



Сердечный тропонин I



Оглавление

Введение	3
Антитела, специфичные к различным эпитопам сТnI	4
Концепция высокочувствительного анализа сТnI	5
Факторы, влияющие на измерения сТnI	6
Разработка анализа сТnI и рекомендованные пары	10
Гетерогенность форм сТnI в крови человека и стандартизация анализа	13
Антитела для обнаружения сТnI или фрагментов сТnI методом вестерн-блоттинга	14
Антитела для обнаружения сТnI у разных видов животных	14
Сердечный тропонин I (сТnI) и тропониновый комплекс	16
Сердечный тропонин T (сТnT)	18
Тропонин C (TnC)	20
Список использованной литературы	21
Избранные статьи ученых Хайтест о тропонине	22
Информация для заказа	24

Условные сокращения

AMI (ОИМ)	– Острый инфаркт миокарда
сс	– клеточная культура; производится <i>in vitro</i> (встречается в кат. № или названии моноклона)
сТnI	– сердечный тропонин I
TnI	– тропонин I
сТnT	– сердечный тропонин T
НАМА	– человеческие антитела, специфичные к антителам мыши
hs-сТn	– высокочувствительный сердечный тропонин
MAb	– моноклональное антитело
skTnI	– скелетный тропонин I
skTnT	– скелетный тропонин T
Tn	– Тропонин
TnC	– Тропонин C

Введение

Тропонин I является субъединицей тропонинового комплекса (Тп), который представляет собой гетеромерный белок, связанный с актиновым филаментом. Тропониновый комплекс играет важную роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц. Комплекс состоит из трех субъединиц: тропонин Т (ТпТ), тропонин I (ТпI) и тропонин С (ТпС). Эти субъединицы удерживаются вместе нековалентными взаимодействиями. ТпТ является тропомиозин-связывающей субъединицей, которая регулирует взаимодействие между тропониновым комплексом и актиновым филаментом. Субъединица ТпI отвечает за ингибирование образования актомиозина при низких внутриклеточных концентрациях Ca^{2+} . Субъединица ТпС связывает ионы Ca^{2+} во время возбуждения мышцы и изменяет конформацию тропонинового комплекса, тем самым обеспечивая образование актомиозинового комплекса и последующее сокращение мышц (1).

У человека ТпI и ТпТ представлены тремя изоформами каждый. Для ТпI, как и для ТпТ, характерна экспрессия двух разных изоформ скелетных мышц (skTnI и skTnT): одна в медленно сокращающихся скелетных мышцах (slow skeletal Тп, ssTnI или ssTnT) и одна в быстро сокращающихся скелетных мышцах (fast skeletal Тп, fsTnI или fsTnT). Третья изоформа ТпI и ТпТ (сТnI и сТnT) типична для сердечной мышцы. В то время как сТnI представлен исключительно в сердечной ткани (2), сТnT, вероятно, менее специфичен и может временно присутствовать в некоторых формах пораженных скелетных мышц (3).

В конце 1980-х годов сТnI (4), а затем сТnT (5) были предложены в качестве маркеров гибели клеток сердца. В настоящее время оба белка широко используются в качестве рекомендованных маркеров для диагностики острого инфаркта миокарда (ОИМ) (6–9), а также маркеров повреждения миокарда при клинических патологиях, таких как постоперационное травмирование миокарда, химиотерапия, кардиотоксичность и многие другие заболевания, связанные с повреждением сердечной мышцы.

Антитела, специфичные к различным эпитопам cTnI

В Хайтест мы работаем с антителами к cTnI более 20 лет, и за это время мы создали и проанализировали тысячи антител, специфичных к cTnI. Лучшие из них были отобраны для дальнейшего производства. Наш отбор антител включает в себя антитела, специфичные к различным эпитопам молекулы cTnI (см рисунок 1).

Антитела компании Хайтест широко используются в коммерческих анализах cTnI, которые основаны на различных типах платформ, таких как: ИФА, турбидиметрия, иммунохроматографический анализ (ИХА или Lateral Flow) и магнитные частицы. Антитела также применяются для научных исследований в таких методах как вестерн-блоттинг, иммуногистохимия и многие другие.

Антитела, доступные в разных форматах.

В настоящее время все наши антитела производятся в форме *in vivo*. Некоторые антитела также доступны *in vitro*. Мы советуем выбирать форму, произведенную *in vitro*, для разработки иммуноанализа, если таковая имеется. Кроме того, теперь мы можем предложить несколько антител в виде химерных рекомбинантных белков. Эти моноклональные антитела состоят из исходных переменных доменов мыши и константных доменов антител человека. Химерные моноклональные антитела помогают избежать ложноотрицательных и ложноположительных результатов, вызванных реакцией человеческих антител на мышинные антитела (НАМА-эффект), в иммуноанализах (см. страницу 9).

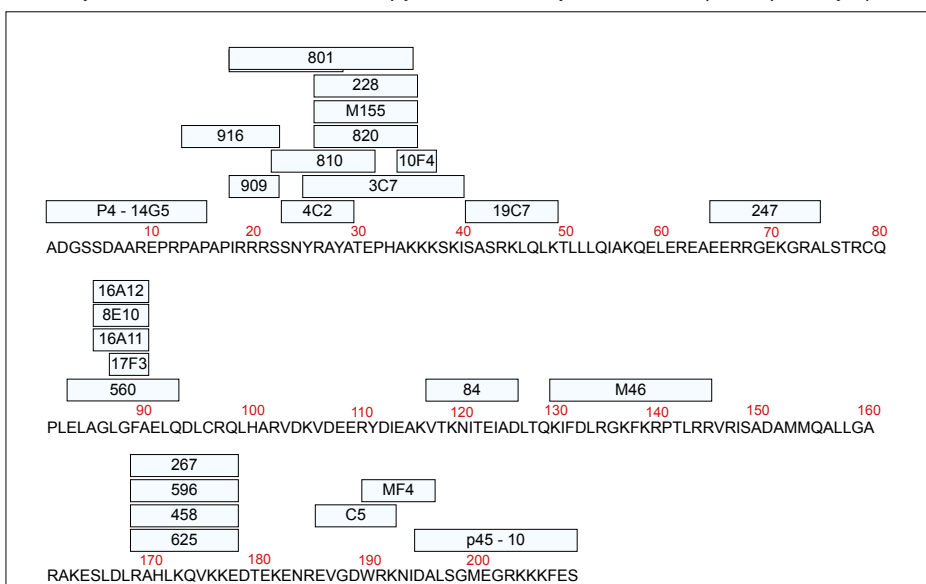


Рисунок 1. Эпитопное картирование моноклональных антител Хайтест к сердечному тропонину I.

Мы предлагаем более 30 специально отобранных антител, которые специфичны к различным эпитопам аминокислотной последовательности молекулы cTnI. Специфичность эпитопов для всех моноклональных антител была точно определена либо с помощью метода дот-блоттинга, либо с помощью других методов, в которых использовались разные библиотеки пептидов.

Концепция высокочувствительного анализа для выявления сердечного тропонина

В конце 1990-х годов современные анализы сТпI (и сТпT) смогли определить концентрацию сТп в крови пациентов на уровнях нг/мл (мкг/л). На практике эти анализы позволили надежно обнаружить сТп всего через 3–6 часов после появления ишемических симптомов, таких как загрудинные боли. Это означало, что сердечные тропонины считались довольно поздними маркерами ОИМ. В противоположность этому, недавние высокочувствительные тесты для определения концентрации сТп (далее hs-сТп), предел чувствительности которых составляет пг/мл (нг/л), а не нг/мл, позволили выявить любое повреждение миокарда, в том числе у пациентов с ОИМ через 1–3 часа после первого приступа; что представляет собой потенциальную 3-часовую экономию времени для обеспечения более быстрой постановки диагноза и, соответственно, лечения пациентов. Высокочувствительные тесты на определение сТп сделали сТп ранними маркерами ОИМ.

Нынешнее поколение коммерчески доступных анализов hs-сТп примерно в 1000 раз более чувствительно (10 нг/л против 10 нг/мл), чем первый анализ сТпI, описанный Каммингсом в 1987 году (4). Высокочувствительные тесты для определения сердечного тропонина способны выявлять незначительные события травмы сердца из длинного списка патологий, которые вызывают некроз ткани миокарда или гибель клеток (8).

Концепция высокочувствительного анализа для определения сТп, его аналитические характеристики и то, что следует знать при внедрении этих анализов в клиническую практику, подробно описаны в недавно опубликованных статьях и обзорах (10–15).



Высокочувствительный анализ для определения концентрации сердечного тропонина

Анализ hs-сТп – это метод, который удовлетворяет двум следующим критериям (16):

1. Верхний контрольный предел (URL) 99-го перцентиля, измеренный с аналитической неточностью (% CV; коэффициент вариации) $\leq 10\%$ и
2. Измеряет концентрации при \geq пределе обнаружения (LoD) у $\geq 50\%$ здоровых людей.

Факторы, влияющие на измерение cTnI

cTnI является очень сложным объектом, который имеет непростой «биохимический характер». Мы потратили годы на изучение cTnI, чтобы лучше понять его биохимические характеристики и посттрансляционные модификации. Наши знания позволили нам лучше понять, какие требования к антителам необходимы для разработки чувствительного количественного иммуноанализа, позволяющего проводить точные измерения в крови.

Хотя cTnI считается золотым стандартом для диагностики повреждения клеток сердечной мышцы, в настоящее время не существует стандартизации между многими различными диагностическими системами, предназначенными для количественных измерений cTnI в крови человека. Таким образом, в одном и том же образце крови часто определяются различные

концентрации cTnI, когда он анализируется с помощью различных коммерческих анализов cTnI.

Наиболее распространенной причиной расхождений между различными измерениями концентрации TnI является различие в эпитопной специфичности антител, которые используются в различных анализах. На измерения концентрации тропонина I оказывают влияние многочисленные факторы. Это и протеолитическая деградация, и комплексообразование cTnI с другими белками, и наличие гепарина в образце, а также cTnI-специфические аутоантитела и гетерофильные антитела, которые могут присутствовать в крови пациента. Различные моноклональные и поликлональные антитела, которые используются в анализах, в разной степени чувствительны к этим факторам.

Кардиоспецифичность

У людей могут встречаться три различные изоформы TnI. Изоформа cTnI является кардиоспецифичной, а ssTnI и fsTnI экспрессируются в скелетных мышцах. Эти три белка являются высоко гомологичными: идентичность последовательности между cTnI и медленным ssTnI составляет приблизительно 52%, а идентичность последовательности между cTnI и ssTnI составляет 46%. На рисунке 2 показано сходство последовательностей между белками cTnI и fsTnI. Помимо дополнительных 30 аминокислотных остатков на N-конце молекулы cTnI, только очень короткие фрагменты являются уникальными для cTnI. В результате этого разработка антител к cTnI без перекрестной реакции со скелетными

изоформами является сложной задачей. В связи с этим, следует учитывать кросс-реактивность антител при разработке иммуноанализа.

Концепция высокочувствительного анализа для определения cTnI предъявляет особые требования в отношении кардиоспецифичности антител. Действительно, даже низкая (0,1% или менее) перекрестная реакция с изоформами скелетного TnI в высокочувствительном анализе может привести к ложным положительным результатам и ошибочным результатам, если концентрация skTnI в крови пациента повышается.

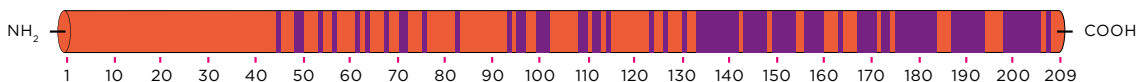


Рисунок 2. Сходство последовательностей между cTnI и двумя изоформами скелетных мышц TnI. Части, которые являются уникальными для cTnI, отмечены оранжевым цветом.



cTnI – сложный объект для количественных измерений.

На количественное измерение сердечного тропонина I в крови пациентов могут влиять несколько факторов, изменяя доступность эпитопов для связывания антител. Это может быть, например, фосфорилирование, протеолитическая деградация или блокирование эпитопов аутоантителами.

Влияние этих факторов на взаимодействие антител с cTnI является многомерным. Например, хорошо известно, что изолированный cTnI очень восприимчив к протеолитической деградации. В тропониновом комплексе же центральная часть cTnI тесно взаимодействует с TnC, и это взаимодействие защищает cTnI от протеолиза. Следовательно, эпитопы, расположенные в центральной части cTnI, значительно более стабильны, чем эпитопы, расположенные в концевых частях молекулы. Однако, в то время как взаимодействие TnC делает центральную часть более стабильной, TnC также конкурирует с антителами за способность связываться с cTnI. Следовательно, не все антитела, специфичные к эпитопам, расположенным в центральной части молекулы cTnI, способны распознавать cTnI в крови пациентов, поскольку, по последним данным, большая часть cTnI находится в комплексе с TnC.

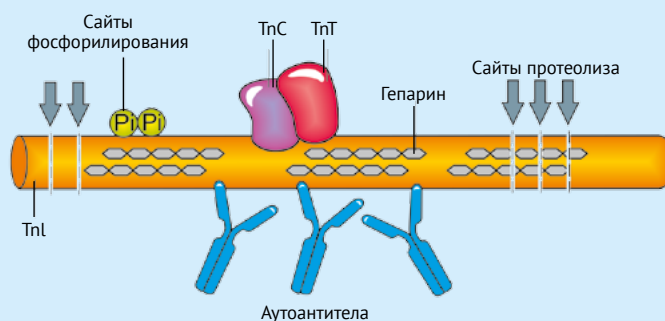


Рисунок 3. Схематическое расположение факторов, которые могут влиять на точные измерения cTnI, циркулирующего в крови человека.

Комплекс cTnI с TnC и cTnT

В кардиомиоцитах cTnI существует в виде тройного тропонинового комплекса с cTnT и TnC. Многие научные группы показали, что в крови пациентов с ОИМ cTnI, по большей части, находится в комплексе с TnC, тогда как информация о существовании тройного комплекса cTnI-cTnT-TnC в крови пациентов противоречива.

Связывание TnC изменяет конформацию cTnI, и часть поверхности cTnI экранируется TnC.

Следовательно, иммунологические свойства cTnI в свободной форме и в комплексе различны. Антитела, эпитопы которых расположены в областях, закрытых связыванием TnC, могут быть не способны распознавать cTnI в белковом комплексе в клинических образцах. Поскольку большинство (если не все) молекулы cTnI в крови обнаруживаются в комплексе с TnC, важно, чтобы cTnI-специфичные антитела, которые используются в анализах, были способны распознавать белок в бинарном комплексе cTnI-TnC.

Протеолитическая деградация

Известно, что сТnI является чрезвычайно нестабильной молекулой, которая легко подвергается протеолитической деградации. Наиболее стабильная часть сТnI находится между аминокислотными остатками 30 и 110 (17). Считается, что как в некротической ткани, так и в крови эта часть молекулы сТnI защищена от действия эндогенных протеаз тропонином С.

Информация об уровне деградации сТnI в крови пациента несколько противоречива. Тем не менее, представляется вероятным, что N-концевые и C-концевые части молекулы сТnI, которые не защищены ТnС, по крайней мере, частично усечены, особенно в образцах, собранных через 20 часов или более после появления симптомов ОИМ.

Фосфорилирование

Серины 22 и 23 сердечного тропонина I могут быть фосфорилированы протеинкиназой A *in vivo*. Это означает, что четыре формы белка сТnI (одна дефосфорилированная, две монофосфорилированные и одна бисфосфорилированная) могут сосуществовать в клетке и появляться в крови после ИМ (18).

Фосфорилирование сТnI изменяет конформацию белка и модифицирует его взаимодействие с другими тропонинами. Оно также влияет на взаимодействие сТnIc некоторыми антителами, такими как 22B11. Моноклональное антитело 22B11 распознает только дефосфорилированную форму сТnI и не реагирует с моно- или бисфосфорилированными формами антигена сТnI. 22B11 может быть использован для количественных измерений дефосфорилированного сТnI в сэндвич-иммуноанализе. Это антитело также может быть использовано для качественной или полуколичественной иммунодетекции дефосфорилированного сТnI при вестерн-блоттинге.

Влияние гепарина

Гепарин широко используется в клинической практике в качестве антикоагулянта. Почти все пациенты с подозрением на ОИМ получают гепарин в первые несколько минут после поступления в стационар.

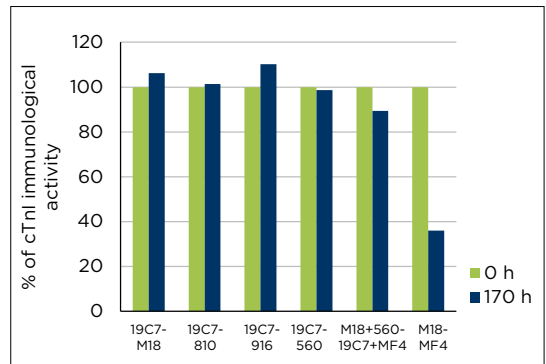


Рисунок 4. Эффект протеолитической деградации. Лучшие пары и комбинации «2+2» моноклональных антител к сТnI, специфичные к стабильной части молекулы сТnI, протестированы стропониновым комплексом (кат. № 8Т62) до и после инкубации в течение 170 часов со смесью эндогенных протеаз из сердечной ткани человека. Контрольный анализ M18-MF4 чувствителен к протеолитической деградации сТnI.

Кроме того, образцы крови часто собираются в пробирки с гепарином. Гепарин является отрицательно заряженной молекулой, и он может легко взаимодействовать с сТnI, который является высоко положительно заряженным белком с $pI \sim 9,9$. Мы показали, что некоторые моноклональные антитела к сТnI чувствительны к присутствию гепарина в образце, что может привести к снижению сигнала в образцах, содержащими гепарин (см. Рисунок 5) (19).

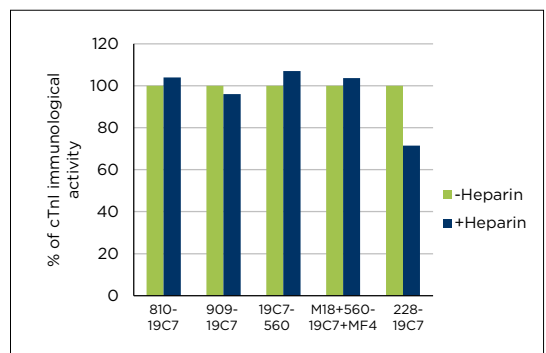


Рисунок 5. Чувствительность к гепарину.

Различные комбинации моноклональных антител тестировали либо в присутствии (5 МЕ/мл), либо в отсутствие гепарина. Нативный сТnI (50 нг/мл) использовали в качестве антигена. Значительное снижение иммунореактивности в присутствии гепарина указывает на то, что моноклональное антитело 228 чувствительно к гепарину.

Аутоантитела

Аутоантитела против сТпИ обнаруживаются в крови как пациентов с заболеваниями сердца, так и у внешне здоровых людей (20–22). Было показано, что аутоантитела негативно влияют на распознавание сТпИ в некоторых анализах.

Гетерофильные антитела и НАМА-эффект

Гетерофильные антитела возникают, когда люди подвергаются воздействию различных животных или продуктов, полученных от животных. Обычно к таким антителам относят антитела человека против антител мыши (НАМА), кролика, козы, овцы, коровы, свиньи, крысы или против лошади. В иммунодиагностике проблема чаще всего связана с НАМА из-за того факта, что в большинстве диагностических наборов используются мышиные моноклональные антитела и их производные.

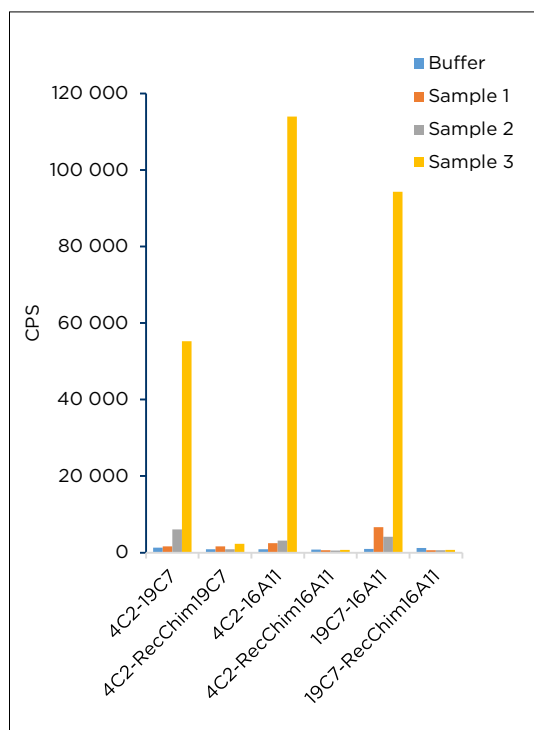
В диагностических тестах НАМА может вызвать ложноположительные, либо ложноотрицательные результаты (23–24). Ложноположительные результаты могут привести к задержкам в постановке правильного диагноза и даже в ненужных госпитализациях, если этот тест используется для диагностики угрожающих жизни состояний, таких как острый инфаркт миокарда (25).

Наборы для определения тропонина особенно чувствительны к НАМА из-за низких требований к предельному значению и потому, что уровни сТпИ очень низки даже в плазме пациентов с ОИМ. Исследование пациентов, имеющих подозрения на инфаркт миокарда, с использованием наборов к сердечному тропонину I, показало, что НАМА вызвало ложноположительные результаты у 5,5% пациентов с повышенным уровнем сТпИ и у 14% пациентов с повышенным сТпИ и нормальной креатинкиназой (26).

Рисунок 6. Химерные антитела смягчают эффект НАМА. Эффективность химерного и нативного моноклонов 19С7 и 16А11 в присутствии НАМА тестировали на трех образцах сыворотки с различными концентрациями НАМА: 807 нг/мл в образце 1, 1388 нг/мл в образце 2 и 6220 нг/мл в образце 3. Буфер без сыворотки использовали в качестве контроля. Сравнимые пары антител показаны на рисунке.

Если концентрация аутоантител высока, это может привести к значительной недооценке количества сТпИ, измеренного в образце крови пациента.

Мощным инструментом для решения проблемы с НАМА в диагностических тестах является использование химерных или полностью гуманизированных антител. Некоторые из наших антител к сТпИ теперь были преобразованы в химерные белки путем изменения константных областей антител с мышиных на человеческие последовательности. При тестировании с образцами сыворотки, содержащими НАМА, результаты показали, что эффект НАМА блокировался с помощью химерных антител сТпИ RecChim 19С7 и RecChim 16А11 (см. Рисунок 6).



Рекомендации по парам антител для разработки анализа для определения сТnI

Мы можем рекомендовать несколько различных комбинаций антител для разработки иммуноанализа для детекции сТnI (см. Таблицу 1). Все предложенные пары подложка-детекция были отобраны после тщательного тестирования сотен различных комбинаций пар антител с использованием нашего внутреннего метода флуоресцентного иммунологического «сэндвич»-анализа. Все рекомендуемые пары демонстрируют хорошую кинетику, низкий фон, высокую аналитическую чувствительность и высокую воспроизводимость. Кроме того, все предлагаемые комбинации антител были протестированы с образцами крови пациентов с ОИМ, и было показано, что они успешно распознают циркулирующий в крови пациентов сТnI. Наши результаты также были подтверждены производителями диагностических тест-систем, которые используют антитела компании Хайтест в своих коммерческих высокочувствительных тестах для определения сТnI.

Важно отметить, что нельзя рекомендовать только одну «лучшую пару» для разработки иммунологического анализа для детекции сТnI.

Причина этого заключается в том, что антитела могут действовать по-разному в зависимости от аналитической платформы. Например, моноклональные антитела, которые показывают отличные характеристики в ELISA, также могут быть идеальными в анализе, в котором используются магнитные частицы, но затем они ведут себя неоптимально в формате иммунохроматографического анализа или наоборот. Хороший оптимизированный анализ – это всегда сумма всех компонентов и переменных набора: антител, аналитической платформы, буферов, меток, инкубационного периода и т.д.

ТАБЛИЦА 1. Рекомендации по парам антител для количественных сэндвич-иммуноанализов сТnI.

Тип анализа	Подложка	Детекция
1 + 1	19C7cc	16A11cc
	19C7cc	560cc
	625	19C7cc
	560cc	458
	4C2cc	19C7cc
2 + 1	19C7cc + MF4cc	7B9cc (specific to TnC)
2 + 2	916 + 560cc	19C7cc + MF4cc
	801 + 560cc	19C7cc + MF4cc
	909 + 560cc	19C7cc + MF4cc
	M18 + 560cc	19C7cc + MF4cc

Подход с использованием нескольких моноклональных антител

В дополнение к «традиционному» формату анализа 1+1, в котором есть одно иммобилизованное и одно детекторное антитело, мы также рекомендуем проверить подход с использованием нескольких моноклональных антител. При этом подходе используется два или даже три иммобилизованных антитела и одно или несколько детекторных антител. По нашему опыту, дополнительные антитела обычно помогают улучшить аналитическую чувствительность. Что еще более важно, этот подход помогает уменьшить негативное влияние на эффективность анализа как различных посттрансляционных модификаций сTnI, так и внешних факторов (таких как гепарин).

Все парные комбинации антител, которые мы рекомендуем, демонстрируют:

- Высокую или очень высокую аналитическую чувствительность
- Отсутствует кросс-реактивность со скелетными зоформами TnI
- Хорошее распознавание сTnI в свободном форме и в комплексе с TnC
- Низкая восприимчивость к частичному протеолизу молекулы сTnI
- Отсутствие восприимчивости или низкая чувствительность к присутствию гепарина в образце
- Отсутствие восприимчивости или низкая чувствительность к фосфорилированию
- Низкая чувствительность к присутствию аутоантител в образце.

Рекомендуемые комбинации для детекции сTnI в ИХА

Тесты на основе иммунохроматографического анализа были популярны в диагностике с момента их появления в конце 1980-х годов. В таблице 2 приведен список комбинаций антител, которые хорошо работают в ИХА. Обратите внимание, что другие комбинации могут работать так же или даже лучше.

ТАБЛИЦА 2. Комбинации пар антител, которые хорошо работают в различных форматах ИХА

Тип анализа	Подложка	Детекция
1 + 1	20C6 (specific to cTn complex)	560cc
	560cc	20C6
	20C6	7B9cc (specific to TnC)
	19C7cc	560cc

Тип анализа	МоАт1	МоАт2	МоАт3
1 + 2 или 2 + 1	4C2cc	7B9cc	20C6
	19C7cc	560cc	20C6
	560cc	7B9cc	20C6
	19C7cc	267	4T21/2
	19C7cc	560cc	4T21/2

Тип анализа	МоАт1	МоАт2	МоАт3	МоАт4
2 + 2	4C2cc	560cc	7B9cc	20C6

Анализы для обнаружения сТnI в комплексных формах

Как показано нами и другими учеными, подавляющее большинство сТnI в крови пациентов с ОИМ обнаруживается в виде бинарного комплекса с TnC (17, 27, 28). Свободный сТnI либо присутствует в незначительных количествах, либо вовсе отсутствует (28). По этой

причине было бы возможно определять концентрацию сТnI, используя пары антител, которые способны распознавать сТnI в комплексе с другими тропонинами. Мы предлагаем два различных подхода для этой цели.

В методах анализа для определения сТnI, с применением антител кTnC, используется пара моноклональных антител, одно из которых специфично к сТnI, а другое – к TnC (см. рисунок 7). TnC не фосфорилируется, не расщепляется протеазами и не чувствителен к присутствию в образце гепарина или аутоантител. Такой подход позволит улучшить аналитическую чувствительность, точность и воспроизводимость количественных иммуноанализов для детекции сТnI. Мы предлагаем два моноклональных антитела (кат. № 4T27 и 4T27cc), которые распознают TnC.

Методы анализа для детекции сТnI, в которых задействованы антитела к тропониновому комплексу, подразумевают использование пары моноклональных антител, одно из которых специфично к полноразмерному тропониновому комплексу, а второе специфичное к сТnI или TnC (см. рисунок 8). Мы предлагаем два моноклональных антитела, которые специфичны к комплексу сТn (кат. № 4TC2). Основываясь на отзывах клиентов, антитела к тропониновому комплексу часто используются в иммунохроматографических анализах.

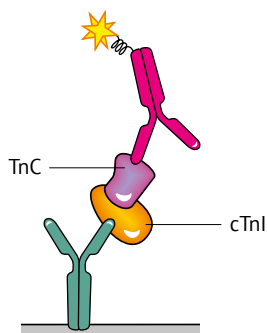


Рисунок 7. Схематическое представление иммуноанализа сТnI с использованием антител к TnC.

В этом типе анализа иммобилизованное антитело (зеленое) специфично к сТnI, а детекторное антитело (розовое) специфично кTnC.

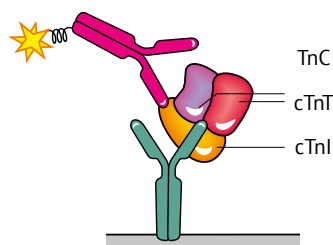


Рисунок 8. Схематическое представление иммуноанализа сТnI с использованием антител к комплексу сТn. В данном типе анализа иммобилизованное антитело (зеленое) специфично к комплексу сТn, а детекторное антитело (розовое) специфично к сТnI.

Гетерогенность форм сТnI в крови человека и стандартизация анализа

Гетерогенность форм сТnI в крови человека и различие в эпитопной специфичности антител, которые используются в различных анализах, означает, что результаты, полученные с использованием разных диагностических систем, могут значительно отличаться. В первом поколении диагностикумов для сТnI концентрация сТnI, измеренная одним анализом, может быть в 10-1000 раз больше, чем измеренная другим набором для детекции сТnI. В результате тесного сотрудничества между национальными и международными организациями, учеными, врачами-практиками и производителями промышленных диагностических наборов, согласованность получаемых данных разными тестами в настоящее время намного лучше. Однако, стандартизация сТnI до сих пор не достигнута.

Шаги в направлении стандартизации наборов для определения сТnI включают в себя:

- Внедрение международного стандарта сТnI (SRM 2921). Этот стандарт был разработан Национальным институтом стандартов и технологий (NIST) с использованием материалов, подготовленных Хайтест.
- Постепенная «стандартизация» эпитопов, обнаруженных в коммерческих наборах. На рисунке 9 показаны специфические особенности эпитопов коммерческих тест-систем, которые в настоящее время представлены на рынке. В большинстве тестов используются антитела, специфичные для трех областей молекулы сТnI: 23–43, 41–56 и 83–93.

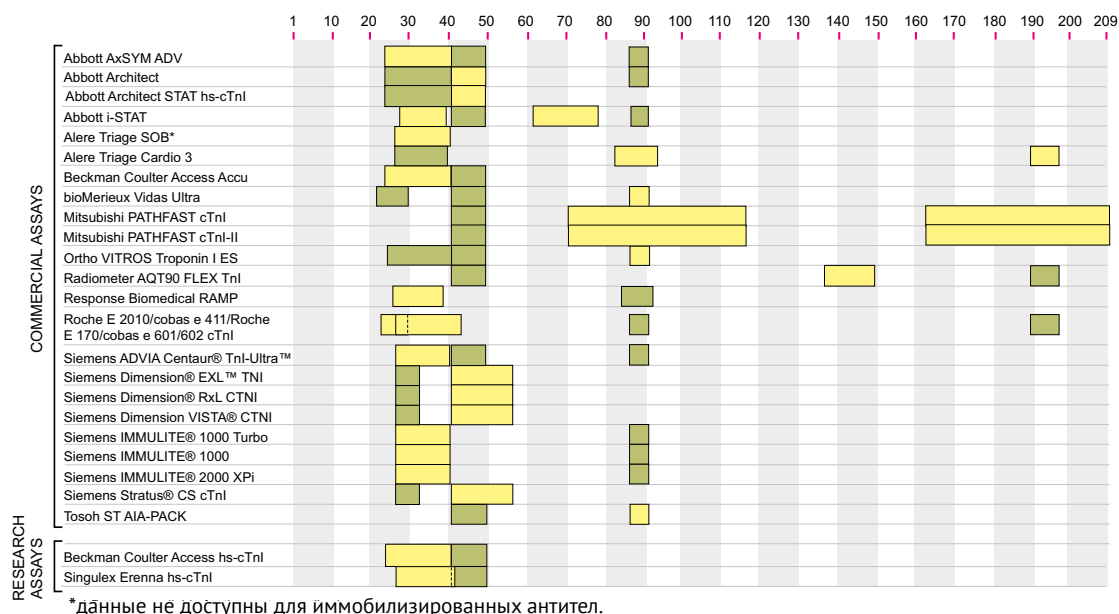


Рисунок 9. Эпитопы антител, используемых в коммерческих наборах для детекции сТnI. Зеленые и желтые столбцы представляют эпитопы, которые распознаются антителами подложки и детекции соответственно. Этот рисунок основан на информации, доступной на веб-сайте Международной федерации клинической химии (IFCC) www.ifcc.org (Аналитические характеристики набора на тропонин, октябрь 2013 г.) и опубликован с разрешения IFCC.

Антитела для обнаружения фрагментов cTnI или cTnI методом вестерн-блоттинга

Все наши моноклональные антитела к cTnI распознают сердечный тропонин I человека (или его фрагменты, если они содержат эпитоп, специфичный для определенного моноклонального антитела) в методе вестерн-блоттинг. Для улучшения чувствительности вестерн-блоттинга мы рекомендуем использовать одно из следующих моноклональных антител: 19C7, 16A11 или MF4.

Антитела для определения cTnI различных видов животных

Тестирование новых лекарств и оценка новых хирургических подходов часто проводится на экспериментальных животных. Важное значение имеет влияние новой терапевтической или хирургической технологии на функции сердца и жизнеспособность кардиомиоцитов, что может быть изучено с помощью измерений cTnI в крови животных.

Некоторые из наших моноклональных антител к cTnI взаимодействуют с сердечным тропонином I различных видов животных в вестерн-блоттинге (см. таблицу 3). Мы также проверили способность выбранных комбинаций антител обнаруживать нативный очищенный cTnI различных видов животных в «сэндвич»-иммуноанализе. В таблице 4 перечислены комбинации, которые, согласно нашим исследованиям, могут быть использованы для иммунологической детекции cTnI у различных животных. Калибровочные кривые для одной из этих пар, M155-19C7, показаны на рисунке 10.

ТАБЛИЦА 3. Кросс-реактивность моноклональных антител к cTnIc антигенами разных видов животных в вестерн-блоттинге.

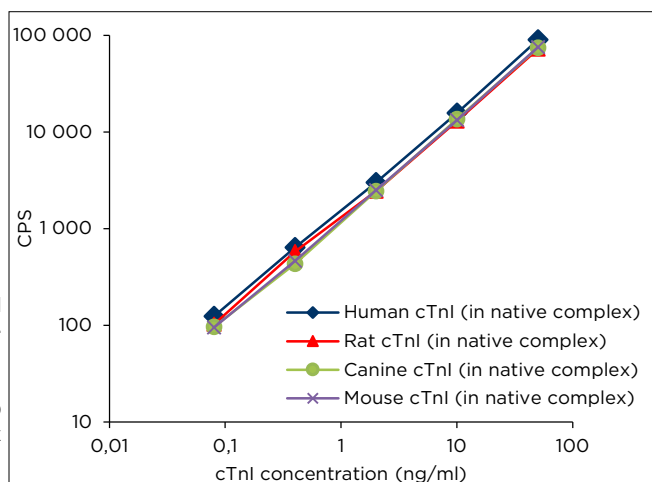
МоАт	Человек	Бык	Свинья	Коза	Собака	Кролик	Кошка	Крыса	Мышь	Рыба
4C2	++	++	++	++	++	++	+	++	++	-
19C7	++	++	+	++	+	++	++	++	+	++
8E10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
16A11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
MF4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
22B11	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-
247	++	++	++	++	++	+	++	++	++	N/A
10F4	++	++	++	++	++	++	++	++	+	N/A

Таблица 4. Парные комбинации моноклональных антител для иммунодетекции cTnI для различных видов животных.

		Детекторное антитело															
		19C7					M155					MF4					
		B	C	M	R	Rb	B	C	M	R	Rb	B	C	M	R		
Антитело подложки	4C2		•	•	•	•										•	
	801			•													
	M155	•	•	•	•	•											
	19C7											•	•	•	•		
	625	•	•	•	•	•											
	MF4			•			•	•	•	•	•						

B: Бык, C: Собака, M: Мышь, R: Крыса, Rb: Кролик

Рис. 10. Калибровочные кривые для cTnI в составе тропониновых комплексов человека, мыши, крысы и собаки. M155 использовали в качестве иммобилизованного, а 19C7 использовали в качестве детектирующего антитела. Эта комбинация моноклональных антител дает одинаковый ответ с антигенами разных видов животных.



Сердечный тропонин I и тропониновый комплекс

Ученые Хайтест работают с сердечным тропонином I уже более 20 лет. За это время они получили глубокое понимание о разработке,

производстве и очистке различных форм этого белка.

Нативный сердечный тропонин I человека

cTnI (кат. № 8T53) Хайтест очищают из сердечной мышечной ткани человека с помощью иммунохроматографии с последующей дополнительной стадией ионообменной хроматографии. Очищенный препарат содержит небольшое количество (<5%) протеолитических фрагментов cTnI, которые сохраняют иммунологическую активность. По данным иммунологических и масс-спектральных исследований, N-концевой аланин нативного cTnI ацетируется. Препарат содержит смесь дифференциально фосфорилированного и дефосфорилированного cTnI. Результаты ДСН-электрофореза (далее SDS-PAGE) очищенного cTnI показаны на рис. 11.

Сердечные тропонины I, которые полностью фосфорилированы или дефосфорилированы после очистки, доступны под кат. №№ 8T53ph и 8T53dp соответственно.

Рекомбинантный сердечный тропонин I человека

Наш рекомбинантный сердечный тропонин I человека (кат. № 8RT17) продуцируется путем экспрессии гена TNNI3 в *E.coli*. Рекомбинантный тропонин I содержит один дополнительный остаток Met на N-конце (вследствие экспрессии *E.coli*) и не фосфорилируется по остаткам Ser23 и Ser24. В SDS-PAGE этот белок мигрирует в виде одной полосы (см. рис. 12). Этот высокоочищенный белок можно использовать в качестве калибратора для иммуноанализов, иммуногена для производства антисывороток и весового стандарта cTnI.

Рисунок 11. Нативный сердечный TnI.

1 мкг очищенного нативного сердечного TnI человека (кат. № 8T53) анализировали в 10–20% SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.

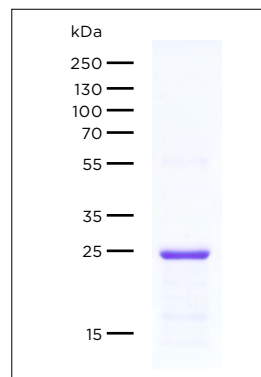
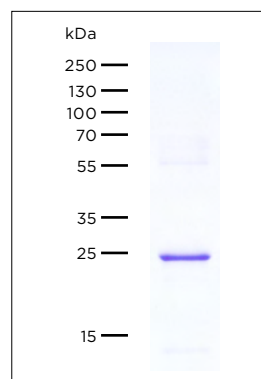


Рисунок 12.

Рекомбинантный сердечный TnI. 1 мкг рекомбинантного сердечного TnI человека (кат. № 8RT17) анализировали в 10–20% SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.



Сердечные тропониновые комплексы человека (I-C и I-T-C).

В сердечном тропониновом комплексе тропониновые субъединицы нековалентно связаны друг с другом. Наиболее сильное взаимодействие было продемонстрировано между cTnI и TnC. Это взаимодействие зависит от ионов Ca^{2+} , и это следует учитывать при использовании образцов сыворотки, содержащих EDTA.

cTnI чрезвычайно нестабилен в своей свободной форме и демонстрирует значительно лучшую стабильность в комплексе с TnC (I-C) или в тройном комплексе cTnI-cTnT-TnC (I-T-C). Эти две формы белка являются предпочтительными в качестве материала для получения стандартных белков и калибраторов (17). На рисунке 13 показана стабильность очищенного cTnI в комплексе I-T-C и в свободной форме при инкубации при 4°С.

В нативном тропониновом комплексе, поставляемом Хайтест, cTnI представлен в той же форме, в которой он может быть обнаружен в крови пациентов с ОИМ. Очистка тропонинового комплекса проводится в мягких условиях без обработки мочевиносодержащими буферами. Концентрация определена количественно для каждого из трех компонентов комплекса. В SDS-PAGE очищенный тропониновый комплекс мигрирует в виде трех основных полос: cTnT, cTnI и TnC (см. рис. 14).

Преимущества нативного тропонинового комплекса перед очищенным cTnI:

- Антиген находится в той же форме, что и в образцах крови пациентов с ОИМ
- Отсутствуют изменения третичной структуры
- Участки связывания антител не модифицированы
- Высокая стабильность cTnI
- Идеально подходит для приготовления калибратора и стандартов cTnI.

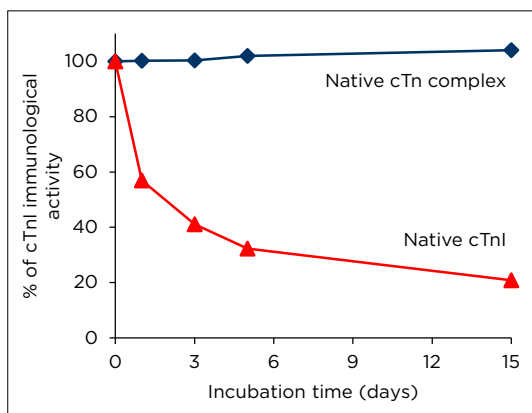


Рисунок 13. Сравнение стабильности различных форм очищенного cTnI. Нативный комплекс тропонина (кат. № 8T62) или нативный cTnI (кат. № 8T53) растворяли в нормальной сыворотке человека (конечная концентрация cTnI в обоих образцах составляла 30 нг/мл) и инкубировали в течение нескольких дней при 4°С. Иммунореактивность образцов измеряли в указанные моменты времени. При растворении в сыворотке cTnI остается высоко стабильным в тропониновом комплексе, тогда как очищенный свободный cTnI быстро теряет свою иммунореактивность.

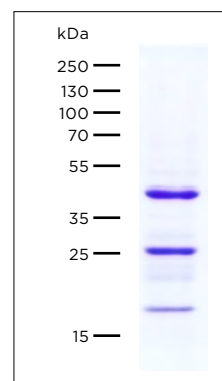


Рисунок 14. Нативный сердечный тропониновый комплекс. Очищенный тропониновый комплекс (кат. № 8T62; количество cTnI составляло 1 мкг) тестировали в 10-20% SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.



В 2004 году Подкомитет по стандартизации Американской ассоциации клинической химии (ААСС) выбрал тропониновый комплекс I-T-C компании Хайтест для использования в качестве эталонного материала в анализах для детекции тропонина I. Сертифицированный справочный материал SRM 2921 доступен только в Национальном институте стандартов и технологий (NIST). Для получения дополнительной информации, пожалуйста, посетите www.nist.gov.

Сердечный тропонин Т (сТnТ)

У человека сердечный тропонин Т кодируется геном TNNT2. Идентифицировано десять различных изоформ сТnТ, которые являются результатом альтернативного сплайсинга транскриптам РНК. Некоторые из этих изоформ характерны для эмбрионального состояния развития сердца, некоторые характерны для здоровой ткани сердца взрослого человека, в то время как другие формы связаны с различными патологиями сердца. Основная изоформа, обнаруженная в сердечной ткани здорового взрослого человека (изоформа 6 или TnT3), имеет длину 287 аминокислот с расчетной молекулярной массой 34,6 кДа.

Подобно сТnI, сердечная изоформа TnT широко используется в качестве маркера повреждения клеток миокарда. сТnТ имеет такую же кинетику высвобождения в кровоток и ту же

чувствительность к незначительному повреждению миокарда (некроз), что и сТnI.

Компания Хайтест предлагает моноклональные антитела, которые подходят для разработки иммуноанализов для диагностических целей, а также несколько моноклональных антител, которые рекомендуются для научно-исследовательской деятельности (см. рисунок 15).

Моноклональные антитела для высокочувствительных анализов сТnТ.

Моноклональные антитела к сТnТ, полученные нами *in vitro* (кат. № 4Т19 сс), могут быть использованы для разработки иммуноанализа с превосходной чувствительностью (предел детекции меньше 0,3 нг/л) и высокой специфичностью (без перекрестной реакции с сТnI или со скелетными изоформами TnT до 30 мкг/л).

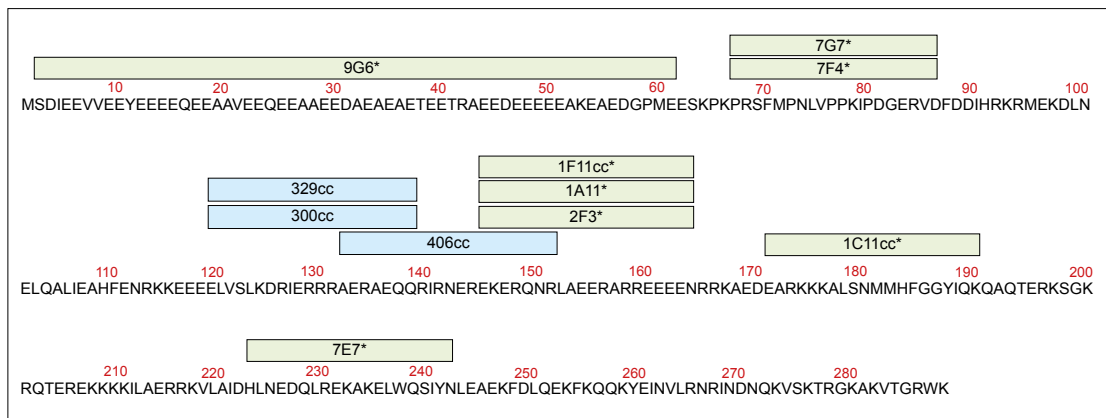


Рисунок 15. Картирование эпитопов моноклональных антител Хайтест к сТnТ. Мы предлагаем антитела для разработки высокочувствительных анализов сТnТ, а также для исследовательских целей (отмечены *).

Способность пар антител 329сс-406сс и 406сс-300сс распознавать сТnТ в крови пациентов с ОИМ была изучена на более чем 80 образцах сыворотки и плазмы. Пары антител демонстри-

руют хорошую корреляцию с коммерчески доступным анализом hs-cTnT. Результаты анализа 38 образцов сыворотки представлены на рисунке 16.

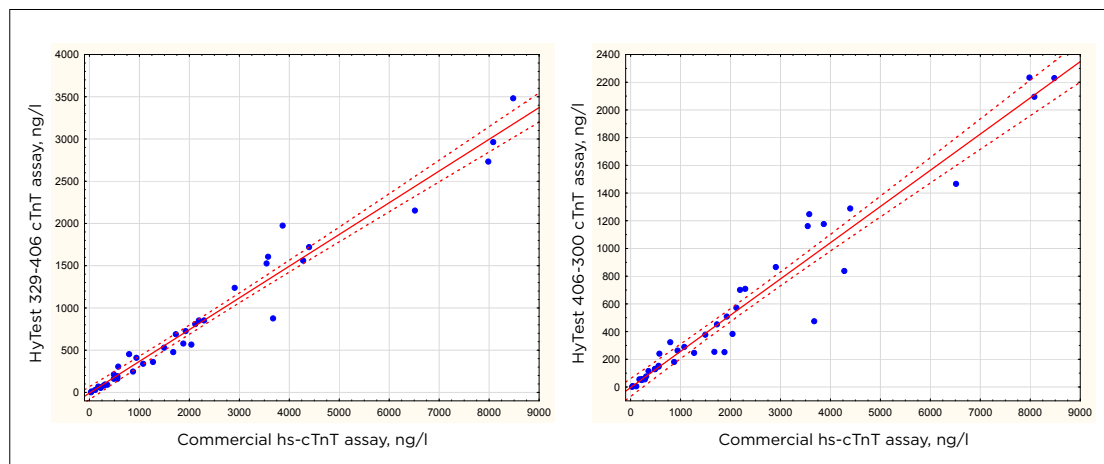


Рисунок 16. Иммуноанализы Хайтест показывают хорошую корреляцию с коммерчески доступным анализом hs-cTnT. Концентрацию сТnТ в 38 образцах сыворотки, полученных от пациентов с ОИМ, определяли, используя два иммуноанализа: в которых использовались антитела Хайтест (пары подложка-конъюгат: 329-406 и 406-300) и коммерческий набор hs-cTnT.

Антитела для научно-исследовательских целей

Мы предлагаем несколько моноклональных антител, которые рекомендуются для исследовательских целей. Они также перекрестно реагируют с белками сТnТ из разных видов животных (см. таблицу 5).

ТАБЛИЦА 5. Кросс-реактивность моноклональных антител к сТnТ с антигенами разных видов животных в вестерн-блоттинге.

МоАт	Человек	Бык	Свинья	Коза	Собака	Кролик	Кошка	Крыса	Мышь	Рыба
7F4	++	N/A	++	N/A	-	-	-	N/A	N/A	-
7G7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2F3	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+
1A11	++	++	++	++	+	+	+	+	++	+
1F11	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+

Нативный сТnT человека

сТnT (кат. № 8T13) предлагаемый компанией Хайтест, получен из сердечной мышечной ткани человека с помощью иммуоаффинной хроматографии с последующей дополнительной стадией ионообменной хроматографии. В SDS-PAGE очищенный белок мигрирует как одна полоса (см. Рисунок 17).

Рекомбинантный сТnT человека

Изоформа 6 (также известная в литературе как TnT3) является основной изоформой тропонина T, которая представлена в ткани сердца здорового взрослого человека.

Наш рекомбинантный сТnT человека (кат. №8 RTT5) продуцируется в *E.coli* путем экспрессии гена, кодирующего изоформу 6 длиной 288 аминокислот (TnT3) сТnT. Эта изоформа является основной изоформой сТnT в здоровом сердце взрослого человека. Белок имеет дополнительный остаток Met на N-конце. В SDS-PAGE очищенный рекомбинантный сТnT мигрирует как одна полоса (см. рисунок 18).

Рекомбинантные ssTnI и fsTnT человека

Рекомбинантные TnT из медленных скелетных мышц (ssTnT, кат. № 8RST2) и TnT быстрых скелетных мышц (fsTnT кат. № 8RFT4) идеально подходят для изучения кросс-реактивности иммуноанализа к этим изоформам.

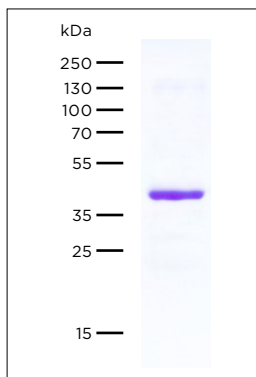


Рисунок 17. Нативный сердечный TnT. 1 мкг нативного сердечного TnT человека (кат. № 8T13) анализировали в 10-20% SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.

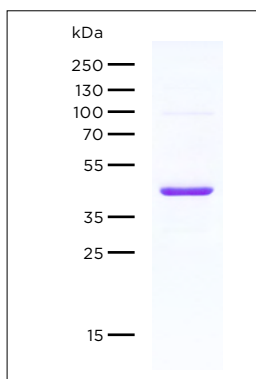


Рисунок 18. Рекомбинантный сердечный TnT. 1 мкг рекомбинантного сердечного TnT человека (кат. № 8RTT5) анализировали в 10-20% SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.

Тропонин C (TnC)

Две формы тропонина C (TnC) экспрессируются в мышцах человека. Один типичен для медленных скелетных мышц и миокарда, а другой – для быстрых скелетных мышц. TnC, присутствующий в сердечной мышце, состоит из 161 аминокислотного остатка. Он имеет молекулярную массу 18,4 kDa и теоретическую изоэлектрическую точку pI 4,05.

TnC образует высокоаффинный комплекс с сТnI, и в крови пациентов с ОИМ большая часть сТnI обнаруживается в комплексе с TnC. TnC защищает сТnI от расщепления протеазой и поэтому может

использоваться в качестве естественного стабилизатора сТnI в водных растворах (17).

Нативный TnC человека из сердечной мышцы

TnC (Кат. № 8T57) компании Хайтест очищен из сердечной мышечной ткани человека с помощью иммуоаффинной хроматографии с последующей дополнительной стадией ионообменной хроматографии. В SDS-PAGE очищенный белок мигрирует в виде одной полосы (не показано).

Статьи

- 1) **Gomes, AV et al.** The role of Troponin in muscle contraction. *Life*. 2002, 54: 323-333.
- 2) **Bodor, GS et al.** Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue; *Clin Chem*. 1995, 41(12): 1710-1715.
- 3) **Jaffe, AS et al.** Diseased skeletal muscle. A noncardiac source of increased circulating concentrations of cardiac troponin T; *J Am Coll Cardiol*. 2011, 58(17): 1819-1824.
- 4) **Cummins, B et al.** Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1987, 113(6): 1333-1344.
- 5) **Katus, HA et al.** Enzyme linked immunoassay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J Mol Cell Cardiol*. 1989, 21(12): 1349-1353.
- 6) Myocardial infarction redefined - A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction *Eur. Heart J*. 2000, 21(18): 1502-1513.
- 7) **Thygesen, K et al.** Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012, 126: 2020-2035.
- 8) **Sandoval, Y and Thygesen, K.** Myocardial Infarction Type 2 and Myocardial Injury. *Clin Chem*. 2017, 63(1):101-107.
- 9) **Cullen, L et al.** Early rule-out and rule-in strategies for myocardial infarction. *Clin Chem*. 2017, 63(1): 129-139.
- 10) **Diercks, DB et al.** Diagnostic accuracy of a point-of-care troponin I assay for acute myocardial infarction within 3 hours after presentation in early presenters to the emergency department with chest pain. *Am Heart J*. 2012, 163: 74-80.
- 11) **Reichlin, T et al.** One-Hour Rule-out and Rule-in of Acute Myocardial Infarction Using High-Sensitivity Cardiac Troponin T. *Arch Intern Med*. 2012, 172(16): 1211-1218.
- 12) **Apple, FS et al.,** on behalf of the IFCC Task Force 4 on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. IFCC educational materials on selected analytical and clinical applications of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Biochem*. 2015, 48:201-203.
- 13) **Sandoval, Y et al.** Diagnosis of type 1 and type 2 myocardial infarction using a high-sensitivity cardiac troponin I assay with gender-specific 99th percentiles based on the Third Universal Definition of Myocardial Infarction classification system. *Clin Chem*. 2015, 61:657-663.
- 14) **Sandoval, Y et al.** Present and future of high sensitivity cardiac troponin in clinical practice: a paradigm shift to high sensitivity assays. *Amer J Med*. 2016, 129:354-365.
- 15) **Apple, FS et al.,** for the IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care, *Clin Chem*. 2017, 63(1):73-81.
- 16) Prof. Fred S. Apple, personal communication.
- 17) **Katrukha, AG et al.** Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin Chem*. 1998, 44(12): 2433-2440.
- 18) **Zhang, J et al.** Top-down quantitative proteomics identified phosphorylation of cardiac troponin I as a candidate biomarker for chronic heart failure. *J Proteome Res*. 2011, 10(9): 4054-4065.
- 19) **Katrukha, AG et al.** Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum. *Clin Chem Lab Med*. 1999, 37(11-12): 1091-1095.
- 20) **Eriksson, S et al.** Negative interference in cardiac troponin I immunoassays from a frequently occurring serum and plasma component. *Clin Chem*. 2003, 49(7): 1095-1104.
- 21) **Eriksson, S et al.** Autoantibodies against cardiac troponins. *N Engl J Med*. 2005, 352(1): 98-100.
- 22) **Eriksson, S et al.** Negative interference in cardiac troponin I immunoassays by circulating troponin autoantibodies. *Clin Chem*. 2005, 51(5): 839-847.
- 23) **Rahman, A and Broadley, SA.** Review article: Elevated troponin: diagnostic gold or fool's gold? *Emerg Med Australas*. 2014, 26:125-130.
- 24) **Morton, A.** When lab tests lie...heterophile antibodies. *Aust Fam Physician* 2014, 43, 391-393.
- 25) **Zaidi, A and Cowell, R.** False positive cardiac troponin elevation due to heterophile antibodies - more common than we recognise. *BMJ Case Reports*, 2010, Jul.
- 26) **Fleming, SM et al.** False-positive cardiac troponin I in a routine clinical population. *Am J Cardiol*. 2002, 89, 1212-1225.
- 27) **Wu, AHB.** Analytical issues for clinical use of cardiac troponin. *Cardiovascular biomarkers*. Editor: Morrow DA. Totowa (NJ): Humana Press; 2006. p 27-41. 15.
- 28) **Bates, KJ et al.** Circulating immunoreactive cardiac troponin forms determined by gel filtration chromatography after acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2010, 56:952-958.

Избранные статьи учёных Хайтест о тропонине

Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, Filatov VL, Bulargina TV and Gusev NB. **A new method of human cardiac troponin I and troponin T purification.** Biochem. Mol. Biol. Int. 1995, 36:195-202.

Protocols for the purification of endogenous troponin I and T are described. The affinity purification method based on our monoclonal antibody C5 could be utilized for the purification of troponin I molecules from various animal species as well.

Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, Pettersson K, Lövgren T, Severina ME, Pulkki K, Vuopio-Pulkki LM and Gusev NB. **Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex.** Clin. Chem. 1997, 43(8):1379-1385.

In this study we have shown for the first time that cTnI molecule is not released in the blood stream in a free form (as it was thought previously) but complexed with TnC. Different cTnI-specific antibodies vary in their ability to recognize cTnI in free and complexed forms. We have suggested using for the assay development antibodies that are not affected by cTnI - TnC complex formation and equally recognize both - free and complexed cTnI forms.

Filatov VL, Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, Bulargina TV, Kolosova OV, Severin ES and Gusev NB. **Epitope mapping of anti-troponin I monoclonal antibodies.** Biochem. Mol. Biol. Int. 1998, 45(6):1179-1187.

We describe here the development of monoclonal antibodies using purified cTnI or troponin complex as immunogen. Epitope specificities of 31 antibodies are determined by using the SPOT technique. The generation of antibodies that recognize both isolated cTnI and cTnI in troponin complex allows for a reliable detection of cTnI in clinical samples.

Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, Esakova TV, Kolosova OV, Pettersson K, Lövgren T, Bulargina TV, Trifonov IR, Gratsiansky NA, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM and Gusev NB. **Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection.** Clin. Chem. 1998, 44(12):2433-2440.

In this study we showed that both N-terminal and C-terminal regions of cTnI were rapidly proteolytically degraded in necrotic tissue incubated at 37°C and in serum incubated at 23°C. The most stable part of cTnI was located between amino acid residues 30 and 110. We suggest that antibodies specific to the epitopes that are most resistant to proteolysis should be utilized when developing cTnI immunoassays.

Filatov VL, Katrukha AG, Bulargina TV and Gusev NB. **Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning.** Biochemistry. 1999, 64(9):969-985.

REVIEW. The review summarizes what is known about the structure and function of troponin complex components. Data on phosphorylation of troponin I and troponin T are viewed.

Katrukha A, Bereznikova A, Filatov V and Esakova T. **Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum.** Clin. Chem. Lab. Med. 1999, 37(11-12):1091-1095.

Effect of complex formation, the unstable nature of cTnI, phosphorylation, as well as other factors that influence the recognition of cTnI in human serum are discussed. We concluded that all of these factors should be considered during the selection of the antibodies for the assay development.

Katrukha A, Bereznikova A and Pettersson K. **New approach to standardization of human cardiac troponin I (cTnI).** Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl. 1999, 230:124-127.

In this study, we compared the results from six different cTnI assays by measuring the cTnI concentration in a total of 21 clinical samples. All of the samples were analyzed in all of the assays using a set of different calibrators. The lowest between-manufacturer bias was obtained when using a heart tissue derived native troponin complex as the calibrator. Our conclusion is that in order to reduce assay-to-assay variation, the native troponin complex should be used as the calibrator.

Katrukha AG. **Antibody selection strategies in cardiac troponin assays.** Cardiac Markers, 2003, 2nd edition, Edited by Alan HB. Wu. 173-185.

In this specific chapter of the book, the biochemical properties of troponin I (and T) are viewed and parameters affecting antibody selection for the assay development are discussed.

Vylegzhanina AV, Katrukha IA, Kogan AE and Bereznikova AV. **Epitope Specificity of Anti-Cardiac Troponin I Monoclonal Antibody 8I-7**. Clin. Chem. 2013, 59(12):1814-1816.

In this letter to the editor, we showed data relating to the epitope specificity of anti-cTnI MAb 8I-7. Our results also indicated that this MAb cross-reacts with skeletal troponin I.

Vylegzhanina AV, Kogan AE, Katrukha IA, Antipova OV, Kara AN, Bereznikova AV, Koshkina EV, Katrukha AG. **Anti-Cardiac Troponin Autoantibodies Are Specific to the Conformational Epitopes Formed by Cardiac Troponin I and Troponin T in the Ternary Troponin Complex**. Clin. Chem. 2017, 63(1), 343-350.

In this article, we investigated the epitope specificity of troponin autoantibodies that prevent an efficient detection of cTnI by such MABs that bind to epitopes commonly utilized in commercial assays. The autoantibodies investigated were specific to the conformational epitopes found in the troponin I-T-C ternary complex but not in the binary I-C complex or free cTnI. On the other hand, the ternary I-T-C complex was one of the main cTnI forms only in the early samples of acute myocardial infarction patients. This means that if the blood of an AMI patient contains autoantibodies then the risk of obtaining falsely low troponin levels is higher in samples that are taken shortly after the onset of the AMI.

Katrukha IA, Kogan AE, Vylegzhanina AV, Serebryakova MV, Koshkina EV, Bereznikova AV, Katrukha AG. **Thrombin-Mediated Degradation of Human Cardiac Troponin T**. Clin Chem. 2017, 63(6):1094-1100.

In this article, our researchers investigated in more detail the proteolytic degradation of cTnT. The results suggest that the 29 kDa fragment present in serum samples is formed during the sample preparation and that it is caused by the

cleavage of cTnT by thrombin, a serine protease that is involved in the coagulation cascade.

Katrukha, IA, Kogan, AE, Vylegzhanina, AV, Kharitonov, AV, Tamm, NN, Filatov, VL, Bereznikova, AV, Koshkina, EV and Katrukha, AG. **Full-Size Cardiac Troponin I and Its Proteolytic Fragments in Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction: Antibody Selection for Assay Development**. Clin. Chem. 2018, 64(7): 1104-1112.

In this study, analysis of serial samples from AMI patients revealed that the blood of AMI patients contained intact cTnI and eleven proteolytic cTnI fragments, the ratios of which did not significantly change within the first 36 hours after AMI. An important finding in this study was that antibodies specific to amino acid residues 23-196 of cTnI were able to recognize 80% of cTnI in clinical samples. However, because autoantibodies binding on this region can cause false negative results, the authors suggest that an immunoassay using antibodies specific to epitopes 23-40 and/or 140-196 would minimize the interfering effects of both truncation and autoantibodies while allowing as sensitive measurement of cTnI as possible.

Vylegzhanina, AV, Kogan, AE, Katrukha, IA, Koshkina, EV, Bereznikova, AV, Filatov, VL, Bloschitsyna, MN, Bogomolova, AP and Katrukha, AG. **Full-Size and Partially Truncated Cardiac Troponin Complexes in the Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction**. Clin Chem. Papers in Press. Published March 11, 2019 as doi:10.1373/clinchem.2018.301127.

In this study, the presence and composition of troponin complexes in the blood of AMI patients were analyzed. The authors suggest that in contrast to current understanding of major forms being IC complex and free cTnT, also ITC complexes (full-size and low-molecular weight) are found in high quantities in patient blood. Ratios of these forms change in the course of time from the onset of AMI and a scheme for this transformation is proposed. Based on results in this study, antibodies specific to region 23-126 would detect all troponin complexes. Also, an assay in which the antibodies recognize both cTnI and TnC could prove to be useful in diagnostics. Finally, for a cTnT assay, most suitable antibody epitopes are suggested.

Информация для заказа

Хайтест имеет патенты на «Метод и набор для диагностики тропонина I» (US7285418 и EP0938678).

Тропонин I (TnI)

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Тропонин I, сердечный	4T21	P4-14G5	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 1-15
		916	IgG3	ИФА, ВБ, а.к.о. 13-22
		909	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 18-22
		M18	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 18-28
		801	IgG3	ИФА, ВБ, а.к.о. 18-35
		810	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 22-31
		4C2	IgG2a	ИФА, ВБ, а.к.о. 23-29
		3C7	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 25-40
		228	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 26-35
		M155	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 26-35
		820	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 26-35
		10F4	IgG2a	ИФА, ВБ, а.к.о. 34-37
		19C7	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 41-49
		247	IgG1	а.к.о. 65-74, взаимодействует только со свободным сTnI
		560	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 83-93
		16A12	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 86-90
		8E10	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 86-90
		16A11	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 86-90
		17F3	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 87-90
		84	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 117-126
		M46	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 130-145, к/р со скелетным TnI < 10 %
		625	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 169-178
		458	IgM	ИФА, ВБ, а.к.о. 169-178
		596	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 169-178, к/р со скелетным TnI < 10 %
		267	IgG2a	ИФА, ВБ, а.к.о. 169-178, к/р со скелетным TnI < 10 %
		C5	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 186-192, к/р со скелетным TnI > 50 %
		MF4	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 190-196
	p45-10	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 195-209	
	4T21cc	4C2cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 23-29
		M155cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 26-35
		19C7cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 41-49
		560cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 83-93
		16A12cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 86-90
16A11cc		IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 86-90	
MF4cc		IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 190-196	
RC4T21	RecChim19C7	IgG1	ИФА, рекомбинантное химерное антитело	
	RecChim16A11	IgG1	ИФА, рекомбинантное химерное антитело	
Тропонин I, сердечный, фосфорилированный	4T45	1G11	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. Н/Д
Тропонин I, сердечный, дефосфорилированный	4T46	22B11	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 20-24
Нативный тропоиноновый комплекс, сердечный	4TC2	20C6	IgG2b	ИФА
		Tcom8	IgG1	ИФА
Тропонин I, скелетный	4T20	12F10	IgG2b	ИФА, ВБ
		7G2	IgG2b	ИФА, ВБ

Тропонин I (TnI)

ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Источник, животное	Примечания
Тропонин I, сердечный	4T21/2	Коза	ИФА

АНТИГЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Тропонин I человека, сердечный	8T53	>98%	Нативный белок
Тропонин I человека, сердечный, рекомбинантный	8RT17	>95%	Рекомбинантный белок
Тропонин I, сердечный, дефосфорилированный	8T53dp	>95%	Нативный белок
Тропонин I, сердечный, фосфорилированный	8T53ph	>95%	Нативный белок
Тропониновый комплекс (I-C)	8IC63	Н/Д	Нативный белок
Тропониновый комплекс (I-T-C) человека	8T62	Н/Д	Нативный белок
Тропониновый комплекс (I-T-C) искусственный	8T62a	Н/Д	Нативный белок
Тропонин I, сердечный, набор калибраторов	8T60	Н/Д	Предполагаемый диапазон от 0 нг/мл до 100 нг/мл
Тропонин I, сердечный, набор антигенов	K01	Н/Д	Нативный белок
Тропонин I человека, скелетный	8T25	>95%	Нативный белок

АНТИГЕНЫ ЖИВОТНЫХ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Тропонин I быка, сердечный	8T53b	>98%	Нативный белок
Тропонин I собаки, сердечный	8T53c	>98%	Нативный белок
Тропонин I мыши, сердечный	8T53m	>98%	Нативный белок
Тропонин I свиньи, сердечный	8T53p	>98%	Нативный белок
Тропонин I крысы, сердечный	8T53r	>98%	Нативный белок
Тропониновый комплекс (I-T-C) собаки	8T62c	N/A	Нативный белок
Тропонин I быка, скелетный	8T25b	>95%	Нативный белок
Тропонин I собаки, скелетный	8T25c	>95%	Нативный белок
Тропонин I мыши, скелетный	8T25m	>95%	Нативный белок
Тропонин I свиньи, скелетный	8T25p	>95%	Нативный белок
Тропонин I крысы, скелетный	8T25r	>95%	Нативный белок

Тропонин Т (TnT)

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Тропонин Т, сердечный	4T19	9G6	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 2-61
		7F4	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 67-86
		7G7	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 67-86
		2F3	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 145-164
		1A11	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 145-164
		1F11	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 145-164
		1C11	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 171-190
		7E7	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 223-242
	4T19cc	300cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 119-138
		329cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 119-138
		406cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 132-151
		1F11cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 145-164
	RC4T19	RecChim406	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 171-190
				ИФА, рекомбинантное химерное антитело

АНТИГЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Тропонин Т, сердечный, человека	8T15	>98%	Нативный белок
Тропонин Т, сердечный, человека, рекомбинантный	8RTT5	>95%	Рекомбинантный белок
Тропонин Т, скелетный, человека	8T24	>95%	Нативный белок
Тропонин Т быстрый скелетный, человека, рекомбинантный	8RFT4	>95%	Рекомбинантный белок
Тропонин Т медленный скелетный, человека, рекомбинантный	8RST2	>95%	Рекомбинантный белок
Тропоновый комплекс (I-T-C) человека	8T62	Н/Д	Нативный белок
Тропоновый комплекс (I-T-C) искусственный	8T62a	Н/Д	Нативный белок

АНТИГЕНЫ ЖИВОТНЫХ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Тропонин Т быка, сердечный	8T13b	>98%	Нативный белок
Тропонин Т собаки, сердечный	8T13c	>98%	Нативный белок
Тропонин Т мыши, сердечный	8T13m	>98%	Нативный белок
Тропонин Т свиньи, сердечный	8T13p	>98%	Нативный белок
Тропонин Т крысы, сердечный	8T13r	>98%	Нативный белок
Тропонин Т быка, скелетный	8T24b	>95%	Нативный белок
Тропонин Т собаки, скелетный	8T24c	>95%	Нативный белок
Тропонин Т мыши, скелетный	8T24m	>95%	Нативный белок
Тропонин Т свиньи, скелетный	8T24p	>95%	Нативный белок
Тропонин Т крысы, скелетный	8T24r	>95%	Нативный белок

Тропонин С (TnC)

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Тропонин С	4T27	7B9	IgG1	ИФА, ВБ
	4T27cc	7B9cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ
Тропоновый комплекс человека, нативный, сердечный	4TC2	20C6	IgG2b	ИФА
		Tcom8	IgG1	ИФА

АНТИГЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Тропонин С, человека	8T57	>98%	Нативный белок
Тропонин С человека, рекомбинантный, медленный скелетный/сердечный	8RSC4	>95%	Рекомбинантный
Тропонин С человека, рекомбинантный, скелетная изоформа 2	8RKC3	>90%	Рекомбинантный
Тропоновый комплекс (I-C)	8IC63	Н/Д	Нативный белок
Тропоновый комплекс (I-T-C) человека	8T62	Н/Д	Нативный белок
Тропоновый комплекс (I-T-C) искусственный	8T62a	Н/Д	Нативный белок

Вместе. Сегодня и Завтра.

www.hytest.ru



117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д.8.
Тел.: +7 499 613 23 20
E-mail: sales@hytest.ru
www.hytest.ru