



# AKUT MİYOKARD ENFARKTÜSLÜ VE SAĞLIKLI OLGULARDA CK-MB AKTİVİTE VE KÜTLE ÖLÇÜMÜ YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İnci KÜÇÜKERCAN<sup>1</sup>, Özlem ÇAKIR<sup>1</sup>, Gülşen TOKDEMİR<sup>1</sup>, Gülcan BALOĞLU<sup>1</sup>, Asuman ORÇUN<sup>1</sup>

CK-MB izoenziminin ölçümünde, rutin laboratuarlarda günümüzde en yaygın kullanılan yöntem immunoinhibisyon ile CK-MB aktivite ölçümüdür. Bu teknik ile ilgili en sık karşılaşılan sorun, miyokardial nekrozun söz konusu olmadığı durumlarda da sonuçların referans aralığının üzerinde çıkmasıdır. Biz çalışmamızda, immunoinhibisyon ile elde edilen sonuçları yeni bir yöntem olarak kabul gören, CK-MB kütle konsantrasyonunun elektrokemiluminometrik immunoassay yöntemi ile karşılaştırdık. Bu amaçla ilk olarak, total CK değeri normal olup CK-MB aktivite değeri firmanın verdiği kit referans aralığının üzerinde olan ve kardiyak şikayet ve öyküsü olmayan 65 olgu çalışmaya alındı. Bu 65 olgu sağlıklı grup olarak kabul edildi. Çalışmanın ikinci bölümünde klinik olarak akut miyokard enfarktüsü (AMI) tanısı almış 34 hasta serumu her iki yöntemle çalışıldı. Sağlıklı grupta her iki yöntemle elde edilen CK-MB sonuçları arasında kötü bir korelasyon bulunurken ( $r=0.076$ ), AMI'li grubun değerleri oldukça yüksek bir korelasyon gösterdi ( $r=0.977$ ). Sonuç olarak, sağlıklı olgularda immunoinhibisyon tekniği ile CK-MB değerlerinin pozitif interfere olduğunu, gerçek yüksek kardiyak CK-MB değerlerinde bu interferansın oranla azaldığını düşünmekteyiz.

*Anahtar kelimeler: Miyokard enfarktüsü, kreatin kinaz, izoenzim*

## CK-MB ISOENZYME DETERMINATION WITH IMMUNOINHIBITION-ACTIVITY AND MASS ASSAYS IN HEALTHY CONTROLS AND PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

In quantification of CK-MB isoenzyme, activity measurements by means of immunoinhibition technique have been widely used in routine laboratories. The most common problem met by this technique is lack of specificity; that is results above reference ranges are not seldom seen in the absence of myocardial necrosis. In this study we compared this traditional technique with a recently introduced CK-MB mass assay with chemiluminometric immunoassay technique with higher specificity. Sixty five subjects with no signs and symptoms of coronary artery disease, whose total CK activities are within; but CK-MB immunoinhibition results are above the reference ranges of manufacturer's, are taken into study (healthy controls). Another 34 subjects diagnosed as acute myocardial infarction (AMI) also are evaluated by the both methods. Results of healthy controls by two methods showed a weak correlation ( $r=0.076$ ); whilst in AMI group a high correlation was observed ( $r=0.977$ ). According to these data, immunoinhibition assay seems to be positively interfered and this interference is obvious in the results of healthy controls, but this positive interference is proportionally very small and so of little importance in AMI patients' sera whose cardiac MB's are quite high.

*Keywords: Infarctions, myocardial, creatine kinase, isoenzymes*

Akut miyokard enfarktüsünde ATP: kreatin fosfokinaz (CK) (E.C.2.7.3.2) ve izoenzimlerinin ölçümü, son 10-20 yılda en çok kullanılan laboratuvar metodu olmuştur<sup>1-4</sup>. CK, her biri 40 kD olan iki subüniteden oluşan dimerik bir enzimdir. Üç farklı izoenzimi vardır; CK-MM (kas tipi), CK-BB (beyin tipi), CK-MB (miyokard tipi). Farklı yapıdaki dördüncü formu ise 64 kD ağırlığındadır, mitokondriyel lokalizasyon gösterir ve dolaşıma salındığında 250 kD'luk makro CK2 diye adlandırılan oligomerler oluşturur<sup>5</sup>.

Serumda dominant enzim %95-99 ile CK-MM olup, CK-MB %1-5 oranında bildirilmektedir, CK-BB ise teorik olarak yok kabul edilir. CK-BB, beyin dokusunda en çok bulunan formdur (%97-98); bunun yanı sıra barsak düz kası (%90-95), prostat (%35-100), plasenta (%100), akciğerde de (%20-50) anlamlı miktarda bulunmaktadır<sup>6</sup>. Normal şartlarda CK-BB kan beyin bariyerini aşarak plazmaya ulaşamaz. CK-BB intestinal iskeminin neden olduğu düz kas hasarında, prostat Ca'da, akciğerin "small cell" Ca'da ve barsak malignitelerinde artar. CK-BB dolaşımında IgG ile birleşerek makro CK'yı oluşturur. Makro CK1 çoğunlukla yaşlı kadınlarda olmak üzere, otoimmün hastalığı olan kişilerde ve HIV enfeksiyonlularında görülür. Makro CK2'nin de çeşitli malignitelerde yükseldiği gösterilmiştir<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Bölümü

AMI tanısında CK-MB tanısız değeri yüksek olan bir testtir. Rutin laboratuvar da halen yaygın olarak kullanılmakta olan immunoinhibisyon-kinetik yöntemin miyokardial nekrozu olmayan, sağlıklı kişilerde de referans aralıklarının üzerinde sonuçlar vermesi testin spesifikliğini azaltırken, klinisyeni yanlış yönlendirebilmektedir. Biz bu çalışmamızda kemiluminesans tekniği ile CK-MB kütle ölçümünün, immunoinhibisyon ile CK-MB aktivite ölçümüne üstünlük sağlayıp sağlamayacağını irdelemek amacıyla sağlıklı ve AMI'li hasta grubunda her iki yöntemin sonuçlarını karşılaştırdık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Laboratuvarımıza gelen kan örneklerinin rutin sonuç kontrolü sırasında total CK'sı normal (referans aralıkları kadın için 0-167 IU/L, erkek için 0-190 IU/L), CK-MB aktivitesi yüksek (referans aralığı 0-24 IU/L) olan 65 (36 kadın, 29 erkek) sağlıklı kontrol olgusu ile, hastanemiz koroner yoğun bakım ünitesinde tedavi gören AMI tanısı almış 34 hastanın (8 kadın, 26 erkek) kanları toplandı.

Kanlar antikoagülansız kuru tüpe alınıp 30 dakika içinde, 1100 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Total CK ve CK-MB aktiviteleri 30 dakika içinde çalışıldı. Serumlar CK-MB kütle çalışması için, üretici tavsiyelerine uyularak, -20°C'de çalışma gününe kadar (minimum 5, maksimum 29 gün) saklandı.



Total CK ölçümü: Hitachi 747 otoanalizöründe, Roche Diagnostics'in 1928929 katalog no'lu CK NAC kitiyle modifiye Rosalki yöntemiyle<sup>7,8</sup> enzimatik-kinetik olarak çalışıldı. Kreatin kinaz, heksokinaz, glikoz 6 fosfat dehidrogenaz enzimlerinin kullanıldığı seri reaksiyon sonucunda artan NADPH 37°C'de 340 nm'de fotometrik olarak ölçüldü.

CK-MB immunoinhibisyon-aktivite ölçümü: Hitachi 911 otoanalizöründe, Roche Diagnostics'in 1127608 katalog no'lu kiti kullanılarak çalışıldı. İmmunoinhibisyon basamağında CK-M'ye karşı bir poliklonal antikorun yardımıyla numune içinde, CK-B alt birimleri etkilenmeksizin, CK-M alt birimlerinin katalitik aktivitesinin yaklaşık %99.6'sı engellenir. Kalan aktivitenin B zincirine ait olduğu, gerçek CK-MB aktivitesinin yarısına karşılık geldiği ve teorik olarak serumda CK-BB ve CK-MM izoenzimlerinin olmadığı varsayılır. Kalan aktivite aynı total CK yöntemiyle enzimatik-kinetik olarak çalışılır, 2 ile çarpılarak CK-MB'ye ait olduğu varsayılan aktivite bulunur<sup>9</sup>.

CK-MB kütle ölçümü: Elecsys 2010 cihazında, Roche Diagnostics'in 11821598 katalog no'lu CK-MB kiti ile elektrokemiluminesans immunoassay tekniği ile çalışıldı. Yöntem CK-MB'ye karşı biotin ve rutenyumla işaretlenmiş iki ayrı antikor kullanarak sandviç prensibiyle çalışır. Biotin ve rutenyum işaretli antikorlar CK-MB ile sandviç formasyonu oluşturduktan sonra ortama eklenen streptavidin, biotin ile etkileşime girer, oluşan immün kompleksler ölçüm hücrelerinde manyetik olarak elektrot yüzeyine tutunur. Tutunmayan kısımlar yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Elektroda voltaj uygulandıktan sonra oluşan kemiluminesans emisyon fotomultiplierden ölçülür<sup>10</sup>.

## BULGULAR

Çalışmamızda yer alan 65 sağlıklı kontrol ve 34 AMI'lü olgunun total CK, CK-MB immunoinhibisyon ve CK-MB kütle değerleri tablo I'de görülmektedir.

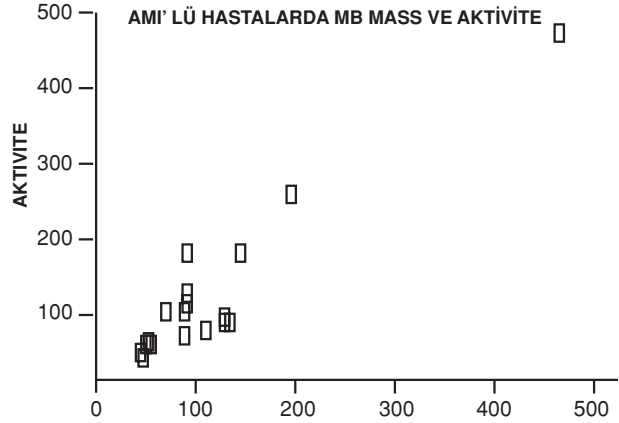
**Tablo I.** Sağlıklı ve AMI'lü olguların CK-MB aktivite (U/L) ve kütle (ng/ml) değerlerinin ortalama, SD, median, minimum, maksimum ve %95 güven aralığı değerleri

	Sağlıklı grup		AMI'lü grup	
	Aktivite	Kütle	Aktivite	Kütle
Ortalama	30.7	1.78	112.18	72.4
Standart sapma (SD)	6.26	1.02	104.63	112.9
Median	29.1	1.45	75	34
Alt % 95 güven aralığı	29	1.52	75.6	33.03
Üst %95 güven aralığı	32.31	2.03	148.7	111.9
Minimum	20.6	0.42	36.4	5.82
Maksimum	57.9	4.8	468	485

Sağlıklıların CK-MB değerleri ortalaması immunoinhibisyon için 30.75 U/L, kütle için 1.78 ng/ml, AMI'lü hastaların değerleri ortalaması sırası ile 112.18 U/L, 72.4 ng/ml olarak bulunmuştur.

Sağlıklı grubun CK-MB immunoinhibisyon ve kütle değerlerini lineer regresyon/korelasyon analizi ile değerlendirdiğimizde sonuçların korelasyon katsayılarını çok düşük bulduk ( $r=0.076$ ).

AMI'lü hasta grubumuzun CK-MB aktivite ve kütle değerleri lineer regresyon/korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde iki yöntemin yüksek korelasyon gösterdiği görüldü ( $r=0.977$ ,  $Sy/x=22.6$ ). Grafik 1'de AMI'lü hastaların CK-MB immunoinhibisyon ve kütle değerlerinin regresyon eğrisi görülmektedir.



**Grafik 1.** AMI'lü olguların CK-MB kütle ve aktivite değerlerinin regresyon eğrisi ( $y=0,91x+46,5$ ).

Sağlıklı ve AMI'lü iki grubun CK-MB immunoinhibisyon sonuçları Mann-Whitney U nonparametrik t testiyle karşılaştırıldığında  $t=6.365$ ,  $p<0.0001$ , CK-MB kütle sonuçları karşılaştırıldığında  $t=5$ ,  $p<0.0001$  olarak bulundu. Her iki yöntemle de AMI'lü hasta değerleri istatistiksel olarak ileri derecede farklılık göstermekte idi.

## TARTIŞMA

Önceki çalışmalarda CK-MB kütle ölçümünün, aktivite ölçümüne göre daha sensitif ve hızlı bir yöntem olduğu ve çeşitli interferan maddelerle (makro CK, adenilat kinaz gibi) daha az etkileşim gösterdiği bildirilmiştir<sup>11</sup>. Eisenberg ve ark.<sup>12</sup>, koroner yoğun bakım ünitesinde izlenen 20 hastanın 24 saat boyunca 3'er saat aralıklarla topladıkları 1298 serum örneğinde zamana göre değer eğrisi çizmişlerdir. Elde edilen bulgular bir çok faktörün CK-MB aktivite yöntemini interfere ettiğini, ancak CK-MB kütle yöntemini etkilemediğini göstermiştir. Nekrotik miyokard dokusundan salınan miyokardial CK, CK-MB'nin kayboluşunun daha yavaş olmasına neden olmuştur. CK-MB inaktivasyonu nekrotik dokudan salınışından sonraki erken dönemlerde başladığından, piki daha az olmaktadır. Bu çalışma CK-MB kütle ölçümünün CK-MB aktivite ölçümüne göre daha iyi bir model olup, özellikle düşük CK-MB değerlerinde kullanışlı olduğunu ve CK-MB kütle ile ölçülen dolaşımdan kaybolma hızının CK-MB aktivite ile ölçülene göre daha hızlı olduğunu göstermiştir.

Hulting ve ark.<sup>1</sup>, total CK'nın hafif yükseldiği AMI'lü hastalarda, CK-MB kütle ve CK-MB aktivite değerlerini CK izoenzim elektroforezi ile karşılaştırmışlardır.



CK-MB kütle ve elektroforez sonuçlarını uyumlu bulurken, CK-B ve CK-B/total CK oranının değerlendirilmesinde CK-MB aktivite ve elektroforez arasında kötü bir korelasyon bulmuşlardır. Hastaların %24 gibi büyük bir kısmında makro CK'ya rastlamışlardır. Sonuç olarak total CK'sı hafif yükselmiş olası AMI'lü hastalarda CK-B aktivitesinin kesin sonuç sağlamadığını ve yüksek CK-MB sonuçlarının makro CK'dan kaynaklandığını görmüşlerdir. Bu nedenle total CK'sı hafif yükselmiş hastalarda CK-MB'yi ölçmede daha spesifik bir yöntem kullanılması gerekliliği sonucuna varmışlardır. Enzim inaktivasyonundan dolayı beklenmedik düşük CK-MB değerleri gösteren AMI'lü hastalar için de bu durumun geçerliliğini kabul etmişlerdir.

Mauro ve arkadaşlarına göre AMI tanısında CK-MB ölçümünün iki önemli sınırlaması vardır. Birincisi CK-MB kalbe spesifik değildir, iskelet kası az ama anlamlı miktarda CK-MB içerir (%1-3). Masif iskelet kas hasarında, inflamatuvar kas hastalıkları ve distrofilerde CK-MB artışı görülür. Kardiyak hasarı göstermede CK-MB/total CK oranı kullanımı gerektirir. Kardiyak hasarda CK MB/total CK oranı %5 üzerinde olurken, iskelet kas hasarında bu oran %3-4 üzerine çıkamaz. İkincisi CK-MB'nin erken salınımı AMI'nün geç tanısındaki değerini sınırlar<sup>13</sup>.

Ravkilde ve ark.<sup>14</sup> ise yaptıkları çalışmada, CK-MB kütle ölçümünün kardiyak hasar için önemli prognostik değere sahip olduğunu göstermişlerdir. Yüksek CK-MB ile seyreden anstabil anginalı hastaları 28 ay izlediklerinde, bunların kardiyak açıdan riskli bir grup olduğu ve klasik AMI'lü hastalardan farklı olmadıklarını izlemişlerdir. Aynı zamanda nonenzimatik kardiyak "marker"larla (troponin, myoglobulin) prognostik değerinin aynı olduğunu göstermişlerdir.

Biz bu çalışmamızda sağlıklı grubun immunoinhibisyon ve kütle değerlerini lineer regresyon ve korelasyon ile değerlendirdiğimizde, sonuçların korele olmadığını gördük ( $r=0.076$ ). Bu durumu CK-MB immunoinhibisyon yönteminin her bir örnekteki makro CK1, makro CK2 ve CK-BB düzeylerinden etkilendiği şeklinde yorumladık. Oysa AMI'lü hasta grubumuzun CK-MB aktivite ve CK-MB kütle değerleri lineer regresyon/korelasyonla değerlendirildiğinde bu hastalarda sonuçların yüksek korelasyon gösterdiğini gözlemledik ( $r=0.977$ ).

Bunu da AMI'lü hastaların serumlarında gerçekten yükselen CK formunun CK-MB olduğu, bunun yanında her serumda olması muhtemel makro CK1, makro CK2 ve CK-BB aktivitelerinin, AMI'lülerin yüksek MB aktivitelerinin yanında sabit ve ihmal edilebilir düzeylerde kaldığı şeklinde yorumladık.

Sonuç olarak sağlıklı olgularda immunoinhibisyon tekniği ile CK-MB değerlerinin pozitif interfere olduğunu, gerçek yüksek kardiyak CK-MB değerlerinde bu interferansın oranla azaldığını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Hulting J. CK-MB mass concentration versus CKB activity for the detection of AMI in patients with slightly elevated total CK activity in serum. *J Internal Medicine* 1994; 12: 705-10.
2. Cattozzo G, Franzini C, Melzi d'Eril GV. Myoglobin and creatine kinase isoenzyme MB mass assays: Intermethod behaviour of patient sera and commercially available control materials. *Clin Chimica Acta* 2001; 303: 55-60.
3. Panteghini M, Pagani F, Bonetti G. The sensitivity of cardiac markers: An evidence-based approach. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(11/12): 1097-106.
4. Price A, Burgin C, Cruise M. Stability of cardiac troponins and CK-MB mass isoenzyme. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(11): 1159-60.
5. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 20<sup>th</sup> edition, W.B. Saunders Comp, 2001: 285-6.
6. Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA. The creatine kinase system in normal and disease myocardium. *N Ang J Med* 1985; 313: 1050.
7. George S, Ishikawa Y, Penyman MB, Roberts R. Purification and characterization of naturally occurring and in vitro induced multiple forms of MM creatine kinase. *J Biol Chem* 1984; 259: 2667-74.
8. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. 3<sup>rd</sup> edition, Philadelphia, W.B. Saunders Comp, 1995: 180-1.
9. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-20.
10. Apple FS. Diagnostic markers for detection of AMI and laboratory medicine. *Clin Chem* 1992; 23(5): 297-322.
11. Bablok W. A general regression procedures for method transformation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 783-90.
12. Eisenberg PR, Shaw D, Schaab C, Jaffe AS. Concordance of creatin kinase-MB activity and mass. *Clin Chem* 1989; 35: 440.
13. Panteghini M. Diagnostic application of CK-MB mass determination. *Clin Chem Acta* 1998; 272: 23-31.
14. Ravilke J, Hansen AB, Horder M, Dorgensen PJ. Risk stratification in suspected AMI based on a sensitive immunoassay for CK-MB. *Cardiology* 1992; 80: 143-51.