

# Alla ricerca di un marcatore di ischemia.

## Il caso dell'albumina modificata dall'ischemia

Marco Bagnati, Matteo Basile, Barbara Toto, Giorgio Bellomo

Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche, Ospedale Maggiore della Carità, Università del Piemonte Orientale, Novara

### SINTESI

La ricerca e la disponibilità di un biomarcatore affidabile di ischemia miocardica ha portato alla proposta di impiegare, a tale scopo, la capacità del siero di legare cobalto. Tale proposta assume che le modificazioni ischemiche a carico dell'albumina circolante possano determinare una significativa riduzione delle sue capacità di legare cobalto. Questo test, denominato IMA (Ischemia-Modified Albumin), può essere facilmente implementato sulla maggioranza delle piattaforme tecnologiche di chimica-clinica. Il test appare, di per sé, semplice e di rapida esecuzione, tale, cioè, da poter essere impiegato anche in condizioni di urgenza.

Questo test è stato impiegato apparentemente con successo per la diagnosi di ischemia in diversi studi clinici e, nonostante una bassa specificità nei confronti dell'ischemia miocardica, la sua elevata sensibilità e il suo elevato valore predittivo negativo ne

hanno fatto proporre l'impiego come test di prima linea nel percorso diagnostico dei pazienti che vengono ammessi al Pronto Soccorso con dolore precordiale. La bassa specificità nei confronti degli eventi ischemici che coinvolgono il miocardio, anziché limitarne l'utilizzo, apre nuovi orizzonti per la diagnostica di laboratorio delle sindromi ischemiche non miocardiche e per gli stati di ipossia generalizzata.

Alcune limitazioni, tuttavia, pongono seri caveat. Fra di esse vanno ricordate la chiara identificazione delle proteine responsabili del legame del cobalto (l'albumina è solo una di esse), la normalizzazione dei risultati per la concentrazione dei siti leganti, la standardizzazione delle metodiche impiegate. Larghi studi controllati sono poi necessari per identificare senza ombra di dubbio le indicazioni e i limiti di questo nuovo e promettente marcatore.

### Lo scenario

Milioni di pazienti si presentano annualmente alle strutture di Pronto Soccorso di tutti gli ospedali con dolore toracico o con altri sintomi suggestivi di ischemia miocardica<sup>1</sup>. Sebbene la disponibilità di marcatori estremamente sensibili e specifici di necrosi miocardica, quali le troponine, abbia reso la diagnosi relativamente più facile e sicura, il riscontro di valori normali di troponine non esclude a priori la possibilità di una patologia miocardica di tipo ischemico<sup>2</sup>. Al contrario, un aumento dei livelli plasmatici di troponine può portare a ricoveri inappropriati dei pazienti in strutture altamente specializzate di trattamento.

Indagini recenti su alcuni biomarcatori di eventi biologici a monte della necrosi post-ischemica, quali i biomarcatori di un processo infiammatorio a carico della parete vascolare come citochine (interleuchina 6, TNF- $\alpha$ ), pro-

teine di fase acuta (proteina C reattiva), molecole di adesione (ICAM, VCAM), espressione e liberazione di mieloperossidasi e/o di metalloproteinasi (MMP 9), che possono a loro volta portare a destabilizzazione e rottura della placca, hanno prepotentemente suggerito l'impiego degli stessi per una migliore stratificazione del rischio e quindi una più corretta identificazione dei pazienti<sup>3</sup>. A questi biomarcatori di eventi pre-ischemici se ne aggiungono altri, peraltro ormai ben conosciuti, in grado di evidenziare eventi post-ischemici quali la necrosi (troponine) e il distress miocardico (peptici natriuretici di tipo B). Apparentemente non vi è la disponibilità, nella pratica clinica, di biomarcatori dell'evento ischemico, indipendentemente dal fatto che questo stesso evento possa esitare nella necrosi e/o nell'insufficienza cardiaca.

La ricerca biologica di base e applicata ha portato episodicamente alla ribalta, in questi ultimi anni, alcuni potenziali marcatori di ischemia fra cui la colina<sup>4</sup> e gli acidi

grassi liberi non legati all'albumina<sup>5</sup>. Il loro successo e la loro applicazione sono stati tuttavia limitati e non di grossa utilità. Un caso diverso è sicuramente rappresentato dall'albumina modificata dall'ischemia (IMA, *Ischemia-Modified Albumin*) cui il mondo scientifico internazionale ha dedicato e sta dedicando una sempre più evidente attenzione.

## Il principio

Bar-Or *et al.* osservarono, per primi, come l'albumina di pazienti in cui si era verificato un evento ischemico possedesse una minore capacità di legare alcuni metalli, in particolare il cobalto<sup>6</sup>. La porzione N-terminale dell'albumina contiene almeno un sito di legame ad alta affinità per alcuni metalli di transizione, fra cui il cobalto<sup>7</sup>. Nel corso dell'evento ischemico la conformazione di tale sito verrebbe modificata, peraltro in modo transitorio, verosimilmente a seguito di un attacco radicalico proveniente dal tessuto sede dell'evento ischemico o conseguente alla reazione infiammatoria indotta dall'ischemia stessa. Alternativamente il sito di legame potrebbe essere modificato dall'acidosi conseguente all'ischemia o, ancora, essere occupato competitivamente da metalli liberati dal tessuto ischemico stesso, come, ad esempio, dimostrato per il rame.

Sulla base di tali considerazioni è stato sviluppato un metodo di dosaggio il cui principio consiste nel valutare il legame del cobalto all'albumina presente nel siero del paziente in esame. Praticamente il siero viene incubato con una soluzione di cobalto cloruro; una parte di cobalto si lega all'albumina, mentre la frazione non legata viene rivelata dall'aggiunta di ditiotreitolo che forma con il cobalto libero un complesso colorato che assorbe attorno a 500 nm. La metodica di dosaggio appare quindi estremamente semplice, di facile esecuzione e implementazione sulla strumentazione di chimica-clinica. Il campione non richiede pretrattamenti e il tempo necessario all'esecuzione del test, comprendendo anche la fase di centrifugazione, non è superiore ai 25 minuti. Tutte queste condizioni ben si adattano, quindi, all'implementazione di questo test nei laboratori che svolgono indagini d'urgenza e all'impiego di questo stesso test per quesiti diagnostici che necessitano di una rapida soluzione e di una altrettanto rapida scelta dei provvedimenti terapeutici.

La riduzione della capacità di legare cobalto presente nell'ischemia modificata dall'albumina è, apparentemente, transitoria, sia *in vivo* sia *ex-vivo*. Quest'ultima caratteristica appare particolarmente critica in quanto limiterebbe le possibilità di effettuare dosaggi su campioni che sono stati prelevati da più di 120-150 minuti o su campioni conservati.

È stata altresì sottolineata ripetutamente la necessità di effettuare tale dosaggio esclusivamente su siero e non su

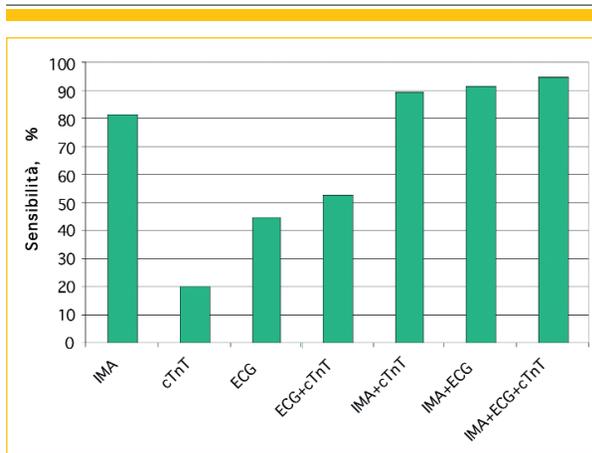
plasma contenente EDTA, citrato o anche eparina per la capacità che hanno questi composti di complessare metalli, e quindi anche cobalto, interferendo con il metodo analitico di dosaggio.

## Promesse

La capacità dell'IMA di individuare eventi ischemici miocardici è stata testata utilizzando modelli *in vivo* di ischemia transitoria indotta, ad esempio mediante angioplastica coronaria transluminale per cutanea (PTCA). Sinha *et al.* hanno comparato i valori di troponina T e di IMA immediatamente prima e dopo 30 minuti e 12 ore dalla PTCA in un gruppo di 19 pazienti con interessamento di un singolo vaso coronario che presentavano, durante la procedura, segni clinici ed elettrocardiografici di ischemia<sup>8</sup>. Mentre i valori di troponina non presentavano variazioni al di sopra dei limiti di riferimento, IMA presentava un significativo aumento dopo 30 minuti per poi ritornare normale dopo 12 ore, a indicare la possibilità di individuare l'evento ischemico indipendentemente dal verificarsi di una necrosi post-ischemica. Questi risultati sono stati confermati da studi successivi di Quiles *et al.* che hanno altresì suggerito una possibile correlazione fra l'entità dell'incremento di IMA e l'entità del tessuto interessato dall'evento ischemico, dalla durata dell'ischemia e dalla presenza di un circolo collaterale efficace nel limitare l'impatto tissutale dell'ischemia stessa<sup>9,10</sup>. Questo stesso gruppo ha, infine, evidenziato una stretta correlazione fra l'incremento di IMA e la comparsa di segni elettrocardiografici di ischemia in pazienti sottoposti a cardioversione elettrica per fibrillazione atriale<sup>11</sup>.

Tutti questi studi, nel loro complesso, dimostrano come il verificarsi di un'ischemia miocardica sia invariabilmente associato a una riduzione della capacità di legare cobalto da parte dell'albumina e la propongono prepotentemente come affidabile marcatore di ischemia.

Diversi studi sono stati condotti per valutare le performance dell'IMA nella diagnostica della cardiopatia ischemica d'urgenza. La maggioranza di tali studi sono stati condotti su piccoli gruppi, con protocolli differenti e impiegando metodi differenti di dosaggio. I risultati di uno di questi, a conduzione multicentrica, meritano di essere citati in quanto si riferiscono a più di 200 pazienti arrivati al Pronto Soccorso entro tre ore dall'insorgenza del dolore toracico e con segni clinici e strumentali di cardiopatia ischemica ma con valori di troponina I nella norma<sup>12</sup>. È stata valutata, in questo studio, la capacità di IMA di predire la comparsa di valori elevati di troponina I e, quindi, di necrosi 6-24 ore dopo l'insorgenza della sintomatologia. La sensibilità e la specificità di IMA sono risultate essere del 70% e dell'80% rispettivamente, con un valore predittivo negativo del 96%. Risultati comparabili sono stati ottenuti da Bhagavan *et al.* che hanno valutato



**Fig. 1** - Sensibilità di IMA, elettrocardiogramma (ECG) e troponina T (cTnT) da soli o in combinazione, nell'identificazione dell'ischemia miocardica. Da Sinha *et al.*<sup>12</sup>, modificato.

IMA in un gruppo di 75 pazienti con diagnosi di ischemia miocardica, effettuata sulla base di dati clinici ed elettrocardiografici, e in un gruppo di 92 pazienti senza evidenze di ischemia<sup>13</sup>. La sensibilità e la specificità di IMA sono risultate dell'88% e del 94% rispettivamente, con un valore predittivo negativo del 91%.

Sinha *et al.* hanno, infine comparato sensibilità e specificità di IMA, elettrocardiogramma e troponina T, da soli o in combinazione, nella diagnostica delle sindromi coronariche acute. I risultati, riportati nella Figura 1, evidenziano come, rispetto ai marcatori di necrosi e all'elettrocardiogramma, IMA sia dotata di una maggiore sensibilità. La combinazione dei tre approcci diagnostici permette di ottenere una sensibilità vicina al 95%<sup>12</sup>.

Già le prime segnalazioni e alcuni dei lavori più recenti evidenziano, però, una specificità di IMA relativamente bassa. In effetti, si ritiene che le modificazioni strutturali responsabili di una riduzione della capacità di legare cobalto presente nell'albumina modificata dall'ischemia, non siano dipendenti dalla tipologia del tessuto interessato dal processo ischemico. Questa caratteristica, anziché rappresentare una seria limitazione, potrebbe aprire interessanti scenari sull'utilizzo di IMA in condizioni cliniche diverse dall'ischemia miocardica. Di queste, sicuramente la più interessante è la sofferenza ipossica fetale nel caso di gravidanze o parti complicati, come recentemente dimostrato da Gugliucci *et al.*<sup>14</sup>

### Cautele

In un recente ed elegante studio, van der Zee *et al.* hanno indagato le correlazioni esistenti fra la comparsa di IMA e i risultati derivanti dalla scintigrafia perfusoria miocardica condotta durante l'esercizio fisico in un gruppo di 38 pazienti con sospetto di malattia ischemica coronaria<sup>15</sup>. Nel corso dell'indagine 15 pazienti hanno sviluppato ischemia miocardica inequivocabilmente dimostrata dai

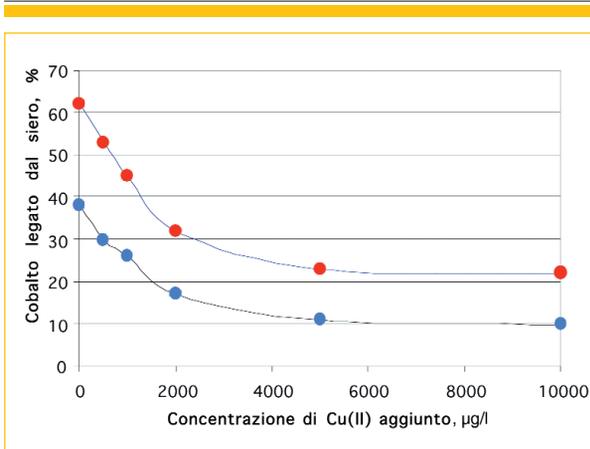
dati scintigrafici. Paradossalmente, in questi pazienti, a seguito del verificarsi dell'ischemia, IMA si riduceva transitoriamente anziché aumentare. Inoltre, una regressione lineare multivariata evidenziava come la concentrazione serica di albumina risultasse il solo parametro predittivo della concentrazione di IMA.

Questo riscontro pone prepotentemente alla ribalta un problema non indifferente legato all'influenza della concentrazione di albumina sulla capacità del siero o di ciò che in esso è contenuto di legare cobalto. Il maggiore produttore e distributore del test e anche una recente rassegna<sup>3</sup> suggeriscono cautela nell'interpretazione dei dati di IMA in pazienti con concentrazione serica di albumina inferiore a 2,5 g/dl o superiore a 5 g/dl. È tuttavia da osservare come i due casi estremi contemplati siano caratterizzati da concentrazioni di albumina l'una il doppio dell'altra e quindi, di per sé, in grado di spiegare differenze consistenti della capacità di legare cobalto. Inoltre, in studi osservazionali di popolazioni diventa strettamente necessario che i gruppi in esame siano, fra di loro, assolutamente comparabili per quanto riguarda la concentrazione di albumina: tale requisito non è quasi mai stato rispettato in tutti gli studi fino ad ora condotti.

Un altro aspetto degno di nota, ma sul quale non è stata mai posta una particolare attenzione, è relativo al fatto che mentre il test misura direttamente la capacità legante cobalto da parte di tutti i siti presenti nel campione di siero in esame, si assuma che qualsivoglia modificazione di tale capacità legante sia da imputare a modificazioni strutturali della porzione N-terminale dell'albumina. Ad esempio, altre proteine diverse dall'albumina, come transferrina<sup>16</sup> e apoproteine AI e B100<sup>17</sup>, sono in grado di legare metalli come il rame e il cobalto. Studi condotti presso il nostro laboratorio hanno, ad esempio, dimostrato che l'albumina rende ragione di non più del 60% del legame del cobalto alle varie componenti seriche. È evidente che, alla luce di queste riflessioni, anche tali variabili debbano essere tenute in considerazione nell'interpretazione dei risultati ottenuti nei vari studi clinici.

Non bisogna dimenticare, inoltre, che una riduzione della capacità legante il cobalto da parte delle varie componenti seriche possa essere imputabile alla competizione da parte di altri metalli liberati nel corso dell'evento ischemico. Studi condotti nel nostro laboratorio hanno infatti dimostrato che il rame (Cu<sup>++</sup>) è in grado di inibire in modo significativo il legame del cobalto sia all'albumina umana purificata sia al siero in toto (Figura 2). Tale osservazione assume una rilevanza notevole alla luce della dimostrazione che, a seguito di un evento ischemico miocardico, la concentrazione di Cu<sup>++</sup> nel seno coronario aumenta di circa 50 volte rispetto ai valori basali<sup>18</sup>.

Un'ultima osservazione riguarda la mancanza di standardizzazione della metodica per il dosaggio di IMA, l'impiego di unità di misura le più variegate e l'utilizzo di va-



**Fig. 2** - Competizione, da parte dello ione rame ( $\text{Cu}^{2+}$ ), sulla capacità legante cobalto di un pool di sieri. Il siero è stato preincubato per 30 minuti con le concentrazioni indicate di rame e, in seguito, la capacità legante cobalto del siero stesso è stata misurata utilizzando lo stesso test impiegato per la valutazione di IMA nel siero di pazienti.

lori di *cut-off* differenti. Alla luce dell'enorme rilevanza potenziale di un biomcatore di ischemia, che verrebbe a colmare un notevole vuoto diagnostico, è indispensabile un momento di riflessione e di ricerca programmata volta a validare in modo inequivocabile il test e le sue limitazioni. Studi controllati e correttamente pianificati e condotti su ampi numeri potranno finalmente chiarire se tale vuoto possa essere colmato.

## Bibliografia

1. 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. *Eur Heart J* 2003; 24: 28-66.
2. Panteghini M, Apple FS, Christenson RH *et al.* Proposals from IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage (C-SMCD): recommendations on use of biochemical markers of cardiac damage in acute coronary syndromes. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 230: 103-112.
3. Apple FS, Wu AHB, Mar J *et al.* Future biomarkers for detection of

- ischemia and risk stratification in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2005; 51: 810-824.
4. Danne O, Mockel M, Lueders C *et al.* Prognostic implications of elevated whole blood choline levels in acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2003; 91: 1060-67.
5. Apple FS, Kleinfeld AM, Adams J III. Unbound free fatty acid concentrations are increased in cardiac ischemia. *Clin Proteomics* 2004; 1: 169-172.
6. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. Novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia. A preliminary report. *J Emerg Med* 2000; 19: 311-315.
7. Bar-Or D, Curtis G, Rao N *et al.* Characterization of the  $\text{Co}_2$  and  $\text{Ni}_2$  binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. *Eur J Biochem* 2001; 268: 42-47.
8. Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR *et al.* Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2003; 107: 2403-05.
9. Quiles J, Roy D, Gaze D, Garrido IP *et al.* Relation of ischemia modified albumin (IMA) levels following elective angioplasty for stable angina pectoris to duration of balloon-induced myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 2003; 92: 322-324.
10. Garrido IP, Roy D, Calvino R *et al.* Comparison of ischemia-modified albumin levels in patients undergoing percutaneous coronary intervention for unstable angina pectoris with versus without coronary collaterals. *Am J Cardiol* 2004; 93: 88-90.
11. Roy D, Quiles J, Sinha M *et al.* Effect of direct-current cardioversion on ischemia-modified albumin levels in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2004; 93: 366-368.
12. Sinha MK, Roy D, Gaze DC *et al.* Role of ischemia modified albumin a new biochemical marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J* 2004; 21: 29-34.
13. Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA *et al.* Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin Chem* 2003; 49: 581-585.
14. Gugliucci A, Hermo R, Monroy C *et al.* Ischemia-modified albumin levels in cord blood. A case-control study in uncomplicated and complicated deliveries. *Clinica Chimica Acta* 2005; 362: 155-160.
15. van der Zee M, Verberne HJ, van Straalen JP *et al.* Ischemia-Modified Albumin Measurements in Symptom-Limited Exercise Myocardial Perfusion Scintigraphy Reflect Serum Albumin Concentrations but not Myocardial Ischemia. *Clin Chem* 2005; 51: 1744-46.
16. Smith TAD. Human serum transferrin cobalt complex: stability and cellular uptake of cobalt. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 4576-79.
17. Perugini C, Seccia M, Albano E, Bellomo G. The dynamic reduction of  $\text{Cu(II)}$  to  $\text{Cu(I)}$  and not  $\text{Cu(I)}$  availability is a sufficient trigger for low density lipoprotein oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1347: 191-198.
18. Chevion M, Jiang Y, Har-El R *et al.* Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia. Possible predictive criteria for tissue injury. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 1102-06.

## ABSTRACT

The search for a suitable and reliable marker of myocardial ischemia has led to the proposal of employing the cobalt binding capacity of total serum assuming that ischemic modifications of circulating albumin would markedly decrease its ability to bind cobalt. This test (IMA, Ischemia-Modified Albumin) can be easily implemented on most of the technological platforms employed for clinical chemistry assays. It is simple and rapid and suitable for most of the diagnostic purposes of emergency medicine.

This assay has been successfully employed to detect myocardial ischemia in various clinical studies and, despite a low specificity for myocardial ischemia, its high sensitivity and negative predictive

value have pointed out its possible role as a first-line assay in clinical setting of patients with chest pain admitted to the Emergency Department. The low specificity toward ischemic events occurring to myocardium is challenging its use in clinical conditions associated with tissue ischemia or whole body hypoxia.

Few caveat, however, must be taken into account. They include the clear identification of the proteins responsible for cobalt binding, the normalization of the results for the serum concentration of the binding sites, the standardizations of the assays employed. Large randomized trials are also absolutely needed to undoubtedly identify the potential and the limit of this new and promising biomarker.