

Troponin, the best there is!

M.P. van DIEIJEN-VISSER, A.M.A. MINGELS, L.H.J. JACOBS, E.P.M. CARDINAELS, W.K.W.H. WODZIG,
O. BEKERS, L.J.J. KLINKENBERG en S.J.R. MEEEX

Cardiaal troponine wordt algemeen geaccepteerd als de gouden standaard voor de diagnostiek van het acuut coronair syndroom (ACS). Onder bepaalde condities worden echter troponineverhogingen in bloed gevonden zonder dat duidelijk sprake lijkt te zijn van ACS, zoals bij ernstige nierschade of na extreme inspanning. Doel van ons onderzoek is de oorzaak van deze troponineverhogingen nader te bestuderen, waarbij de nadruk ligt op de vraag of troponinerelease mogelijk is zonder dat sprake is van cardiale celdood.

In 1989 publiceerde Hugo Katus het eerste artikel over troponine T als biomarker voor myocardschade (1). Onze eerste publicatie over troponine T stamt uit 1996 (2, 3), waarbij wij ons destijds met name interesseerden voor de mogelijkheid om met troponine de grootte van het myocardinfarct te kwantificeren (3). Hierbij maakten we gebruik van modellen die we hadden ontwikkeld om de infarctgrootte te kwantificeren aan de hand van het verloop van de klassieke biomarkers voor hartspierschade Creatine Kinase (CK) en Lactaat Dehydrogenase (LD) in serum (4, 5), de in die tijd gangbare biomarkers voor de diagnostiek van het myocardinfarct. Nu, ruim 20 jaar na hun introductie hebben de hartspecifieke troponines hun sporen in de diagnostiek meer dan verdiend. Volgens de nieuwe internationale richtlijnen is troponine de gouden standaard voor de diagnostiek van het acuut coronair syndroom.

Het troponinecomplex, bestaat uit drie eiwitten troponine T, I en C en speelt een rol bij de contractie van zowel hart- als skeletspier. Aangezien troponine T en troponine I aanwezig in de hartspier een iets andere structuur hebben dan troponine uit de skeletspier, bleek het mogelijk specifiek de uit het hart afkomstige troponines in het bloed aan te tonen met behulp van immunoassays voor cardiaal Troponine (cTnT en cTnI). De aanvankelijke discussie welke marker beter is - cTnT of cTnI - speelt niet meer en de keuze wordt voornamelijk bepaald door het in het laboratorium aanwezige analyseplatform. In de loop der jaren is behalve de specificiteit, ook de gevoeligheid van de troponinebepalingen verbeterd, waardoor de bruikbaarheid voor vroegdiagnostiek van een infarct sterk is toegenomen. Aanvankelijk hadden wij voor de vroeg-

diagnostiek onze pijlen op de snelle, maar minder specifieke biomarkers Myoglobine en Fatty Acid Binding Protein (FABP) gezet (6), maar door de komst van de gevoelige en uiterst specifieke troponine-assays zijn deze praktisch van de markt verdwenen. Myoglobine en FABP komen niet meer in de richtlijn voor (7, 8). Binnen de onderzoekslijn is voornamelijk gebruik gemaakt van de troponine T bepaling, waarbij voor de eerste generatietest de afkapwaarde voor myocardinfarct bij 0,1 µg/l lag, terwijl deze voor de vijfde generatie high-sensitive cardiac TnT (hs-cTnT) bij 14 ng/l ligt. In het onderzoek met de hs-cTnT vonden wij een afkapwaarde van 16 ng/l en waren de eersten die een significant verschil tussen mannen (18 ng/l) en vrouwen (8 ng/l) vonden (9, 10).

Uit een recente inventarisatie over het gebruik van hartmarkers in Europees verband blijkt dat 93% van de laboratoria inmiddels Troponine (cTnT 48%, cTnI 45%) als marker voor de diagnostiek van het myocardinfarct gebruikt (11), echter nog zeer vaak gecombineerd met de klassieke markers als CK-MB_{massa}, myoglobine, CK of LDH, ondanks het feit dat de internationale richtlijn troponine als enige marker adviseert. De troponine-onderzoekslijn is gericht op een aantal aspecten:

- De release karakteristieken van troponine in vivo (na myocardinfarct) en in vitro (celkweek)
- De oorzaak van troponineverhogingen in condities waar myocardinfarct/ ischemische hartschade minder waarschijnlijk is, zoals na extreme inspanning of bij ernstige nierinsufficiëntie
- Troponine als prognostische parameter

Release karakteristieken van troponine

In figuur 1 wordt de release van troponine na een myocardinfarct weergegeven. Voor cTnT blijkt de release in tegenstelling tot die van cTnI in twee fasen te verlopen. De oorspronkelijke hypothese was dat cTnT voor rond de 5% als vrij troponine T in het plasma circuleert en dat de eerste piek de release van het vrij circulerend troponine T betreft. Na een myocardinfarct met volledige reperfusie binnen 5 uur na de klachten werd een duidelijke piek gevonden na ongeveer 14 uur, die afwezig was bij patiënten zonder reperfusie. Voorspellen bleek echter niet betrouwbaar (12). Ook voor cTnI is een vrije cytoplasmatische fractie beschreven, maar alle releasepatronen laten slechts 1 piek zien, wat twijfels geeft over de oorspronkelijke hypothese.

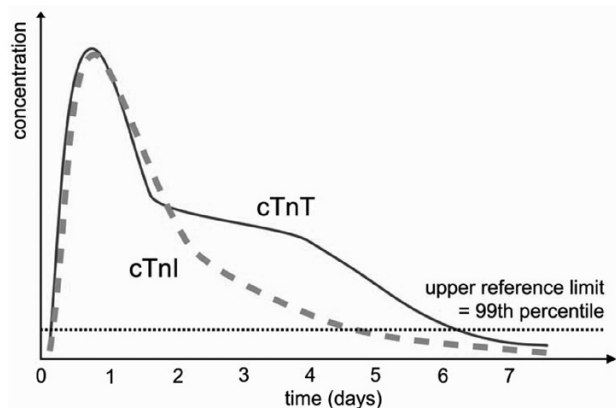
Centraal Diagnostisch Laboratorium, Maastricht Universitair Medisch Centrum, Maastricht

E-mail: mp.van.diejien.visser@mumc.nl

Met behulp van immunoblotting hebben wij voor het eerst aangetoond dat in bloed zowel intact troponine als ook fragmenten van troponine voorkomen (13-15). Kort na het myocardinfarct is hoofdzakelijk intact troponine aanwezig, terwijl later alleen nog fragmenten in de bloedbaan aanwezig zijn (16). Een andere verklaring voor de dubbele piek zou een verschil in halfwaardetijd tussen de fragmenten en het intacte troponine kunnen zijn. Verder onderzoek moet dit uitwijzen. Recent werd echter door Bates et al gesuggereerd dat troponine T uitsluitend intact in het bloed voorkomt, als TIC, IT of vrij T en gaat daarmee in tegen onze resultaten (17). In een vervolgonderzoek hebben wij deze resultaten kunnen weerleggen en aangetoond dat cTnT wel degelijk gedegradeerd voorkomt in serum (dissertatie A. Mingels, februari 2012). Het feit dat op verschillende momenten na het myocardinfarct fragmenten van troponine aanwezig zijn kan ook consequenties hebben voor het meetresultaat. Voor troponine-assays is van belang dat catcher en detector-antilichaam aangrijpen op epitopen die vlak bij elkaar liggen op het troponinemolecuul, om zo de invloed van fragmentatie op het resultaat zoveel mogelijk te beperken. Degradatie van troponine heeft uiteraard ook consequenties voor de standaardisatie en harmonisatie van met name troponine I assays. Wij hebben laten zien dat het voorgestelde goed gekarakteriseerde referentiemateriaal NIST SRM 2921 niet geschikt is als harmonisator vanwege de tijdsafhankelijke veranderingen die na toevoeging aan plasma optreden (18). CTn positief patiëntenmateriaal heeft de voorkeur als assayharmonisator voor cTnI.

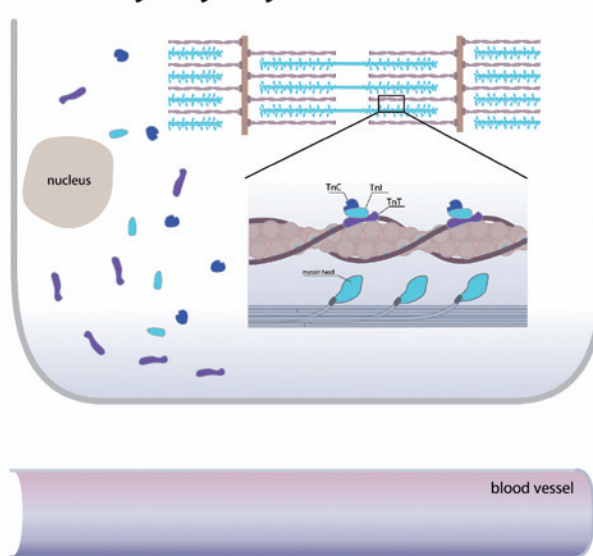
Simulatie van hartschade in gekweekte muizenhartcellen

Om te kunnen bestuderen of eiwitten, zoals troponine of afbraakproducten ervan, ook zonder celdood de cel kunnen verlaten (figuur 2), hebben we in samenwerking met de groep van Van der Laarse uit Leiden neonatale ratten cardiomyocyten blootgesteld aan metabole inhibitie met behulp van natriumazide. Deze experimenten wezen uit dat cTnT en cTnI pas uit de cel vrijkomen na irreversibele beschadiging van de cardiomyocyt (19). Bij volledige celdood (bepaald aan de hand van LDH release) werd echter slechts een deel van het oorspronkelijk in de cellen aanwezige troponine teruggevonden,

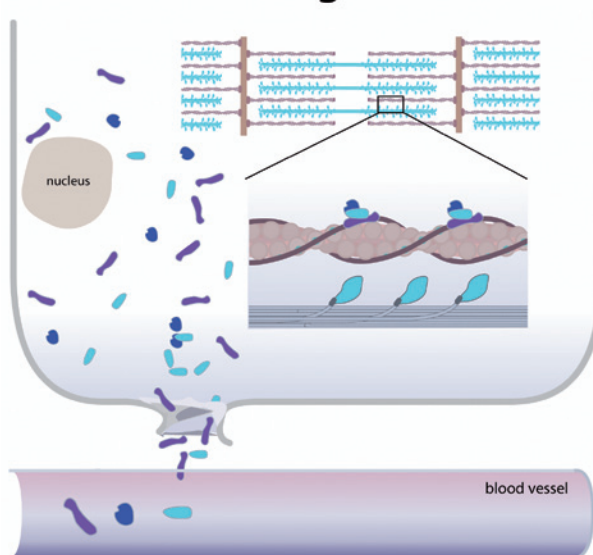


Figuur 1. Typische release kinetiek van cTnT (doorgetrokken lijn) en cTnI (stippellijn) na een acuut myocardinfarct.

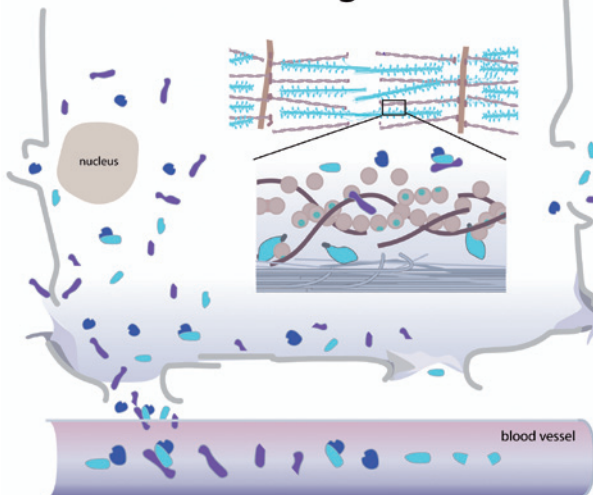
Healthy myocyte



Reversible damage



Irreversible damage



Figuur 2. Cardiale troponinerelease uit omkeerbaar en onomkeerbaar beschadigde hartcellen.

terwijl voor LDH 100% werd teruggevonden. Dit wijst op intracellulaire afbraak of moleculaire veranderingen waardoor het troponine niet meer meetbaar is. Als dit in vivo ook het geval is heeft dit consequenties voor het kwantificeren van infarcten op basis van de totale troponine-uitstorting in bloed. Dit kan mogelijk een verklaring zijn voor het feit dat kwantificeren van de infarctgrootte op basis van de cTn release een onderschatting geeft ten opzichte van de totale enzymrelease (2, 20). Voor de vervolggelaxperimenten in Maastricht hebben wij gebruik gemaakt van gekweekte muisenhartcellen (HL1-cardiomyocyten) die worden gekweekt in een speciaal medium. Deze cellen werden op verschillende manieren geprikkeld om celdood tot stand te brengen. De cellen werden hiertoe blootgesteld aan verschillende omstandigheden, zoals zuurstoftekort bij glucosedepriatie (simulatie van ischemische schade) of met elektrische hyperstimulatie (simulatie van zware inspanning). Ook in deze opstelling blijkt dat cTns alleen vrijkomen in geval van onomkeerbare cellulaire schade, maar ook hier blijkt de totale troponinerelease onvolledig, in tegenstelling tot de release van LDH (dissertatie LH Jacobs, februari 2012). Een van de theorieën is dat de release van cTn ook mogelijk is via membraanblebbing (21). Onder invloed van ischemie ontstaat in eerste instantie een vorm van exocytose, uitstulpingen (bleb) van de celwand, waarmee cytoplasma en tegelijkertijd eiwitten kunnen vrijkomen, zonder dat celdood optreedt. Tot nu toe zijn op grond van onze celkweekexperimenten vooral aanwijzingen dat cTn alleen vrijkomt bij celdood. Wat er gebeurt tijdens de apoptotische fase en of cTn release ook mogelijk is in geval van omkeerbare schade blijft nog onbeantwoord. Ook de vraag of de cTn fragmenten voor of na de celdood worden gevormd en wat de gevolgen hiervan zijn voor de contractiekracht van de hartspiercel is nog niet beantwoord. Deze vragen zijn momenteel onderwerp van verdere studie.

Troponineverhogingen bij ernstige nierschade

Patiënten met terminale nierinsufficiëntie (End Stage Renal Disease, ESRD) hebben een slechte levensverwachting en hart en vaatziekten zijn bij 30% van deze patiënten de doodsoorzaak. Bij patiënten met ESRD en verhoogde troponineconcentraties is sprake van een duidelijk slechtere prognose en een hogere mortaliteit (22). Troponineverhogingen worden bij deze patiënten echter ook in afwezigheid van klinische verdenking op myocardische gevonden. In een recente studie hebben wij aangetoond dat 32 patiënten met ESRD die gedurende 6 maanden werden vervolgd, allemaal ten minste 1 keer verhoogde hs-cTnT concentraties vertoonden (10, 23). In een eerdere studie hebben wij gesuggereerd dat de troponineverhogingen bij deze patiënten veroorzaakt worden door verminderde renale klaring van troponinefragmenten (13, 24). Dit is in lijn met het feit dat ook voor NT-proBNP bij ESRD patiënten disproporzionele verhogingen worden gevonden die mogelijk verklaard kunnen worden door verminderde klaring (25). Dit laat onverlet dat bij deze patiënten ook sprake is van hartfalen en myocardische, maar dat dit zeker niet de verhoging bij alle patiënten kan verklaren.

Troponineverhogingen bij extreme inspanning

Bij marathonlopers hebben wij met behulp van de gevoelige cTnT bepaling vlak na de marathon troponineconcentraties gevonden boven het 99^{ste} percentiel van een controlegroep. Ook hebben wij aangetoond dat de mate van training en de leeftijd belangrijke voorspelers zijn voor deze troponineverhogingen (9) en is de nierfunctie bestudeerd (26). Na het lopen van een halve marathon of korter kan al troponine in het bloed worden aangetoond (27). Belangrijke vraag is of het hierbij om reversibele of irreversibele hartschade gaat. In een vervolgstudie zal worden gekeken naar troponinerelease bij getrainde en ongetrainde personen ouder dan 50 jaar die deelnemen aan verschillende inspanningsvormen en inspanningsniveaus. Behalve biomarkers zullen ook beeldvormende technieken (CT en/of MRI) worden gebruikt. Daarmee kunnen we een eventuele vergroting of beschadiging van het hart en ook calcificaties van de coronairvaten opsporen en beoordelen.

Troponine als prognostische parameter

Behalve voor de diagnostiek blijkt troponine ook een rol te spelen als voorspeller van hart- en vaatziekten. In een recente studie hebben wij een duidelijke relatie aangetoond tussen troponineverhogingen en calcificaties van de coronairvaten die waren vastgesteld met behulp van een CT-scan (28). Ook hebben wij gezien dat hs-TnT een risicovoorspeller is in patiënten met acute dyspnoe (29). In de vervolgstudie zullen de resultaten van de CT- en/of MRI-scan en hartmarkers bij sporters worden gerelateerd aan de traditionele risicofactoren als lipidenprofiel en bloeddruk. Doel is om te komen tot een betere inschatting van risico's op hartschade bij extreme, maar ook minder extreme vormen van inspanning in een populatie sporters ouder dan 50 jaar, met en zonder verhoogd risico op hart- en vaatziekten, zoals vastgesteld met de traditionele risicofactoren. Een goede inschatting van het risico op inspanningsgerelateerde hartschade is van groot belang, zeker bij personen met verhoogd risico. Voor dit onderzoek hebben wij in 2011 een subsidie van 1.300.000 euro ontvangen van de Stichting de Weijerhorst. Dit biedt ons de mogelijkheid de komende jaren ook meer basaal onderzoek te doen naar de release van troponine onder verschillende omstandigheden en vooral naar de vraag of het om omkeerbare schade gaat.

Referenties

1. Katus HA, Remppis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kubler 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.
2. Kragten JA, Hermens WT, van Diejen-Visser MP. Cardiac troponin T release into plasma after acute myocardial infarction: only fractional recovery compared with enzymes. *Ann Clin Biochem.* 1996; 33: 314-323.
3. Kragten JA, Hermens WT, van Diejen-Visser MP. Cumulative troponin T release after acute myocardial infarction (AMI). Influence of reperfusion. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997; 35: 459-467.
4. Visser MP, Krill MTA, Willems GM, Hermens WT. Selection of a suitable model for the plasma clearance and distribution of cardiac enzymes in the dog. *Cardiovasc Res.* 1981; 15: 35-42.

5. Hermens WT, Willems GM, Visser MP. Quantification of circulating proteins. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers; 1982.
6. Wodzig WK, Kragten JA, Hermens WT, Glatz JFC, van Dieijen-Visser MP. Quantification of cardiac myoglobin and fatty acid-binding protein release after acute myocardial infarction. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997; 35: 191-198.
7. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2007; 115: 356-375.
8. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation.* 2007; 116: 2634-2653.
9. Mingels A, Jacobs L, Michielsen E, Swaanenburg J, Wodzig W, van Dieijen-Visser M. Reference population and marathon runner sera assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and I assays. *Clin Chem.* 2009; 55: 101-108.
10. Jacobs LH, van de Kerkhof J, Mingels AM, Kleijnen VW, van der Sande FM, Wodzig WK, et al. Haemodialysis patients longitudinally assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and cardiac troponin I assays. *Ann Clin Biochem.* 2009; 46: 283-290.
11. Pulkki K, Suvisaari J, Collinson P, Ravkilde J, Stavlic-Rukavina A, Hammerer-Lercher A, et al. A pilot survey of the use and implementation of cardiac markers in acute coronary syndrome and heart failure across Europe. The CARDIAC Marker Guideline Uptake in Europe (CARMA-GUE) study. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47: 227-234.
12. Rempis A, Scheffold T, Karrer O, Zehelein J, Hamm C, Grunig E, et al. Assessment of reperfusion of the infarct zone after acute myocardial infarction by serial cardiac troponin T measurements in serum. *Br Heart J.* 1994; 71: 242-248.
13. Diris JH, Hackeng CM, Kooman JP, Pinto YM, Hermens WT, van Dieijen-Visser MP. Impaired renal clearance explains elevated troponin T fragments in hemodialysis patients. *Circulation.* 2004; 109: 23-25.
14. Michielsen EC, Diris JH, Hackeng CM, Wodzig WK, van Dieijen-Visser MP. Highly sensitive immunoprecipitation method for extracting and concentrating low-abundance proteins from human serum. *Clin Chem.* 2005; 51: 222-224.
15. Michielsen EC, Diris JH, Kleijnen VW, Wodzig WK, van Dieijen-Visser MP. Size-exclusion chromatography of circulating cardiac troponin T. *Clin Chem.* 2006; 52: 2306-2307.
16. Michielsen EC, Diris JH, Kleijnen VW, Wodzig WK, van Dieijen-Visser MP. Investigation of release and degradation of cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem.* 2007; 40: 851-855.
17. Bates KJ, Hall EM, Fahie-Wilson MN, Kindler H, Bailey C, Lythall D, et al. Circulating immunoreactive cardiac troponin forms determined by gel filtration chromatography after acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 2010; 56: 952-958.
18. Cobbaert CM, Weykamp CW, Michielsen EC, Baadenhuijsen H, van Dieijen-Visser MP. Time-dependent instability of cardiac troponins in human plasma spiked with NIST reference material 2921. *Clin Chem.* 2008; 54: 2078-2079.
19. Hessel MH, Atsma DE, van der Valk EJ, Bax WH, Schalij MJ, van der Laarse A. Release of cardiac troponin I from viable cardiomyocytes is mediated by integrin stimulation. *Pflugers Arch.* 2008; 455: 979-986.
20. Diris JHC, Kragten JA, Kleine AH, Hermens WT, van Dieijen-Visser MP. Effect of acute phase response on cumulative troponin T release. *Clin Chem Lab Med.* 2000; 38: 955-959.
21. Hickman PE, Potter JM, Aroney C, Koerbin G, Southcott E, Wu AH, et al. Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. *Clin Chim Acta.* 2010; 411: 318-323.
22. Apple FS, Murakami MM, Pearce LA, Herzog CA. Predictive value of cardiac troponin I and T for subsequent death in end-stage renal disease. *Circulation.* 2002; 106: 2941-2945.
23. Jacobs LH, van de Kerkhof JJ, Mingels AM, Passos VL, Kleijnen VW, Mazairac AH, et al. Inflammation, overhydration and cardiac biomarkers in haemodialysis patients: a longitudinal study. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25: 243-248.
24. Diris JH, van Dieijen-Visser MP. Significance of serum troponin T in patients with kidney disease. *Ann Clin Biochem.* 2004; 41: 346; author reply
25. Jacobs LH, Mingels AM, Wodzig WK, van Dieijen-Visser MP, Kooman JP, Srisawasdi P, et al. Renal dysfunction, hemodialysis, and the NT-proBNP/BNP Ratio. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134: 516-517.
26. Mingels A, Jacobs L, Kleijnen V, Wodzig W, van Dieijen-Visser M. Cystatin C a marker for renal function after exercise. *Int J Sports Med.* 2009; 30: 668-671.
27. Mingels AM, Jacobs LH, Kleijnen VW, Laufer EM, Winkens B, Hofstra L, et al. Cardiac troponin T elevations, using highly sensitive assay, in recreational running depend on running distance. *Clin Res Cardiol.* 2010; 99: 385-391.
28. Mingels AM, Laufer EM, Winkens MH, Joosen IA, Schellings MW, Leiner T, et al. The extent of coronary atherosclerosis is associated with increasing circulating levels of high sensitive cardiac troponin T. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biol.* 2010; 30: 1269-1275.
29. Jacobs LHJ, Van Wijk S, Eurlings LW, van Kimmenade R, Lemmers R, Broos P, et al. Troponin T measurements by high sensitivity versus conventional assays for risk stratification in acute dyspnea. *Clin Chem.* 2012, accepted.