



Srdeční troponiny I a T jsou specifické a citlivé biomarkery srdečního poškození, představující preferované sérologické testy určené k hodnocení pacientů s podezřením na akutní infarkt myokardu. Pro klinické použití jsou v současné době aktuálně po celém světě k dispozici troponinové testy různé úrovně citlivosti. Řadu let se také používají tzv. „vysoce citlivé“ testy. Harmonizace těchto testů je žádoucím cílem, zůstává však úkolem k řešení v nejbližší (?) budoucnosti.

Poznámky ke klinické využitelnosti metody stanovení troponinu T v porovnání s metodami na stanovení troponinů I, stav v r. 2018 aneb Úvaha nad současnou nabídkou metod na stanovení hs troponinů

MUDr. JAROSLAVA AMBROŽOVÁ¹, MUDr. PAVEL MALINA, Ph.D.²

¹ OKB-H Nemocnice Prachatice, a.s., ² OKB Nemocnice Písek, a.s.

Něco málo z fyziologie troponinů

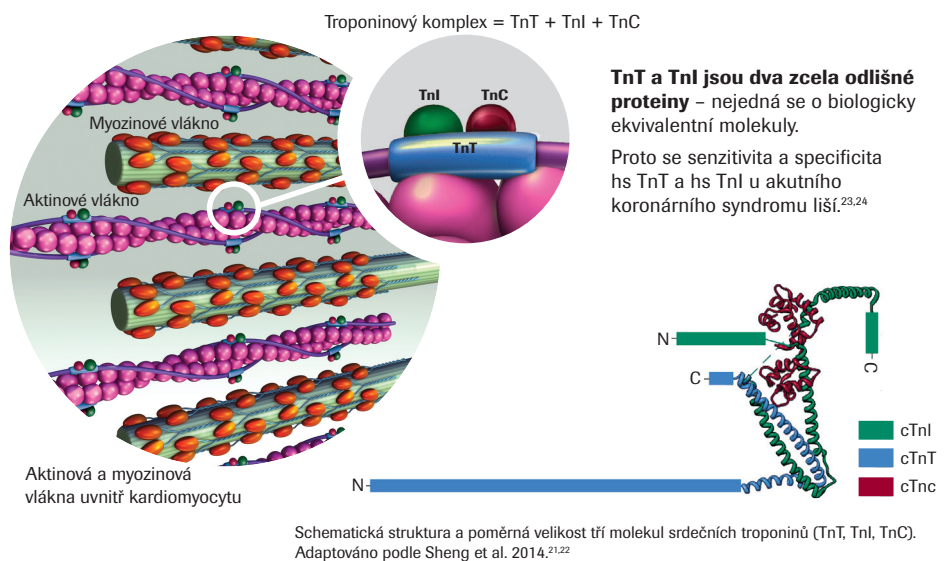
Troponin, který je nedílnou součástí kontraktilního aparátu, se nachází v drážce mezi aktinovými filamenty v každé svalové tkáni (kosterní svaly, srdeční sval) a představuje komplex tří regulačních

proteinů připojených k jinému proteinu zvanému tropomyosin.

Existují tři formy troponinu (C, I, T), z nichž jako markery srdečního poškození (kardiomarkery) slouží pouze troponin I (cTnI) a T (cTnT), neboť oba mají jedinečné, pro myokard specifické aminokyselinové složení. Normálně se v krvi cTnI ani cTnT nevyskytují. Jsou pevně vázány v kardiomyocytech (buňkách srdeční svaloviny) a malá část tvoří jejich cytosolovou frakci (v obou případech tento podíl činí cca ≤ 8 %). Při poškození kardiomyocytů dochází vlivem změny permeability jejich buněčné membrány k vyplavování cTnI a cTnT do krevního řečiště. Vzestup jejich hladin v krvi je vyvolán především rychlým uvolněním právě cytoplazmatické frakce. A tento fakt je základem využití cTnI a cTnT jako kardiomarkerů.

Není troponin jako troponin

Každý z troponinů (TnT, TnI, TnC) má odlišnou fyziologickou roli ve struktuře a činnosti kardiomyocytu.^{21,22}



▲ Převzato z brožury Roche Elecsys® Troponin T hs (2018-CD-53).



Metody měření cTnI a cTnT s přívláskem **vysoce citlivé**, tzv. hs (high sensitivity), musí v současnosti splňovat mnohá analytická kritéria uvedená v aktuálním doporučení expertů IFCC.¹ Za základní požadavek na celkovou preciznost měření se považuje hodnota vyjádřená jako $CV^{\dagger} \leq 10\%$ pro koncentrace o hodnotě 99. percentilu[‡] fyziologických hodnot a vyšší. Současně metoda „hs“ musí být schopna stanovit číselně vyjádřené koncentrace u nejméně 50% dospělých mužů a žen z referenčního souboru zdravých osob nad hodnotou LoD (Limit of Detection).

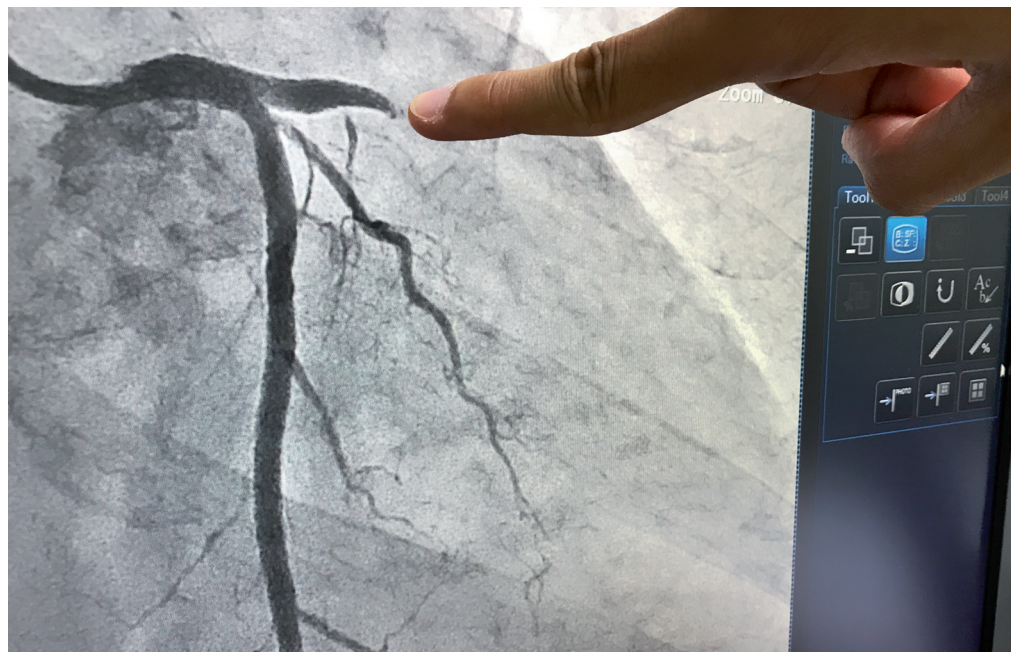
Z klinického hlediska musí „hs“ metody na stanovení troponinů mít minimálně:

1. **zvýšenou citlivost pro časnější detekci** (zkrácení diagnostického intervalu) **zvýšených hodnot nad 99. percentilem fyziologických hodnot;**
2. **sníženou specifčnost** k vyloučení ostatních příčin možného vzestupu troponinů a **umožnění stratifikace rizika pacientů s akutním koronárním syndromem** v diferenciální diagnostice ischemických/neischemických příhod.

Metrologické aspekty stanovení troponinů

Metrologická[§] návaznost kalibrátorů laboratorních metod na referenční metody a/nebo dostupný certifikovaný referenční materiál (CRM) je univerzálním nástrojem **standardizace** zacílené na globální srovnatelnost laboratorních výsledků, což platí nejen pro odbornost klinické biochemie (801). Pouze standardizace metod může zajistit klinikům faktickou **srovnatelnost výsledků laboratorních** metod napříč různými analytickými systémy.

Harmonizací vyšetření se v jistém smyslu rozumí **nižší úroveň standardizace** a ilustruje stav, kdy v době neexistence mezinárodního standardu, na nějž by se mohly metody všech výrobců navázat, se blíže neurčeným technicky vhodným



postupem (modelováním, resp. počítačovou simulací nastavení hodnot kalibrátoru) zajistí **potřebná úroveň klinické srovnatelnosti výsledků měřených veličin**.

Aby byly metody standardizované či alespoň harmonizované, musí právě výrobci zajistit, že jejich analytické systémy/metody mají návaznost na vhodné certifikované referenční materiály nebo postupy měření a že nejistota kalibrátorů je dokumentována. Analyty se pak t. č. podle možnosti své standardizace/harmonizace dělí na: **typ A** (dobře definované chemické entity, tzv. **navázatelné na SI jednotky**) nebo **typ B** (heterogenní analyty přítomné v humánních vzorcích,

kteří **však nelze na SI jednotky přímo navázat**). Zatímco analytický typ A reprezentuje malý počet (cca 65) dobře definovaných sloučenin náležejících do klasické chemie (např. elektrolyty, minerály, cholesterol, kreatinin, steroidní hormony

a vitaminy), **typ B představují všechny ostatní analyty** obvykle měřené imunochemickými metodami, **včetně proteinů, troponiny nevyjímaje**. Často jde o limitně „esoterické“ sloučeniny, které lze snadno odhalit podle toho, že jejich výsledky se vyjadřují například pomocí **arbitrárních jednotek** (př. WHO IU) nebo také **hmotnostních jednotek** (viz troponiny). „Esoterické“, B typy analytů, měřené imunochemickými metodami jsou tedy největší současnou výzvou ke standardizaci/harmonizaci, neboť výrobci těchto metod mají různé vlastní „pultovní“ kalibrátory a mezinárodně uznávané referenční materiály/postupy měření často nejsou k dispozici.

V tomto ohledu je namístě poznámka, že právě každý jednotlivý výrobce metody na stanovení cTnI má svůj vlastní kalibrátor (patentované protilátky proti konkrétnímu epitopu[¶] na molekule měřené veličiny – TnI), přičemž žádný z těchto „pultovních“ kalibrátorů není dosud

Vysvětlivky: [†] CV – variační koeficient. [‡] Percentil – statistický parametr vyjadřující, kde se nalézá měřená hodnota v rámci celé populace stejného věku a pohlaví. Každý jeden percentil vyjadřuje jednu setinu frekvence výskytu v rámci celé populace. [§] Metrologie – vědní disciplína, která se zabývá jednotností a správností měření. [¶] Epitop – konkrétní oblast antigenu, na kterou se vážou protilátky. Každá proteinová molekula obsahuje několik epitopů.



navázán na mezinárodní standard cTnI, a to **navzdory faktu, že tento standard fakticky existuje** (NIST SRM 2921), což se dá přirovnat ke stavu, jako kdyby každý výrobce cTnI – z těžko klinikovi pochopitelných důvodů – měřil jiným metrem. Faktickým důsledkem takového počínání je, že i v renomovaných klinických studiích zacílených na vzájemné porovnání hs metod cTnI se často uvádějí výsledky naměřené v různých specifických zařízeních, založené na analýzách, v nichž se používají různé protilátky rozlišující různé antigeny/epitopy, byť stejného analytu, nebo se v dvoukrokových imunoanalýzách volí různé záchytné/detekční protilátky. Takové analytické srovnávání se pak nejen z metrologického úhlu pohledu nutně musí zcela míjet se zamýšleným účelem klinického použití, ale především s finálním cílem globální srovnatelnosti.

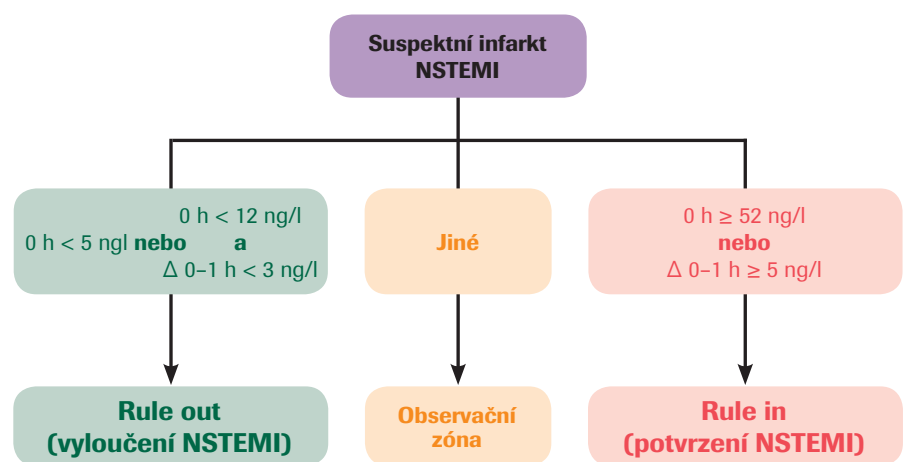
V současnosti i zpětně historicky se za nejhůře metodicky srovnatelný analyt považuje právě cTnI. Je totiž po dlouhá léta známo, že se výsledky TnI napříč jednotlivými analytickými systémy mohou významně lišit. Ještě donedávna se uvádělo, že mnohdy až **300x**. Proto i výrobci v příbalových letáčích v lepším případě **důrazně** odkazují na vlastní klinické rozhodovací meze cTnI. Ty se však také výrobce od výrobce navzájem významně liší! Výrobci to následně řeší tím, že uživatelé v příbalových letáčích opět důrazně vybízejí k ověřování těchto mezí, aniž by je to zbavovalo implicitní povinnosti provádět jejich řádnou klinickou validaci před vlastním uvedením metody na trh. **Řádně otestované a výrobci klinicky validované** jsou dle autorů B. Friedeckého a J. Kratochvíly² dosud pouze dvě soupravy na stanovení hs troponinů, a to **hs cTnI výrobce Abbott a hs cTnT výrobce Roche**, přičemž hs cTnT jako metoda monopolního výrobce má i řádně **klinicky validovanou hodnotu cut-off**, tedy i výhodu faktické **globální klinické srovnatelnosti výsledků v rámci pracovišť, která tuto metodu používají**.

Klinické poznámky k použití metody hs cTnT v porovnání s metodami hs cTnI

Výhodou laboratorní metody **stanovení hs cTnT** oproti metodám **hs cTnI je v první řadě její delší čas vývoje a srovnatelně delší doba klinického ověření**, na němž se podílela celá řada významných osobností z oboru klinické biochemie i v ČR. Byl to především **prof. MUDr. M. Engliš, DrSc.**, jenž po dlouhá léta vedl diskusi na toto téma, která na konci více než desetiletého vývoje vyústila mj. právě ve **vyšokou citlivost metody** a potvrzení její **nezpochybnitelně negativní prediktivní hodnoty** (tj. že **hodnoty nacházející se pod hodnotou cut-off**, tedy **negativní, potvrzují neexistenci myokardiální ischemie**), což bohužel dosud nelze tvrdit na 100% o některých metodách na stanovení cTnI. Metoda **hs cTnT** je totiž v současné době jedinou metodou se standardizovanými rozhodovacími hodnotami, což má nesporný klinický a praktický význam, zatímco vysoce různé „**hs**“ **citlivosti metod na stanovení cTnI** za jistých klinických okolností mohou velmi limitovat jejich praktickou využitelnost v diferenciální diagnostice akutních srdečních příhod.

právě hs cTnT jako **nezávislého prediktoru horší transplantační prognózy u těchto pacientů**, vypovídajícího navíc o multifaktoriálním či blíže nespecifikovaném **poškození myokardu**, resp. o **poškození srdeční svaloviny ischemií související s hyperkatabolickým stavem** při ledvinovém selhávání. Četné studie³⁻¹⁷ tím vyvrátily původní diskusní otázku údajné falešné positivity hs cTnT u těchto pacientů.

Dlouhodobý vývoj metody stanovení hs cTnT v podstatě zajistil rychlý nástup využití tzv. **delta hodnot (Δ)**, což jsou minimální změny (tedy nárůsty nebo poklesy) měřené veličiny zjištěné při opakovaných měřeních v doporučených intervalech (tj. obvykle za 1–3 hodiny, **u hs cTnT už za 1 hodinu**). Ty významně zpřesňují využití získaných hodnot následných měření hs cTnT jako cíleného ukazatele **stratifikace rizika pacientů s akutním koronárním syndromem v diferenciální diagnostice ischemických/neischemických příhod**. Váhavíci klinik může s jejich pomocí docílit téměř 100% jistoty, s níž lze akutní infarkt myokardu (AIM) buď potvrdit, nebo vyloučit, viz obrázek č. 1.



▲ Obr. č. 1: Východí rozhodovací algoritmus 0/1 h pro hs TnT (Doporučení ESC 2015).

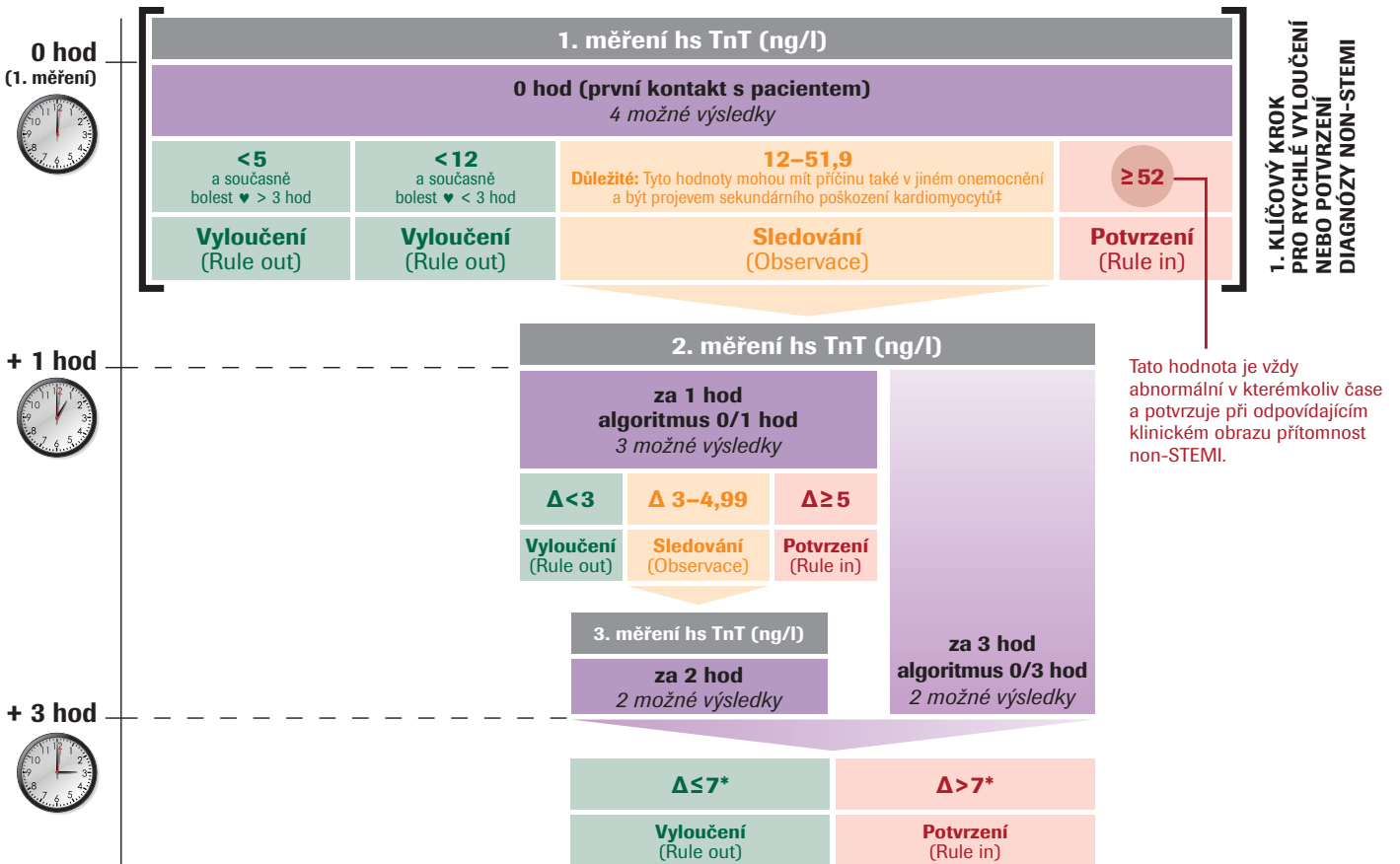
Téma **mírně zvýšených hodnot hs cTnT u hemodialyzovaných pacientů** bylo v minulosti velmi zevrubně diskutováno a na světlo světa se dostaly závěry řady studií, které potvrdily využití

Delta hodnoty pro metody hs cTnT jsou již také k dispozici. Nicméně na rozdíl od hs cTnT mají jednotlivé metody určené ke stanovení hs cTnI samozřejmě různé rozlišovací delta hodnoty, jakož



Jak pracovat s hodnotami hs TnT?

Algoritmus 0/1 hod nebo 0/3 hod v diagnostice suspektního non-STEMI²⁵⁻²⁸



▲ Převzato z brožury Roche Elecsys® Troponin T hs (2018-CD-53).

i doporučené intervaly měření podle jednotlivých klinických studií, což může klinikům činit nemalé diagnostické problémy. Úkolem laboratoří, které provádějí „hs“ měření troponinů, však není respektovat časté přání kliniků na „jednotné referenční meze, resp. hodnoty cut-off“. V případě troponinů to za stávajícího stavu techniky a neexistence harmonizace hs cTnI metod ani není možné. Za všech technických a personálních podmínek by cílem snažení laboratorních týmů mělo být: poskytovat **exaktní výsledky** všemi dostupnými metodami, nejen těmi určenými ke stanovení troponinů! Moudří klinické posuzují výsledky metod vždy minimálně srovnáním s konkrétními rozhodovacími mezemi poskytovanými a ověřenými danou laboratoří a v případě jakýchkoliv dilemat či pochybností v diferenciálně diagnostickém procesu by na úrovni

laboratoře měly být k dispozici adekvátní konzultační služby.

Kardiologové často argumentují, že řada pacientů s chronickými formami ICHS má „svou“ konkrétní chronickou hodnotu troponinu hs cTnT. I takové hodnoty se však v rámci studií^{18,19} **osvědčily** jako další, v praxi dobře použitelný **nezávislý**

ukazatel horší prognózy ICHS onemocnění, a tak se s pomocí výše uvedených delta hodnot klinické mohou rozhodnout, zda i v těchto případech výsledek měření hs cTnT diagnózu AIM potvrzuje, či nikoliv.

Nespornou výhodou stanovení **hs cTnT** oproti cTnI představuje pro ambulantní

Vysvětlivky: † Další onemocnění, která mohou být spojena se zvýšenými hodnotami hs TnT: Tachyarytmie. Srdeční selhání. Akutní hypertenzní stavy. Kritické stavy (např. šok/sepsé/popáleniny). Myokarditida. Tako-tsubo kardiomyopatie. Strukturální onemocnění srdce (např. aortální stenóza). Disekce aorty. Plicní embolie, plicní hypertenze. Renální dysfunkce a s ní spojené postižení srdce. Koronární spasmus. Akutní neurologická příhoda (CMP, subarachnoidální krvácení). Srdeční kontuze nebo výkony na srdci. Hypo- a hyperthyreóza. Infiltrativní onemocnění (např. amyloidóza, hemochromatóza, sarkoidóza, sklerodermie). Myokardiální léková toxicita nebo otravy (např. doxorubicin, 5-fluorouracil, herceptin, hadí jedy). Extrémní vytrvalostní zátěž. Rabdomyolýza. Δ = hodnota „delta“ neboli změna hodnot hs TnT mezi dvěma měřeními. Příklad: hodnota při prvním měření [14 ng/l] – hodnota při druhém měření [21 ng/l] = hodnota delta [7 ng/l]. ♥ = bolest na hrudi.
* = 50 % horní referenční meze hs TnT. Schéma adaptováno podle 2015 ESC Guidelines²⁵, Twerenbold, et al. 2018²⁷, Vigen, et al. 2018.²⁸



specialisty v terénu jeho jednoznačně **vysoká stabilita v biologickém materiálu**, tj. neexistence významné závislosti kvality vyšetření na přesném dodržení preanalytických podmínek odběru a na rychlém transportu, na rozdíl od troponinů I. Dominantní formu cTnT v krvi totiž představuje jeho **volná forma**, pouze v malé míře je cTnT vázán v terciálním komplexu cTnC-cTnI-cTnT. Uvolněný cTnT je v krvi přítomen v uniformní a stabilní formě a vysvětlení výborné stability cTnT v krvi je proto snadné: volný cTnT je **hydrofilní a relativně rezistentní protein**. Molekula cTnT tím, že neobsahuje cysteinová rezidua, nepodléhá oxidoredukčním vlivům. Epitopy, vůči kterým jsou zaměřeny protilátky v analytické soupravě ke stanovení hsTnT Roche Diagnostics, proto nemohou být fosforylovány.

Naproti tomu je volný cTnI čistě **hydrofobní**, a tím i **méně stabilní** protein s tendencí vázat se na jiné proteiny (především na cTnC a cTnT). Koncentrace volného cTnI je v krvi velmi nízká nebo neprokazatelná. Hlavní formy cTnI představují binární (cTnI-cTnC) a terciální (cTnC-cTnI-cTnT) komplexy. Volný

i v komplexech vázaný cTnI může být až z 50 % na několika místech fosforylován a na dvou cysteinových reziduích oxidován nebo redukován.

Jako důkaz **klinické spolehlivosti** metody hs TnT může být uveden fakt, že v historii laboratoře OKB-H Nemocnice Prachatice, a.s., nebyl zaznamenán žádný případ, kdy by nebyl laboratorně zjištěn čerstvý záchyt AIM potvrzený následně dalšími vyšetřovacími metodami. Na rozdíl od metody na stanovení hs TnI, kterou používají smluvní laboratoře ve stejném kraji. Je proto důležité si uvědomit, že se vyplácí mít vlastní letitou klinickou zkušenost s konkrétní metodou stanovení troponinu – a naše laboratoř úspěšně poskytuje svým zákazníkům stanovení hs cTnT již 10 let jako řádně akreditovanou metodu.

Závěr

Držme se staré dobré kvality! Toť motto závěrečného autorského slova s tím, že pro laboratorní provozy tzv. okresního dosahu s poměrně velkým zázemím ambulantních lékařů, kteří posílají své

požadavky na stanovení troponinu z větší či menší vzdálenosti od dané zdravotnické laboratoře, je důležité, aby analyt nebyl transportem ovlivněn. Čili pro podobná laboratorní pracoviště a jejich zákazníky je klíčová především stabilita měřeného analytu a řádně klinicky ověřená spolehlivost metody. Proto za mnohem výhodnější považují autoři tohoto sdělení měření hladin hs cTnT oproti hs cTnI. Někteří kardiologové z kardio-center požadují stanovení hs cTnI. Často s nepsaným komentářem, že hs cTnI preferují jako formu troponinu s větší diagnostickou výpovědní hodnotou, ovšem bez řádného uvedení pádných argumentů a náležitých faktických důkazů. Domnívají se, že výhodou méně senzitivního stanovení hs cTnI je to, že se nezvyšuje u tolika pacientů s nekoronárním postižením myokardu.²⁹ Je to, jako by chtěli jezdit v trabantu, když mají v garáži mercedes či BMW. Tito kliničtí specialisté se patrně v laboratorní metrologii vůbec neorientují, požadavky současné laboratorní kvalimetrie na jednotlivé imunochemické metody nechápou (a to nejen pro stanovení troponinů) a z důvodu neznalosti je nepovažují za hodné respektu.



Prim. MUDr. Jaroslava Ambrožová

OKB-H Nemocnice Prachatice, a.s.

Kontakt: ambrozova@nempt.cz

Od roku 1983 pracuje jako lékařka v laboratořích specializovaných na klinickou biochemii a hematologii, od roku 1989 na pozici lékařky vedoucí laboratoře různých úrovní. V době postgraduálního vzdělávání absolvovala tři zahraniční pobyty v mezinárodních lékařských vzdělávacích centrech (Drážďany, Adelaide, Chicago). Původní specializací v klinické biochemii II. stupně si velmi záhy rozšířila o interní lékařství s návaznou specializací v hematologii a transfúzní službě, a proto také dlouhou řadou let lékařsky zajišťuje i dvě specializované ambulance: metabolickou a hematologickou. V letech 1985–1988 absolvovala postgraduální kurz FF UK a ČSAV „Základy matematických metod pro využití v experimentálním výzkumu“, z něhož mj. vychází její celoživotní zájem o aplikovanou matematiku a zejména pak o korektní statistické zpracování dat, produkovaných v hojně míře právě ve zdravotnických laboratořích. Inspiraci ke své práci v posledních letech nejčastěji hledá a spolehlivě nachází v nejrůznějších doporučeních CLSI.

Ve volném čase relaxuje zahradničením, příležitostným cestováním a sportem (plavání a pilates), návštěvou kulturních akcí, četbou všeho možného a hrou na klavír.



LITERATURA

1. Apple FS, et al.: On behalf of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. IFCC educational materials on selected analytical and clinical applications of high sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Biochem* 2015; 48: 201-3.
2. Friedecký B, Kratochvíla J: Vysoce citlivé (hs) metody stanovení kardiálních troponinů v roce 2017. Soubor informací o analytice a diagnostice akutních koronárních syndromů, FONS Informační Bulletin 1/2018.
3. Friedecký B, Jabor A, Kratochvíla J, Rajdl D, Kettner J, Franeková J, Janota T, Pudil R, Hnátek T, Rokyta R. Doporučení ČSKB: Používání kardiálních troponinů při podezření na akutní koronární syndrom. ČSKB, Akutní kardiologie, ČKS. *Klin Biochem Metab*, 23 (44), 2015, No. 2, p. 71-77.
4. McGill D, et al: Over time, TnT-hs replaces NT-proBNP as the most powerful predictor of death in patients with dialysis-dependent chronic renal failure; *Clin Chim Acta*. 2010; 411(13-14): 936-9.
5. Scheven L, et al: PREVEND study group: TnT-hs and NT-proBNP are associated with cardiovascular events despite the cross-sectional association with albuminuria and glomerular filtration rate; *Eur Heart J*. 2012; 33(18): 2272-81.
6. Artunc F, et al: Sensitive Tns – which suits better for hemodialysis patients? Associated factors and prediction of mortality; *PLoS One*. 2012; 7(10): e47610.
7. Hasegawa M, et al: Prognostic value of highly sensitive troponin T on cardiac events in patients with chronic kidney disease not on dialysis; *Heart Vessels*. 2013; 28(4): 473-9.
8. Wolley M, et al: Variation in and prognostic importance of troponin T measured using a high-sensitivity assay in clinically stable haemodialysis patients; *Clin Kid J* 2013; 6(4): 402-9.
9. Dubin RF, et al and the CRIC Study Investigators: Predictors of cTnT-hs in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study in the chronic renal insufficiency cohort (CRIC); *BMC Nephrol*. 2013; 14(1): 229.
10. Bosselmann H, et al: Prognostic significance of cardiovascular biomarkers and renal dysfunction in outpatients with systolic heart failure: a long term follow-up study; *BIInt J Cardiol* 2013; 170(2): 202-7.
11. Hassan HC, et al: TnT-hs as a predictor of cardiac events and mortality in the stable dialysis population; *Clin Chem*. 2014; 60(2): 389-98.
12. Honneger S, et al: Prognostic value and long-term variation of high sensitivity troponin T in clinically stable haemodialysis patients; *N Z Med J* 2014; 127(1402): 97-109.
13. Bansal N, et al. TnT-hs & NT-proBNP and risk of incident heart failure in patients with CKD: The Chronic Renal Insufficient Cohort (CRIC) Study; *J Am Soc Nephrol*, 2014, Oct 2. [Epub ahead of print]
14. Kim Y, et al: Association of high-sensitivity cardiac troponin T and natriuretic peptide with incident ESRD: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study; *Am J Kidney Dis* 2015; 65(4): 550-8.
15. Hickman PE, et al: Multiple biomarkers including cardiac troponins T and I measured by high-sensitivity assays, as predictors of long-term mortality in patients with chronic renal failure who underwent dialysis; *Am J Cardiol* 2015; 115(11): 1601-6.
16. Twerenbold R, et al: Optimal cut-off levels of more sensitive cardiac troponin assays for the early diagnosis of myocardial infarction in patients with renal dysfunction; *Circulation* 2015; 131(23): 2041-50.
17. Cardinaels EPM, et al: High-sensitivity cardiac troponin concentrations in patients with chest discomfort: is it the heart or the kidneys as well?; *PLoS One*, 2016; 11(4): e0153300.
18. Daněk J, et al: Koncentrace troponinů u pacientů se stabilní ICHS; *Cor et Vasa* 2016.
19. Apple FS, et al. Cardiac Troponin Assays: Guide to Understanding Analytical Characteristics and Their Impact on Clinical Care. *Clinical Chemistry Jan* 2017, 63 (1) 73-81; DOI: 10.1373/clinchem.2016.255109.
20. Wu AH, et al: Clinical Laboratory Practice Recommendations for the Use of Cardiac Troponin in Acute Coronary Syndrome: Expert Opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018, DOI: 10.1373/clinchem.2017.277186.
21. Sheng, JJ et al. *Frontiers in Physiology* (2014): Volume 5. Article165: 2.
22. Takeda, S et al. *Nature* 424 (2003): 35–41. DOI:10.1038/nature01780.
23. Wildi, K et al. *Circulation* 2015; 131: 2032–2040.
24. Badertscher, P et al. *Clinical Chemistry* 64:3 (2018): 525.
25. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2016 Jan 14; 37(3): 267–315.
26. Widimský, P et al. Summary of the 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Prepared by the Czech Society of Cardiology. *Cor et Vasa* 58 (2016) e4–e28, jak vyšel v online verzi *Cor et Vasa* na <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010865016000059>
27. Twerenbold, R et al. *J Am Coll Cardiol* 2018; 72(6): 620–32.
28. Vigen, R et al. *Circulation* 2018.
29. Thygesen, K et al: Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018) *J Am Coll Cardiol* 2018 72(18): 2231–64.