

# Actividad de la isoenzima CKBB en suero y broncoaspirado de recién nacidos pretérmino con síndrome de distrés respiratorio

M.R. Sánchez Navarro, C. Oliver Almendros, M.E. Fernández-Conde, J.A. Hurtado\*, M. Samaniego Muñoz\*

**Resumen.** *Objetivo:* Comprobar la utilidad de la determinación sérica de isoenzimas de creatin quinasa (CK), como marcadores de daño tisular pulmonar, en recién nacidos pretérmino con síndrome de distrés respiratorio (SDR).

*Pacientes y métodos:* Se estudiaron 46 neonatos clasificados en dos grupos: uno formado por 26 recién nacidos con SDR que precisaron ventilación mecánica y un grupo control formado por 20 niños sanos con edad gestacional, peso y horas de vida similares al grupo anterior. La actividad de CK y de sus isoenzimas se determinó en el aspirado bronquial y en muestras de suero extraídas antes y 24 horas después de la instilación traqueal de surfactante exógeno. Las isoenzimas se separaron por electroforesis sobre gel de agarosa expresándose su actividad como porcentaje de la CK total. En los aspirados bronquiales se cuantificaron las proteínas totales expresándose la actividad enzimática de CK en UI/mg de proteína  $\times 10^{-3}$ .

*Resultados:* La isoenzima CK-BB aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) en el suero de los niños patológicos en relación con el grupo control. En el aspirado bronquial, el estudio isoenzimático mostró que la isoenzima CKBB representaba el 98-100 % de la actividad enzimática total de CK.

*Conclusiones:* El estudio muestra diferencias significativas en los perfiles isoenzimáticos de CK en los neonatos con dificultad respiratoria. El aumento en el suero de la isoenzima CK-BB podría ser un marcador eficaz de daño tisular en la enfermedad pulmonar del recién nacido.

*An Esp Pediatr 1999; 51:514-518*

**Palabras clave:** Síndrome de distrés respiratorio; isoenzimas; CK-BB; aspirado bronquial; surfactante.

## CREATINE KINASE BB ACTIVITY IN THE SERUM AND BRONCHIAL ASPIRATE OF PRETERM NEWBORNS WITH RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

**Abstract.** *Objective:* The aim of this study was to test the utility of serum creatine kinase (CK) isoenzyme determinations as a marker of tissue injury in preterm newborns with respiratory distress syndrome (RDS).

*Patients and methods:* Two groups of neonates were studied, 26 suffering from RDS who required mechanical ventilation and 20 healthy newborns with gestational ages, hours of life and birth weights similar

to the first group. The activity of CK and its isoenzymes was determined in the bronchial aspirate and serum samples that were obtained before and 24 hours after exogenous surfactant therapy. The isoenzymes were separated by electrophoresis on agarose gel and their activity expressed as a percentage of the total CK. Total proteins were quantified in the bronchial aspirate and CK enzymatic activity expressed in U/mg of protein  $\times 10^{-3}$ .

*Results:* The CK-BB isoenzyme was significantly increased ( $p < 0,001$ ) in the serum of infants with RDS compared with the control group. In the bronchial aspirate, the isoenzymatic study showed that the CK-BB isoenzyme represented 98-100% of the total enzymatic CK activity.

*Conclusions:* The study shows significant differences in the CK isoenzyme patterns of neonates with RDS compared to controls. An increase in serum levels of the CK-BB isoenzyme could be an effective marker of tissue injury in lung disease in the newborn.

**Key words:** Respiratory distress syndrome. Isoenzymes. CK-BB. Bronchial aspirate. Surfactant.

## Introducción

La creatin quinasa (CK, EC 2.7.3.2) es una enzima intracelular presente en todos los tejidos bajo tres formas isoenzimáticas diferentes conocidas como MM, MB y BB. En el tejido fetal la isoenzima BB es la forma predominante, las isoenzimas MM y MB aparecen gradualmente, hacia la 8ª semana, al expresarse el gen M y el perfil CK va cambiando, a medida que se diferencian los tejidos, hasta que finalmente es la MM la isoenzima más significativa<sup>(1)</sup>.

Mientras que en un individuo adulto normal, la CKMM sérica representa el 95-97% de la actividad enzimática total y la CKBB es prácticamente inexistente, se ha demostrado que las tres isoenzimas están presentes en el suero del recién nacido sano durante el primer mes de vida y en la sangre del cordón umbilical<sup>(2-7)</sup>.

El hecho de que la isoenzima BB se encontrara en el suero de enfermos con lesiones cerebrales graves hizo pensar que se trataba de una isoenzima específica de tejido cerebral, por lo que, aunque la CKBB ha sido ampliamente estudiada, su utilidad clínica ha estado un tanto limitada a la valoración del daño neurológico<sup>(8-12)</sup>. Hoy se conoce su amplia distribución en el organismo y se sabe que la CKBB se expresa de forma predominante en el pulmón, intestino, pared vascular, páncreas, útero, mama, próstata y placenta<sup>(13-17)</sup>.

Departamento de Bioquímica. Hospital Universitario "S.Cecilio". Unidad Neonatal. Hospital Universitario "Virgen de las Nieves". Granada.  
*Correspondencia:* Manuel Samaniego Muñoz. Unidad Neonatal. Hospital "Virgen de las Nieves". Avda de las Fuerzas Armadas. 18014 Granada.

*Recibido:* Noviembre 1998  
*Aceptado:* Septiembre 1999

Tabla I Características clínicas de los pacientes estudiados

| Parámetro                | 1ª muestra<br>(suero y aspirado) | 2ª muestra<br>(suero) |
|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Nº. pacientes            | 26                               | 18                    |
| Horas de vida            | 0 - 6                            | 24                    |
| pH arterial              | 7,2 ± 0,03                       | 7,37 ± 0,04           |
| PaCO <sub>2</sub> (mmHg) | 64,7 ± 6,4                       | 43,8 ± 9,1            |
| PaO <sub>2</sub> (mmHg)  | 46,1 ± 5,1                       | 94,5 ± 19,4           |

Siendo la CK-BB mayoritaria en el tejido pulmonar, la destrucción/lesión de las células epiteliales de revestimiento alveolar, que ocurre en el distrés respiratorio idiopático, podría condicionar un aumento de la actividad sérica de la creatin quinasa y en especial de su isoenzima BB.

Hemos estudiado los perfiles isoenzimáticos de CK en el suero y en el líquido procedente del lavado broncoalveolar de neonatos pretérmino con síndrome de distrés respiratorio (SDR), que por su gravedad precisaron ventilación mecánica, con objeto de encontrar un marcador bioquímico de fácil determinación que pudiera proporcionar información sobre el grado de daño tisular pulmonar y que fuera eficaz indicador evolutivo de la enfermedad.

### Pacientes y métodos

Se han estudiado 46 recién nacidos (RN) clasificados en dos grupos: uno formado por 26 neonatos pretérmino ingresados, en la unidad de cuidados intensivos neonatales, por presentar un cuadro de dificultad respiratoria en el período neonatal inmediato, y un grupo de control formado por 20 RN sanos de características similares. Las medias de peso natal y edad gestacional del grupo patológico fueron de 1.560 ± 567 gramos; 31 ± 3 semanas y 2.005 ± 469 gramos; 33 ± 2,8 semanas las del grupo de control.

Los enfermos fueron seleccionados en relación con los parámetros clínicos, función respiratoria y afectación radiológica compatibles con un SDR que precisaron ventilación mecánica, la cual fue iniciada entre las 0-4 horas de vida, atendiendo a los siguientes criterios de gravedad: test de Apgar al minuto de vida inferior a 5, y a 7 a los 5 minutos, pH < 7,20, PaCO<sub>2</sub> ≥ 60 mmHg, y PaO<sub>2</sub> ≤ 50 mmHg. Se obtuvieron muestras de sangre venosa, enviadas al laboratorio, centrifugadas y procesadas de forma inmediata con el objeto de evitar al máximo la inactivación *in vitro* de la isoenzima BB<sup>(18)</sup>. La misma pauta fue seguida con los RN sanos.

El líquido del lavado broncoalveolar se recogió por un método estandarizado consistente en la instilación con sonda fina a través del tubo endotraqueal de solución salina al 0,9%, calentada previamente en la palma de la mano, en partes alícuotas de 1 ml, que se aspiraron, tras un minuto de ventilación manual,

Tabla II Actividad enzimática de CK y sus isoenzimas en el suero de los RN estudiados. Valores medios ± DE

|                        | RN sanos<br>n = 20 | RN con SDR<br>n = 26 |
|------------------------|--------------------|----------------------|
| <b>CK total</b> (IU/l) | 234 ± 87           | 276 ± 123            |
| <b>CK-MM</b> (%)       | 88,7 ± 6,5         | 53,4 ± 19,7          |
| <b>CK-MB</b> (%)       | 6,1 ± 3,1          | 6,9 ± 1,8            |
| <b>CK-BB</b> (%)       | 5,2 ± 3,4          | 39,7 ± 17,9*         |
| *p < 0,001             |                    |                      |

en un recipiente estéril de doble entrada. El aspirado se centrifugó, para eliminar el moco, utilizándose el sobrenadante para las determinaciones analíticas, desechándose aquellos aspirados que contenían restos hemáticos. Tanto las muestras de sangre como las de lavado broncoalveolar se recogieron en las primeras 6 horas de vida y antes de la instilación traqueal de surfactante exógeno (SF) que fue administrado a 18 niños (se instilaron 200 mg/kg/dosis, de Curosurf por vía endotraqueal, fraccionando la dosis en dos alícuotas); nuevas muestras de sangre venosa fueron extraídas y procesadas 24 horas después de la instilación del surfactante.

Las actividades totales de CK se midieron a 37° C en auto-analizador Hitachi 704 con reactivos Boehringer Mannheim (Automated Analysis for BM/Hitachi 704, 705; Mannheim, F.R.G.). Las isoenzimas se separaron por electroforesis con el sistema Paragon Electrophoresis System (Beckman Instruments, Inc., Fullerton CA) utilizando *kits* "Creatine Kinase Isoenzyme Electrophoresis" (Beckman, CK, P/N 655930). Se utilizó gel de agarosa tamponado a pH 7. La electroforesis tuvo lugar a 100 voltios durante 20 minutos; una vez finalizada, se incubaron los geles con un sustrato específico para la enzima durante 20 minutos a 45° C en cámara húmeda. La cantidad relativa de las bandas se cuantificó midiendo la fluorescencia a 340 nanómetros, en un densitómetro Appraise (Beckman) y la cantidad de cada isoenzima se calculó como porcentaje de la actividad enzimática total. En los aspirados bronquiales se cuantificaron las proteínas totales utilizando el método Pyrogallol-red-molibdate (Quantimetrix), expresándose las actividades enzimáticas de CK en UI/mg de proteína x 10<sup>-3</sup>.

**Análisis estadístico.** Las variables cuantitativas se expresan en función de su media y desviación estándar ( $\bar{x} \pm DE$ ). Se utiliza el test paramétrico de la "t" de Student para comparación de muestras independientes y el mismo test para muestras apareadas. Se aplicó el método de regresión lineal "r" de Pearson para estudiar la correlación entre variables, estableciéndose el nivel de significación en un valor de p < 0,05. Los datos se procesaron con el paquete estadístico Rsigma para PC<sup>(19)</sup>. La bibliografía se obtuvo gracias al Servidor de la Hemeroteca de la Facultad de Medicina de Granada, utilizando el método *on-line* y recuperando las publicaciones sobre el

Tabla III Actividad enzimática de CK y de sus isoenzimas en el suero y en el broncoaspirado de los RN con SDR. Valores medios  $\pm$  DE

|          | CK total      |                        | Isoenzimas de CK (%) |               |                 |
|----------|---------------|------------------------|----------------------|---------------|-----------------|
|          | IU/l          | IU/mg $\times 10^{-3}$ | CK-MM                | CK-MB         | CK-BB           |
| Aspirado |               | 257 $\pm$ 159          | 2,2 $\pm$ 1,4        | 0,2 $\pm$ 0,1 | 97,6 $\pm$ 2,3  |
| Suero    | 276 $\pm$ 123 |                        | 53,4 $\pm$ 19,7      | 6,9 $\pm$ 1,8 | 39,7 $\pm$ 17,9 |

tema incluidas en el sistema internacional MEDLINE desde los años 1971 a 1998.

## Resultados

En la tabla I se recogen las características clínicas de los RN patológicos en el momento de la recogida de muestras; las primeras muestras, tanto de sangre como de lavado bronquial, se recogieron al mismo tiempo, entre las 0-6 horas de vida, siendo los valores medios de pH arterial (7,2  $\pm$  0,03), la PaCO<sub>2</sub> (64,7  $\pm$  6,4 mmHg) y la PaO<sub>2</sub> (46,1  $\pm$  5,1 mmHg).

La tabla II muestra los valores medios y la desviación estándar (DE), de la actividad sérica de CK, así como los correspondientes valores porcentuales de sus isoenzimas encontrados en los dos grupos estudiados. En la comparación de resultados encontramos que, mientras en el suero de los RN sanos la actividad enzimática de CKBB representa el 5-8% del total de CK, esta isoenzima se eleva significativamente (40-67%) en el suero de los neonatos con SDR ( $p < 0,001$ ), y el valor sérico de CKMM, que en los RN sanos representa el 88-95% del total de CK, desciende significativamente (53-74%) en relación al grupo control ( $p < 0,001$ ). La diferencia no fue significativa para los valores de CK total ni para los de la isoenzima CKMB.

En el grupo de niños patológicos que, dada su gravedad, precisaron ventilación mecánica, las isoenzimas de CK se pudieron estudiar tanto en el suero como en el líquido procedente del lavado broncoalveolar. Encontramos que, en el broncoaspirado, la CKBB es la isoenzima predominante, representando el 98-100% de la actividad enzimática total, la isoenzima CKMB es prácticamente inexistente y el valor porcentual de CKMM es inferior al 3%. La tabla III muestra los valores medios y DE de la actividad enzimática e isoenzimática de CK encontrados en el aspirado bronquial y los valores plasmáticos correspondientes. El coeficiente de correlación mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la actividad enzimática de CKBB del aspirado y su correspondiente valor plasmático ( $r = 0,51$ ,  $p < 0,05$ ). La figura 1 muestra los perfiles isoenzimáticos de CK encontrados en el suero de los RN sanos y en el suero y broncoaspirado de los RN con SDR.

En 18 neonatos, tratados con surfactante, medimos la actividad enzimática 24 horas después de su instilación siendo, en

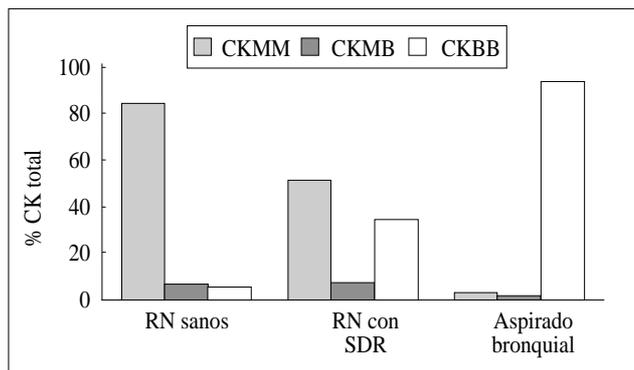


Figura 1. Distribución de isoenzimas de CK en el suero de RN sanos y en el suero y broncoaspirado de RN con síndrome de distress respiratorio.

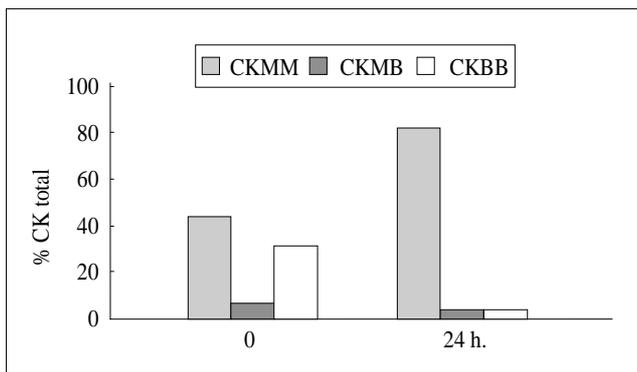
el momento de la extracción de muestras, los valores medios de pH arterial (7,37  $\pm$  0,04), la PaCO<sub>2</sub> (43,8  $\pm$  9,1 mmHg) y la PaO<sub>2</sub> (94,5  $\pm$  19,4 mmHg). Encontramos que los valores porcentuales de CKBB descendían en el suero de forma significativa (4,6  $\pm$  3,4%), coincidiendo con la mejoría del cuadro clínico e incluso se mostraban inferiores a los presentados por el grupo de control ( $p < 0,001$ ). La figura 2 muestra la comparación de resultados antes y después de la instilación de surfactante.

## Discusión

En este estudio hemos medido la actividad enzimática de la creatin quinasa y la distribución de sus isoenzimas en el suero y en el líquido procedente del lavado broncoalveolar de niños prematuros con SDR grave que precisaron ventilación mecánica, encontrando un aumento significativo en los valores porcentuales de CKBB en el suero de estos niños.

En condiciones normales la isoenzima BB no está presente en el suero de los adultos pero sí se encuentra en pequeñas concentraciones en el suero del RN sano sin que se haya encontrado relación entre los niveles séricos de CK-BB y la edad gestacional (20-21). La baja o nula concentración de BB en el suero se cree debida, por un lado, a su rápido aclaramiento del plasma y, por otro, a la inestabilidad *in vitro* de esta isoenzima, se ha calculado que, una vez extraída la muestra, en 1 hora se pierde más del 50% de su actividad y el 95-100% entre los 80-90 minutos (22).

La CKBB se ha encontrado elevada en el suero de RN hipóxicos e incluso se ha referido una relación cuantitativa con el daño neurológico tras asfixia grave. La patología que afecta al sistema nervioso central reviste gran importancia en el período neonatal tanto por su pronóstico inmediato como por las secuelas que pudiera originar y son muchos los trabajos encaminados a encontrar un parámetro bioquímico, como la CKBB, que sirva de marcador de lesión neuronal (23-27). Hoy se sabe que son varios los estados patológicos que pueden condicionar un aumento de la concentración sérica de CKBB; así, se ha encontrado elevada en el suero de pacientes con infarto intestinal y en neonatos con enteritis necrotizante neonatal, donde se ha podido establecer una relación entre las cifras séricas de BB y grado de daño tisular (28,29). Actualmente la CKBB está siendo am-



**Figura 2.** Distribución de isoenzimas de CK en el suero de RN con SDR, antes y 24 horas después de la instilación traqueal del surfactante.

pliamente estudiada en relación con su posible utilidad como marcador tumoral y se han encontrado niveles elevados de esta isoenzima en el suero de pacientes con cáncer de colon, pulmón, y otras localizaciones<sup>(30-33)</sup>. La CKBB ha sido estudiada también en otros fluidos orgánicos como líquido cefalorraquídeo, derrame pleural, aspirado bronquial... y se han intentado correlacionar los valores encontrados con los valores séricos<sup>(34-36)</sup>.

Hemos estudiado la distribución de isoenzimas de la CK en el suero de niños con dificultad respiratoria grave en el período neonatal inmediato y encontramos un perfil isoenzimático diferente al presentado por el neonato sano. Al igual que ocurre en el adulto, en el RN sano la isoenzima sérica predominante es la CKMM pero esta isoenzima disminuye significativamente, al tiempo que la CKBB aumenta, en ocasiones de forma espectacular (> 60%), en el suero de los RN con SDR.

Por otro lado, al estudiar las isoenzimas de CK en el líquido procedente del lavado broncoalveolar, encontramos un patrón isoenzimático característico en el que la isoenzima BB es la predominante, representando el 98-100% de la actividad enzimática total, mientras la CKMB es inapreciable y CKMM presenta valores muy bajos (0-3%). Comprobamos una correlación positiva entre la actividad enzimática de CKBB del aspirado bronquial y el incremento de esta misma enzima en el suero. Teniendo en cuenta que la creatin quinasa es una enzima *constitutiva* de tejido, que los niveles plasmáticos considerados como "normales" obedecen a la renovación celular y que un aumento de estos niveles en el suero es siempre indicativo de daño celular o necrosis este incremento podría reflejar un flujo de la BB del tejido pulmonar dañado a la sangre a través de la membrana alvéolo-pulmonar comprometida en el distrés.

El aumento sérico de CKBB es un dato de difícil interpretación por un lado, las lesiones neuronales producidas por la falta de oxigenación del tejido encefálico tras un episodio hipóxico-isquémico podrían, por sí solas, condicionar un aumento de la actividad enzimática sérica de BB; por otro, no se puede dejar pasar el hecho de que la BB no es específica de tejido cerebral, resulta predominante en tejido pulmonar y es sabido que, en el distrés, la deficiencia de factor tensioactivo causa la lesión

de las células epiteliales de revestimiento alveolar y que la hipoxia, hipercapnia y acidosis respiratoria contribuyen a lesionar aún más las células epiteliales al disminuir secundariamente la producción de surfactante y producir una vasoconstricción pulmonar a nivel de las arteriolas y pequeñas arterias pulmonares.

Creemos que los niveles de BB, encontrados en nuestro estudio, son demasiado elevados para proceder de la lesión "irreversible" de tejido cerebral los niños de nuestra serie presentan unas medias de peso y edad gestacional moderadas los casos extremos fueron excluidos ante la dificultad de conseguir un grupo control de neonatos sanos con similares características. La supervivencia neonatal global, para toda la serie, fue del 88% y la evolución neurológica satisfactoria, con sólo un caso de secuelas importantes y dos casos de secuelas leves, sin que se encontraran diferencias entre supervivientes y fallecidos con respecto a los niveles plasmáticos de CKBB.

Se concluye que la determinación de la isoenzima BB de la creatin quinasa podría utilizarse como marcador de daño tisular pulmonar en el SDR, aunque es posible que su mayor interés radique en las mediciones repetidas de este parámetro para apreciar su cinética de normalización en la sangre, ya que la relación cuantitativa que parece existir entre los valores séricos y la gravedad del cuadro clínico podría conferir a este marcador un importante valor pronóstico.

## Bibliografía

- 1 Hoerter JA, Ventura-Clapier R, Kuznetsov A. Compartmentation of creatine kinase during perinatal development of mammalian heart. *Mol Cell Biochem* 1994; **133**:277-286.
- 2 Cao A, Tralbalza N, de Virgili S, Furbetta M, Coppa G. Serum creatine kinase activity and serum creatine kinase isoenzymes in newborn infants. *Biol Neonate* 1971; **17**:126-134.
- 3 Bayer PM, Gabl F, Gergely T, Zargonik J, Widhalm K, Skalak O. Isoenzyme of creatine kinase in the perinatal period. *J Clin Chem Clin Biochem* 1977; **15**:349-352.
- 4 Jung K, Neimann R, Cobert G, Nugel E, Egger E. Creatine kinase isoenzyme BB in serum of healthy adults and children. *Clin Chim Acta* 1979; **91**:165-168.
- 5 Urdal P, Urdal K, Stromme JH. Age-related reference intervals for creatine kinase BB in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1982; **42**:621-625.
- 6 Amato M, Aegerter E, Reiber W, Schneider H. Creatine phosphokinase isoenzyme activity in umbilical artery, umbilical vein and capillary blood of newborn infants at term. *Arch Gynecol Obstet* 1992; **251**:171-174.
- 7 Jedeikin R, Makela SK, Shennan AT, Rowe RD, Ellis G. Creatine kinase isoenzymes in serum from cord blood and the blood of healthy full-term infants during the first three postnatal days. *Clin Chem* 1982; **28**:317-322.
- 8 Kumpel B, Wood SM, Anthony PP, Brimblecombe FS. Umbilical cord serum creatine kinase BB in the diagnosis of brain damage in the newborn: problems in interpretation. *Arch Dis Child* 1983; **58**:382-383.
- 9 Kaste M, Somer H, Kontinen A. Brain-type creatine kinase isoenzyme. Occurrence in acute cerebral disorders. *Arch Neurol* 1977; **34**:142-144.
- 10 Becker M, Menzel K. Brain-typical creatine kinase in the serum of newborn infants with perinatal brain damage. *Acta Paediatr Scand* 1978; **67**:177-180.

- 11 Walsh P, Jedeikin R, Ellis G, Primhak R, Makela Sk. Assessment of neurologic outcome asphyxiated term infants by use of serial CK-BB isoenzyme measurement. *J Pediatr* 1982; **101**:988-992.
- 12 Ruth VJ. Prognostic value of creatine kinase BB-isoenzyme in high risk newborn infants. *Arch Dis Child* 1989; **64**:563-568.
- 13 Swei H, Tsung. Creatine kinase isoenzymes patterns in human tissue obtained at surgery. *Clin Chem* 1976; **22**:173-175.
- 14 Jockers-Wretou E, Giebel W, Pfliederer G. Immunohistochemical localitation of creatinkinase isoenzymes in human tissue. *Histochem* 1977; **54**:83-86.
- 15 Urdal P, Urdal K, Stromme JH. Cytoplasmic creatine kinase isoenzymes quantitated in tissue specimens obtained at surgery. *Clin Chem* 1983; **29**:310-313.
- 16 Wallimann T, Hemmer W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 1994; **133-134**:193-220.
- 17 Moss DW, Anderson AR. Enzymes. In Burtis AC, Ashwood ER (eds) Tietz Textbook of Clinical Chemistry, WB Saunders: Philadelphia. second edn, 1994. pp. 797-809.
- 18 Chastain SL, Ketchum CH, Grizzle WE. Stability and electrophoretic characteristics of creatine kinase BB extract humain brain and intestine. *Clin Chem* 1988; **34**:489-492.
- 19 Moreu L, Molineri LM, Fernández E. RSIGNA. Base de datos. Bioestadística. Madrid: Horus Hardware S.A 1990.
- 20 Oliver C, Peña M, Sánchez MR; Hurtado JA, Samaniego M. Isoenzimas de creatin quinasa. Valores de referencia en recién nacidos a término y prétermino. *Química Clínica* 1994; **13**:419.
- 21 Weiss E, Ulrich S, Berle P, Picard-Maireau A. CKBB as indicator of prenatal brain-cell injury in fetuses with absent or reverse end-diatolic flow velocities of the umbilical arteries. *J Perinatal Med* 1994; **22**:219-226.
- 22 Nealon DA, Henderson AR. In vitro protein interaction with human creatine kinase isoenzyme. *J Res Lab Med* 1978; **5**:186-189.
- 23 Primahak R A, Simmonds E. Firts day serum creatine kinase BB isoenzyme in high-risk infants. *Eur J Pediatr* 1991; **150**:271-273.
- 24 Amato M, Huppi P, Markus D, Herschkowitz N. Neurological function of inmature babies after surfactant replacement therapy. *Neuropediatrics* 1991; **22**:43-44.
- 25 Malamitsi-Puchner A, Minaretzis D, Martzeli L, Papas C. Serum levels of creatine kinase and its isoenzymes during the 1st postpartum day in healthy newborns delivered vaginally or by cesarean section. *Gynecol Obstet Invest* 1993; **36**:25-28.
- 26 Talvik T, Haldre S, Soot A, Hamarik M, Piirsoo A, Mikelsaar AV. Creatine kinase isoenzyme BB concentration in cerebrospinal fluid in asphyxiated preterm neonates. *Acta Paediatr* 1995; **84**:1183-1187.
- 27 Lackman GM. Innfluence of neonatal idiopathic respiratory distress syndrome on serum enzyme activities in premature healthy and asphyxiated newbons. *Am J Perinatol* 1996; **13**:329-334.
- 28 Michael W F, Uma K M, Stevens R. Creatine kinase isoenzymes in the diagnosis of intestinal infarction. *Digest Dis Sci* 1991; **36**:1589-1593.
- 29 Samaniego Muñoz M, Sánchez Navarro MR. Serum CK-BB. A biochemical marker in neonatal necrotizing enterocolitis. *An Esp Pediatr* 1996; **44**:577-580.
- 30 Wong SS, Wu AH, Fritsche HA. Reassessment of creatine kinase BB as a marker for cancer of the prostate, breast, and lung. *Clin Chem* 1987; **33**:809-811.
- 31 Neri B, Bartalucci S, Gemelli MT, Tommasi M, Bacalli S. Creatine kinase isoenzyme BB: A lung cancer associated marker. *Int J Biol Markers* 1988; **3**:19-22.
- 32 Niklinski J, Furman M. Clinical tumour markers in lung Cancer. *Eur J Cancer Prev* 1995; **4**:129-138.
- 33 Joseph J, Cardesa A, Carreras J. Creatine kinase activity and isoenzymes in lung, colon and liver carcinomas. *Br J Cancer* 1997; **76**:600-605.
- 34 Ruiz-Moral R, Pérez Jiménez F, Cosano A, Hens M; Muñoz L Alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase, lactate dehydrogenase and creatine kinase in bronchial aspirate from neoplastic and normal pulmonary tissue. *Enzyme* 1985; **33**:105-108.
- 35 Paavonen T Liippo K, Aronen H, Kiiistala U. Lactate dehydrogenase, creatine kinase and their isoenzymes in pleural effusions. *Clin Chem* 1991; **37**:1909-1912.
- 36 Nussinovitch M, Klinger G, Soen G, Magazanik A, Volovitz B, Varsano I, Nussinovitch A. Increased creatine kinase brain isoenzyme concentration in cerebrospinal fluid with meningitis. *Clin Pediatr* 1996; **35**:349-51.