

Human meningiomas are rich in progesterin receptors, which are expressed in an oestrogen independent fashion. In cultured meningioma cells, antiprogestins decrease thymidine incorporation. Clinical studies indicate that patients may benefit from antiprogestin treatment. In the search for an explanation for the ER negative/PR positive phenotype of meningioma, a protein was found in human meningioma cytosol which binds to a synthetic oestrogen responsive element (ERE). Using reverse transcriptase PCR mRNA encoding for the wild-type oestrogen receptor (ER) was found. In addition, several splice variants of ER mRNA were identified, including variants lacking exons 4, 5 and 7. We found the ERD4 protein to have no

transcriptional activity and the ERD7 protein reportedly is dominant negative. These mutants therefore probably are not responsible for the autonomous PR synthesis in human meningioma. The ERD5 protein, by contrast, has been reported to have oestrogen independent transcriptional activity and it is tempting to speculate that this protein is the ERE binding protein we have found. The role of the wild type ER mRNA is presently unclear. Activation of other signal transduction pathways in meningioma does not lead to an increased PR concentration.

*Key-words: steroid receptors, meningiomas, estrogen, (anti-) progesterin, cell culture.*

Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 22-28

## Troponine T uitstorting in plasma na een acuut myocard infarct

M. P. van DIEIJEN-VISSER<sup>1</sup>, K.W.H. WODZIG<sup>1</sup>, J. A. KRAGTEN<sup>2</sup> en W. Th. HERMENS<sup>3</sup>

Bij patiënten met een acuut myocard infarct (AMI), die werden behandeld met trombolytische therapie, werd de uitstorting van troponine T in het plasma gekwantificeerd en vergeleken met totale uitstorting van de cytoplasmatische cardiale enzymen creatine kinase (CK) en  $\alpha$ -hydroxy butyraat dehydrogenase (HBD). Bij de berekening van de totale eiwit of enzymuitstorting in het plasma werd gebruik gemaakt van een twee-compartimentenmodel. De cumulatieve eiwit- of enzymuitstorting werd uitgedrukt in gram-equivalenten (g-eq) gezond hartspierweefsel per liter plasma (infarctgrootte). Voor de cardiale enzymen CK en HBD bedroeg de gemiddelde totale uitstorting over 72 uur respectievelijk 5,9 (range 0,5-29; median 3,5; n=22) and 5,9 (range 0,3-36; median 3,3; n=22) g-eq/l. De uitstorting was constant na 72 uur en de verschillen tussen CK en HBD waren niet significant. De gemiddelde cumulatieve troponine T uitstorting bedroeg slechts 0,30 (range 0,0-2,0; median 0,3; n=22) g-eq/l na 72 uur en 0,51 (range 0,0-3,6; median 0,3; n=22) g-eq/l na 168 uur. Na 72 uur was de totale troponine T uitstorting in het plasma slechts 5% en na 168 uur slechts 8,5% van de totale enzymuitstorting.

**Conclusie:** Ondanks het feit dat de troponine T uitstorting slechts een fractie is van de uitstorting van de cytoplasmatische enzymen CK en HBD, bestaat er een goede correlatie tussen de troponine T uitstorting

en de enzymuitstorting. Kwantificeren van de infarctgrootte dient echter bij voorkeur te gebeuren aan de hand van plasmacurves van cytoplasmatische enzymen die volledig in de bloedbaan worden uitgestort en die bij voorkeur langzaam worden afgebroken, zoals het HBD.

*Trefwoorden: compartimenten model, cardiale markers, kwantificeren van weefselschade, infarctgrootte, trombolytische therapie, reperfusie*

### Diagnostiek en vroegdiagnostiek van het acuut myocard infarct

Hart- en vaatziekten zijn in Nederland de belangrijkste doodsoorzaak. Voor patiënten met een dreigend hartinfarct is het van groot belang de diagnose acuut myocard infarct (AMI) in een zo vroeg mogelijk stadium te stellen, zodat tijdig met trombolytische (stolseloplossende) therapie kan worden gestart en de hartspierschade zoveel mogelijk beperkt kan blijven. Voor het vaststellen of uitsluiten van de diagnose AMI moet aan tenminste twee van de drie door de WHO (World Health Organization) opgestelde criteria zijn voldaan:

- het specifieke klachtenpatroon, zoals typische pijn op de borst gedurende meer dan 30 minuten
- karakteristieke veranderingen in het electrocardiogram (ECG)
- tijdsafhankelijke daling of stijging van cardiale eiwitten of enzymen (biochemische markers) in het bloed (1).

Echter, bij ongeveer 40% van de patiënten zijn de pijnklachten aspecifiek en zijn met name bij de aanvang van de klachten nog geen duidelijke ECG-veranderingen aanwezig (2). Voor de biochemische diagnostiek wordt meestal gebruik gemaakt van het enzym creatine kinase (CK) of van het meer hartspecifieke iso-enzym CK-MB, van lactaat dehydrogenase (LD) of van de meer hartspecifieke iso-enzymen LD1 en LD2 (gemeten met  $\alpha$ -hydroxy-boterzuur dehydrogenase als substraat, HBD). Verhoogde plasma-

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht<sup>1</sup>, Afdeling Cardiologie, Ziekenhuis De Wever en Gregorius, Heerlen<sup>2</sup> en Cardiovascular Research Institute Maastricht, Rijksuniversiteit Limburg, Maastricht<sup>3</sup>.*

Naar een voordracht voor de Werkgemeenschap Klinische Chemie i.o., juni 1995

Correspondentie: Prof. Dr. M. P. van Dieijen-Visser, Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Postbus 5800, 6202 AZ Maastricht.

Ingekomen: 25.08.95

concentraties van deze cytoplasmatische cardiale enzymen kunnen echter pas vanaf circa 4 uur na het begin van de pijnklachten worden aangetoond. Dit heeft ertoe geleid dat de laatste jaren naarstig is gezocht naar eiwitten of enzymen, die al in een eerder stadium in de bloedbaan kunnen worden aangetoond en die tevens hartspecifiek moeten zijn (3).

De criteria waaraan de ideale cardiale marker voor vroegdiagnostiek zou moeten voldoen zijn eenvoudig op te stellen:

- de marker moet hartspecifiek zijn
- in hoge concentraties aanwezig zijn in de hartspier
- slechts in lage concentraties aanwezig zijn in het plasma van gezonden
- snel vrijkomen en de analyse moet in korte tijd kunnen worden uitgevoerd.

Op dit moment is er geen enkele marker voor vroegdiagnostiek die al deze eigenschappen in zich verenigd heeft.

Het detecteren van cardiale markers in een zeer vroeg stadium wordt enerzijds mogelijk gemaakt door gebruik te maken van zeer gevoelige immunochemische technieken in plaats van de minder gevoelige enzymatische analyses. Echter, de meest gevoelige immunochemische analyses kunnen in veel gevallen nog niet met spoed worden uitgevoerd, hetgeen juist weer een vereiste is voor diagnostiek van het AMI in een vroeg stadium. Anderzijds wordt gebruik gemaakt van biochemische markers die eerder vrijkomen in de bloedbaan. Voor de cytoplasmatische eiwitten met een laag molecuulgewicht, zoals myoglobine (17 kDa) (4,5), maar ook voor de nieuwe marker "fatty acid binding protein" (FABP, 15 kDa) (6,7), is aangetoond dat deze inderdaad eerder in de bloedbaan terecht komen dan cytoplasmatische eiwitten met een hoger molecuulgewicht. De snelle uitstorting in het bloed maakt deze eiwitten bij uitstek geschikt voor diagnostiek in een vroeg stadium. Echter, de korte halfwaardetijd in het bloed en het feit dat ze renaal worden geklaard, maakt ze minder geschikt voor nauwkeurige kwantificering van de infarctgrootte aan de hand van de plasmacurve, in vergelijking tot HBD dat zeer langzaam uit de circulatie verdwijnt en niet renaal wordt geklaard. Daar komt bij dat beide markers minder hartspecifiek zijn dan bijvoorbeeld CK-MB-massa, troponine I of troponine T. Voor de laatstgenoemde markers geldt evenwel dat ze later vrijkomen dan deze markers met een laag molecuulgewicht. Voor CK-MB-massa, troponine T en troponine I, de meer hartspecifieke markers wordt geprobeerd de onderste detectiegrens zodanig te optimaliseren, dat al in een zeer vroeg stadium plasmaverhogingen kunnen worden gedetecteerd. Een probleem hierbij is dat de analysetijd voor de meer gevoelige methodieken meestal langer is, waardoor de gevoeligste variant van deze bepalingen veelal niet met spoed kan worden uitgevoerd. De ideale marker voor vroegdiagnostiek is dan ook op dit moment nog niet voorhanden. Optimalisatie van analysetechnieken moet hier in de toekomst zeker perspectieven gaan bieden.

De biochemische markers met een korte halfwaardetijd, zoals myoglobine en FABP, zijn in tegenstelling tot de andere markers zeer geschikt om te beoordelen

of een reïnfarct is opgetreden. De snelle fluctuaties in de plasmaconcentraties maken het mogelijk vrij nauwkeurig vast te stellen of opnieuw necrose is opgetreden.

### **Kwantificeren van de infarctgrootte**

Behalve voor de diagnostiek wordt de uitstorting van cardiale enzymen in het plasma tevens gebruikt om de infarctgrootte te kwantificeren. Een biochemische marker die geschikt is voor diagnostiek in een vroeg stadium, hoeft echter niet tevens geschikt te zijn voor het kwantificeren van de infarctgrootte. Voor de cytoplasmatische enzymen CK, LD of HBD is aangetoond dat er een kwantitatieve relatie bestaat tussen het aantal grammen weefselnecrose en de totale enzymuitstorting in plasma. Indien de totale enzymuitstorting in plasma, berekend met een één- of twee-compartimenten model (8,9) wordt gedeeld door de enzyminhoud per gram gezond hartweefsel, kan de hartspierschade worden uitgedrukt in het aantal gram-equivalenten gezond hartweefsel dat per liter plasma in de bloedbaan is terechtgekomen. Voor de cytoplasmatische enzymen CK, LD of HBD resulteert de totale enzymuitstorting per liter plasma in een vergelijkbare schatting van de infarctgrootte (8-11). De lange halfwaardetijd in bloed maakt het cytoplasmatische HBD (LD1 en LD2) bij uitstek geschikt voor het betrouwbaar kwantificeren van de infarctgrootte. De op grond van de HBD-uitstorting bepaalde infarctgrootte geldt dan ook in het algemeen als gouden standaard. Kwantificering van de infarctgrootte aan de hand van plasma enzymcurves wordt bijvoorbeeld toegepast om de effecten van trombolytische therapie op de infarctgrootte te kunnen beoordelen (11,12).

### **Detecteren van reperfusie aan de hand van het uitstortingspatroon in plasma**

Ellis et al (13) hebben gesuggereerd dat de snelle uitstorting van myoglobine bij patiënten die worden behandeld met trombolytische therapie een hoge voorspellende waarde heeft voor het aantonen van reperfusie. Voor de verschillende markers myoglobine (13,14), CK (15) en CK-MB (16) is enerzijds een snellere stijging van de plasmawaarden en anderzijds een eerder bereiken van de maximale concentratie (piekwaarde) gepropageerd als niet-invasieve methode om een eventuele reperfusie vast te stellen. Bosker et al (17) hebben echter aangetoond, dat ondanks het feit dat de piek eerder optreedt bij patiënten waarbij reperfusie is opgetreden, het verloop van de plasmacurves van CK en HBD niet gebruikt kan worden om op betrouwbare wijze het optreden van reperfusie te voorspellen. Voor troponine T heeft Katus aangegeven dat bij patiënten die worden behandeld met trombolytische therapie en bij wie reperfusie is opgetreden de uitstorting in twee fasen verloopt. Dit in tegenstelling tot het verloop van de plasmacurve van patiënten die niet werden behandeld met trombolytische therapie en waarbij geen reperfusie optrad (18).

### **Uitstortingskarakteristieken van cardiale eiwitten en enzymen**

Uit het voorgaande is duidelijk dat de toepassingsmo-

gelijkheden van een cardiale marker voor een belangrijk deel worden bepaald door de uitstortingskarakteristieken, de snelheid waarmee de eiwitten vanuit het necrotische weefsel in de bloedbaan terechtkomen en van het verloop van de plasmacurve. Dit laatste wordt voor een belangrijk deel bepaald door de afbraakconstante van de betreffende marker in het bloed. Daarnaast speelt de kwaliteit van de analysetechniek en de intra- en inter-individuele variatie van het eiwit in gezond hartweefsel een belangrijke rol.

Om een inschatting te kunnen maken van de mogelijkheden of onmogelijkheden van een cardiale marker met betrekking tot het toepassingsgebied moeten een aantal vragen worden beantwoord:

- Is de marker hartspecifiek?
- Is er een relatie tussen de snelheid waarmee de eiwitten in de bloedbaan terechtkomen en het moleculgewicht, c.q. de grootte van het eiwit?
- Is er een verschil in uitstortingssnelheid voor cytoplasmatische eiwitten, vergeleken met de structurele eiwitten, zoals bijvoorbeeld troponine T en troponine I uit de myofibril of vergeleken met bijvoorbeeld mitochondriale eiwitten?
- Hoe groot is de halfwaardetijd van de verschillende biochemische markers in het bloed en is er sprake van renale klaring?
- Hoe groot is de intra- en inter-individuele variatie in de enzym- of eiwitinhoud per gram gezond hartweefsel?

Voor de enzymatische markers zoals CK, LD, HBD en ASAT (8-12,15-17,19) zijn deze vragen voor een belangrijk deel beantwoord. Over de nieuwe markers zoals myoglobine, FABP, troponine T, troponine I of CK-MB-massa is veel minder bekend.

Doel van het onderzoek is bestudering van de uitstortingskarakteristieken van nieuwe cardiale markers en evalueren van de bruikbaarheid van deze markers voor diagnostiek, vroegdiagnostiek en voor het kwantificeren van de infarctgrootte aan de hand van de plasmacurve.

In deze bijdrage zullen wij ons beperken tot de troponine T uitstorting na een AMI en deze vergelijken met de uitstorting van cytoplasmatische enzymen, zoals CK en HBD (LD1 en LD2).

## PATIËNTEN en METHODEN

### Patiënten

De patiënten (16 mannen en 6 vrouwen) meldden zich binnen 6 uur na het ontstaan van de klachten op de eerste hulp van het Ziekenhuis De Wever en Gregorius in Heerlen, met verdenking op een acuut myocardinfarct en werden behandeld met trombolytische therapie.

Veneuze heparine bloedmonsters werden vlak voor de behandeling afgenomen en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 18, 22, 28, 34, 58, 70, 82, 94, 118, 142 en 166 uur erna. De afnametijden werden uitgedrukt in uren vanaf het begin van de pijnklachten. De plasmamonsters werden bewaard bij -70 °C.

### Bepaling van enzymen en troponine T

De CK en HBD activiteit werd spectrofotometrisch

bepaald op een Cobas Bio Centrifugaal analyzer, bij 37 °C. Er werden commerciële testkits gebruikt voor de bepaling van CK-NAC (IFCC aanbeveling, Unimate 3 Roche, art no 07 3647 3) en HBD (DGKC aanbeveling, geoptimaliseerde test van Boehringer, art no. 1 442 589).

Troponine T werd bepaald met een enzym-immunoassay van Boehringer (20). De bepaling werd uitgevoerd op een ES22 fotometer van Boehringer.

### Bepaling van de enzym- en troponine T inhoud per gram hartweefsel

Hartweefsel werd verkregen bij obductie via de afdeling Klinische Pathologie van het De Wever Ziekenhuis, van patiënten met een niet-cardiale doodsoorzaak.

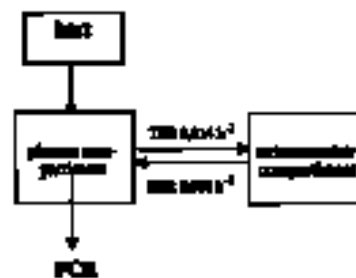
Het epicardiale vet werd verwijderd en er werd een transmuraal monster genomen. Een halve gram hartweefsel werd gehomogeniseerd (Ultraturrax, Janke en Kunkel, type 8-10) en gesoniceerd (Sonorex Baudelin, type RK 102 H, 120-140 W, 35 kHz) in 9,5 ml gepasteuriseerde plasma-eiwitoplossing (Het Nederlandse Rode Kruis Bloedtransfusie Centrum in Amsterdam, Nederland). De suspensie werd gecentrifugeerd bij 2000g gedurende 15 minuten en het supernatant werd onmiddellijk ingevroren bij -70 °C. In gezonde harten van honden resulteert deze procedure in een totale variatie in de enzyminhoud van 10-12% (21).

Voor bepaling van de totale troponine T inhoud per gram hartweefsel werd gebruik gemaakt van de methode beschreven door Katus (18).

### Berekening van de totale uitstorting van enzymen en van troponine T in het plasma

De totale enzymuitstorting en de totale troponine T uitstorting per liter plasma vanaf het begin van de pijnklachten tot aan het tijdstip t, Q(t), werd berekend met een twee-compartimentenmodel (figuur 1).

De parameters TER, ERR en FCR zijn respectievelijk de transcapillaire "escape rate", de extravasculaire



$$Q(t) = C_{pl} + TER \cdot \int_0^t exp [ERR - (t-\tau)] C(\tau) d\tau + FCR \int_0^t C(\tau) d\tau$$

$\frac{plasma}{concentratie}$  +  $\frac{interstitieel}{concentratie}$  +  $\frac{afgevoerd}{concentratie}$

$$Integrale (g-cp/L) = Q(t) / \text{inhalatie per gram hartweefsel}$$

Figuur 1. Twee-compartimenten model.

"return rate" en de fractionele afbraakconstante in reciproke uren ( $h^{-1}$ ). Het twee-compartimentenmodel is gevalideerd in de hond (8,9,10,22) en de geschatte modelparameters in de mens zijn (9):

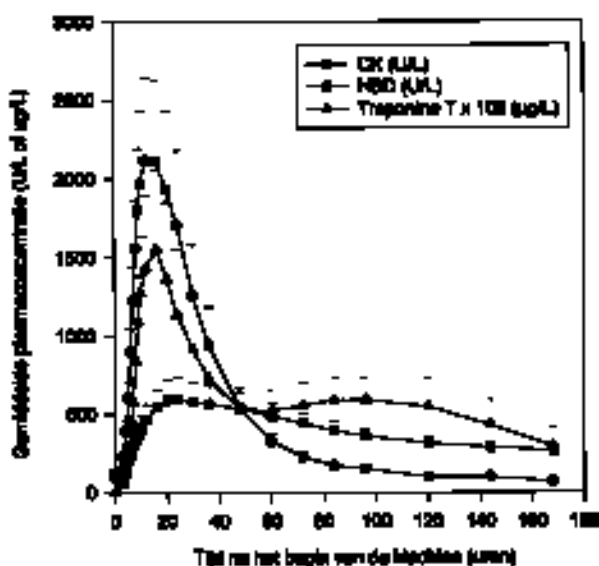
$FCR_{HBD} = 0,015 h^{-1}$ ,  $FCR_{CK} = 0,20 h^{-1}$ ,  $TER = 0,014 h^{-1}$  en  $ERR = 0,018 h^{-1}$ .

De afbraakconstante van troponine T werd berekend middels een fitprocedure op gelijktijdig gemeten troponine T en HBD plasmacurves. Dit resulteerde in een FCR van  $0,11 \pm 0,05 h^{-1}$  (mean  $\pm$  SD) (9). De methode is gebaseerd op een gelijktijdige uitstorting van twee eiwitten uit hetzelfde compartiment (cytoplasma) en dus het vrije cytoplasmatische troponine T dat de eerste 24 uur vrijkomt, versus cytoplasmatisch HBD. De fitprocedure werd beperkt tot de eerste 24 uur. Tevens werd geverifieerd of over 18 en over 30 uur dezelfde resultaten werden gevonden. De gemiddelde geschatte afbraakconstante,  $FCR_{troponin T} = 0,11 h^{-1}$  werd gebruikt bij de berekeningen. De gemeten plasma enzymactiviteit op elk tijdstip  $t$ ,  $C(t)$  werd gecorrigeerd voor de normale steady state activiteit  $C_s$ . Indien het eerste bloedmonster binnen vier uur na het optreden van de klachten werd afgenomen, werd deze waarde gebruikt als  $C_s$ . In de overige gevallen (3 patiënten) werden vaste waarden gebruikt van 100 U/l, 112 U/l en 0  $\mu g/l$  voor respectievelijk CK, HBD en troponine T.

### Infarctgrootte in gram-equivalenten gezond myocardweefsel per liter plasma

Door de cumulatieve uitstorting  $Q(t)$  te delen door de eiwitinhoud per gram gezond hartweefsel kan de infarctgrootte worden uitgedrukt in het aantal grammen gezond hartweefsel dat per liter in het bloed (plasma) is uitgestort.

Infarctgrootte (gram-equivalent/l) =  $Q(t) /$  eiwitinhoud per gram hartweefsel.



**Figuur 2.** Gemiddelde plasmaconcentraties van CK, HBD in U/l en troponine T x 100 in  $\mu g/l$  voor 22 patiënten. Het gemiddelde + S.E.M. (Standard error of the mean) is aangegeven.

### Statistiek

De niet-parametrische Spearman rangcorrelatietest werd gebruikt voor de berekening van de correlaties.

## RESULTATEN

### Gemiddelde plasmaconcentratie na een AMI

In figuur 2 is de gemiddelde CK, HBD en troponine T concentratie als functie van de tijd weergegeven voor 22 patiënten. Het grote verschil in tijdsverloop tussen CK en HBD weerspiegelt geen snellere uitstorting van CK of najlen van HBD, maar wordt veroorzaakt door een verschil in afbraaksnelheid in het bloed. Voor CK geldt dat 20% van de activiteit in het plasma het eerste uur (h) wordt afgebroken, terwijl dit voor HBD slechts 1,5% is ( $FCR_{HBD} = 0,015 h^{-1}$ ,  $FCR_{CK} = 0,20 h^{-1}$ ). De twee pieken in de troponine T curve wijzen duidelijk in de richting van een tweede bron van uitstorting, het aan de myofibril gebonden troponine T, dat ongeveer 40 uur na het begin van de symptomen in de bloedbaan verschijnt.

### Enzym en troponine T inhoud per gram hartweefsel

In tabel 1 wordt de enzyminhoud per gram hartweefsel, verkregen bij obductie, vermeld.

De CK-inhoud per gram hartweefsel kan alleen worden bepaald in vers hartweefsel. Daarom werd voor de CK-inhoud de door van der Laarse gevonden waarde van 865 U/gram natgewicht (23), bepaald in hartbiopten, gebruikt. Deze waarde werd vermenigvuldigd met de temperatuurconversiecoëfficiënt van 2,5, hetgeen resulteert in een CK-inhoud van 2163 U/gram natgewicht.

### Cumulatieve uitstorting van de enzymen en van troponine T in plasma

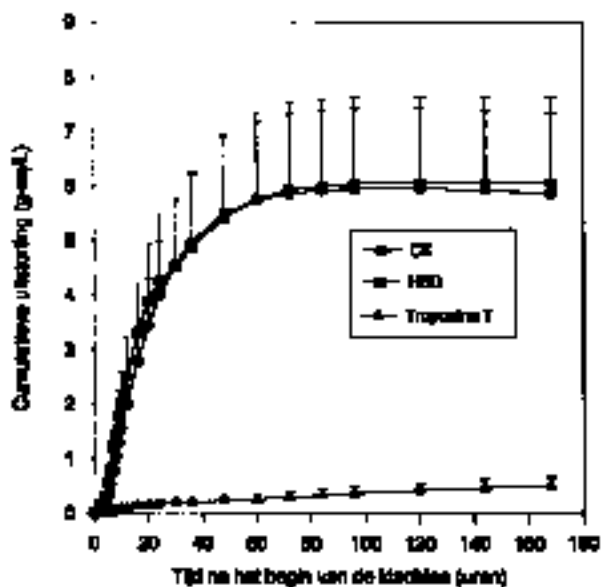
In figuur 3 en in tabel 2 wordt de gemiddelde uitstorting, uitgedrukt in gram-equivalenten hartweefsel per liter plasma, gegeven voor CK, HBD en troponine T. De CK en de HBD uitstorting was niet significant verschillend. De gemiddelde troponine T uitstorting, uitgedrukt in gram-equivalenten gezond hartweefsel bedraagt na 72 uur slechts  $0,30 \pm 0,09$  g-eq/l. Voor de inhoud van de verschillende markers per gram hartweefsel werden de waarden vermeld in tabel 1 gebruikt. Na 168 uur is de gemiddelde troponine T uitstorting uitgedrukt in gram-equivalenten hartweefsel  $0,51 \pm 0,16$  g-eq/l. De troponine T uitstorting is na 168 uur nog niet constant, terwijl de enzymuitstorting na 72 uur wel constant is. Na 72 uur is de troponine T uitstorting slechts 5% en na 168 uur slechts 8,5% van de uitstorting van de cytoplasmatische enzymen CK of HBD.

**Tabel 1.** Gemiddelde HBD en troponine T inhoud per gram hartweefsel

Parameter	gemiddelde inhoud per gram natgewicht	CV(%)
HBD (U/g natgewicht)	156	17,7
Troponine T ( $\mu g/g$ natgewicht)	234	27,6

**Tabel 2.** Gemiddelde HBD, CK en troponine T uitstorting voor 22 patiënten

Parameter	Q(72)HBD	Q(72)CK	Q(72)TnT	Q(168)TnT
Gemiddelde (g-eq/l)	5,93	5,86	0,30	0,51
SD	7,46	6,80	0,42	0,75
SEM	1,59	1,45	0,09	0,16
Mediaan	3,28	3,47	0,16	0,25
Range	0,51-35,5	0,54-29,1	0,0-2,03	0,01-3,56



**Figuur 3.** Gemiddelde cumulatieve uitstorting voor CK, HBD en troponine T op verschillende tijdstippen na het begin van de klachten en uitgedrukt in gram-equivalenten hartweefsel per liter plasma, in 22 patiënten. Het gemiddelde plus de S.E.M. is afgebeeld.

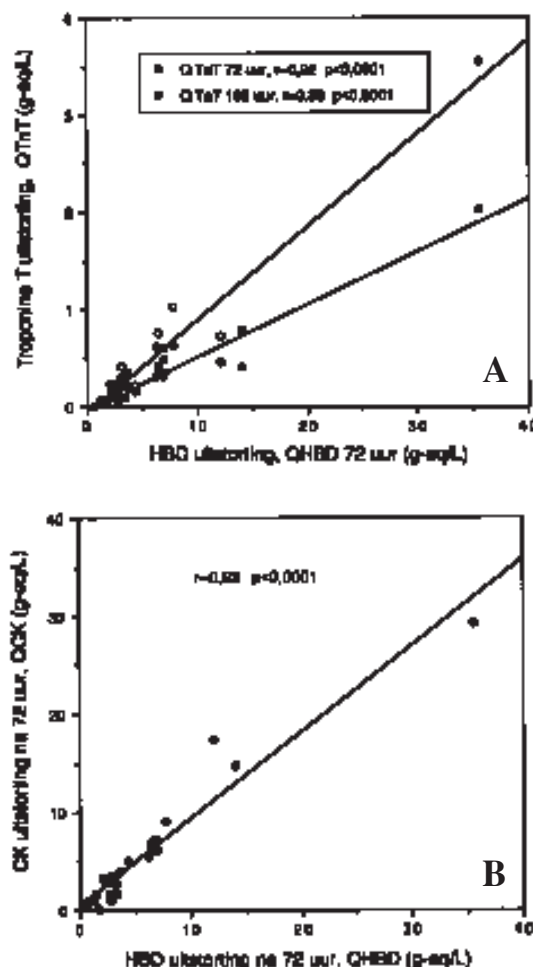
### Correlatie tussen de infarctgrootte berekend met de verschillende markers

De correlaties (Spearman rangcorrelatie) tussen de grootte van de infarcten, gebruik makend van QHBD als referentie, ten opzichte van de cumulatieve CK of troponine T uitstorting is weergegeven in figuur 4. Hoewel de gemiddelde troponine T uitstorting slechts 5% is van de gemiddelde HBD uitstorting na 72 uur, wordt een significante correlatie gevonden tussen de cumulatieve HBD uitstorting en de cumulatieve troponine T uitstorting na 72 uur (figuur 4A) ( $r=0,92$ ;  $p<0,0001$ ), maar ook na 168 uur ( $r=0,89$ ;  $p<0,0001$ ). De correlatie tussen de QHBD en de QCK na 72 uur is vergelijkbaar (figuur 4B,  $r=0,93$ ;  $p<0,0001$ ).

### DISCUSSIE

#### Afbraakconstanten in het plasma

Op het punt waar de plasmacurve de maximale uitstorting bereikt is de hoeveelheid eiwit die in de bloedbaan terecht komt, gelijk aan de hoeveelheid die wordt afgebroken. Voorbij de piek treedt er echter nog altijd uitstorting van het betreffende eiwit op. De afbraakconstante kan dan ook niet worden geschat uit het dalende been van de plasmacurve. In de hond is aangetoond dat de verdwijningsconstante ( $k_d$ ) berekend uit het dalende stuk van de plasmacurve onge-



**Figuur 4.** Rangcorrelatie tussen cumulatieve HBD en troponine T uitstorting na 72 en na 168 uur (A) en tussen cumulatieve HBD en CK uitstorting na 72 uur (B).

veer driemaal zo laag is als de werkelijke FCR (10,13). Hetzelfde blijkt uit onze studie voor troponine T. De berekende waarde FCR van  $0,11 \text{ h}^{-1}$  is ongeveer driemaal de verdwijningssnelheid geschat uit het steilste deel van de plasmacurve, namelijk  $0,03 \text{ h}^{-1}$  (3% per uur).

#### Volledige uitstorting van cytoplasmatische enzymen uit het hart

In experimentele studies is aangetoond dat er een totale "recovery" is van cytoplasmatische cardiale eiwitten vanuit het ischemische myocard. Na permanente coronaire occlusie blijkt de totale CK en HBD activiteit uitgestort vanuit het necrotische weefsel, gelijk te zijn aan de totale berekende uitstorting van deze eiwitten in het plasma, dat wil zeggen 100% opbrengst. Deze resultaten kunnen uiteraard niet wor-

den geëxtrapoleerd naar de mens. In de hond is tevens aangetoond dat eiwitpreparaten die werden geïnfundeerd in geïnfarceerd myocard, al binnen enkele uren de circulatie bereiken. Deze situatie is uiteraard niet volledig te extrapoleren naar de situatie tijdens een AMI. Echter, het feit dat de infarctgrootte gevonden voor de verschillende enzymen, ook in de mens (11) vergelijkbaar is wijst in de richting van volledige "recovery" van de cytoplasmatische enzymen in het plasma.

### **Kwantificeren van de cumulatieve troponine T uitstorting**

Indien bij de berekeningen wordt uitgegaan van de door ons gevonden totale troponine T inhoud van 234 µg/g (tabel 1) bedraagt de cumulatieve troponine T uitstorting na 72 uur 5% en na 168 uur 8,5% van de cumulatieve uitstorting van de cytoplasmatische enzymen na 72 uur, uitgedrukt in gram-equivalent normaal hartweefsel (figuur 3). Indien gebruik wordt gemaakt van de totale troponine T inhoud gevonden door Katus van 400 µg/g (18), resulteert dit in een gemiddelde cumulatieve troponine T uitstorting van slechts 0,26 g-eq/l na 72 uur. Het verschil in troponine T inhoud per gram weefsel gevonden door ons, vergeleken met de waarde van Katus (18) is derhalve niet van invloed op de uiteindelijke conclusie dat de troponine T uitstorting slechts een fractie bedraagt van de totale weefselinhoud.

### **Troponine T als marker voor kwantificeren van de infarctgrootte**

Schatten van de mate van ischemische hartspierschade van cardiale enzymen in het plasma is van belang bij het beoordelen van bepaalde therapieën, bijvoorbeeld trombolytische therapie, op de uiteindelijke infarctgrootte. In diverse studies werd een overtuigende correlatie gevonden tussen de enzymatische en de histologische schatting van de infarctgrootte (24-27). Ondanks het feit dat een goede correlatie wordt gevonden tussen de totale troponine T uitstorting en de totale HBD of CK uitstorting, gaat de voorkeur bij kwantificeren van de infarctgrootte aan de hand van de uitstortingscurve in plasma nog altijd uit naar een cardiale merker die zo volledig mogelijk in het bloed wordt uitgestort, zoals bijvoorbeeld HBD en die bovendien langzaam wordt afgebroken.

### **Conclusie**

- Na een acuut myocard infarct is de totale troponine T uitstorting in de bloedbaan slechts een fractie van de totale enzymuitstorting.
- De correlatie tussen de infarctgrootte bepaald aan de hand van de troponine T plasmacurves, is vergelijkbaar met de infarctgrootte bepaald aan de hand van de plasmacurves van HBD of CK.
- Kwantificeren van de infarctgrootte aan de hand van de uitstorting van cardiale markers in het bloed, dient bij voorkeur te worden uitgevoerd met een cytoplasmatische hartspecifieke marker met een lange halfwaardetijd in bloed, zoals het HBD.

Wij bedanken mev. M. Koenders-Delnoy en mev. M. van der Vloet-Boermans, Klinisch Chemisch Laboratorium Ziekenhuis De Wever en Gregorius in Heerlen voor de technische ondersteuning.

### **Literatuur**

1. World Health organization criteria for the diagnosis of acute myocardial infarction. Geneva: Cardiovascular disease unit of WHO, 1981.
2. Adams J, Trent R, Rawles J on behalf of the GREAT group. Earliest electrocardiographic evidence of myocardial infarction: implications for thrombolytic treatment. *Br Med J* 1993; 307: 409-413.
3. Bhayana V, Henderson AR. Biochemical markers of myocardial damage. *Clin Biochem* 1995; 28: 1-29.
4. Mair J, Artner-Dworzak E, Lechleitner P, Morass B, Smidt J, Wagner I, Dienstl F et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction by a newly developed rapid immunoturbidimetric assay for myoglobin. *Br Heart J* 1992; 68: 462-468.
5. Dieijen-Visser MP van, Kragten JA, Glatz JFC, Hermens WTh. Clinical relevance of early markers for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1993; 18: 140-144.
6. Glatz JFC, Kleine AH, Nieuwenhove FA van, Hermens WTh, Dieijen-Visser MP van and Vusse GJ van der. Fatty-acid-binding protein as a plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans. *Br Heart J* 1994; 71: 135-140.
7. Glatz JFC, Kleine AH, Nieuwenhoven FA van, Dieijen-Visser MP van, Hermens WTh, Vusse GJ van der. Fatty acid-binding protein and myoglobin as plasma markers for the early assessment of acute myocardial infarction in man. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1993; 18: 144-150.
8. Visser MP, Krill MTA, Willems GM, Hermens WTh: Selection of a suitable circulatory model for the plasma clearance and distribution of cardiac enzymes in the dog. *Cardiovasc Res* 1981; 15: 35-42.
9. Willems GM, Visser MP, Krill MTA, Hermens WTh. Quantitative analysis of plasma enzyme levels based on simultaneous determination of different enzymes. *Cardiovasc Res* 1982; 16: 120-131.
10. Hermens WTh, Veen FH van der, Willems GM, Mullers-Boumans ML, Schrijvers- van Schendel A, Reneman RS: Complete recovery in plasma of enzymes lost from the heart after permanent coronary artery occlusion in the dog. *Circulation* 1990; 81: 649-659.
11. Simoons ML, Serruys PW, Van den Brand M, Res J, Verheugt FWA, Krauss XH et al. Early thrombolysis in acute myocardial infarction: Limitation of infarct size and improved survival. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 717-728.
12. Hermens WTh, Veen FH van der, Willems GM, Reneman RS. Enzymatic infarct size and its significance for evaluation of thrombolytic therapy after acute myocardial infarction (Letter to the Editor). *Circulation* 1990; 81: 1719-1720.
13. Ellis AK, Little T, Masud ARZ, Liberman HA, Morris DC, Klocke FJ. Early non-invasive detection of successful reperfusion in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1988; 78: 1352-1357.
14. Ellis AK, Saran BR. Kinetics of myoglobin release and prediction of myocardial depletion after coronary artery reperfusion. *Circulation* 1989; 80: 676-683.
15. McCullough DA, Harrison PG, Forshall JM, Irving JB, Hillman RJ. Serum myoglobin and creatine kinase enzymes in acute myocardial infarction treated with Anistreplase. *J Clin Pathol* 1992; 45: 405-407.
16. Grande P, Granborg J, Clemmensen P, Sevilla DC, Wagner NB, Wagner GS. Indices of reperfusion in patients with acute myocardial infarction using characteristics of CK-MB time-activity curve. *Am Heart J* 1991; 122: 400-408.

17. Bosker HA, Laarse A van der, Cats VM, Brusckhe AVG. Are enzymatic tests good indicators of coronary reperfusion? *Br Heart J* 1992; 67: 150-154.
18. Katus HA, Rempis A, Scheffold T, Diederich KW, Kuebler W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1360-1367.
19. Zwaan Ch de, Willems GM, Vermeer F, Res J, Verheugt FWA, Laarse A van der, Simoons ML et al. Enzyme tests in the evaluation of thrombolysis in acute myocardial infarction. *Br Heart J* 1988; 59: 175-183.
20. Katus HA, Rempis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kübler W. Enzyme linked immuno assay of cardiac Troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 1349-1353.
21. Visser MP, Krill MTA, Muijtens AMMI, Willems GM, Hermens WTh. Distribution of enzymes in dog heart and liver. Significance for assessment of tissue damage from data on plasma enzyme activities. *Clin Chem* 1982; 27: 1845-1850.
22. Kreef BK van, Veen FH van der, Willems GM, Hermens WTh. Circulatory models in assessment of cardiac enzyme release in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264 (Heart Circ Physiol 33): H747-H754.
23. Laarse A van der, Dijkshoorn NJ, Hollaar L en Caspers T. The (iso)-enzyme activities of lactate dehydrogenase, alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase, creatine kinase and aspartate aminotransferase in human myocardial biopsies and autopsies. *Clin Chim Acta* 1980; 104: 381-391.
24. Clark GL, Robison AK, Gnepp DR, Roberts R, Sobel BE. Effects of lymphatic transport of enzyme on plasma creatine kinase time-activity curves after myocardial infarction in dogs. *Circ Res* 1978; 43: 162-169.
25. Bleifeld W, Mathey D, Hanrath P, Buss H, Effert S. Infarct size estimated from serial creatine phosphokinase in relation to left ventricular dynamics. *Circulation* 1977; 55: 303-311.
26. Grande P, Hansen BF, Christiansen C, Naestoft J. Estimation of acute myocardial infarct size in men by serum CK-MB measurements. *Circulation* 1982; 65: 756-764.
27. Hackel DB, Reimer KA, Ideker RE, Mikat EM, Hartwell TD, Parker CB, Braunwald EB, Buja M, Gold HK et al. Comparison of enzymatic and anatomic estimates of myocardial infarct size in man. *Circulation* 1984; 70: 824-835.

### Summary

*Troponin T release into plasma after acute myocardial infarction. Dieijen-Visser MP van, Wodzig KWH, Kragten JA and Hermens WTh. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 22-28.*

After acute myocardial infarction (AMI) cardiac enzymes and proteins are released into plasma and are used as biochemical markers of cardiac muscle injury. We studied the completeness of the release of troponin T, a cardiac protein that is largely bound to myofibrillar structures and compared it with the release of cytoplasmic cardiac enzymes creatine kinase (CK) and  $\alpha$ -hydroxy butyrate dehydrogenase (HBD) in patients with AMI, treated with thrombolytic therapy. A two-compartment model was used to calculate the cumulative plasma release of the different cardiac markers. The calculated cumulative plasma release was expressed in gram equivalents (g-eq) healthy myocardium per liter plasma (infarct size). For the cardiac enzymes CK and HBD the mean total release over 72 hours, was respectively 5.9 (range 0.5-29, median 3.5, n=22) and 5.9 (range 0.31-36, median 3.3, n=22) g-eq/l, it did not further increase after 72 hours and the differences between enzymes were not significant. The cumulative troponin T release, expressed in gram equivalents of myocardium per liter of plasma was only 0.30 (range 0.0-2.0, median 0.16, n=22) g-eq/l after 72 hours and 0.51 (range 0.0-3.6, median 0.3, n=22) g-eq/l after 168 hours. After 72 hours total recovery of troponin T in g-eq/l is only 5% and after 168 hours only 8.5% of the total recovery of cytoplasmic cardiac enzymes after 72 hours.

Although cumulative troponin T release correlates well with infarct size estimated from cumulative plasma enzyme release, estimation of infarct size should preferably be performed from the plasma release curve of a slowly cleared cytoplasmic enzyme or protein.

*Key-words: compartmental model; cardiac markers; quantification of tissue damage; infarct size; reperfusion; thrombolytic therapy.*

*Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 28-33*

## Toepassing van moleculair biologische methoden in het vaststellen van genetische afwijkingen bij hyperlipoproteïnemieën

P.N.M. DEMACKER, S.J.H. BREDIE en A.F.H. STALENHOF

In elk biomedisch onderzoek is er een wisselwerking tussen de diagnostische mogelijkheden en de toename van het theoretische inzicht. Dit kan goed wor-

*Afdeling Algemeen Interne Geneeskunde, Academisch Ziekenhuis Nijmegen*

Naar een voordracht voor de Werkgemeenschap Klinische Chemie i.o., juni 1995

Correspondentie: Dr. P. N. M. Demacker, Afdeling Algemeen Interne Geneeskunde, Academisch Ziekenhuis, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

den toegelicht op basis van de progressie van kennis op het gebied van het lipoproteïnenmetabolisme en de daarmee verband houdende verbeterde diagnostiek.

De weg die de afgelopen 20 jaar is afgelegd was lang maar uiterst vruchtbaar. Zeer veel afwijkingen in het lipoproteïnenmetabolisme, die voorheen nauwelijks te onderscheiden waren van andere afwijkingen, kunnen nu worden gediagnostiseerd op moleculair niveau. Voor een klinische-chemisch georiënteerd onderzoeker op het gebied van lipoproteïnenafwijkingen was en is dit een vruchtbare tijd. In het navolgende zal worden uitgelegd hoe men op basis van