

Troponiinin aptameerisitojat

LuK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biokemia
4/2024
Satu Pursimo

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

SATU PURSIMO: Troponiinien aptameerisitojat

LuK-tutkielma, 18 s.

Biokemia

02/2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Sydän- ja verisuonisairaudet ovat johtava kuolinsyy maailmanlaajuisesti, ja niissä sydäninfarkti toimii merkittävänä tekijänä edellyttäen tarvetta nopeaan ja tarkkaan diagnoosiin. Perinteisiä vasta-aineita käyttäviä immunomäärityksiä käytetään yleisesti troponiinien havaitsemiseen, mutta aptameerit, joilla on korkea sitoutumisaffiniteetti ja selektiivisyys, ovat nousseet lupaavaksi vaihtoehdoksi. Tämä tutkielma on kirjallisuuskatsaus, joka keskittyy sydämen troponiini I (cTnI) -pitoisuuksien määrittämiseen verinäytteistä vertaamalla aptameerien käyttöä perinteisiin vasta-aineisiin perustuviin immunomäärityksiin sekä pohditaan aptameerien tulevaisuudennäkymiä sydäninfarktidiagnostiikassa.

Troponiinit ovat sydänlihaksen säätelyproteiineja, joista etenkin troponiini I (cTnI) ja troponiini T (cTnT) voivat toimia sydäninfarktin biomarkkereina. Muihin biomarkkereihin verrattuna troponiinit pysyvät verenkierrossa usein kauemmin ja ovat hyvin sydänspesifisiä. Aptameerit ovat yksijuosteisia nukleiinihappoja tai peptidejä, jotka voivat sitoutua selektiivisesti spesifisiin kohdemolekyyleihin. Ne tarjoavat etuja vasta-aineisiin verrattuna, kuten helppo synteesi, alhainen immunogeenisyys ja kemiallinen stabiilisuus. Aptasensorit, jotka käyttävät aptameereja biologisina tunnistuselementteinä, osoittavat korkeaa herkkyyttä ja nopeita havaitsemisaikoja. Haasteita, kuten aptameerituotannon skaalautuvuus ja biostabiilisuuden parantaminen, on kuitenkin edelleen. Toisin sanoen aptameerit tarjoavat merkittäviä etuja vasta-aineisiin verrattuna troponiinien havaitsemisessa, erityisesti synteessin helppouden, stabiilisuuden ja spesifisyyden suhteen. Lisätutkimusta kuitenkin tarvitaan aptameerien tuotannon ja käytön optimoimiseksi diagnostiikassa, mutta niillä on lupaavaa potentiaalia.

Avainsanat: Sydäninfarkti; troponiini; aptameeri; aptasensori; diagnostiikka

Sisällysluettelo

1. Johdanto	2
2. Troponiinit biomarkkereina	4
3. Aptameerisitojat sydäninfarktidiagnostiikassa	6
3.1 Aptameerit ja SELEX-valintaprosessi	6
3.2 Troponiinien aptasensorit	8
3.2.1 Optiset aptasensorit	8
3.2.2 Elektrokemialliset aptasensorit	10
4 Aptameerit ja vasta-aineet	13
4.1 Immunomääritykset	13
4.2 Aptameerit vaihtoehtona vasta-aineille	14
5 Yhteenveto	16
Lähteet	17

1. Johdanto

Sydän- ja verisuonitaudit aiheuttivat vuonna 2021 lähes kolmasosan kaikista kuolemista maailmanlaajuisesti. Merkittävimpiä työikäisten kuolemaan johtavia sydän- ja verisuonitauteja olivat iskeemiset sydänsairaudet, joille tunnusomaista on heikentynyt verenkierto sydänlihakseen. Sydäninfarkti, joka tunnetaan yleisesti nimellä sydänkohtaus, on hengenvaarallinen sairauskohtaus, jossa verenkierto sydämeen estyy osittain tai kokonaan aiheuttaen pysyviä vaurioita sydänkudokseen. Sydäninfarktin yleisimpiin oireisiin liittyy rintakipu ja hengenahdistus, ja se edellyttää aina välitöntä sairaalahoitoa. (Saleh ja Ambrose 2018.)

Ensisijainen syy sydäninfarktiin on sepelvaltimoiden tukos. Ateroskleroosi eli kolesterolin ja muiden aineiden kertyminen valtimoihin muodostaa plakkeja, jotka ajan myötä voivat repeytyä. Tämä johtaa verihyytymien muodostumiseen, jotka voivat tukkia sepelvaltimoita. Verenkierron katkeaminen aiheuttaa hapenpuutteen sydänlihakseen, mikä puolestaan johtaa pysyviin sydänlihaskudon vaurioihin. Ateroskleroosiin vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa tupakointi, korkea verenpaine, korkea kolesterolitaso ja diabetes. Lisäksi ikä, sukupuoli ja elämäntapatekijät, kuten huono ruokavalio ja lihavuus, vaikuttavat sydäninfarktille altistumiseen. (Saleh ja Ambrose 2018.)

Sydäninfarktin diagnosointiin käytetään ensisijaisesti sydänfilmiä eli elektrokardiogrammia (engl. *electrocardiogram*, EKG). EKG on nopea ei-invasiivinen työkalu, joka tunnistaa sydämen sähköisen toiminnan muutoksilla sydänlihaskudon vaurion sijainnin ja laajuuden. Laitteiston korkea hinta ja epätarkkuus rajoittavat kuitenkin sen käyttöä. Toinen keino on sydäninfarktiin liittyvien biomarkkereiden pitoisuuksien määrittäminen verinäytteiden avulla. EKG:hen verrattuna verinäytetestit tarjoavat korkeamman diagnostisen tarkkuuden ja mahdollistavat jatkuvan seurannan. (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)

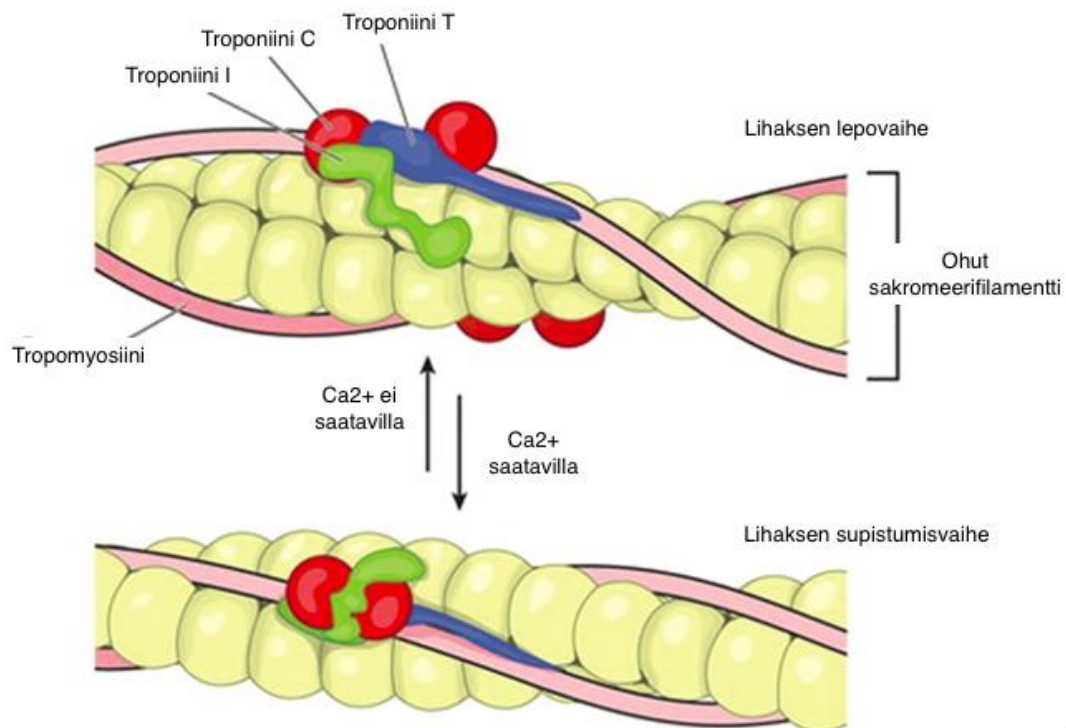
Troponiinia pidetään sydäninfarktidiagnostiikassa biomarkkereiden kultaisena standardina. Sydänlihakselle spesifisten troponiinien pitoisuuksien kohoaminen verenkierrossa viittaa suoraan sydänkudon vaurioon. Yleensä verinäytteen troponiinit analysoidaan käyttämällä erilaisia immunomääritystekniikoita. Vasta-aineiden, etenkin monoklonaalisten vasta-aineiden, käyttö on vakiintunut immunomäärityksissä niiden korkean spesifisyyden ja herkkyuden vuoksi. (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)

Viimeisinä vuosina aptameerit ovat kuitenkin nousseet lupaavaksi vaihtoehdoksi vasta-aineiden käytölle. Aptameerit ovat lyhyitä, yksijuosteisia nukleiinihappoja tai peptidejä, joilla on merkittävä kyky sitoutua selektiivisesti spesifisiin kohdemolekyyleihin. Aptameereilla on monenlaisia etuja vasta-aineisiin verrattuna, kuten niiden helppo synteesi, alhainen immunogeenisyys ja kemiallinen stabiilisuus. Aptameerien kyky muodostaa monimutkaisia kolmiulotteisia rakenteita mahdollistaa niiden monipuolisen soveltamisen diagnostiikassa. (Nimjee ja muut 2017.)

Tässä tutkielmassa käsitellään sydänlihakselle spesifisen troponiini I:n (engl. *cardiac troponin I*, cTnI) pitoisuuksien määrittämistä verinäytteistä. Tutkielmassa tarkastellaan, miten aptameereja voidaan soveltaa troponiinimäärityksissä ja vertaillaan niitä perinteisten vasta-aineiden käyttöön. Lisäksi pohditaan tulevaisuuden näkymiä aptameerien käytölle sydäninfarktidiagnostiikassa.

2. Troponiinit biomarkkereina

Troponiinit ovat tärkeitä säätelyproteiineja lihasten ohuissa filamenteissa. Yhdessä tropomyosiinin kanssa ne muodostavat poikkijuovaisen sydänlihaksen rakenteen ja säätelevät lihasten supistumista Ca^{2+} -välitteisellä aktiini-myosiini-vuorovaikutuksella. Sydänlihaksen heterotrimeerinen troponiinikompleksi sisältää kolmea eri troponiinin isoformia: troponiini I:tä (engl. *cardiac troponin I*, cTnI), troponiini T:tä (engl. *cardiac troponin T*, cTnT) ja troponiini C:tä (engl. *cardiac troponin C*, cTnC) (kuva 1). cTnT sitoo troponiinikompleksin tropomyosiiniin, cTnI inhiboi aktiini-myosiini-vuorovaikutusta ja cTnC sitoo kalsiumia käynnistäen supistumisen. (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.) Troponiini T koostuu kolmesta domainista: N-terminaalista, konservatiivisesta keskuksesta ja C-terminaalista. Troponiini I koostuu neljästä alfa-heliksisistä, jotka sisältävät viisi domainia: N-terminaali, IT-varsi, inhibitoriset peptidit, säätelijäpeptidit ja liikkuva C-terminaali. (Duque-Ossa ja muut 2023.)



Kuva 1. Sydänlihaksen troponiinikompleksi lihaksen lepo- ja supistumisvaiheessa. Kuva muokattu kohteesta (Shave ja muut 2010).

Sydäninfarktit voidaan EKG:n perusteella jakaa kahteen eri tyyppiin: ST-nousuinfarkteihin (engl. *ST-segment-elevation myocardial infarction*, STEMI) ja sydäninfarkteihin ilman ST-

nousua (engl. *non-ST-segment-elevation myocardial infarction*, NSTEMI). STEMI:ssä sepelvaltimo on kokonaan tukossa, kun taas NSTEMI:ssä vain osittain. Molemmissa tyypeissä hapen ja ravinteiden puute johtaa sydänlihassolun solukuolemaan eli nekroosiin, jossa solun hajoaminen vapauttaa sen sisällön ympäröivään kudokseen. Sydänlihaksesta vapautuneiden troponiinien pitoisuutta määrittämällä saadaan tietoa sydäninfarktin laajuudesta ja vakavuudesta. EKG:tä hyödynnetään alkuvaiheen hoitotarpeen arviointiin ja yhdessä troponiinitestien avulla voidaan antaa lopullinen diagnoosi. (Barstow ja muut 2017.)

Sydäninfarktin biomarkkereina hyödynnetään sydämen troponiini I:tä (cTnI) ja troponiini T:tä (cTnT). Näiden troponiinien isoformit ovat spesifisiä sydänlihakselle, kun taas esimerkiksi cTnC:n isoformeja voi löytyä myös luurankolihaksesta. Sydänspesifisyyden lisäksi cTnI ja cTnT toimivat hyvinä biomarkkereina niiden ilmentymisen vuoksi sydäninfarktin varhaisissa vaiheissa ja troponiinimääritysten herkkyiden vuoksi. cTnT vapautuu verenkiertoon 2–4 tuntia sydäninfarktin jälkeen ja säilyy verenkierrossa yli 10 päivää saavuttaen maksimipitoisuuden 1–2 päivässä. cTnI taas vapautuu verenkiertoon 3–4 tuntia sydäninfarktin jälkeen ja säilyy verenkierrossa yli 10 päivää saavuttaen maksimipitoisuuden 1-2 päivässä. cTnT:hen verrattuna cTnI omaa suuremman herkkyuden ja spesifisyyden sydänlihakseen. (Duque-Ossa ja muut 2023.) NSTEMI potilaille tehty tutkimus osoitti myös, että cTnI-pitoisuus kasvaa verenkierrossa huomattavasti nopeammin cTnT:hen verrattuna (Pickering ja muut 2020).

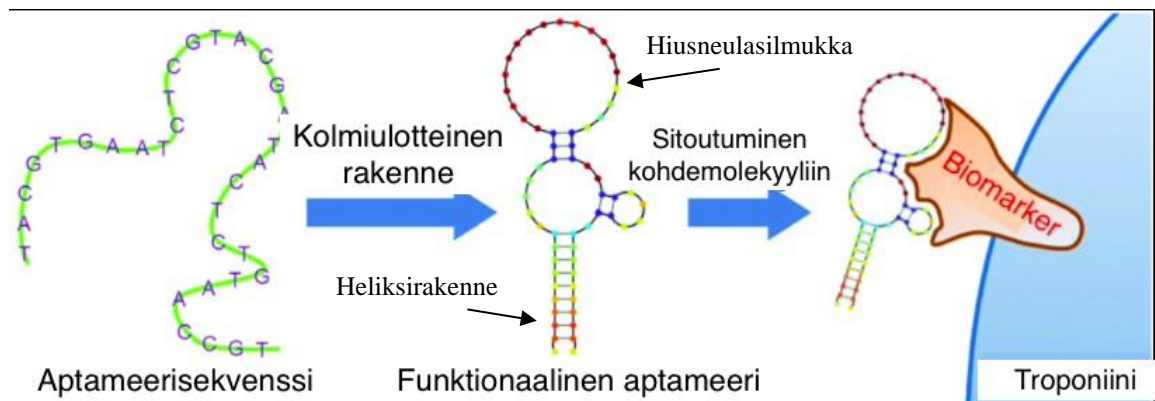
Normaali troponiinipitoisuus veressä on 1 ng/L-50 ng/L. Miesten troponiiniarvot ovat usein korkeampia kuin naisten sekä iän myötä troponiinitasot myös vaihtelevat. Troponiinit vapautuvat aluksi komplekseina vereen. Yhteisymmärrykseen tarkasta rakenteesta ei olla päästy, mutta spesifisten entsyymien avulla kompleksi hajoaa proteolyttisesti. Vapautuvien cTn:ien muodot voivat vaihdella, joista osa voidaan tunnistaa merkkiaineina sydäninfarktille. (Katrukha ja Katrukha 2021.) Termiä sydänlihaskohtaus voidaan käyttää, kun jokin määritetty troponiiniarvo ylittää vertailupopulaation 99. persentiilin yläreferenssiarvon. Tämä viittaa kynnysarvoon, jonka jälkeen troponiinitasoa pidetään epänormaaleina. (Thygesen ja muut 2018.)

Kyky havaita troponiinipitoisuus verestä sydänkohtauksen alkuvaiheessa edistää merkittävästi oikea-aikaista diagnoosia ja toimenpiteitä. Troponiinin säilyminen verenkierrossa mahdollistaa sarjamittaukset ja seurannan, mikä auttaa arvioimaan sydänlihaskohtauksen etenemistä. Myös sydäninfarktiin liittymättömät sairaudet, kuten munuaisten vajaatoiminta, voivat johtaa kroonisesti kohonneisiin troponiiniarvoihin. Testeissä on tällöin otettava huomioon myös potilaan sairaushistoria ja muut diagnostiset tulokset. (Mair ja muut 2018.)

3. Aptameerisitojat sydäninfarktidiagnostiikassa

3.1 Aptameerit ja SELEX-valintaprosessi

Aptameerit koostuvat nukleotideistä muodostuvista ketjuista. Ketjun nukleotidit rakentuvat deoksiriboosista tai riboosista sekä vaihtelevasta emäksestä: adeniini (A), tyymiini (T), sytosiini (C), guaniini (G) tai urasiili (U). Yksijuosteisilla aptameereilla on luonnollinen taipumus laskostua erillisiksi rakenteiksi vetysidosten ja ei-kovalenttisten vuorovaikutusten, kuten π - π vuorovaikutuksen, avulla. Aptameerien sekundäärirakenne koostuu usein emäspareista vetysidoksin muodostuvista heliksirakenteista ja hiusneulasilmukoista (engl. *hairpin loop*). Hiusneulasilmukoita syntyy nukleotidiketjun taipuessa itseään päin, jolloin se muodostaa silmukan muotoisen rakenteen. Aptameerien sitoutuminen proteiiniin epitooppiin perustuu rakenteelliseen komplementaarisuuteen, sähköstaattisiin vuorovaikutuksiin, vetysidoksiin ja Van der Waalsin voimiin. (kuva 2). (Gelinis ja muut 2016.)

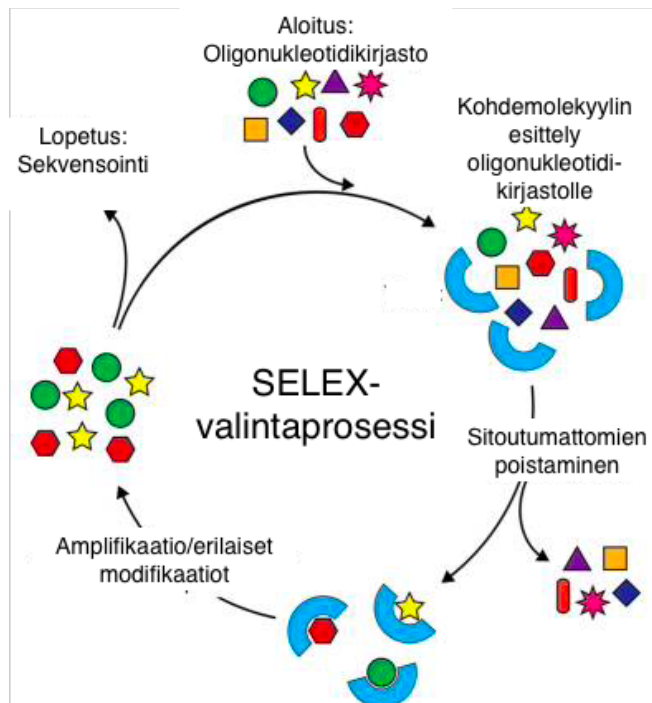


Kuva 2. Aptameerien rakenne ja sitoutuminen. Kuva muokattu kohteesta (Sun ja muut 2014).

Aptameerit voidaan luokitella nukleiinihapon tyyppin perusteella kahteen luokkaan: DNA-aptameerit ja RNA-aptameerit. RNA-aptameerien nukleotidirakenteessa tyymiiniin (T) tilalla on urasiili (U) sekä deoksiriboosin tilalla riboosi. RNA-aptameerien riboosin reaktiivisen hydroksyyliiryhmän vuoksi niiden rakenne on epästabiilimpi DNA-aptameereihin verrattuna. DNA-aptameerien tuotantokustannukset ovat alhaisemmat kuin RNA-aptameerien ja niiden valintaprosessi on yksinkertaisempi. RNA-aptameerien reaktiivisuus ja ei-Watson-Crick-emäspariutuminen mahdollistavat kuitenkin monipuolisemmat kolmiulotteisen rakenteet,

mikä on hyödyllinen ominaisuus spesifisyyttä ja korkeaa affiniteettia vaativiin tehtäviin. (Zhu ja muut 2015.)

Rakenteellista komplementaarisuutta kohdemolekyyliin voidaan muokata aptameerien tuottovaiheessa *in vitro* SELEX-valintaprosessilla (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). SELEX-prosessi varmistaa, että aptameerit sitoutuvat riittävän suurella spesifisyydellä ja affiniteetilla kohdemolekyyliinsä. SELEX-prosessi alkaa monipuolisen oligonukleotidikirjaston syntetisoimisella. Kirjaston monimuotoisuuteen vaikuttavat muun muassa sekvenssien monimuotoisuus, kemialliset modifikaatiot sekä erilaiset vakioalueet ja alukkeet. Valinta RNA- ja DNA-kirjaston väliltä edistää myös sopivan aptameerin valintaa. Oligonukleotidikirjaston valinnan jälkeen sitä esitellään kohdemolekyylille, jolloin osa sekvensseistä sitoutuu siihen. Sitoutuneet oligonukleotidit eluoidaan pois ja ne monistetaan DNA-sekvenssin tapauksessa polymeerasiketjureaktiolla eli PCR:llä ja RNA-sekvenssin tapauksessa käänteiskopiointi PCR:llä (engl. *reverse transcriptase PCR*, RT-PCR). Monistumisessa muodostunut kaksijuosteinen DNA/RNA muunnetaan takaisin yksijuosteiseksi DNA:ksi tai RNA:ksi. Tämä sykli toistetaan useamman kerran sitoutumisominaisuuksien parantamiseksi. Lopuksi rikastetut aptameerit sekvensoidaan. (kuva 3). (Bayat ja muut 2018; Kohlberger ja Gadermaier 2022)



Kuva 3. *SELEX-valintaprosessi*. Kuva muokattu kohteesta (Kinghorn ja muut 2017).

3.2 Troponiinien aptasensorit

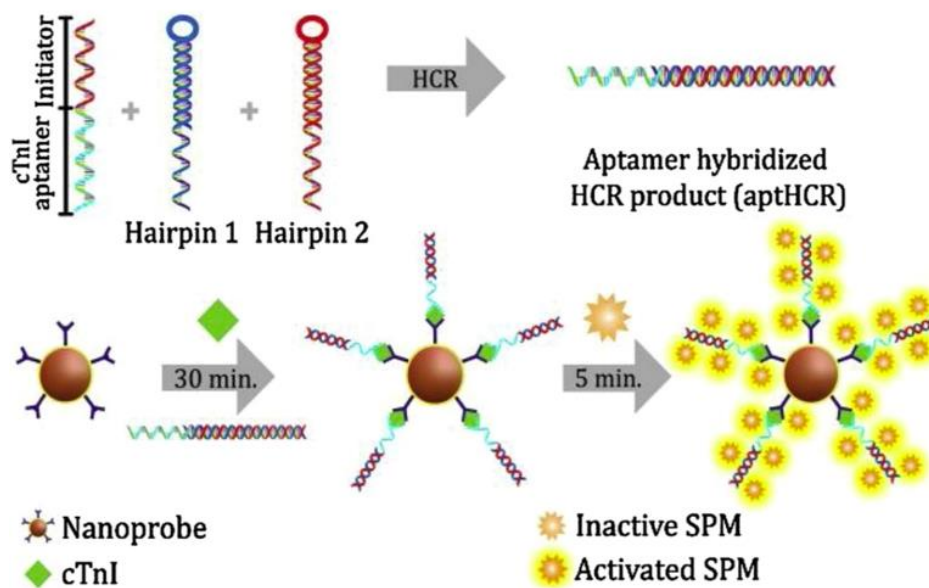
Biosensorit ovat analyttisiä laitteita, jotka mahdollistavat nopean analyysin ja reaaliaikaisen kohdemolekyylin detektion. Niiden toiminta perustuu biologisen tunnistuselementin hyödyntämiseen, joka sitoutuu spesifisesti kohdemolekyyliin ja laukaisee mitattavissa olevan signaalin. (Hosseinzadeh ja Mazloun-Ardakani 2020.) Optisten biosensorien toiminta voi perustua valon absorptioon, heijastuksen muutokseen tai valomäärän mittaamiseen, ja niiden saamat tulokset ovat usein herkkyydeltään parhaita. Optiset biosensorit voidaan jakaa kemiluminesenssiin, fluoresenssiin, ja pintaplasmoniresonanssiin (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) perustuviin sensoreihin. Optisten biosensoreiden lisäksi on elektrokemiallisiin ominaisuuksiin perustuvia sensoreita: amperometriset, impedimetriset ja kenttäefekti transistoriin (engl. field effect transistor, FET) perustuvat sensorit. Aptasensorit ovat biosensoreita, jotka hyödyntävät aptameereja biologisina tunnistuselementteinä. Aptasensorit on nostettu esille tehokkaiksi työkaluiksi sydänlihaksen troponiinien havaitsemiseen. (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)

3.2.1 Optiset aptasensorit

Troponiini I:n havaitsemiseen kehitetyt kemiluminoivat aptasensorit ovat yleisimmin elektrokemiluminoivia (ECL) sensoreita. Tyypillisesti ECL-aptasensoreissa aptameerit on immobilisoitu elektrodin pinnalle. Kohdeanalyytit sitoutuvat aptameereihin, jolloin elektrodissa tapahtuvat hapetus-pelkistys-reaktiot muodostavat viritystiloja. Viritystilojen purkautuessa muodostuva kemiluminesenssisignaali voidaan havaita ja sitä voidaan hyödyntää kohdeanalyytin eli tässä tapauksessa troponiini I:n pitoisuuden määrittämiseen. Erilaiset nanopartikkelit ovat erityisesti kiinnostuksen kohteina ECL-aptasensorien tehokkuuden tutkimisessa. Eräässä tutkimuksessa ruteenikompleksiin $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -perustuvan ECL-aptasensorin tavoitteena oli detektoida ATP:ta ja cTnI:tä samanaikaisesti. ECL:ään perustuvassa mittauksessa cTnI:n toteamisrajaksi (LOD) määritettiin 0.3 pg/ml (0.3 ng/L). (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.) Määrittämisen johtavuus- ja latauskyvyn parantamiseksi aptasensoria modifioitiin syklometalloidun iridium(III)-polyvinyylipyridiinipolymeerin nanopartikkelin (CIPNP) avulla, jolloin toteamisrajaksi saatiin 20 fM (0.48 ng/L). Kyseisessä tutkimuksessa iridiumia sisältävällä nanopartikkelilla modifioitua ECL-aptasensoria inkuboitiin troponiini I:n kanssa 1 h. (Saremi ja muut 2019.)

Fluoresoivat aptasensorit perustuvat fluoroforin kiinnittymiseen aptameeriin ja fluoresenssin intensiteetin muutoksen mittaukseen. Toisin sanoen troponiinin sitoutuessa leimattuun aptameeriin, sen konformaatiomuutos laukaisee fluoroforin fluoresoivan signaalin, joka voidaan detektoida monin eri tavoin. Veren seerumille muodostetussa fluoresoivassa

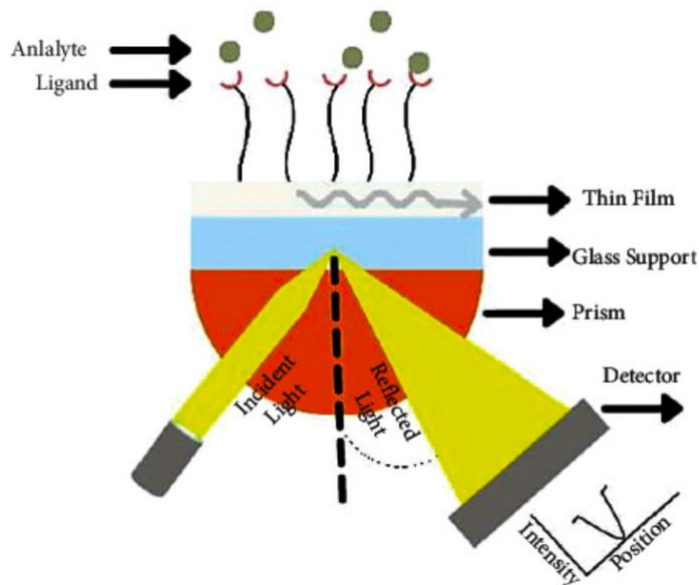
aptasensorissa cTnI sitoutuu vasta-aineilla modifioidun magneettisen piidioksidin ($mSiO_2$) ja hybridisaatioketjureaktion aptameeripohjaisen DNA-rakenteen (aptHCR) väliin sandwich -mallin mukaisesti. Fluoresenssisignaali syntyy kaksijuosteiseen DNA:han kiinnitetyn leiman avulla. Tämä leima emittoi virityksen purkautuessa fluoresoivan signaalin, joka voidaan havaita. (kuva 4). Tämän detektiomenetelmän toteutusrajaksi määritettiin 20 fM (0.48 ng/L) ja sillä on myös nopea detektioaika (30 min) ilman erityistä näytteen esivalmistelua tai puhdistusta. (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)



Kuva 4. $mSiO_2$ aptHCR -aptasensorin toimintaperiaate. $mSiO_2$ aptHCR -aptasensori on fluoresoiva aptasensori, jonka avulla voidaan detektoida cTnI:n pitoisuutta verestä. cTnI sitoutuu $mSiO_2$:n (kuvassa ruskealla) ja aptHCR:n väliin sandwich-mallin mukaisesti. aptHCR on hybridisaatioketjureaktion aptameeripohjainen DNA-rakenne, johon on liitetty fluoresoivia leimoja. Havaittu fluoresenssisignaali muodostuu leiman virityksen purkautuessa. Kuva on kohteesta (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)

SPR:ään ja Ramansirontaan (engl. *Surface Enhanced Raman Scattering*, SERS) perustuvat aptasensorit tehostavat tunnistussignaalia kohdemolekyyliden sitoutuessa aptameerien tunnistuselementteihin hyödyntämällä erilaisia pintamateriaaleja. SPR:ään pohjautuvien aptasensorien toiminta perustuu aptameerien immobilisointiin metallipinnalle, joka on yhteydessä lasipintaan. Lasipintaan kohdennettu valonsäde taittuu rajapinnasta. Taitekertoimen muutos viittaa troponiinin siotutumiseen aptameeriin. (kuva 5). SERS-pohjaiset aptasensorit taas perustuvat aptameerien immobilisointiin SERS-aktiiviseen substraattiin. Troponiinin sitoutuessa muodostunut kompleksi altistetaan Raman -spektroskopialle, jossa kompleksiin kohdennettu laser aiheuttaa troponiinin värähtelyä ja

Raman-signaalin emissiota. Raman-signaali viittaa sironneen valon energiamuutokseen sen osuessa kohdemolekyyliin. Signaalin avulla voidaan analysoida troponiinipitoisuutta. Erään tutkimuksen mukaan paperiseen nauhaan perustuvan SERS-pohjaisen aptasensorin toteutumisrajaksi määritettiin 0.1 ng/ml (100 ng/L). (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)

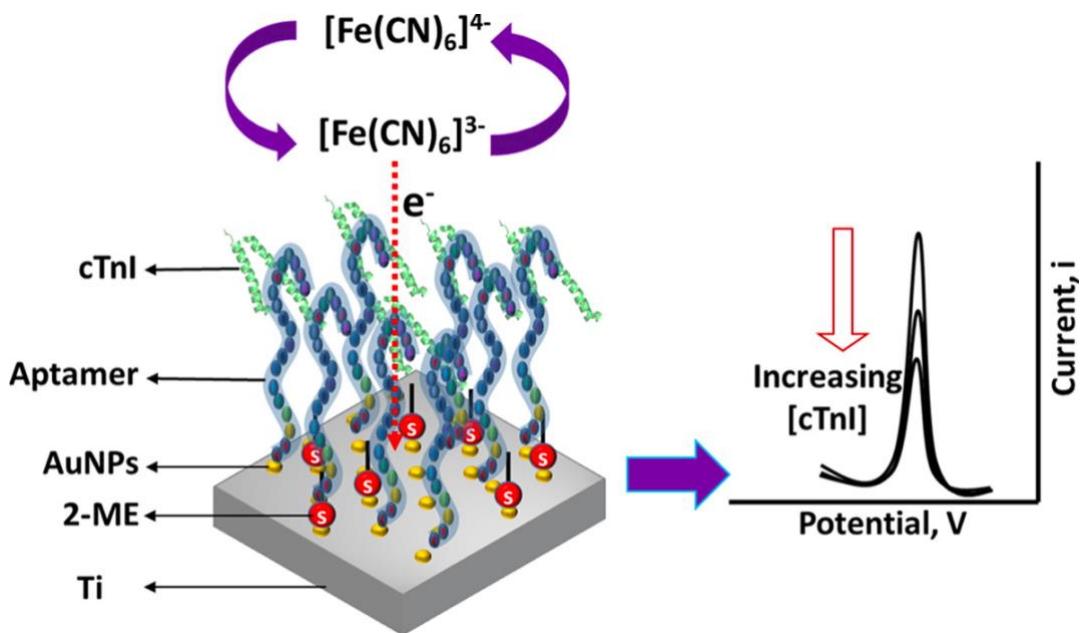


Kuva 5. *SPR:n toimintaperiaate*. Näyteanalyytin sitoutuessa lasipintaan kiinnitettyihin ligandeihin, se aiheuttaa muutoksen prismasta heijastuvan valonsäteen taitekertoimeen. Tätä periaatetta hyödynnetään eräissä troponiineja havaitsevilla aptasensoreissa. Tällöin havaittu taitekertoimen muutos voidaan verrannollistaa troponiinipitoisuuteen veressä. Kuva kohteesta (Mulyanti ja muut 2022).

3.2.2 Elektrokemialliset aptasensorit

Elektrokemialliset aptasensorit pohjautuvat aptameerin sitoutumisen indusoimiin muutoksiin sähkökemiallisissa ominaisuuksissa. Amperometriset aptasensorit perustuvat vakio potentiaalissa aptameerin ja troponiinin sitoutuessa tapahtuvaan sähkövirran muutokseen, jota havainnoimalla voidaan määrittää veren troponiinitasoa. Voltametrisissa aptasensoreissa taas määrittämiseen kohdistetaan sähköpotentiaalinen muutos, mikä aiheuttaa elektronien siirtymistä hapetus-pelkistysreaktioissa. Troponiinin sitoutuminen aptameereihin aiheuttaa muutoksen elektroninsiirrossa, mikä voidaan havaita ja verrata tunnetuilla troponiinipitoisuuksilla muodostettuun standardikäyrään, joka kuvaa pitoisuuden suhdetta sähköpotentiaalinen muutokseen. Veren seerumille neliöaaltovoltametriaan (engl. *square wave voltammetry*, SWV) perustuvan aptasensorin toteutumisrajaksi määriteltiin 1.0 pM (24 ng/L).

(Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.) cTnI:n havaitsemiseksi tarkkuudeltaan herkimmäksi voltametriseksi aptasensoriksi esiteltiin kustannustehokas kultananopartikkeilla eli AuNTPs:llä modifioitu titanium -metalliliuska, jonka toteutusrajaksi saatiin 0.18 pM (4.3 ng/L). Kuvan 6 mukaisesti havaitaan, miten virran muutos viittaa suoraan troponiini I:n pitoisuuden kasvuun. Tutkimuksessa inkubaatioaika troponiini I:n kanssa oli 50 min. (Lopa ja muut 2019.)

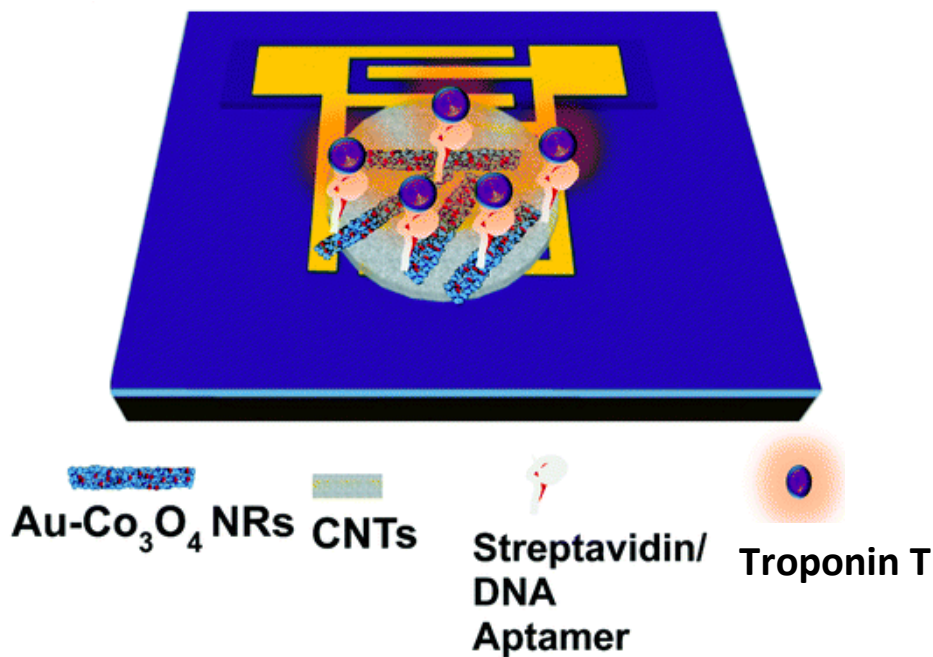


Kuva 6. AuNTPs:llä modifioitu titanium -metalliliuska. AuNTPs:llä modifioitu titanium -metalliliuska on voltametrinen aptasensori, jonka avulla voidaan detektoida cTnI:n pitoisuutta verestä. Kultananopartikkeilla (AuNPs) kerrostettu titanium-levy (Ti) on immobilisoitu aptameereilla ja 2-merkaptetanolilla (2-ME). cTnI:n sitoutuminen havaitaan ferri-/ferrosyanidi $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ hapetus-pelkistys-parin avulla, johon cTnI:n sitoutuminen aiheuttaa anodisen huippuvirran laskun (engl. anodic peak current, I_{pa}). Kuva kohteesta (Lopa ja muut 2019).

Impedimetristen aptasensorien toiminta perustuu impedanssin suureeseen, joka kuvaa vaihtovirran aiheuttamaa vastusta virtapiirissä. Kohdemolekyylin sitoutuminen elektrodiin immobilisoituun aptameeriin aiheuttaa muutoksen impedanssissa, mikä on verrannollinen troponiinin pitoisuuteen. Impedanssin muutos perustuu elektroninsiirtokinetiikan muutokseen elektrodilla, joka vaikuttaa mitattuun resistanssiin. Eri materiaalien käyttö voi edistää impedimetristen aptasensorin toimintatehoa muun muassa korkean johtavuuden ja hapetus-pelkistys-ominaisuuksien avulla. Molybdeenisulfidiin (MoS₂) -perustuvan aptasensorin toteutusrajaksi määriteltiin 10 fM (0.24 ng/L). Toisessa lupaavassa impedimetrisessä aptasensorissa myoglobinin ja cTnI:n tunnistamiseksi vetysubstioituun graphidiyyniin

(HsGDY) upotettiin nanotimanttirakenteita (NDs), jolloin saatiin aikaiseksi hyvin herkkä HsGDY@NDs -aptasensori. Toteutumisrajaksi tälle menetelmälle määritettiin cTnI:n tunnistamiseen 6.29 fg/mL (0,00629 ng/L). Optimaaliseksi reaktioajaksi määriteltiin tutkimuksessa 1,5 h, johon kuului 1 h inkubaatioaika ja 30 min sitoutumisaikaa. (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)

FET:iin perustuvissa aptasensoreissa kahden metallielektrodin välinen puolijohdemateriaali modifioituu aptameerin sitoutuessa kohdemolekyyliin. (kuva 7). Esimerkkinä cTnI:n havaitseminen syljistä pintaplasmafluoresenssispektroskopian (engl. *surface-plasma fluorescence spectroscopy*, SPFs) ja grafeeni FET:iin (gFET) perustuvan sensorin avulla, jonka toteutumisrajaksi saatiin 0.88 pg/mL (0.88 ng/L). Toteutumisrajan 0.1 ng/mL (100 ng/L) saavutti cTnI:tä havaitseva kultakerrostettu polypii FET (Si-FET). FET:iin perustuvat aptasensorit tarvitsevat vielä lisäkehitystä herkemman havaitsemistarkkuuden saavuttamiseksi. (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)



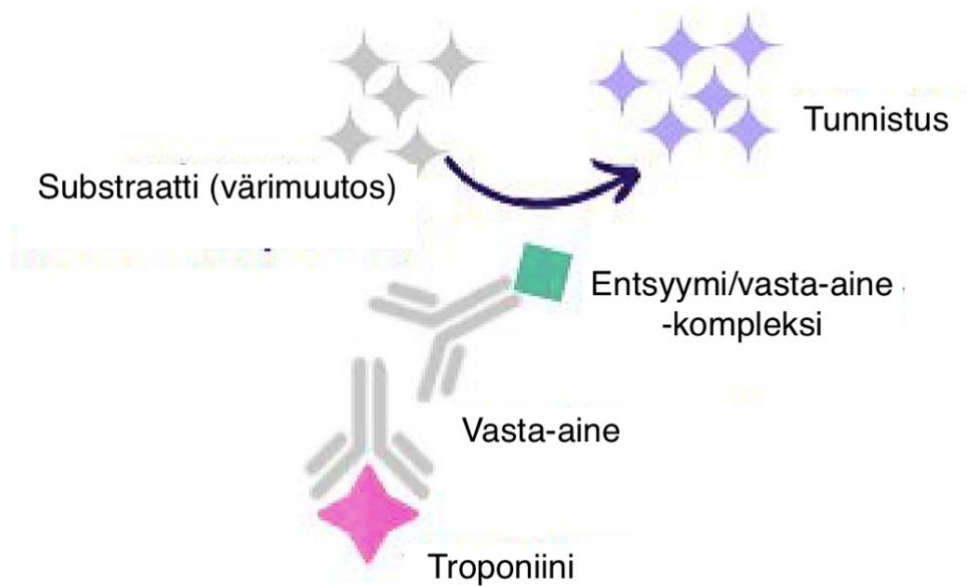
Kuva 7. FET-pohjaisen aptasensorin periaate cTnI:n havaitsemiseen. Aptasensorin pinta on immobilisoitu streptavidiinilla, joihin aptameerit sitoutuvat. cTnI:n sitoutuminen indusoi konformaatiomuutoksen aptameereissa muuttaen sensorin pintavarausta. Varauksen muutos havaitaan kahden elektrodin välisessä hiilinanoputkissa (engl. carbon nanotubes, CNTs) kulkevassa sähkökentässä ja havaittu signaali osoittaa troponiinipitoisuuden. Tämän aptasensorin herkkyyttä on parannettu kultananopartikkeleilla kerrostetun kobolttioksidinanosauvan (Au-Co₃O₄NRs) avulla. Kuva muokattu kohteesta (Surya ja muut 2020.)

4 Aptameerit ja vasta-aineet

4.1 Immunomääritykset

Sydämen troponiinipitoisuuden mittaus perinteisin menetelmin perustuu vasta-aineiden spesifisyyteen sydämen troponiinin havaitsemiseksi ja kvantitoimiseksi potilaan verestä. Potilalta otettu verinäyte sekoitetaan spesifisten sydämen troponiineja tunnistavien vasta-aineiden kanssa. Vasta-aineet kohtaavat näytteessä sydämen troponiinimolekyylejä, jolloin ne muodostavat vasta-aine-antigeenikompleksin spesifisen sitoutumisproessin kautta. Sitoutuminen tapahtuu sydämen troponiinimolekyylien antigeenisissä kohdissa, jolloin muodostuu stabiili kompleksi. Mitattavissa oleva signaali, joka osoittaa vasta-aine-antigeenikompleksin läsnäolon ja määrän, voidaan tuottaa eri menetelmiä käyttäen. Yleisimpiä tekniikoita ovat entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), kemiluminesenssi-immunomääritys (engl. *chemiluminescent immunoassay*, CLIA) ja fluoresenssi-immunomääritykset (engl. *fluorescence immunoassays*, FI). Myös pintaplasmoniresonanssia (engl. *Surface plasmon resonance*) voidaan hyödyntää troponiinin havaitsemiseen vasta-aineita käyttämällä. (Fathil ja muut 2015.)

ELISA:ssa vasta-aineeseen liitetty entsyymi tuottaa värinmuutoksen tai vastaavan signaalin. (kuva 8). Muodostetun signaalin intensiteetti on suoraan verrannollinen sydämen troponiinin pitoisuuteen potilaan veressä, mikä korreloi sydänlihaskaurion laajuuteen. (Fathil ja muut 2015.) Kaupallisten ELISA -kittien herkkyys, havaitsemisalue ja määritysaika vaihtelevat. Herkin tulos saadaan RayBio cTnI ELISA Kit:llä, jonka analyysin herkkyys on 0.38 pg/mL (0.38 ng/L). Menetelmä vaatii kuitenkin 4–6 tunnin määritysaajan. Laajimman havaitsemisalueen, 31.3–4000 pg/mL (31.3–4000 ng/L), omaava Ab200016 cTnI ELISA Kit voisi olla hyvä pitkän ajan seurantaan, mutta se ei anna toteutumisrajaltaan yhtä herkkiä tuloksia muihin kitteihin verrattuna. Lyhimmät määritysaajat kaupallisissa ELISA kiteissä ovat 1,5 tuntia, mutta ne vaativat usein uhrauksia analyysin herkkyydessä. (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.)



Kuva 8. *ELISA-määrityksen periaate. Kuva muokattu kohteesta (Duque-Ossa ja muut 2023).*

CLIA käyttää kemiluminoivia substraatteja, usein luminolia sekä leimausentsyymejä, kuten piparjuuriperoksidaasia, analyysissaan. Näytepitoisuudet määritetään kemiluminesenssin avulla emittoituneen valon intensiteetin perusteella. FI:ssa taas hyödynnetään vasta-aineeseen kiinnittynyttä leimaa, joka virityksen purkautuessa vapauttaa fluoresenssisignaalin. Havaittu fluoresenssisignaali on suoraan verrannollinen näyteanalyytin pitoisuuteen. FI:ssa erityistä on mahdollisuus hyvin herkkiin määrittäisiin. Sydämen troponiini I:n havaitsemiseen kehitetylle sirupohjaiselle sandwich-immunomääritykselle määritettiin toteutumisrajaksi 0.1 µg/L (100 ng/L). (Fathil ja muut 2015.) SPR:ää käytetään myös erilaisissa immunomääritystekniikoissa molekyylivuorovaikutusten havaitsemiseksi. Yksi esimerkki on cTnI:tä havaitseva SPR-immunosensori, joka saavutti havaitsemisrajaksi 68 ng/L. SPR-immunomääritykset tarjoavat useita etuja, kuten leimattoman havaitsemisen, vuorovaikutusten reaaliaikaisen analyysin, anturin pinnan regeneroinnin ja edullisen analyysin. (Kwon ja muut 2011)

4.2 Aptameerit vaihtoehtona vasta-aineille

Monenlaisia eri ominaisuuksia omaavia aptasensoreita on valmistettu troponiinipitoisuuden havaitsemiseen. Optiset aptasensorit, erityisesti elektrokemiluminesoivat ja fluoresoivat aptasensorit ovat osoittaneet suurta herkkyyttä ja alhaisia määrittäysaikoja (alle 1 h). Elektrokemiallisten aptasensorien määrittäysaika on lähes samaa luokkaa verrattuna optisiin aptasensoreihin, mutta niiden herkkyys on hieman heikompi. Erilaisissa ELISA-määrityksissä havaitsemisrajat sekä määrittäysajat vaihtelevat suuresti. Määrittäysajat ovat keskimäärin

kuitenkin aptasensorimäärityksiä huomattavasti suurempi (1,5 h – yli 6 h). Määritysaikojen lisäksi rajoituksina niin ELISA:ssa kuin CLIA:ssa ja FI:ssa ovat suuret näytekoot, vasta-aineiden kalliit hinnat, pitkä näytteiden esivalmistelu ja työläät protokollat. ELISA:aan verrattuna CLIA tarjoaa hieman nopeammat havaitsemisajat ja FI taas saavuttaa usein alhaisempia toteutumisrajoja (LOD). (Fathil ja muut 2015.)

Aptameerit ovat osoittaneet minimaalista ristireaktiivisuutta ei-kohdemolekyylien kanssa, mikä vähentää väärin positiivisten tulosten todennäköisyyttä. Tämä ominaisuus on erityisen edullinen erottamaan sydänspesifinen troponiini luurankoli hasten troponiinista tai muista häiritsevistä aineista veressä. Aptameerit voivat saavuttaa vasta-aineisiin verrattavia sitoutumisaffiniteetteja parantaen troponiinien havaitsemisen tarkkuutta. Herkimmät analyysit löytyvät yhä kuitenkin perinteisten immunomääritysten parista. Aptameerit ovat helposti muokattavissa parantamaan niiden stabiilisuutta, herkkyyttä ja spesifisyyttä. Aptameerit kestävät erilaisia varastointiolosuhteita menettämättä rakennettaan tai sitoutumisominaisuuksia. Parannettu stabiilisuus edistää aptameeripohjaisten määritysten säilyvyyttä, mikä ratkaisee reagenssien varastointiin ja käsittelyyn liittyvät ongelmat. Vasta-aineiden käytöllä on pitkä historia ja niiden laaja kaupallinen saatavuus ovat yksi niiden tärkeimmistä eduista. Rajoituksina vasta-aineiden käytölle ovat kuitenkin niiden heikompi stabiilisuus sekä monimutkainen ja kallis tuotanto. Sekä vasta-aineita että aptameereja voidaan valikoida ja tuottaa spesifisesti sydämen troponiineille tarpeeksi korkealla affiniteetilla. Niitä molempia voidaan myös integroida erilaisiin diagnostisiin testeihin ja alustoihin. (Barstow ja muut 2017; Hosseinzadeh ja Mazloun-Ardakani 2020.)

5 Yhteenveto

Sydämen troponiinien, erityisesti troponiini I:n (cTnI) ja troponiini T:n (cTnT), havaitseminen ja kvantitointi on ratkaisevan tärkeää sydäninfarktin diagnosoinnissa. Perinteiset vasta-aineita hyödyntävät immunomääritysmenetelmät ovat olleet troponiinin havaitsemisen kultastandardi niiden korkean spesifisyyden ja herkkyuden vuoksi. Lupaavaksi vaihtoehdoksi nousevat aptameerit tarjoavat kuitenkin useita etuja vasta-aineisiin verrattuna niiden synteessin helppouden, alhaisen immunogeenisyyden ja kemiallisen stabiiliuden suhteen. SELEX-valintaprosessi mahdollistaa sellaisten aptameerien synteessin, jotka on modifioitu sitoutumaan erityisesti sydämen troponiineihin, minimoiden ristireaktiivisuuden ja väärät positiiviset tulokset.

Aptasensorit eli biosensorit, jotka käyttävät aptameereja tunnistuselementteinään, ovat osoittaneet suurta herkkyyttä ja nopeita havaitsemisaikoja erilaisissa troponiinimäärityksissä. Aptameerien monipuolisuus, stabiilisuus ja muuntelun helppous ovat niiden tärkeimpiä etuja vasta-aineisiin verrattuna. Aptameerien eduista huolimatta cTnI:n havaitsemiseen sydäninfarktidiagnostiikassa tai hoitopistetestauksessa ei toistaiseksi kuitenkaan hyödynnetä aptasensoreita (Kazemi Asl ja Rahimzadegan 2023.) Perinteiset immunomääritykset tarjoavat edelleen herkimvät analyysit troponiinin havaitsemiseen.

Yksi isoimmista haasteita aptameerien käytölle on aptameerituotannon skaalautuvuus kustannustehokkaasti samalla säilyttäen lopputuotteiden yhtenäisyys. Nukleiinihappopohjaisina aptameerit ovat herkkiä nukleaasien aiheuttamalle hajoamiselle, jolloin niiden biostabilisuuden parantaminen ja suojaaminen entsymaattiselta hajoamiselta on olennainen osa luotettavien määritysten saavuttamiseksi. Aptameeripohjaisen diagnostiikan protokollien luominen sekä eri valmistusprosessien validointi ja standardointi vaatii lainsäädännöllistä hyväksyntää, mikä saattaa olla aikaa vievä prosessi. Aptameeriteknologian jatkuvan tutkimuksen ja kehityksen myötä aptasensorien tulevaisuudennäkymät troponiinin havaitsemisessa ja muissa diagnostisissa sovelluksissa ovat kuitenkin lupaavat.

Lähteet

- Barstow, C., Rice, M. & McDivitt, J. D. (2017) Acute Coronary Syndrome: Diagnostic Evaluation. *Am Fam Physician* **95**:170–177.
- Bayat, P., Nosrati, R., Alibolandi, M., Rafatpanah, H., Abnous, K., Khedri, M. & Ramezani, M. (2018) SELEX methods on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers. *Biochimie* **154**:132–155.
- Duque-Ossa, L. C., García-Ferrera, B. & Reyes-Retana, J. A. (2023) Troponin I as a Biomarker for Early Detection of Acute Myocardial Infarction. *Curr Probl Cardiol* **48**:101067.
- Fathil, M. F. M., Md Arshad, M. K., Gopinath, S. C. B., Hashim, U., Adzhri, R., Ayub, R. M., ... Tang, T.-H. (2015) Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers. *Biosens Bioelectron* **70**:209–220.
- Gelinas, A. D., Davies, D. R. & Janjic, N. (2016) Embracing proteins: Structural themes in aptamer-protein complexes. *Curr Opin Struct Biol* **36**:122–132.
- Hosseinzadeh, L. & Mazloum-Ardakani, M. (2020) Advances in aptasensor technology. *Adv Clin Chem* **99**:237–279.
- Katrakha, I. A. & Katrukha, A. G. (2021) Myocardial Injury and the Release of Troponins I and T in the Blood of Patients. *Clin Chem* **67**:124–130.
- Kazemi Asl, S. & Rahimzadegan, M. (2023) Recent Advances in the Fabrication of Nano-aptasensors for the Detection of Troponin as a Main Biomarker of Acute Myocardial Infarction. *Crit Rev Anal Chem* **53**:594–613.
- Kinghorn, A. B., Fraser, L. A., Lang, S., Shiu, S. C.-C. & Tanner, J. A. (2017) Aptamer Bioinformatics. *Int J Mol Sci* **18**.
- Kohlberger, M. & Gadermaier, G. (2022) SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnol Appl Biochem* **69**:1771–1792.
- Kwon, Y.-C., Kim, M.-G., Kim, E.-M., Shin, Y.-B., Lee, S.-K., Lee, S. D., ... Ro, H.-S. (2011) Development of a surface plasmon resonance-based immunosensor for the rapid detection of cardiac troponin I. *Biotechnol Lett* **33**:921–927.
- Lopa, N. S., Rahman, M. M., Ahmed, F., Ryu, T., Sutradhar, S. C., Lei, J., ... Kim, W. (2019) Simple, low-cost, sensitive and label-free aptasensor for the detection of cardiac troponin I based on a gold nanoparticles modified titanium foil. *Biosens Bioelectron* **126**:381–388.
- Mair, J., Lindahl, B., Hammarsten, O., Müller, C., Giannitsis, E., Huber, K., ... Jaffe, A. S. (2018) How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* **7**:553–560.
- Mulyanti, B., Nugroho, H. S., Wulandari, C., Rahmawati, Y., Hasanah, L., Hamidah, I., ... Majlis, B. Y. (2022) SPR-Based Sensor for the Early Detection or Monitoring of Kidney Problems. *Int J Biomater* **2022**:9135172.
- Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C. & Sullenger, B. A. (2017) Aptamers as Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **57**:61–79.

Pickering, J. W., Young, J. M., George, P. M., Pemberton, C. J., Watson, A., Aldous, S. J., ... Than, M. P. (2020) Early kinetic profiles of troponin I and T measured by high-sensitivity assays in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta* **505**:15–25.

Saleh, M. & Ambrose, J. A. (2018) Understanding myocardial infarction. *F1000Res* **7**:F1000 Faculty Rev-1378.

Saremi, M., Amini, A. & Heydari, H. (2019) An aptasensor for troponin I based on the aggregation-induced electrochemiluminescence of nanoparticles prepared from a cyclometallated iridium(III) complex and poly(4-vinylpyridine-co-styrene) deposited on nitrogen-doped graphene. *Mikrochim Acta* **186**:254.

Shave, R., Baggish, A., George, K., Wood, M., Scharhag, J., Whyte, G., ... Thompson, P. D. (2010) Exercise-induced cardiac troponin elevation: Evidence, mechanisms, and implications. *J Am Coll Cardiol* **56**:169–176.

Sun, H., Zhu, X., Lu, P. Y., Rosato, R. R., Tan, W. & Zu, Y. (2014) Oligonucleotide aptamers: New tools for targeted cancer therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* **3**:e182.

Surya, S. G., Majhi, S. M., Agarwal, D. K., Lahcen, A. A., Yuvaraja, S., Chappanda, K. N. & Salama, K. N. (2020) A label-free aptasensor FET based on Au nanoparticle decorated Co(3)O(4) nanorods and a SWCNT layer for detection of cardiac troponin T protein. *J Mater Chem B* **8**:18–26.

Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A. & White, H. D. (2018) Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol* **72**:2231–2264.

Zhu, Q., Liu, G. & Kai, M. (2015) DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. *Molecules* **20**:20979–20997.