

آیا سطح بالای آنتی استرپتوکیناز سرم اثر بخشی داروی استرپتوکیناز را در بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکارد محدود می کند؟*

دکتر حسن شمیرانی^۱، دکتر عباس رضایی، دکتر سعید متین خواه، فرزاد عریضی

چکیده مقاله

مقدمه. آنتی بادی آنتی استرپتوکیناز موجود در سرم افرادی که قبلاً با عفونتهای استرپتوکوکی سرخورد داشته اند ممکن است با اثر ترومبولیتیکی داروی استرپتوکیناز مداخله کند. داروی استرپتوکیناز به عنوان تنها داروی ترومبولیتیک مصرفی در ایران، به عنوان خط اول درمان انفارکتوس حاد میوکارد به شمار می رود. با توجه به شیوع بالای عفونتهای استرپتوکوکی در ایران نسبت به کشورهای توسعه یافته و صنعتی این احتمال وجود دارد که سطح بالای آنتی بادی موجود در سرم مبتلایان، اثر استرپتوکیناز مصرفی را خنثی نماید.

روشها. از ۱۲۶ بیمار مبتلا به انفارکتوس حاد میوکارد مراجعه کننده به بیمارستان نور (وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان) قبل از تجویز استرپتوکیناز، آنتی بادی آنتی استرپتوکیناز سرم آنها به روش الیزا اندازه گیری شد و سپس اثر دارو با توجه به تغییرات الکتروکاردیوگرامهای پی در پی که طی مدت بستری بیمار به عمل می آمد بررسی و مقایسه شد.

نتایج. در ۱۷ نفر از ۱۲۶ بیمار (۱۳/۵ درصد)، دارو اثری نداشت و عیار آنتی بادی موجود در سرم آنها بالا بود. این مقدار ۲/۵ برابر مقادیر ذکر شده در مراجع می باشد. در ۲۵ بیماری که دارو بر آنها مؤثر بود سه نفر سطح بالای آنتی بادی علیه استرپتوکیناز داشته اند.

بحث. با توجه به عدم وجود ارتباط بین سطح بالای آنتی بادی ضد استرپتوکیناز با اثربخشی داروی استرپتوکیناز در درمان بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی در این مطالعه، پیشنهاد می شود برای روشن شدن موضوع ضمن انجام مطالعات با حجم نمونه های بیشتر معیارهای عینی تر نظیر اندازه گیری سطح فیبری نوژن سرم به عنوان شاخص اثربخشی داروی استرپتوکیناز مورد بررسی قرار گیرد.

● واژه های کلیدی. بیماریهای عروقی کرونر، درمان ترومبولیتیک، استرپتوکیناز، آنتی بادی ضد استرپتوکیناز.

مقدمه

انفارکتوس میوکارد یکی از شایع ترین و مهلک ترین بیماریهاست که غالباً به دلیل کاهش ناگهانی جریان خون کرونر به دنبال انسداد ترومبولیتیک یکی از شرایین کرونر که قبلاً توسط آترواسکلروز تنگ شده است روی می دهد (۱). حدود ۲۵ درصد مرگها در آمریکا در سن بالاتر از ۳۵ سالگی ناشی از

انفارکتوس میوکارد می باشد و حدود نیمی از مرگهای ناشی از انفارکتوس میوکارد ناگهانی بوده و قبل از رسیدن به بیمارستان رخ می دهد (۲، ۳). انفارکتوس میوکارد در بیش از ۹۰ درصد موارد در انسداد کامل شریان کرونری و تنها در کمتر از ۵ درصد در زمینه شریان کرونر طبیعی رخ می دهد و در صورت عدم خون رسانی مجدد مناسب و به موقع، خطر بروز نارسایی قلب به دنبال انفارکتوس میوکارد ۲ تا ۶ برابر می گردد (۴-۷).

در جریان بروز ایسکمی و انفارکتوس میوکارد دو مکانیسم افزایش تقاضا (Demand) و کاهش خون رسانی (Supply) دخیل هستند. با توجه به نقش ترومبوز که در بیش از ۹۰ درصد موارد نقش دارد کاهش خون رسانی نقش مهمتری در بروز انفارکتوس دارد (۳، ۴). از جمله اقدامات درمانی در انفارکتوس، برقراری خون رسانی مجدد است که به سه روش (پیوند عروق کرونر، انجام PTCA، ترومبولیتیک تراپی) انجام می گیرد (۸). استرپتوکیناز به عنوان تنها ماده ترومبولیتیک در دسترس در ایران، ترکیبی پروتئینی است که به وسیله سوشهای متعدد استرپتوکوک همولیتیک تولید می شود (۹، ۱۰). بیشتر افراد آنتی بادیهای در گردش خنثی کننده استرپتوکیناز دارند که ممکن است ناشی از عفونتهای قبلی با استرپتوکوک بتاهمولیتیک باشد.

در ایران به عنوان یک کشور در حال توسعه، فراوانی عفونتهای استرپتوکوکی بالاست (۱۱). بنابراین در طی درمان ترومبولیتیک، استرپتوکیناز کافی باید تزریق شود تا این آنتی بادیها را خنثی کند. در بعضی موارد، این افزایش دارو نیز مؤثر نیست که شیوع این موارد در حدود ۵ درصد بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکارد را در بر می گیرد (۱۲).

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثربخشی داروی استرپتوکیناز بر بهبودی بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکارد در جامعه دارای سطح بالایی از آنتی بادیهای ضد استرپتوکیناز صورت گرفته است.

* این طرح با شماره ۷۶۰۴۶ در دفتر هماهنگی امور پژوهش ثبت شده و هزینه آن از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان پرداخت گردیده است.
۱- گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی استان اصفهان، اصفهان.

روشها

تعداد ۱۲۶ نفر از بیماران مبتلا به انفارکتوس مراجعه کننده به بیمارستان نور وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتخاب گردیدند. کلیه بیماران در ۶ ساعت اول شروع درد قفسه سینه مراجعه نموده بودند و در بررسی ECG اولیه موج Q تشکیل نشده بود. افزایش آنزیمهای قلبی (LDH, CPK) در طی مدت بستری در تمام بیماران وجود داشت.

قبل از تجویز استرپتوکیناز، ۵ میلی لیتر از خون وریدی گرفته و سرم آنها توسط سانتریفوژ (۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جدا و تا زمان آزمایش در دمای 4°C - ذخیره گردید. برای بررسی سطح آنتی استرپتوکیناز سرم از روش ELISA استفاده گردید (کیت های آزمایشگاهی در این مورد وجود ندارد) (۱۳، ۱۴).

برای انجام آزمایش ELISA از میکروپلیت های ۹۶ حفره ای (Nunc Microplate 96 wells Polysorp) استفاده شد. به این روش که از ویالهای استرپتوکیناز تجویزی به بیماران (Streptokinase KABI Pharmacia) به عنوان آنتی ژن استفاده شد. صد میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده (100U/ml) در هر حفره از میکروپلیت اضافه و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در 4°C انکوبه گردید. سپس محلول اضافی را از حفرات خارج و به حفرات مقدار $250\mu\text{l}$ از محلول بافر فسفات سالین حاوی یک درصد سرم آلبومین گاوی (۱BSA-% PBS) اضافه نموده تا از باند شدن غیراختصاصی در مراحل بعدی جلوگیری به عمل آید.

پس از ۳۰ دقیقه انکوبه شدن پلیت ها در 37°C عمل شستشو ۴ مرتبه توسط محلول (۱، Tween 20، PBS-%) انجام گردید و در هر حفره $100\mu\text{l}$ از سرم $1:40$ رقیق شده بیمار و یا سرم فرد سالم به هر حفره اضافه و پلیت ها به مدت یک ساعت در 37°C انکوبه شدند. در مرحله بعد پلیت ها سه بار شستشو و سپس $100\mu\text{l}$ از آنتی بادی خرگوشی علیه IgG انسانی که با Horse Radish Peroxidase کوئزومگ شده بود اضافه گردید. این آنتی بادی (Rabbit anti human IgG Conjugate HRP) از شرکت داکو دانمارک تهیه و با رقت $1:6000$ مورد استفاده قرار گرفت.

پلیت ها پس از یک ساعت نگهداری در 37°C ، سه بار مورد شستشو قرار گرفته و سرانجام $100\mu\text{l}$ از محلول سوبسترای آنزیم پراکسیداز به هر حفره اضافه گردید. محلول اخیر حاوی (O.P.D) Ortho Phenylidiamine Dichloride بود که برای تهیه آن هر قرص 30 میلی گرمی را در $100\mu\text{l}$ از PBS سیترا ته با pH معادل ۵ حل و سپس $2\mu\text{l}$ آب اکسیژنه به آن اضافه گردید.

پس از ده دقیقه نگهداری در 37°C به هر حفره $50\mu\text{l}$ از محلول H_2SO_4 (۵/۰ مولار) اضافه شد تا بدین طریق واکنش متوقف گردد و

میزان جذب نور (Optical Density) O.D. به وجود آمده با طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه BIO-TEK instruments ELISA Reader قرائت گردید (۱۴-۱۹).

در تعدادی از حفرات پلیت ها از نمونه سرم کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. برای کنترل منفی از سرم افرادی استفاده شد که در تاریخچه پزشکی خود هیچگونه مدرکی دال بر ابتلا به عفونت استرپتوکوکی نداشتند و نیز تیتراژ آنتی استرپتولیزین O (ASO) خیلی پایین (کمتر از ۱۰۰ todd) داشتند.

برای کنترل مثبت، از سرم افرادی استفاده شد که به تأیید پزشک معالج و گزارشهای پاراکلینیکی بیش از ۱۵ روز از ابتلای آنها به عفونت استرپتوکوکی گذشته بود و تیتراژ بسیار بالایی از ASO (بالای ۵۰۰ todd) برای آنها گزارش شده بود. در تعدادی از نمونه ها نیز از آنتی بادی منوکلونال علیه استرپتوکیناز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید که هیچگونه تفاوتی بین دو گروه (ASO بالا و آنتی بادی منوکلونال) کنترل مثبت وجود نداشت. در نهایت با استفاده از فرمول زیر:

$$\text{حداقل O.D. جذب نوری نمونه سرمی مثبت} = \text{Cut off} \\ \text{حداکثر O.D. جذب نوری نمونه سرمی منفی}$$

دامنه ای از میزان آنتی بادی موجود در سرم به دست می آید (Cut off). Cut off یکی از روشهای علمی کاربردی ELISA برای اندازه گیری تیتراژ آنتی بادی در سرم افراد می باشد. با استفاده از سطح آنتی بادی آنتی استرپتوکیناز و استفاده از منحنی جذب و Optical Density نمونه هایی که عیار آنها بالاتر از نسبت Cut off بود مثبت تلقی گردید. از طرف دیگر ECG های سریال که در طی مدت بستری از بیمار گرفته می شد تشکیل یا عدم تشکیل موج Q (که نشانه تأثیر یا عدم تأثیر استرپتوکیناز بود) بررسی و ضمن مقایسه تست آماری آنها با استفاده از آزمون دقیق فیشر نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه ۱۸ نفر افراد سالم نیز که هیچگونه سابقه MI نداشتند، بررسی شدند.

نتایج

از مجموع ۱۲۶ نمونه سرم جمع آوری شده از بیماران مبتلا به MI قبل از دریافت استرپتوکیناز، ۲۰ نفر (۱۶ درصد) آنتی بادی آنتی استرپتوکیناز با تیتراژ بالا داشتند. از مجموع ۱۲۶ بیمار مبتلا به MI که استرپتوکیناز گرفته اند تعداد ۲۵ نفر (۲۰ درصد) در بررسی ECG های سریال به مدت حدود سه روز، موج Q تشکیل نشد و تغییرات ECG بر MI دلالت نداشت و یا به عبارت دیگر دارو بر آنها اثر داشته است.

در مجموع تعداد افرادی که دارو بر آنها اثر نداشته است و تیتراژ آنتی بادی سرم آنها بالا بود ۱۷ نفر (۱۳/۵ درصد) می باشند و براساس آزمون آماری بین سطح آنتی بادی با تیتراژ بالا و اثر استرپتوکیناز رابطه معنی داری ملاحظه نشد ($P > 0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱. فراوانی موارد اثربخشی داروی استرپتوکیناز بر اساس سطح آنتی‌بادی بر علیه استرپتوکیناز در بیماران مبتلا به MI

اثربخشی استرپتوکیناز		تیترا آنتی‌بادی
غیر مؤثر	مؤثر	
۱۷	۳	سرم مثبت
۸۴	۲۲	سرم منفی

بحث

درمان ترومبولیتیک به طور وسیعی برای خون‌رسانی استفاده می‌شود. از میان داروهای موجود، تنها استرپتوکیناز در ایران در دسترس می‌باشد. به همین دلیل بررسی نقش و تأثیر استرپتوکیناز اهمیت به سزایی دارد و در زمینه تأثیر و موانع تأثیر آن نیز مطالعات گوناگونی انجام شده که بعضاً نتایج متفاوتی به دست آمده است. در بعضی مطالعات نشان داده شده که در صورت سطح بالای آنتی‌بادی علیه استرپتوکیناز که ناشی از عفونت فارتزیت استرپتوکوکی اخیر باشد داروی استرپتوکیناز را باید حداقل سه تا شش ماه بعد استفاده کرد (۷).

در صورت دریافت استرپتوکیناز از دو روز تا دو سال بعد یا حتی تا چهار سال بعد مقاومت به وجود می‌آید و اثر استرپتوکیناز کاهش می‌یابد، همچنین اگر بیماری در کمتر از شش ماه بعد از دریافت استرپتوکیناز نیاز مجدد به درمان ترومبولیتیک پیدا کند تجویز مجدد استرپتوکیناز جایز نیست (۷). برخی تحقیقات نشان داده‌اند که وجود آنتی‌بادی علیه استرپتوکیناز مانعی برای اثربخشی استرپتوکیناز در جهت ایجاد پرفیوژن مجدد نمی‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Feares و همکاران انجام گردید، بیماران واجد شرایط که استرپتوکیناز دریافت می‌کردند سطح آنتی‌بادی استرپتوکیناز با روش IgG با روش Micro Radio Immunoassay اندازه‌گیری شد و اثربخشی دارو توسط آنژیوگرافی در ۱ و ۲۴ ساعت پس از تجویز استرپتوکیناز بررسی و نتیجه‌گیری شد که محدوده وسیعی از تیترا مقاومت به استرپتوکیناز در بیماران وجود دارد، در حالی که هیچیک از بیماران قبلاً این دارو را مصرف نکرده بودند. بیشتر این بیماران مقاومت کمی نسبت به استرپتوکیناز داشتند و اثر استرپتوکیناز به وسیله غلظت آنتی‌بادیهای IgG علیه استرپتوکیناز کاهش قابل ملاحظه‌ای پیدا نکرده بود. ولی مقاومت به این دارو پس از تجویز آن تا ۴ سال در گردش خون باقی می‌ماند (۱۵).

با استفاده از روشهای Dilution Neutralization Assay و ELISA در مطالعه‌ای سطح آنتی‌استرپتوکیناز اندازه‌گیری و برای بررسی تأثیر استرپتوکیناز از روش Lysis Invitro Fibrin Plate Assay استفاده شد. نتیجه بیانگر آن بود که شیوع آنتی‌بادیهای ضد استرپتوکیناز در جمعیت عادی و در بیمارانی که برای اولین بار با MI مراجعه می‌کنند مشخص نیست (۱۶). هیچکدام از بیماران غلظت بالای آنتی‌بادی

آنتی‌استرپتوکیناز با مقاومت فیبرینولیتیک in vitro به استرپتوکیناز نداشتند و بیشتر آنها به دُر استاندارد استرپتوکیناز پاسخ دادند علیرغم اینکه بسیاری از بیماران قبلاً عفونت استرپتوکوکی داشته‌اند (۱۶). در بررسی پس از تزریق استرپتوکیناز مقاومت به استرپتوکیناز از یک دوره ۲ تا ۴ روز پس از درمان شروع شده و برای بیش از ۲ سال و در بعضی نتایج بیش از ۴ سال ادامه می‌یابد (۱۶).

در مطالعه انجام شده در Utah نتیجه‌گیری شد که وجود آنتی‌استرپتوکیناز تأثیر تعیین‌کننده مهمی در پاسخ به درمان استرپتوکیناز ندارد (۱۵). بنابراین حتی در مطالعات وسیع نیز نتیجه قطعی به دست نیامده که احتمالاً به دلیل وجود سطوح مختلف آنتی‌بادیهای علیه استرپتوکیناز در مطالعات مختلف می‌باشد.

در مطالعه حاضر چنانچه قبلاً ذکر شد، بروز موج Q به دنبال تجویز استرپتوکیناز در بیماران مبتلاً به انفارکتوس میوکارد به معنای عدم جلوگیری از بروز انفارکتوس تلقی شد. با توجه به این نکته در ۸۰ درصد (۱۰۱ نفر) بیماران علیرغم دریافت استرپتوکیناز موج Q تشکیل شد و تنها در ۲۰ درصد (۲۵ نفر) بیماران موج Q ایجاد نشد.

این در حالی است که در بعضی از بیماران علیرغم وجود نشانه‌های انفارکتوس قلبی (بالا رفتن قطعه ST در الکتروکاردیوگرام به اندازه ۲ میلی‌متر در اشتقاقهای جلوی قلبی یا یک میلی‌متر در اشتقاقهای استاندارد همراه درد قفسه سینه به مدت بیش از ۳۰ دقیقه) حتی بدون دادن استرپتوکیناز موج Q ایجاد نشده و بیماران دچار انفارکتوس نمی‌گردند که احتمالاً به دلیل برطرف شدن اسپاسم و یا انجام لیز خود بخودی ناشی از فعال شدن سیستم ضد انعقاد بدن است (۱۹).

همچنین در بعضی بیمارانی که موج Q نیز تشکیل نشده شاید به دلیل لیز خود بخودی باشد تا اینکه استرپتوکیناز اثر کرده باشد، در بعضی مطالعات ذکر شده که اگر استرپتوکیناز در زمان مناسب داده شود خون‌رسانی مجدد در ۵۵ تا ۶۰ درصد موارد رخ می‌دهد در حالی که در این مطالعه تنها حدود ۲۰ درصد بیماران موج Q تشکیل ندادند (۱۹).

البته قابل ذکر است که اهمیت اثر استرپتوکیناز صرفاً بر خون‌رسانی مجدد نیست بلکه در مورد پیشگیری از Remodelling، آریتمی‌ها و نارسایی قلب نیز مؤثر می‌باشد (۱).

در این مطالعه مشخص شد که بروز موج Q در بیمارانی که سطح بالای آنتی‌بادی علیه استرپتوکیناز دارند بیشتر از کسانی است که سطح آنتی‌بادی کمتری داشته‌اند (۱۷ نفر از ۲۰ نفر) ولی حتی در بیمارانی که سطح آنتی‌بادی پایینی داشته‌اند نیز موج Q ظاهر شد (۸۴ نفر از ۱۰۶ بیمار). با توجه به یافته‌های فوق رابطه بین سطح آنتی‌بادی و اثر استرپتوکیناز مورد تردید قرار می‌گیرد.

آیا با درمان ترمبولیتیک سطح فیبرینوژن که فاکتور مؤثر در بروز ترومبوز و ایجاد انفارکتوس است، کاهش مؤثر پیدا می‌کند یا نه؟
تعداد بیماران مورد مطالعه بر اساس ۵ درصد سطح بالای آنتی‌بادی علیه استریتوکیناز انتخاب شدند در حالی که در این مطالعه میزان سطح بالای آنتی‌بادی علیه استریتوکیناز به حدود ۱۳/۵ درصد رسیده، لذا پیشنهاد می‌گردد مطالعه‌ای با حجم نمونه بیشتر انجام شود.

در بررسی علت بروز موج Q در بیماری که در زمان مناسب استریتوکیناز گرفته‌اند و سطح آنتی‌بادی علیه استریتوکیناز کم بوده مواردی قابل ذکر است. عوامل ترمبولیتیک دیگری را باید مد نظر داشت مانند مهارکننده‌های پلاسمینوژن فعال شده (TPAl) یا لیپوپروتئین که از نظر مولکولی شبیه پلاسمینوژن بوده و از ایجاد پلاسمین جلوگیری کرده و حالت لیز رخ نمی‌دهد (۱۸-۲۰). باید سطح فیبرینوژن مورد بررسی قرار گیرد که

مراجع

- 1- Antman EM. Acute myocardial infarction. In: Brounwald F, Isselbacher W, Kasper M. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th Ed. Philadelphia, WB Saunders Co. 1998.
- 2- National Center for Health Statistics. Annual summary of births, marriages, divorces and deaths. Washington DC. United States 1995; 43(13): 5-10.
- 3- Thomos I, Thom willam B, Silbershats KH, D'Agustino RB. Incidence, prevalence mortality of Cardiovascular Disease in the U.S.A. In: Fuster V. *Hurst's The Heart*. 9th Ed. Philadelphia, McGrawhill Co. 1998.
- 4- Ong L, Reiser P, Coromilas J. Left ventricular function and rapid release of creatine kinase MB in acute myocardial infarction: evidence for spontaneous reperfusion. *N Eng J Med* 1983; 309:1.
- 5- DeWood MA, Spores J, Notske RN. Prevalence of total coronary artery occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Eng J Med* 1980; 303:897.
- 6- Betriu A, Castaner A, Sanz GA. Angiographic finding 1 month after myocardial infarction: A prospective study of 259 survivors. *Circulation* 1982; 65: 1099.
- 7- Buja LM, Willerson JT. Clinicopathologic correlates of acute ischemic heart disease syndromes. *Am J Cardiol* 1981; 47:343.
- 8- Rwayne A, Craig M, Pratt R. Diagnosis and management of patient with acute myocardial infarction. In: *Hurst's The heart*. Philadelphia, MC Grow Hill Co. 1998.
- 9- Hannal La. Pyogenic coccous. In: *Jawet's E, Melnick JL, Adelberg EA. Medical microbiology*. 20th Ed. Norwalk, Appleton & Lange Co. 1995.
- 10- Alan B, Streptococcus pyogenes. In: *Mandell D. Principles and practice of infectious disease*. WB Saunders Co. 1996.
- 11- Janes T. Rheumatic Fever. In: *Behrman RF, Kliegman RM, Arvin AM. Nelson's Textbook of Pediatrics*. WB Saunders company: 754-759, 1996.
- 12- Feares R, Glasgow E. Monitoring of streptokinase resistance titer in acute myocardial infarction. *Br Heart J* 1992; 68: 167-8.
- 13- Gemill JD, Hogy KJ. Predosing antibody levels and efficacy of thrombolytic drugs containing streptokinase. *Br Heart J* 1994; 72: 222-5.
- 14- Buchalter MB, Sontraringam G. Streptokinase resistance: when might streptokinase administration be ineffective? *Br Heart J* 1992; 68: 449-53.
- 15- Fears R, Hearn J. Lack of influence of pretreatment antistreptokinase antibody on efficacy. *American Heart J* 1992; 124: 305-12.
- 16- Lynch pentecost BL, Littler WA, Stockley RA. Why do patients develop reactions to streptokinase. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 274-85.
- 17- Summaria L, Pavlovic B, Sandesara J. An anti-plasminogen antibody preparation that inhibits the activation of human plasminogen but enhances the activator activity of the B-chain-streptokinase complex. *Thromb Res* 1989; 54: 1-15.
- 18- Lynch M, Pentecost BL, Littler WA, Stockley RA. Overt and subclinical reactoins to streptokinase in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1994; 4(9): 849-02.
- 19- Karika LJ. Principles of immunochemical techniques. In: *Burtisc CA, Ashwood ER. TIETZ textbook of clinical chemistry*. 12th Ed. Philadelphia, WB Saunders Co. 1994: 304-6.
- 20- Alexander RW, Craig M, Pratt R. Diagnosis and management of patient with Acute Myocardial infarction. In : *Hurst's The heart*, MC Grw Hill Company : 1366,1998.