore così da permettere il dosaggio in una finestra diagnostica utile a porre diagnosi anche tardivamente. Queste proprietà determinano le caratteristiche diagnostiche di un marcatore, ovvero la sensibilità e la specificità cliniche e, di conseguenza, la sua efficacia. Tali caratteristiche sono definite da fattori biochimici e fisiopatologici quali: peso molecolare (PM) (in genere, le molecole più piccole sono rilasciate in circolo più precocemente); compartimentazione cellulare (le proteine citoplasmatiche possono essere rilasciate più rapidamente rispetto a quelle strutturali, che compaiono in circolo più tardivamente); solubilità (le macromolecole a bassa solubilità, come alcune proteine strutturali sono rilasciate più lentamente); coefficiente di rilascio (le molecole a elevato PM rimangono a lungo nella zona di necrosi, dove il flusso ematico è rallentato, e subiscono la degradazione catabolica già a livello locale, quindi la quantità misurata in circolo sarà più bassa rispetto a quella effettivamente liberata dalle cellule danneggiate. Variazioni del flusso ematico, per es. in caso di riperfusione coronarica, condizionate particolarmente la cinetica di tali proteine); clearance (le proteine a basso PM mostrano generalmente una clearance plasmatica più rapida di quelle ad elevato PM, con conseguente emivita plasmatica più breve e finestra diagnostica più limitata); localizzazione tissutale (la presenza di alcune proteine nella muscolatura scheletrica oltre che in quella cardiaca pregiudica ovviamente la specificità diagnostica per il danno cardiaco); specificità per il danno miocardico irreversibile (è possibile che proteine a basso PM e contenute nel citoplasma possano essere liberate dalle cellule dopo una alterazione re-

versibile della membrana da ischemia transitoria, tuttavia il rilascio prolungato di proteine strutturali è altamente specifico per la presenza di necrosi cellulare).

Creatinchinasi isoenzima MB^{1,2}

La creatinchinasi (CK) è un enzima che svolge un ruolo chiave nel metabolismo energetico della cellula per la sua capacità di formare ATP a partire da creatinfosfato e ADP e catalizzare anche la reazione inversa, con conseguente rapido immagazzinamento o rilascio di energia. La CK ha una struttura dimerica derivante dalla combinazione di due monomeri, definiti M e B del PM rispettivamente di 43000 e 44500 dalton, ciascuno codificato da un gene specifico. Le diverse combinazioni di questi due monomeri danno origine a tre isoenzimi, differenziabili in base alla loro mobilità elettroforetica e alle rispettive proprietà immunologiche: CK-BB, CK-MB, e CK-MM. Esiste anche un isoenzima mitocondriale, codificato da un gene specifico e costituito da due subunità identiche, a distribuzione tissutale ubiquitaria e presente in circolo in forma di oligomero ad elevato PM. La localizzazione tissutale della CK non è cardiospecifica, essa, infatti, è distribuita in molti tessuti, peraltro in modo disomogeneo. Essa è presente in quantità elevata nel citoplasma delle cellule muscolari scheletriche, quasi esclusivamente rappresentata da CK-MM con piccole quantità di CK-MB (1-3%). Più importante è la quota di CK-MB presente nel miocardio (circa il 20% della CK cardiaca), mentre il restante 80% è rappresentato da CK-MM, questa caratteristica rende possibile l'utilizzo dell'isoenzima MB come marcatore di danno miocardico. Nel muscolo scheletrico fetale la percentuale degli isoenzimi è quasi identica fino al terzo mese di gestazione, prevale poi CK-MM caratteristica del muscolo adulto. Nell'adulto sano, l'attività sierica della CK riflette la composizione isoenzimatica del muscolo scheletrico, quasi totalmente attribuibile alla CK-MM che, infatti, è più del 98% dell'attività enzimatica totale.

In corso di infarto acuto del miocardio (IMA), la CK-MB presenta una tipica cinetica di rilascio: compare in circolo circa 3-4 ore dopo l'inizio della sintomatologia, aumenta fino a raggiungere il picco dopo 10-20 ore, per ritornare poi alla normalità tra 2 e 3 giorni dopo l'inizio della sintomatologia. Per quanto riguarda la specificità per il danno irreversibile è

stato dimostrato che esiste una chiara correlazione tra incrementi della concentrazione di CK-MB in circolo e il reperto istologico autoptico solo nel caso di lesione irreversibile.

Mioglobina¹

La mioglobina è una proteina globulare a basso peso molecolare (17800 dalton), costituita da una catena polipeptidica di 153 aminoacidi e da un gruppo prostetico, l'eme, identico a quello dell'emoglobina. La mioglobina è presente nel citoplasma delle cellule cardiache e muscolari scheletriche dove svolge un importante ruolo nel trasporto dell'ossigeno dalle membrane cellulari ai mitocondri e funge da riserva di ossigeno. Non sono conosciute forme tessuto-specifiche e, di conseguenza il suo rilascio nella circolazione sanguigna non è marcatore specifico di danno miocardico, in quanto un aumento della mioglobina nel sangue si può verificare anche in caso di trauma alla muscolatura scheletrica. Tuttavia, per le piccole dimensioni e la localizzazione citoplasmatica la mioglobina viene rilasciata molto rapidamente dopo un danno cellulare nel torrente circolatorio, dove è rilevabile già dopo 1-2 ore dall'evento, questo fa della mioglobina un marcatore molto sensibile di necrosi. La proteina raggiunge il suo picco di concentrazione dopo circa 6-12 ore, per poi decrescere fino a rientrare ai valori basali entro 24-36 ore.

La sua eliminazione è esclusivamente renale, dove, come tutte le proteine a basso PM, passa liberamente attraverso il filtro glomerulare. La sua concentrazione può, pertanto, modificarsi in condizioni di insufficienza renale, presentando valori elevati per mancata eliminazione. Purtroppo, la sua efficacia diagnostica è limitata dalla totale mancanza di specificità, legata alla sua presenza nel muscolo scheletrico, che comporta incrementi di mioglobina in corso non solo di patologie muscolari, ma anche di semplice esercizio fisico, specie se prolungato.

Troponine³⁻⁹

La contrazione del muscolo striato dipende, a livello molecolare, dall'interazione fra la miosina, contenuta nel filamento spesso della fibra muscolare, e l'actina, contenuta nel filamento sottile. L'interazione, mediata dal calcio, è regolata dal complesso troponina-tropomiosina.

Questo complesso è situato lungo il filamento sottile con un rapporto troponina:tropomiosina:actina di 1:1:7. Il complesso "troponina" consiste di tre proteine in rapporto equimolecolare tra loro: troponina C (TnC; PM 18000 dalton), troponina I (TnI; PM 22000 dalton) e troponina T (TnT; PM 37000 dalton). La TnC, la TnI e la parte C-terminale della TnT formano una testa globulare, mentre la parte restante della molecola di TnT assume la forma di una bacchetta che interagisce con la tropomiosina a sua volta legata all'actina. L'evento promotore della contrazione muscolare è rappresentato dalla liberazione del calcio che, rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico, si lega ai siti regolatori della TnC inducendo una modificazione conformazionale dell'intera unità troponinica e conseguente esposizione sull'actina dei siti attivi specifici per il legame con la testa della miosina. L'interazione actina-miosina promuove lo scorrimento dei due filamenti, sottile (actina) e spesso (miosina), l'uno sull'altro con conseguente accorciamento della fibra muscolare e contrazione del muscolo. Quando il calcio ritorna nel reticolo sarcoplasmatico il complesso troponinico ritorna nella sua conformazione

originale, la TnI inibisce l'attività ATP-asi dell'actomiosina e il muscolo si rilassa.

TnT e TnI hanno ognuna tre isoforme differenti, ognuna codificata da un gene diverso. Queste isoforme si trovano nel muscolo cardiaco, nelle fibre muscolari scheletriche veloci e nelle fibre muscolari scheletriche lente e sono quindi tessuto-specifiche. La TnC è rappresentata da un'unica isoforma comune a tutti i tipi di muscolatura. Le isoforme cardiache di TnT (cTnT) e TnI (cTnI) possiedono quindi la caratteristica, in base alla localizzazione tissutale, che permette di identificarle come marcatori di lesione miocardica a elevata specificità. Per quanto riguarda la TnT sono state dimostrate 125 differenze aminoacidiche tra la forma scheletrica veloce adulta e la forma cardiaca, con un grado di omologia del 56.6%, e 120 differenze tra la forma scheletrica lenta adulta e la forma cardiaca, con un grado di omologia del 58.3%. Similmente per la TnI il grado di omologia è del 41.4% tra la forma scheletrica veloce adulta e la forma cardiaca e del 46.2% tra la forma scheletrica lenta adulta e la forma cardiaca. In entrambi i casi le differenze tra gli aminoacidi sono concentrate nella regione N-terminale. Durante lo sviluppo fetale del muscolo c'è una espressione simultanea delle isoforme dai tre geni della TnT. Al contrario, non c'è espressione della forma cardiaca di TnI durante lo sviluppo del muscolo scheletrico fetale. Nel cuore umano è predominante la isoforma scheletrica lenta della TnI, questa scompare dopo la nascita e la forma cardiaca risulta la sola evidenziabile dopo i 9 mesi di vita. Le isoforme della TnI mostrano differenti risposte ai cambiamenti di pH e all'ischemia. La isoforma scheletrica lenta sarebbe più resistente all'acidosi, proteggendo il neonato all'instaurarsi di questa condizione metabolica, per contro, in presenza di ischemia miocardica, la fosforilazione delle serine in posizione 43 e 45 della isoforma cardiaca diminuirebbe la risposta al calcio evitando l'instaurarsi di una contrattura cardiaca ischemica.

La compartimentazione delle due troponine all'interno della cellula miocardica comprende anche una piccola quota libera nel citoplasma, di probabile neosintesi, pari al 6% e al 3% della concentrazione intracellulare totale rispettivamente per la cTnT e per la cTnI. La compartimentazione delle troponine condiziona le cinetiche di rilascio riscontrate in corso di IMA. Dopo IMA, le troponine mostrano due picchi imputabili alla presenza dei due differenti pool intracellulari, e, in particolare, quello precoce al pool citoplasmatico, che fuoriesce dalla cellula subito dopo l'insulto ischemico, e quello tardivo al pool strutturale che si libera solo dopo la completa disgregazione cellulare. La cinetica di rilascio delle troponine è caratterizzata da un'ampia finestra diagnostica: dopo un IMA, infatti, i valori si mantengono elevati per almeno 4-5 giorni (cTnI) o 5-7 giorni (cTnT). Un fattore biochimico che ha importanti conseguenze sui metodi analitici relativamente alla preparazione di calibratori e anticorpi per la determinazione della cTnI è rappresentato dal fatto che le forme molecolari di cTnI presenti in circolo dopo un IMA sono molto eterogenee. Infatti, almeno l'80% della cTnI è presente in circolo complessata con la TnC, mentre la restante percentuale è rappresentata dal complesso ternario cTnI-C-T e dalla forma libera. Inoltre, bisogna tener presente che le regioni N- e C-terminale della molecola di cTnI sono suscettibili alla proteolisi con conseguente perdita di reattività verso eventuali anticorpi diretti ai siti antigenici contenuti in tali frammenti molecolari. Un'altra caratteristica biochimica con importanti risvolti di tipo

preanalitico e analitico è la presenza sulle molecole di entrambe cTnI e cTnT di cariche positive che possono legare l'eparina, un polianione carico negativamente. Questo legame può ridurre l'immunoreattività della molecola troponinica e rendere problematico l'utilizzo di tale anticoagulante.

È indubbio, tuttavia, che l'efficacia diagnostica delle troponine nella definizione del danno miocardico risulta particolarmente elevata in termini di sensibilità e specificità. Questa elevata efficacia è strettamente connessa con le basse concentrazioni di cTnT e cTnI nel siero di soggetti sani, che permette di utilizzare livelli decisionali molto bassi.

Proteine leganti gli acidi grassi^{10,11}

Le proteine leganti gli acidi grassi (*fatty acid-binding proteins*, FABP) sono un gruppo di proteine caratterizzate da un basso PM (15000 dalton) e localizzazione citoplasmatica nelle cellule di tutti i tessuti che utilizzano gli acidi grassi come substrato metabolico. In particolare, sono state descritte almeno sei forme differenti di FABP. Queste forme prendono il nome dal tessuto nel quale sono state identificate per la prima volta o dal tessuto in cui sono più abbondantemente presenti, si distinguono quindi le forme: epatica, cardiaca, intestinale, renale, adipocitica, mielinica. La forma epatica si trova anche nel piccolo intestino e nel rene, e la forma cardiaca (hFABP) è presente oltre che nelle cellule miocardiche anche nel muscolo scheletrico, nel cervello, nel polmone, nelle ghiandole mammarie, sebbene in quantità nettamente inferiore rispetto a quella trovata nel miocardio. La hFABP è presente nelle cellule cardiache in quantità molto elevata (15-30% di tutte le proteine citosoliche), mentre, in condizioni normali, la sua concentrazione plasmatica è irrilevante. Questi fattori biochimici determinano un'elevata sensibilità diagnostica della hFABP per il danno miocardico che, abbinata alla precocità di comparsa in circolo della proteina, connessa al suo basso PM, rendono la hFABP un marcatore molto sensibile e precoce di IMA.

Glicogeno fosforilasi BB¹¹

La glicogeno fosforilasi (GP) è un enzima glicolitico che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo dei carboidrati catalizzando la prima reazione della glicogenolisi nella quale il glicogeno viene trasformato in glucosio-1-fosfato. GP è un dimero composto da due identiche subunità. Nei tessuti umani si trovano tre isoenzimi, codificati ciascuno da un gene specifico, che differiscono per la sequenza amminoacidica della porzione carbossiterminale e sono, quindi, distinguibili immunologicamente: la GP-LL (epatica), la GP-MM (muscolare), la GP-BB (cerebrale). Questi isoenzimi non sono tessuto specifici, infatti la GP-BB (PM di 96000 dalton) si trova oltre che nel cervello anche nel tessuto miocardico dove peraltro è l'isoenzima predominante. Il ruolo fisiologico della GP-BB la rende estremamente sensibile al ridotto apporto di ossigeno alle cellule miocardiche. Infatti, l'ipossia determina una brusca riduzione della glicogenolisi, con conseguente passaggio della GP-BB dalla forma strutturale, intimamente legata al reticolo sarcoplasmatico, alla forma libera nel citoplasma, da dove, organizzata in dimeri, fuoriesce nel comparto extracellulare, attraversando la membrana danneggiata, e da lì nel circolo. Queste peculiarità fisiopatologiche renderebbero la GP-BB un marcatore molto sensibile e molto specifico di ischemia cellulare, ma anche molto precoce, in quanto la sua comparsa in circolo riflette le modificazioni

metaboliche che si verificano a livello cellulare, immediatamente dopo un insulto ischemico. GP-BB non è una proteina cardio-specifica quindi la sua specificità per la diagnosi di IMA è limitata, tuttavia aumenti della GP-BB in circolo sono specifici di danno ischemico miocardico qualora venisse escluso un danno a livello del tessuto cerebrale.

Albumina modificata dall'ischemia (IMA)^{12,13}

Nel siero di pazienti con ischemia miocardica l'albumina mostra una ridotta capacità di legare il cobalto se comparata all'albumina nel siero di soggetti sani. Questa osservazione ha portato ad ipotizzare che sia possibile diagnosticare l'ischemia miocardica prima della comparsa della necrosi cellulare attraverso la misurazione del cobalto non legato all'estremità N-terminale dell'albumina modificata dall'evento ischemico. Tuttavia, il marcatore IMA se da una parte è intrigante per la sua recondita possibilità di evidenziare l'evento precedente la necrosi, dall'altra non può essere assunto come specifico per l'ischemia miocardica, dal momento che il suo aumento rappresenta sostanzialmente un indicatore generico di stress ossidativo e potrebbe quindi essere osservato durante episodi ischemici a danno di altri organi che non siano il cuore.

Bibliografia

1. Adams JE III, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* 1993; 88:750-63.
2. Ishikawa Y, Saffitz JE, Mealman TL, Grace AM, Roberts R. Reversible myocardial ischemic injury is not associated with increased creatinine kinase activity in plasma. *Clin Chem* 1997; 43:467-75.
3. Collinson PO, Boa FG, Gaze DC. Measurement of cardiac troponins. *Ann Clin Biochem* 2001; 38:423-49.
4. Takeda S, Yamashita A, Maeda K, Maeda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form. *Nature* 2003; 424:35-41.
5. Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, Pettersson K, Lovgren T, Severina ME, *et al.* Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as a complex. *Clin Chem* 1997; 43:1379-85.
6. Wu AHB, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, *et al.* Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin Chem* 1998; 44:1198-208.
7. Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov V, Esakova TV. Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37:1091-5.
8. Hammerer-Lercher A, Erlacher P, Bittner R, Korinthenberg R, Skladal D, Sorichter S, *et al.* Clinical and experimental results on cardiac troponin expression in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chem* 2001; 47:451-8.
9. Apple FS. Cardiac troponin testing in renal failure and skeletal muscle disease patients. In: Wu AHB ed. *Cardiac Markers*. Totowa, USA: Humana Press; 2003. p. 139-47.
10. Glatz JFC, Van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins. Their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 1996; 35:243-82.

11. Wu AHB, Crosby P, Fagen G, Danne O, Frei U, Mockel M, *et al*. Ischemia modified albumin, free fatty acids, whole blood choline, B-type natriuretic peptide, glycogen phosphorylase BB, and cardiac troponin. In: Wu AHB ed. *Cardiac Markers*. Totowa, USA: Humana Press; 2003. p. 259-78.
12. Bar-Or D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. Characterization of the Co^{2+} and Ni^{2+} binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. *Eur J Biochem* 2001; 268:42-7.
13. Roy D, Quiles J, Sharma R, Sinha M, Avanzas P, Gaze D, *et al*. Ischemia-modified albumin concentrations in patients with peripheral vascular disease and exercise-induced skeletal muscle ischemia. *Clin Chem* 2004; 50:1656-60.