

The state and diagnostic value of plasma tissue factor in early-hospitalised patients with chest pain

Citation for published version (APA):

van der Putten, R. F. M. (2005). *The state and diagnostic value of plasma tissue factor in early-hospitalised patients with chest pain*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2005

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY



Chest pain is a common presentation complaint in the emergency department and the task of evaluating and diagnosing chest pain is a major challenge in health care. Acute coronary syndromes (ACS) refer to any constellation of clinical symptoms that are compatible with acute myocardial ischemia. ACS therefore encompasses acute myocardial infarction (AMI), unstable angina pectoris (UAP) and sudden cardiac death. More rapid triaging of patients admitted to the hospital with chest pain suggestive of AMI is needed (i) to facilitate early intervention with thrombolytic therapy or angioplasty in patients with AMI, (ii) to determine which patients require admission to the intensive care unit, and (iii) to exclude low-risk patients who can be safely sent home and followed as outpatients (cost reduction).

Commonly, about half of all patients presenting with chest pain is rapidly identified as low-risk and sent home. Of the other patients with chest pain, in about 40% of cases diagnosis of AMI is readily made on the basis of clinical history and ECG changes; in the remaining 60%, however, AMI diagnosis and its discrimination from UAP is not easy while the prevalence of AMI is low (about 10%). AMI diagnosis in this subgroup of patients is usually made with plasma (or serum) markers of myocardial necrosis, but these markers show poor performance in the early hours after AMI. Since intra-coronary blood clot formation precedes coronary occlusion and muscle necrosis, detection of activated coagulation potentially allows early detection of AMI.

Intra-coronary thrombosis plays a key role in the pathogenesis of ACS, and it has been shown that the prothrombotic activity of human atherosclerotic lesions is associated with the presence of tissue factor (TF), a cellular transmembrane protein which, after its exposure to blood, initiates blood coagulation. As a result, for many years, the prevailing view on acute intra-coronary thrombosis has been that it is caused by exposure to plasma of TF in endothelial lesions, for instance due to plaque rupture. More recently, however, a novel hypothesis has been put forward in which TF present in the circulating blood may participate in hemostasis and thrombosis. In this view, microparticle-associated TF that circulates in plasma plays a significant role in hemostasis by enabling the generation of fibrin at the site of the growing thrombus.

A number of studies have reported increased plasma TF antigen levels in the acute phase in patients with UAP and AMI, but the interpretation of these data is complicated by the fact that it is not clear whether plasma TF is in a functional or in a non-functional form. Since a small amount of active TF in plasma would cause acute thrombosis, it is clear that *in situ* functionality must be limited, but the protein could circulate in an 'encrypted' or a potentially active form. Such encryption could be undone by various (patho-)

physiological triggers, such as by the exposure of procoagulant cellular phospholipids. Alternatively, plasma TF antigen could partially consist of irreversibly damaged molecules, still retaining their antigenic epitopes, for instance due to proteolytic activity in plasma as has been described for several other proteins. Also, a less active form of plasma TF, alternatively-spliced human TF (ashTF), has recently been described. Unfortunately, due to the limited availability of assays that are capable of measuring plasma TF activity, the role of plasma TF remains poorly understood.

Therefore, the principal aims of the studies described in this thesis were to develop sensitive assays for the measurement of TF antigen and of TF activity in plasma, and to evaluate the use of plasma TF antigen and TF activity, in combination with other markers of activated blood coagulation and with fatty acid-binding protein (FABP, an early marker of myocardial necrosis) in the diagnosis of patients presenting at the emergency department with chest pain suggestive of ACS.

In *Chapter 1* a brief introduction into the diagnosis of ACS is provided. It is explained that markers of myocardial necrosis are important in a number of cases, but that they are not detectable until a few hours after the acute event. In contrast, markers of coagulation activation are rapidly cleared from the circulation, and thus become less useful with longer periods after the acute event. Therefore, in order to establish an accurate diagnosis that is independent on the delay of the patient to the hospital, it could be useful to combine plasma markers of coagulation activation and plasma markers of myocardial necrosis.

A survey of important studies that have evaluated plasma levels of coagulation markers in the early hours after onset of ACS is presented in *Chapter 2*. Only studies were discussed in which blood sampling in ACS patients had been performed on admission to the hospital, before antithrombotic or thrombolytic medication had been administered or revascularization procedures were initiated, and in which markers in these patients were compared with at least one control group. It was evident from these studies that, although there is compelling evidence for a major role of arterial thrombosis in the development of ACS, only a few studies have reported on the sensitivity and specificity of hemostatic markers and their combination with markers of myocardial necrosis to detect ACS in a clinical setting. The results from these studies were non-conclusive and were difficult to compare because they differed in: i) inclusion/exclusion criteria; ii) definitions of AMI and UAP; iii) reference groups; iv) assays and v) cut-off values that were used.

In *Chapter 3* the development of a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of plasma TF antigen is described, using high-

affinity monoclonal antibodies that were raised against recombinant soluble TF. In healthy donors normal ranges for plasma TF antigen were 2.5 (1.0-9.3) pM, 3.4 (2.2-17.6) pM, 3.4 (2.4-19.2) pM and 2.8 (1.3-9.8) pM for citrated, EDTA, heparinized plasma and serum, respectively. Furthermore, in plasma samples from type 2 diabetic patients intra-individual TF antigen variation for this new assay (14%) was lower than for the Imubind TF ELISA (49%), a commercial ELISA that is often used to study plasma TF antigen levels. The difference is explained by the fact that the new ELISA has a detection limit of 40 fM, which is about 6 times lower than that for existing assays. Apparently, much of the earlier reported large intra-individual variation was caused by assay imprecision. Plasma TF antigen levels in type 2 diabetic patients were 3.0 (0.9-24.3) pM, and were not significantly different from those in healthy donors (2.5 (1.0-9.3) pM).

A capture assay for measurement of plasma TF activity is described in *Chapter 4*. This assay uses one of the high-affinity anti-TF antibodies that were also used in the new ELISA, bound to Affigel. After capture from plasma, the TF was eluted from the gel and reconstituted into phospholipid-glucoside micelles, avoiding time-consuming dialysis. Full-length recombinant human TF is used as activity calibrator which, by determination of its k_{cat} ($1.9 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$), allows expression of activities in pM of active protein. The detection limit for this assay is 80 fM. All plasma TF was found to be exposed for capture, and in healthy donors normal ranges for plasma TF activity were 2.0 (1.3-4.2) pM and 2.3 (1.3-5.3) pM for citrated and EDTA plasma, respectively. No plasma TF activity was found in heparinized plasma and serum, which may be explained by inhibition of TF by its natural inhibitor: tissue factor pathway inhibitor (TFPI). No TF activity was found for plasma TF in its *in vivo* proteo-lipid matrix, and it was concluded that TF activity in systemic plasma is 'encrypted', possibly due to the absence of procoagulant phospholipids. However, the majority of TF antigen in plasma is 'potentially active', i.e., can be reactivated after incorporating TF into a procoagulant phospholipid matrix.

The characteristics of FABP, considered to be the earliest marker of myocardial necrosis, are reviewed in *Chapter 5*. For patients not treated with thrombolytics, elevated plasma FABP levels are detectable as soon as 1-3 hours after onset of AMI, whereas peak values are reached 6-8 hours after onset of AMI. Plasma FABP levels return to their reference value within 24-36 hours after the onset of chest pain, indicating the usefulness of this marker particularly for the assessment of recurrent infarction. Several clinical studies with patients suspected of having AMI reveal a superior performance of FABP over myoglobin (often used as early necrosis marker) for the *early* detection of AMI. This finding is likely due to marked differences in tissue contents of FABP and myoglobin in cardiac and skeletal muscles that result in a relatively low upper reference concentration in plasma for FABP (6 $\mu\text{g/L}$) compared with

that for myoglobin (60 µg/L). The differences in tissue contents are also reflected in the plasma concentrations of these proteins after either cardiac or skeletal muscle injury, in such a manner that the ratio of the plasma concentrations of myoglobin and FABP can be applied to discriminate myocardial from skeletal muscle injury.

In *Chapter 6*, the new TF assays were used to study plasma TF antigen and TF activity levels in ACS patients. The median value (with range) of 2.2 (1.1-9.8) pM for TF antigen found in non-cardiac chest pain patients confirmed the values that were found in healthy controls (2.5 (1.0-9.3) pM). Most TF antigen circulated in a potentially active form, the remaining 20-30% of TF antigen could consist of a recently detected alternatively-spliced variant. When left in its *in vivo* state, TF captured from plasma was totally inactive, possibly due to the absence of a procoagulant matrix. Compared to the TF activity of controls with non-cardiac chest pain (1.7 (0.3-31.8) pM), TF activity in ACS patients was unchanged (2.0 (0.4-24.2) pM) and TF antigen was about 25% elevated in ACS patients (2.7(1.3-14.8) pM). In a diagnostic panel with prothrombin fragment 1+2 (F1+2) and FABP, TF antigen elevations did not significantly improve the early diagnosis of ACS.

Finally, in *Chapter 7*, the main findings of this thesis are summarized and their contributions to the thoughts on the current role of plasma TF in hemostasis and thrombosis are discussed.

SAMENVATTING

| <

Pijn op de borst is een klacht die vaak wordt gehoord op de spoedeisende hulp. Bij een dergelijke klacht is het in een aantal gevallen nog moeilijk om snel een juiste diagnose te stellen. Acute coronaire syndromen (ACS) worden gekenmerkt door klinische symptomen die duiden op de aanwezigheid van cardiale ischemie - zuurstofgebrek in het hart. ACS zijn het acute hartinfarct (AMI, acute myocardial infarction), instabiele angina pectoris (UAP, unstable angina pectoris) en plotselinge hartdood. Een snelle diagnose bij patiënten die zich presenteren met pijn op de borst is nodig om: (i) bij AMI-patiënten een vroege interventie met trombolytische therapie of revascularisatie-procedures mogelijk te maken, (ii) te bepalen welke patiënten moeten worden opgenomen op de intensive care-afdeling, (iii) patiënten met weinig risico op complicaties snel en veilig naar huis te sturen (kostenbesparing).

Van ongeveer de helft van alle patiënten die zich presenteren met pijn op de borst wordt vastgesteld dat ze weinig risico lopen op complicaties: ze kunnen veilig naar huis worden gestuurd. Van de overige patiënten met pijn op de borst wordt in ongeveer 40%, op basis van hun klinische voorgeschiedenis en veranderingen die op het electrocardiogram (ECG) zichtbaar zijn, de diagnose AMI gesteld. In de resterende 60% is de diagnose AMI en het onderscheid met UAP niet gemakkelijk te maken, terwijl AMI in deze groep uiteindelijk maar weinig voorkomt (~10%). De diagnose AMI wordt in deze groep gesteld na het meten van de concentraties en/of activiteiten van markers van hartspierweefselschade in (bloed-)plasma of serum. Markers van hartspierweefselschade zijn echter niet bruikbaar in de eerste uren na AMI. Aangezien AMI meestal het gevolg is van een bloedstolsel, dat zich vormt op een geruptureerde atherosclerotische plaque en vervolgens een kransslagader geheel afsluit, maakt het meten van markers van geactiveerde bloedstolling in plasma wellicht een vroege detectie van AMI mogelijk.

Er is aangetoond dat de mate van stolselvorming op gescheurde atherosclerotische plaques sterk samenhangt met de aanwezigheid van tissue factor (TF) daarin. TF, dat zich in de vaatwand bevindt, is een transmembraan-eiwit dat de bloedstollingscascade start als het in contact komt met de stollingsfactoren in het bloed. Het endotheel aan de binnenkant van de vaatwand vormt een barrière tussen het vaatwand-TF en deze stollingsfactoren. Jarenlang werd gedacht dat hemostase (of trombose) werd veroorzaakt doordat vaatwand-TF na beschadiging van het endotheel (of geruptureerde atherosclerotische plaques) werd blootgesteld aan het bloed. Recentelijk is echter aangetoond dat TF onder fysiologische omstandigheden niet alleen in de vaatwand zit, maar ook in het bloed! Sindsdien zijn wetenschappers geïnteresseerd in de rol van dit zogenoemde 'blood-borne TF' in hemostase en trombose. Op basis van de huidige kennis veronderstelt men

| 173

dat TF, dat gebonden aan micropartikels in plasma circuleert, mogelijk belangrijk is voor de vorming van fibrine op het oppervlak van het groeiende stolsel.

Een aantal publicaties laten verhoogde waarden van TF-antigeen (TF-concentraties) in plasma zien in de eerste uren van UAP en AMI. Omdat onduidelijk is of het plasma-TF in een functionele vorm circuleert, is het moeilijk om te zeggen wat dit betekent. Aangezien al een klein beetje actieve TF in plasma onmiddellijk trombose veroorzaakt, ligt het voor de hand te veronderstellen dat de TF-activiteit in plasma *in vivo* laag zal zijn. Het is echter onduidelijk in welke vorm plasma-TF circuleert. TF zou in een 'encrypted'-vorm kunnen circuleren, d.w.z., TF is inactief, maar kan actief worden gemaakt door verschillende (patho-)fysiologische 'triggers', bijv. door het in contact te brengen met procoagulante cellulaire fosfolipiden. Ook zou TF in plasma irreversibel beschadigd (maar nog wel antigeen) kunnen zijn, bijv. door proteolytische activiteit in plasma, zoals ook voor andere eiwitten is beschreven. Een minder functionele vorm van TF in plasma is beschreven - 'alternatively-spliced human TF' (ashTF). Doordat een geschikte methode voor het meten van TF-activiteit in plasma ontbreekt, is de rol van het plasma-TF in hemostase en trombose nog niet opgehelderd.

De belangrijkste doelstellingen van het in dit proefschrift beschreven onderzoek waren: i) het ontwikkelen van gevoelige methoden om TF-antigeen en TF-activiteit in plasma te kunnen meten, ii) het evalueren van het meten van TF-antigeen en TF-activiteit in combinatie met enkele andere bloedstollingsmarkers en met fatty acid-binding proteïne (FABP, een vroege marker van hartspierweefselschade) in de diagnose van patiënten die zich in het ziekenhuis presenteren met pijn op de borst.

In *Hoofdstuk 1* wordt uitgelegd wat acute coronaire syndromen zijn, en hoe de diagnose AMI wordt gesteld. In een aantal situaties zijn hartspierweefselmarkers hierbij onmisbaar, maar deze kunnen pas enkele uren na het begin van een AMI in het bloed worden gemeten. Markers van stollingsactivatie zijn vaak verhoogd na AMI, maar worden ook weer snel uit het bloed geklaard. Naarmate het langer geleden is dat de pijn op de borst voor het eerst werd gevoeld, worden deze stollingsmarkers dus minder bruikbaar. Om onafhankelijk van de vertraging van de patiënt tot het ziekenhuis snel een juiste diagnose te kunnen stellen, lijkt het zinvol markers van bloedstollingsactivatie en hartspierweefselschade te combineren.

In *Hoofdstuk 2* wordt een overzicht gegeven van belangrijke studies die stollingsactivatie in de eerste uren na het begin van ACS hebben bestudeerd. Alleen studies worden besproken waarbij bloed werd afgenomen vóór antitrombotische of trombolytische medicatie werd toegediend, en/of revascularisatieprocedures werden gestart. Ook moesten de stollingsmarkers

in de ACS-groepen zijn vergeleken met minimaal één controlegroep. Hoewel er overtuigend bewijs is voor een belangrijke rol van arteriële trombose in de pathogenese van ACS, blijkt uit dit overzicht dat er maar enkele studies zijn die de sensitiviteit en specificiteit van stollingsmarkers in een klinische studie hebben bepaald. Uit het overzicht zijn geen eenduidige conclusies te trekken: de studies zijn moeilijk te vergelijken omdat ze verschillen in: i) inclusie- en exclusiecriteria; ii) gehanteerde definities van AMI en UAP; iii) gebruikte referentiegroepen; iv) gebruikte assays (meetmethoden) en v) gekozen grenswaarden (cut-off waarden).

De ontwikkeling van een nieuw immunoassay (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) voor het meten van TF-antigeen in plasma wordt beschreven in *Hoofdstuk 3*. In dit assay worden monoclonale antistoffen gebruikt met een hoge affiniteit voor TF die zijn opgewekt tegen 'recombinant soluble TF'. Het referentie-interval voor TF-antigeen is bepaald in plasma van gezonde donoren, en was 2.5 (1.0-9.3) pM, 3.4 (2.2-17.6) pM, 3.4 (2.4-19.2) pM en 2.8 (1.3-9.8) pM TF-antigeen voor citraat-, EDTA-, heparineplasma en serum, respectievelijk. In plasma van patiënten met type 2 diabetes werd aangetoond dat de intra-individuele variatie voor dit nieuwe assay (14%) lager is dan voor de Imubind TF ELISA (49%), een commerciële ELISA die in de literatuur vaak is beschreven. Het verschil wordt verklaard doordat de nieuwe ELISA een detectielimiet heeft van 40 fM. Dat is zo'n 6 keer lager dan die van de meeste andere TF-assays. De intra-individuele variatie van het nieuwe TF-assay wordt grotendeels veroorzaakt door de inter-assayvariatie. Bij patiënten met type 2 diabetes (3.0 (0.9-24.3) pM) werd geen verschil in TF-antigeen gemeten ten opzichte van gezonde donoren (2.5 (1.0-9.3) pM).

Een nieuw assay voor het meten van TF-activiteit in plasma wordt beschreven in *Hoofdstuk 4*. Een van de TF-antistoffen die worden gebruikt in de ELISA, wordt in dit assay gekoppeld aan agarose-gel. Hiermee wordt het TF uit plasma gevangen. Na het wegwassen van de niet-gebonden bestanddelen van plasma, wordt het TF losgemaakt van de gel en opgenomen in fosfolipiden-glucoside micellen. Een tijdrovende dialyseprocedure was niet nodig om de TF-activiteit van het gereconstitueerde TF te kunnen bepalen. Als calibrator wordt 'full-length recombinant human TF' gebruikt. Door de katalytische constante (k_{cat}) van de calibrator ($1.9 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$) te bepalen, kon de TF-activiteit in plasma worden uitgedrukt in pmol/L actief eiwit. De detectielimiet van het assay is 80 fM.

Alle TF kon uit het plasma worden gebonden, dus TF in plasma is volledig geëxposeerd. Het referentie-interval voor TF-activiteit werd bepaald in plasma van gezonde donoren en was 2.0 (1.3-4.2) pM en 2.3 (1.3-5.3) pM voor citraat- en EDTA-plasma, respectievelijk. In heparineplasma en serum werd geen TF-activiteit gevonden. Dit wordt mogelijk veroorzaakt doordat de natuurlijke remmer van TF-activiteit in plasma (tissue factor pathway

inhibitor (TFPI)) in heparineplasma en serum actief is. Er werd ook geen TF-activiteit gevonden voor TF in zijn *in vivo* matrix. Daarom werd geconcludeerd dat TF-activiteit in plasma 'encrypted' (afgeschermd) is, mogelijk door de afwezigheid van procoagulante fosfolipiden. Toch is de meerderheid van het TF in plasma 'potentieel actief': het meeste TF in plasma kon actief worden gemaakt door het op te nemen in een procoagulante fosfolipidenmatrix.

De eigenschappen van FABP, dat wordt beschouwd als de vroegste marker van hartspierweefselschade, worden besproken in *Hoofdstuk 5*. Bij patiënten die niet met trombolytica zijn behandeld, kunnen 1-3 uur na het begin van AMI verhoogde FABP-concentraties in plasma worden gemeten. De hoogst gemeten waarde (peak value) van FABP wordt 6-8 uur na het begin van AMI gemeten. De FABP-waarden in plasma zijn 24-36 uur na het begin van pijn op de borst weer normaal, zodat deze marker ook uitermate geschikt is om een nieuw infarct te detecteren. Uit klinische studies blijkt dat FABP een betere marker voor de vroege detectie van AMI is dan myoglobine (dat nu nog vaak wordt gebruikt als vroegste hartspierweefselmarker). Waarschijnlijk komt dit door het verschil in weefselgehalte van FABP en myoglobine in hart- en skeletspierweefsel. FABP heeft een relatief lagere bovenste referentiewaarde in plasma (6 µg/L) dan myoglobine (60 µg/L). Dit verschil komt ook tot uitdrukking in de plasmaconcentraties van deze eiwitten na hart- of skeletspierschade. Zo kan de verhouding in plasmaconcentratie van myoglobine en FABP worden gebruikt om onderscheid te maken tussen hart- en skeletspierschade.

In *Hoofdstuk 6* worden de nieuwe assays gebruikt om TF-antigeen en TF-activiteit in plasma van ACS-patiënten te bepalen. De mediaan (met bereik) van 2.2 (1.1-9.8) pM voor TF-antigeen die werd gemeten in de NCCP-controlegroep (non-cardiac chest pain) bevestigt de waarden die eerder werden gemeten in het plasma van gezonde donoren (2.5 (1.0-9.3) pM). Het meeste TF-antigeen circuleert in een potentieel actieve vorm. De resterende 20-30% bestaat mogelijk uit 'alternatively-spliced human TF'. Vergeleken met de TF-activiteit van de NCCP-groep (1.7 (0.3-31.8) pM), was de TF-activiteit in ACS patiënten niet verhoogd (2.0 (0.4-24.2) pM). TF-antigeen was ongeveer 25% verhoogd in ACS patiënten (2.7(1.3-14.8) pM), maar in een panel met protrombine fragment 1+2 en FABP, had TF-antigeen geen toegevoegde waarde bij de diagnose van ACS.

Tenslotte worden in *Hoofdstuk 7* de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift nog eens samengevat en wordt de bijdrage hiervan aan de ideeën over de mogelijke rol van plasma-TF in hemostase and trombose besproken.