

Heterogeniteit van circulerend cardiaal troponine T

E. MICHELSEN¹, M. HESSEL², A. van der LAARSE², W. WODZIG¹ en M. van DIEIJEN-VISSER¹

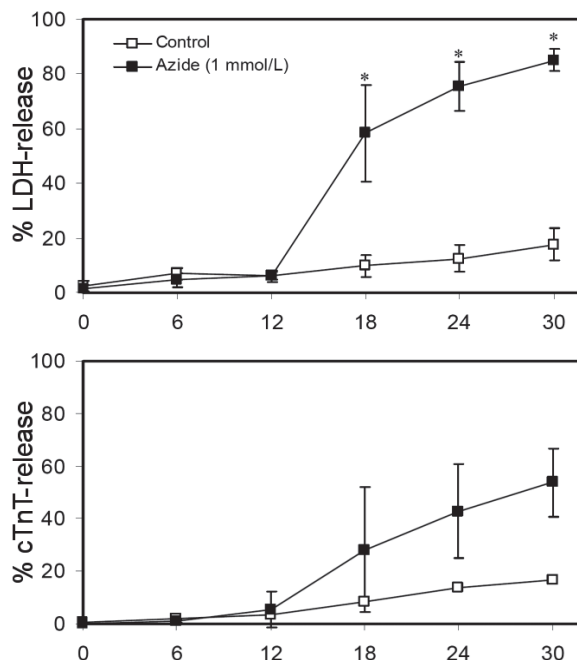
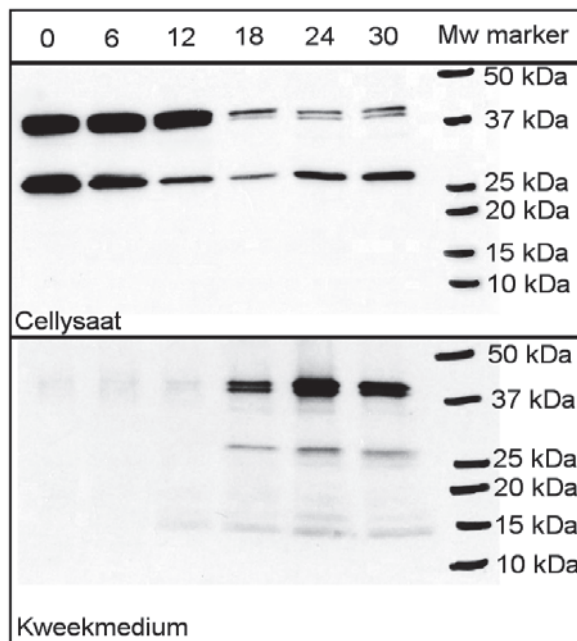
Cardiaal troponine I en T (cTnI en cTnT) zijn de meest gevoelige en specifieke merkers voor hartspierschade (1). Ze worden in de kliniek dan ook gebruikt als ondersteuning voor diagnostiek van hartspierschade in het algemeen en het acute myocardinfarct (AMI) in het bijzonder. Van cTnI is bekend en breed geaccepteerd dat er post-translationele modificaties voorkomen (oxidatie, reductie of fosforylering). Tevens komen in de circulatie zowel het intacte eiwit, als ook kleinere fragmenten voor. Dit heeft vooral consequenties voor de verschillende commerciële immuno-assays die gebruik maken van verschillende combinaties van antilichamen en kalibratoren. Hierdoor is standaardisatie van deze assays buitengewoon gecompliceerd.

Voor cTnT is er maar één fabrikant die een immuno-assay op de markt brengt (Roche Diagnostics). Hoewel de eerder genoemde moeilijkheden en beperkingen voor standaardisatie derhalve niet gelden voor cTnT, is het voor een correcte interpretatie van de resultaten van belang te weten in welke vormen dit eiwit in de circulatie voorkomt. Bijvoorbeeld als verklaring voor onbegrepen cTnT-verhogingen die kunnen worden gezien bij patiënten zonder duidelijk aanwezige ischemische cardiale schade (2). Onze hypothese is dat immunoreactieve degradatieproducten van cTnT hiervoor een mogelijke verklaring vormen. Om degradatie van cTnT aan te tonen is gebruikt gemaakt van verschillende technieken.

Methoden en Resultaten

In een in-vitromodel voor ischemische schade is gekeken naar de release van cTnT. Het model bestaat uit het metabool inhiberen van neonatale cardiomyocyten van de rat door toevoeging van 1 mmol/l natriumazide aan het kweekmedium. In dit model is reeds eerder aangetoond dat cellen na 12 uur een transitie doormaken van reversibele naar irreversibele schade (necrose) (3). Dit is ook onder meer te zien (figuur 1) aan de hand van de release van lactaatdehydrogenase (LDH). De belangrijkste bevindingen van deze studie waren: (a) de release van cTnT (en cTnI) uit metabool geïnhibeerde cardiomyocyten is geassocieerd met irreversibele celschade, (b) cTnT komt uit de cardiomyocyt als intact eiwit en als degradatieproducten, (c) het percentage release van cTnT uit necrotische cardiomyocyten is lager (±50%,

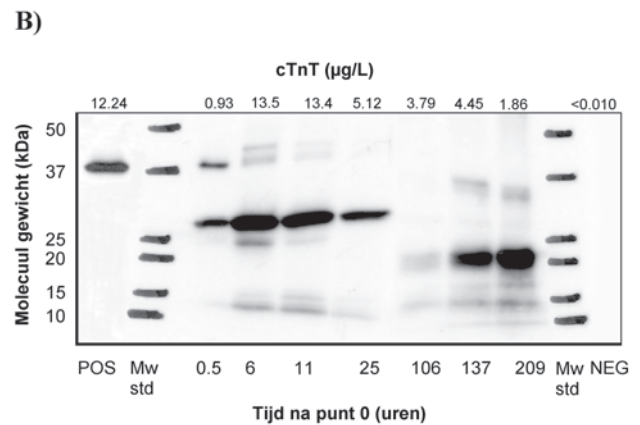
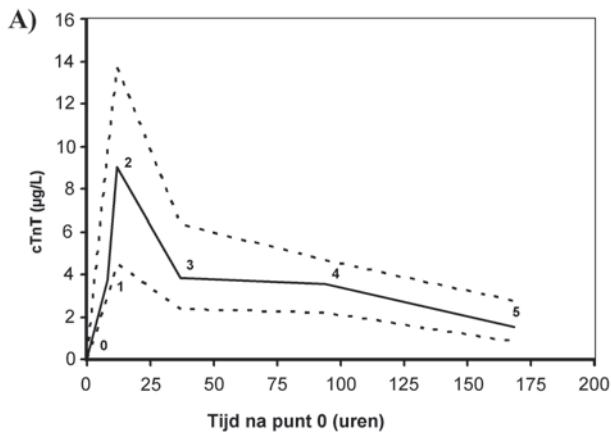
Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch ziekenhuis Maastricht, Maastricht¹; Afdeling Cardiologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden²



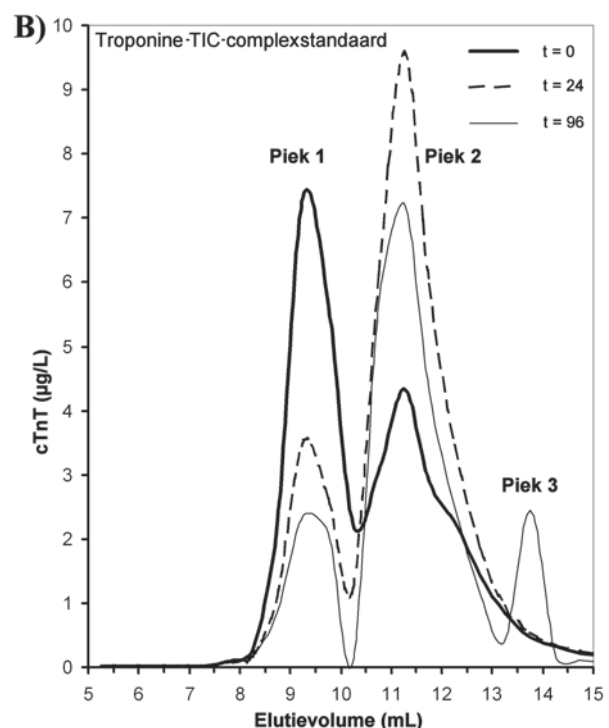
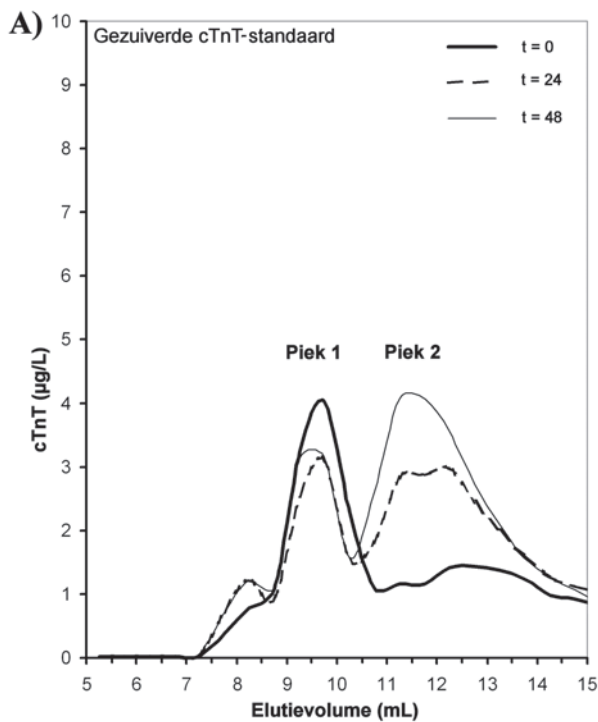
Figuur 1. Immunoblots van cellysaat en kweekmedium. Duidelijk is een afname te zien van het intacte cTnT (37 kDa) en een groot fragment (±27 kDa) vanuit de cel, terwijl deze gelijktijdig verschijnen in het kweekmedium samen met een fragment van ±15 kDa. De twee panels onder laten een toename zien van het LDH in het kweekmedium na stimulatie met 1 mmol/l natriumazide. Tegelijkertijd neemt ook de concentratie cTnT in kweekmedium toe ten opzichte van controlecellen.

gemeten met de commerciële immunoassay van Roche) dan het percentage release van LDH ($\pm 90\%$, enzymatische assay), en (d) de totale hoeveelheid cTnT neemt af in de tijd terwijl de hoeveelheid LDH gelijk blijft. Met immunoblotting is vervolgens met een mix van vier monoklonale antilichamen tegen cTnT zichtbaar gemaakt dat cTnT vanaf 12 uur in het kweekmedium verschijnt als intact eiwit (37 kDa) en twee degradatieproducten (± 27 en ± 15 kDa) en tegelijkertijd verdwijnt uit de cel (4). Vervolgens is de overstap gemaakt naar de in-vivo-situatie. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van serum van dialysepatiënten en patiënten met AMI.

Bij de eerste groep patiënten was geen intact eiwit (37 kDa) zichtbaar, maar wel een fragment van ± 25 kDa (5). In bijna alle patiënten ging dit samen met meerdere kleinere cTnT-fragmenten. In deze populatie is het echter heel moeilijk, zo niet onmogelijk, om vast te stellen waar het onderscheid ligt tussen cTnT-release als gevolg van (minimale) cardiale schade enerzijds en ophoping door verslechterde nierfunctie anderzijds. In deze patiënten varieerde de cTnT gemeten met de Roche immunoassay tussen <0.010 en $0.5 \mu\text{g/l}$, waarbij sprake was van een significante relatie met de dialysetijd (6). De afkapwaarde voor AMI met een 10%-CV-waarde ligt bij $0,03 \mu\text{g/l}$.



Figuur 2. Serum-cTnT-concentratie veranderingen na acuut myocardinfarct. (A) Samengestelde cTnT-concentratiecurve van 20 AMI-patiënten. De serumconcentratie is weergegeven als mediaan (lijn) en interkwartielrange (onderbroken lijnen). Gebaseerd op deze kinetiek werd de curve verdeeld in 6 punten, aangegeven met de cijfers 0–5. (B) Representatieve immunoblot van serum van een patiënt met AMI. Laan 1, positieve controle (intact cTnT migreert tot ongeveer 37 kDa); laan 2 en 10, molecuulgewicht standaard; laan 3–9, serummonsters op 0,5, 6, 11, 25, 106, 137 en 209 uur na aanvang van de symptomen. Laan 11, negatieve controle. cTnT-concentraties staan boven de corresponderende lanen.



Figuur 3. Incubatie van cTnT-standaarden in serum. (A) Elutieprofiel van een gezuiverde standaard geïncubeerd in serum gedurende 0, 24 en 48 uur. (B) Elutieprofiel van een troponine-TIC-complexstandaard geïncubeerd in serum gedurende 0, 24 en 96 uur. cTnT werd gemeten met Roche immunoassay op een Elecsys 2010 platform.

In een studie met 20 patiënten met bewezen AMI werd het intacte eiwit slechts gevonden in de eerste 12 uur (figuur 2B). Dit is de tijd tot de maximale cTnT-concentratie werd bereikt (7). Hierna werden bij alle patiënten alleen fragmenten gevonden, waarvan die met molecuulmassa van 27 kDa, 20 kDa en 15 kDa de meest voorkomende waren.

Het is goed om vast te stellen dat de Roche cTnT-immunoassay in afwezigheid van het intacte eiwit een positieve uitslag genereerde. Dit fenomeen werd ook bij de bovengenoemde dialysepatiënten gezien. De bovengenoemde studies zijn uitgevoerd met verschillende monoklonale antilichamen gericht tegen verschillende epitopen van het cTnT-molecuul. Echter, dit zijn andere antilichamen dan de twee die gebruikt worden in de immuno-assay van Roche (M7 en M11.7). Om deze discrepantie te omzeilen hebben we tenslotte gebruikt gemaakt van 'size-exclusion chromatography' (SEC) (8). Hierbij hebben we twee verschillende cTnT-standaarden geïncubeerd in serum gedurende 0, 24 en 48/96 uur. Op een chromatografische kolom werden de serummonsters op grootte gescheiden middels HPLC en opgevangen in kleine fracties. Hierin werd met de commerciële immunoassay de concentratie van cTnT bepaald (figuur 3).

Beide standaarden lieten twee pieken zien. Na 24 uur incubatie bij 37 °C was piek 2 toegenomen ten koste van een vergelijkbare afname van piek 1. Bij de troponine-TIC-complexstandaard (HyTest Ltd., Finland) verscheen zelfs een derde piek na 96 uur incubatie. Na controle van de twee standaarden met massaspectrometrie bleek dat piek 1 alleen overeen kon komen met het intacte eiwit. Hieruit volgt automatisch dat piek 2 en piek 3 kleinere fragmenten moeten zijn die reactief zijn in de immunoassay van Roche. Een andere aanwijzing dat piek 1 niet het complex van troponine-TIC kan zijn is dat de gebruikte chromatografische kolom dit grote complex niet kan scheiden. Dit complex zou direct elueren na het dode volume van de kolom (± 7 ml). In een studie door een andere groep werden deze resultaten ook gevonden (9), echter de interpretatie van de resultaten bleek incorrect (10).

Conclusies

cTnT komt in de circulatie als intact eiwit voor direct na een infarct en voorts als gedegradeerd eiwit in de vorm van verschillende fragmenten. De exacte fragmenten zijn nog niet geïdentificeerd, maar met zekerheid kan worden gesteld dat de huidige commerciële

immunoassay zowel het intacte eiwit, als enkele fragmenten herkent. Het is duidelijk dat degradatie gevolgen heeft voor de uitkomst van de analyse. Het is goed mogelijk dat de immunoreactieve fragmenten die zijn aangetoond bij dialysepatiënten ook voorkomen bij enkele andere aandoeningen met nog onbegrepen cTnT-verhogingen. Het vervolgonderzoek zal gericht zijn op het identificeren van de in vivo voorkomende fragmenten.

Referenties

1. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3): 959-69.
2. Panteghini M. The new definition of myocardial infarction and the impact of troponin determination on clinical practice. *Int J Cardiol* 2006; 106(3): 298-306.
3. Chen SJ, Bradley ME, Lee TC. Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases. *Mol Cell Biochem* 1998; 178(1-2): 141-9.
4. Hessel MH, Michielsen EC, Atsma DE, Valk EJ van der, Bax WH, Hermens WT, Dieijen-Visser MP van, Laarse A van der. Metabolic inhibition of cultured rat cardiomyocytes induces parallel release of cardiac troponin I and T. Submitted 2007.
5. Michielsen EC, Diris JH, Hackeng CM, Wodzig WK, Dieijen-Visser MP van. Highly sensitive immunoprecipitation method for extracting and concentrating low-abundance proteins from human serum. *Clin Chem* 2005; 51(1): 222-4.
6. Diris JH, Hackeng CM, Kooman JP, Pinto YM, Hermens WT, Dieijen-Visser MP van. Impaired Renal Clearance Explains Elevated Troponin T Fragments in Hemodialysis Patients. *Circulation* 2004; 109(1): 23-5.
7. Michielsen EC, Diris JH, Kleijnen VW, Wodzig KW, Dieijen-Visser MP van. Investigation of release and degradation of cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2007; In Press.
8. Michielsen EC, Diris JH, Kleijnen VWVC, Wodzig KW, Van Dieijen-Visser MP. Interpretation of cardiac troponin T behaviour in size-exclusion chromatography. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(12): 1422-7.
9. Fahie-Wilson MN, Carmichael DJ, Delaney MP, Stevens PE, Hall EM, Lamb EJ. Cardiac Troponin T Circulates in the Free, Intact Form in Patients with Kidney Failure. *Clin Chem* 2006; 52(3): 414-420.
10. Michielsen EC, Diris JH, Kleijnen VWVC, Wodzig KW, Dieijen-Visser MP van. Size-exclusion chromatography of circulating cardiac troponin T. *Clin Chem* 2006; 52(12): 2306-7; author reply 2307-9.