

Makrotroponiinit ja troponiinien autovasta-aineet sydäninfarktidiagnostiikassa

LuK-tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemia

05/2024

Heidi Rizk

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

HEIDI RIZK: Makrotroponiinit ja troponiinien autovasta-aineet sydäninfarktidiagnostiikassa

Tutkielma 13 s

Biokemia

Toukokuu 2024

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

Sydäninfarkti on sairauskohtaus, jossa hapellisen veren virtaus sepelvaltimon kautta sydänlihakseen on rajoittunut. Sydäninfarktissa sydänlihaksesta vapautuu verenkiertoon sydänperäisiä troponiineja, jotka havaitaan verikokeissa käyttämällä kohdennettua määrittystä. Sydänperäisen troponiinin määritykset ovat alttiita häiriöille. Tässä tutkielmassa selvitetään troponiinin autovasta-aineiden ja makrotroponiinien aiheuttamaa häiriötä sydänperäisen troponiinin määrityksille.

Troponiinin autovasta-aineet ovat immuunijärjestelmän tuottamia troponiinille spesifisiä vasta-aineita. Troponiinin autovasta-aineet muodostuvat, kun verenkiertoon vapautuu troponiinia ja immuunijärjestelmä havaitsee niitä. Makrotroponiini koostuu sydänperäisestä troponiinista ja siihen sitoutuvasta troponiinin autovasta-aineesta. Makrotroponiinit saavat määrityksen tulokset ilmenemään kohonneilta. Tähän häiriömekanismiin vaikuttaa makrotroponiinien rakenne ja niiden pitkäikäisyys verenkierrossa. Troponiiniin sitoutuvat vasta-aineet voivat puolestaan aiheuttaa virheellisen pieniä tuloksia. Makrotroponiini voidaan havaita käyttämällä menetelmiä, jotka poistavat näytteistä vasta-aineet ja vasta-ainekompleksit tai jotka jaottelevat näytteessä olevat molekyylit molekyylipainon tai tiheyden mukaan. Troponiinin autovasta-aineet voidaan havaita niitä tunnistavalla immunomäärityksellä.

Sydäninfarktin ja muiden äkillisten sydänoireyhtymien hoidon kannalta on tärkeää, että makrotroponiinien ja troponiini autovasta-aineiden vaikutuksia sydäninfarktin diagnosointiin tutkitaan.

Sisällysluettelo

| | |
|--|----|
| 1. Johdanto | 2 |
| 2. Makrotroponiinit ja troponiinin autovasta-aineet..... | 3 |
| 3. Makrotroponiinien ja autovasta-aineiden häiriömekanismit..... | 3 |
| 4. Makrotroponiinit ja autovasta-aineet sydäninfarktidiagnostiikan häiritsijöinä | 4 |
| 5. Makrotroponiinien ja autovasta-aineiden havaitseminen | 5 |
| 6. Yhteenveto..... | 11 |
| 7. Lähdeluettelo | 12 |

1. Johdanto

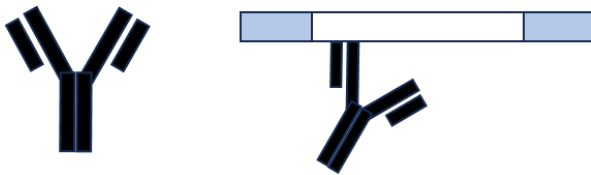
Sydäninfarkti on sairauskohtaus, jossa osa sydäimestä saa liian vähän happea verenkierrosta. Tämä johtuu yleensä sepelvaltimon tukoksesta. Sepelvaltimo toimittaa sydämeen happipitoista verta. Sepelvaltimeen kehittyy plakki, kun valtimon seinämään kertyy kolesterolia, rasvaa ja valkosoluja. Sepelvaltimoplakki muuttuu ajan myötä hauraaksi ja voi revetä. Repeämän seurauksena sepelvaltimon sisään muodostuu verihyytymä, joka estää verenkierron ja veren hapen pääsyn sydänlihaskudokseen. Sydäninfarktin yleisiä oireita ovat rintakipu, hengenahdistus, pahoinvointi ja epänormaali sydämen syke. Mahdollisia sydäninfarktin syntyyn myötävaikuttavia tekijöitä ovat vanhuus, tupakan poltto, korkea verenpaine, matalan tiheyden lipoproteiinin kolesterolin korkeat tasot verenkierrossa, diabetes ja monet muut. Sydäninfarktin diagnosoimiseen käytetään potilaan oireita, sydänsähkökäyrää (engl. *electrocardiogram*, ECG), sekä sydänperäisiä troponiineja mittaavia verikokeita. Sydäninfarktin hoidossa tähdätään sydänlihaksen verenkierron palauttamisen ja jälkihoitoon sisältyy elämäntapojen muuttaminen, esimerkiksi terveellisempi ruokavalio ja liikunta (Lu ja muut 2015.)

Troponiini kompleksi, joka koostuu troponiinialayksiköistä I, T ja C, osallistuu lihassoluissa lihasten supistumiseen. Troponiini esiintyy eri isoformeina luusto- ja sydänlihaksissa. Sydänperäiset troponiinit (cardiac troponin, cTn) ovat sydänlihassoluissa esiintyviä proteiineja. cTn:ät ovat tärkein biomerkkiaine sydänlihassolujen vaurioitumisen, kuten sydäninfarktin, diagnosoimiseksi (Savukoski ja muut 2012). Sydäninfarktin tapahtuessa sydänlihassolut vaurioituvat tai kuolevat, jolloin cTn:iä vapautuu verenkiertoon. cTn:n mittauksella pystytään havaitsemaan tuore tai pysyvä sydänlihassaurio (Savukoski ja muut 2014). cTn-mittaukset auttavat arvioimaan sydäninfarktin laajuutta ja ennustamaan potilaan ennustetta. On tärkeää huomata, että cTn:n pitoisuus veressä voi nousta myös muista syistä, kuten voimakkaan fyysisen rasituksen tai sydämen vajaatoiminnan vuoksi, joten potilaan kokonaisvaltainen arviointi on tärkeää (Dzoyem ja muut 2014).

cTn-pitoisuutta mitataan immunomäärityksen avulla. Välillä cTn-mittauksissa esiintyy häiriöitä, jotka hankaloittavat testien käyttöä diagnostiikassa. Eräitä mahdollisia häiriötekijöitä cTn-mittauksissa ovat troponiinin autovasta-aineiden ja makrotroponiinin esiintyminen näytteissä. Tässä tutkielmassa tavoitteena on esitellä, mitä troponiinin autovasta-aineet ja makrotroponiini ovat, millaisilla menetelmillä ne voidaan havaita ja miten ne voivat häiritä sydäninfarktidiagnostiikkaa.

2. Makrotroponiinit ja troponiinin autovasta-aineet

cTn-autovasta-aineiden ja cTn:ien kompleksia kutsutaan nimellä makrotroponiini (kuva 1) (Lam ja muut 2023). Autovasta-aineet ovat immuunijärjestelmän tuottamia vasta-aineita, jotka virheellisesti tunnistavat elimistön omia molekyylejä. Autovasta-aineita voi muodostua cTn:ille ja muillekin elimistön molekyyleille. cTn-spesifiset autovasta-aineet (engl. *cardiac troponin autoantibody*, cTnAAB) muodostuvat, kun cTn vapautuu verenkiertoon ja immuunijärjestelmä havaitsee niitä. cTnAAB:n muodostumisen mekanismeja ei tunneta. cTnAAB:t voi esiintyä henkilöillä terveydentilasta riippumatta. Läheskään kaikilla ei ole cTnAAB:itä. On esitetty, että mikä tahansa alun perin sydämen vaurio, joka on aiheutunut, esimerkiksi tulehduksen, iskemian tai voimakkaan fyysisen kestävyystreenin vuoksi, voisi laukaista cTn-spesifisen autoimmuunireaktion. Siksi cTnAAB:itten läsnäolo näennäisesti terveillä henkilöillä hiljaisen cTn-vapautumisen seurauksena ei ole yllättävää. Geneettiset ja muut tekijät voivat vaikuttaa cTnAAB:n muodostumiseen. cTnAAB-pitoisuudet voivat vaihdella yksilöillä (Savukoski 2014.) Makrotroponiini muodostuu, kun cTnAAB sitoutuu cTn-molekyyleihin.



Kuva 1. Makrotroponiini. Vasemmalla oleva vasta-aine on cTn-spesifinen autovasta-aine. cTn-autovasta-aine sitoutuu cTn:ään muodostaen kuvassa oikealla oleva kompleksin, makrotroponiinin.

3. Makrotroponiinien ja autovasta-aineiden häiriömekanismit

Kaikki immunomääritykset ovat alttiita epätäydellisyyksille. Ne ovat alttiita häiriöille, jotka voivat johtaa virheellisiin mittauksiin, väriin positiivisiin ja negatiivisiin tuloksiin (Hammarsten ja muut 2023). Makroentsyymit ja makrokompleksit tunnetusti aiheuttavat häiriötä ja hämmennystä verikokeiden tulosten tulkinnassa, kuten esimerkiksi makroprolaktiinit prolaktiinimäärityksissä. Makroentsyymit voivat häiritä niiden kohdennetun substraatin normaalia hajoamista ja poistumista elimistöstä. Tämän seurauksena kyseisen substraatin pitoisuus verenkierrassa saattaa kasvaa, koska sitä ei poisteta elimistöstä. Makrotroponiinit voivat makrokomplekseina häiritä cTn-immunomäärityksiä vastaavasti. On esitetty, että makrotroponiinit säilyvät suurina komplekseina verenkierrassa paljon pidempään kuin vapaat cTn-molekyylit (Mair ja muut 2023).

Tästä syystä ne voivat aiheuttaa normaalia korkeampia cTn-mittaustuloksia ja makrotroponiineilla voi olla diagnostisia vaikutuksia, mutta asiaa ei ole vielä tutkittu kattavasti.

Normaalisti munuaiset poistavat troponiinit elimistöstä. Munuaiset eivät kuitenkaan pysty tehokkaasti poistamaan suuria makrotroponiini komplekseja, mikä lisää niiden pitkäaikaista läsnäoloa verenkierrossa. Tämä pitkittynyt esiintyminen verenkierrossa voi johtaa jatkuvasti kohonneisiin cTn-tasoihin määrittelyssä, koska cTn-määritykset havaitsevat makrotroponiinit kuin ne olisivat vapaita cTn:iä (Lam ja muut 2021). Makrotroponiinit ovat kaiken lisäksi pitkäikäisiä komplekseja, joiden puoliintumisaika on muutaman viikon pituinen verrattuna vapaan cTn:n puoliintumisaikaan, joka on muutaman tunnin pituinen (Hammarsten ja muut 2023).

Autovasta-aineet voivat häiritä cTn-määrityksiä myös muulla tavalla kuin muodostamalla makrotroponiineja. cTn-molekyyleillä on N- ja C-terminaalit, jotka ovat herkkiä proteolyttiselle hajoamiselle. N- ja C-terminaalit ovat tällöin epästabiileja osia molekyylistä. Tämän vuoksi useimmat immunomäärityksen vasta-aineet suunnitellaan niin, että ne kiinnittyvät cTn:n keskiosaan. cTnAAB:t noudattavat samankaltaista lähestymistapaa ja kiinnittyvät myös cTn:n keskiosaan. Tällöin cTnAAB:t estävät cTn-määrityksen vasta-aineiden kiinnittymistä tutkittavaan cTn:ään. (Savukoski ja muut 2012.)



Kuva 2. cTn-molekyylä, yksinkertaistettu. Kuvassa esitetään cTn-molekyylin N- ja C-terminaali (sininen) ja molekyylin keskiosa (valkoinen) (Cheng ja muut 2016).

4. Makrotroponiinit ja autovasta-aineet sydäninfarktidiagnostiikan häiritsijöinä

Useat tutkimukset cTn-määrityksistä vihjaavat siihen, että makrotroponiinit voivat myötävaikuttaa sydäninfarktin ja muiden sydänlihassairauksien virheelliseen diagnoosiin. Makrotroponiinin mahdolliset vaikutukset nykyisiin cTn-määrityksiin on nykyään tunnistettu merkittävänä poikkeavuuksien syynä (Lam ja muut 2020). Ne aiheuttavat analyttistä ongelmaa, koska makrotroponiinit vääristävät cTn-määrityksien tuloksia. Virheelliset tulokset vaikeuttavat oikean diagnoosin tekemistä.

Makrotroponiinit aiheuttavat positiivista häiriötä cTn-määrityksissä. Ne saavat tulokset näyttämään siltä, kuin potilaan cTn-arvot olisivat kohonneet, mikä johtaa väärään diagnoosiin käynnissä olevasta tai äskettäin tapahtuneesta sydänsairaudesta. cTnAAB:t vastaavat

negatiivisista häiriöistä. cTnAAB:t saavat vuorostaan tulokset näyttämään siltä, kuin potilaan cTn-arvot olisivat alhaiset. Tämä vaarantaa potilaiden terveyttä viivästyttämällä olennaista hoitoa (Lam ja muut 2021).

Eräässä tutkimuksessa havaittiin, että potilasryhmässä, jossa yksilöillä oli kohonneet cTn-tasot, suurin osa näytteistä vaikutti olevan tai oli alttiina makrotroponiinin vaikutuksille. Nämä potilaat, joiden cTn-määrittelyssä oli ongelmia, viettivät sairaalassa pidemmän ajan. Useimmilla heistä oli merkkejä sydänperäisestä syystä, joka selitti kohonneen cTn-pitoisuuden. Makrotroponiinin läsnäolo ei kuitenkaan pois sulje akuuttia sydäninfarktia tai taustalla olevaa sydänsairautta. Potilailla voi olla aito patologinen syy cTn-pitoisuuden nousulle (Lam ja muut 2023.)

Kun diagnostisen testin tulokset eivät täsmää kliinisen tilanteen kanssa, aiheutuu epäselvyyttä potilaan tilasta. Epäselvyys saattaa viivästyttää potilaan tarpeellista hoitoa ja se voi johtaa potilaan terveyden heikkenemiseen. Virheellinen diagnoosi voi johtaa potilaan epäasianmukaiseen hoitoon. Väärällä diagnoosilla on myös psykologinen vaikutus sekä potilaisiin että heidän perheisiinsä. Se saattaa aiheuttaa turhaa ahdistusta ja epävarmuutta. Virheelliset diagnoosit voivat myös aiheuttaa tarpeettomia hoitokuluja. Potilaille joudutaan tekemään lisätutkimuksia ja konsultaatioita oikean diagnoosin saavuttamiseksi. Lisäksi, jos alkuperäinen virhediaгноosi johtaa komplikaatioihin tai muihin lääketieteellisiin ongelmiin, se voi lisätä terveydenhuoltokustannuksia pitkällä aikavälillä.

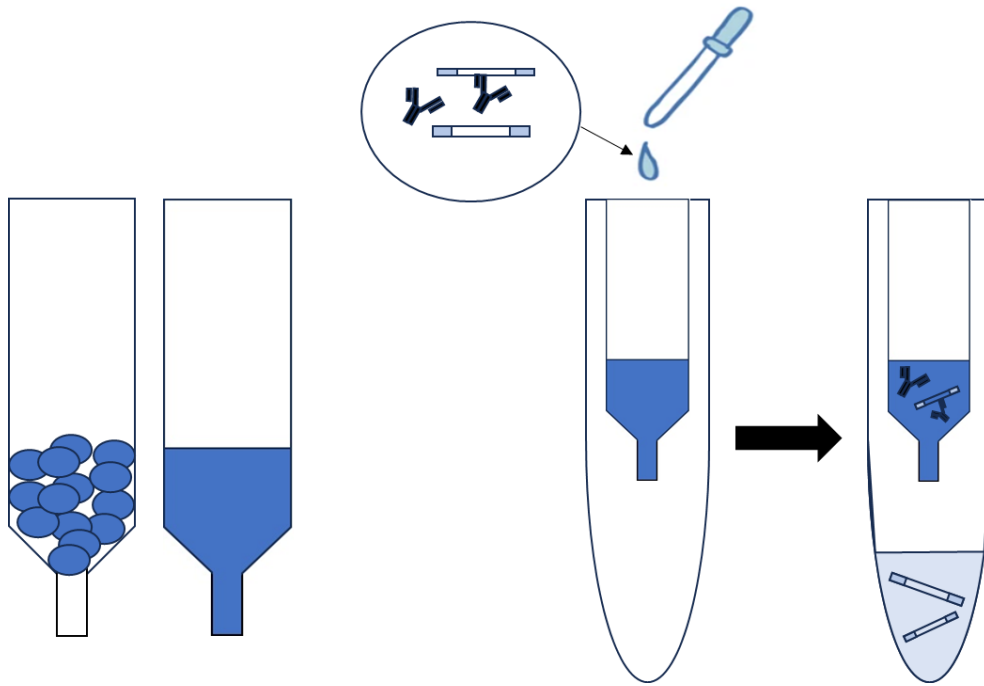
Useammassa tutkimuksessa on selvitetty, miten makrotroponiinit vaikuttavat potilaan diagnoosiin. On tärkeää, että terveydenhuollon ammattilaiset ja laboratoriohenkilöstö ovat tietoisia cTnAAB:ien ja makrotroponiinin mahdollisesta häiriöstä ja harkitsevat vaihtoehtoisia diagnostisia lähestymistapoja tai tulkitsevat cTn-mittaustuloksia varovaisesti, erityisesti tapauksissa, joissa kliininen epäily ei vastaa saatuja cTn-tasoja (Hammarsten ja muut 2023).

5. Makrotroponiinin ja autovasta-aineiden havaitseminen

cTn-määrittelyn ristiriitaiset tulokset viittaavat mahdolliseen makrotroponiinivälitteiseen häiriöön. Häiriötä voi päätellä, jos kliininen epäily MI:stä on matala ja cTn-pitoisuus pysyy korkeana ajan kuluessa. Potilaan näytteet analysoidaan cTn-määrittelyillä ennen ja jälkeen immunoglobuliinien, kuten cTnAAB:iden, poiston. Näin saadaan tietoa siitä, jos potilaalla on makrotroponiineja verenkierrossa ja vaikuttivatko ne potilaan cTn-määrittelyn tuloksiin, diagnoosiin ja lopulta potilaan hoitoon. Tällä hetkellä ei ole keinoja eri cTn-määrittelysten poikkeavien tulosten tulkintaan, koska eri määrittelysten standardointi puuttuu. Määrittelyillä on vaihteleva reaktiivisuus makrotroponiiniin ja autovasta-aineisiin, mikä vaikeuttaa eri valmistajien määrittelysten vertailua (Lam ja muut 2023).

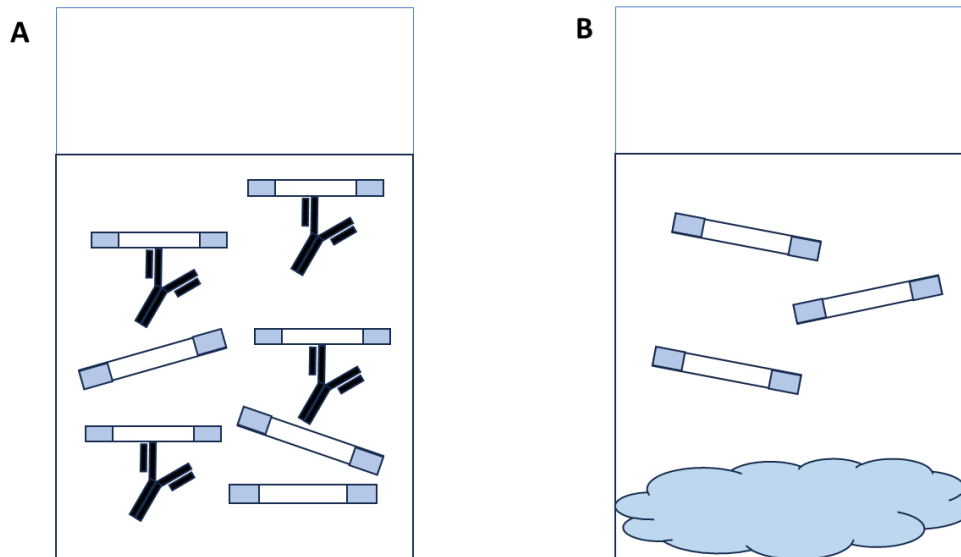
Ensimmäinen toimenpide ristiriitaisuuden selvittämiseksi on tehdä samaa menetelmää toisen kerran. Jos tämänkin jälkeen jää epäilyksiä, voi yrittää käyttää toisen valmistajan tuottamaa määritystä tai käyttää heterofiilistä vasta-ainetta estävää ainetta. Estäjäaine estää ristisidosten muodostumisen immunomäärityksen vasta-aineiden ja heterofiilisten vasta-aineiden välillä. Epäilyn jatkuessa voi siirtyä käyttämään muita menetelmiä, jotka poistavat vasta-aineet ja vasta-ainekompleksit näytteestä tai määrittävät näytteen molekyylien koot. Tuloksen perusteella epäily makrotroponiinin läsnäolosta vahvistuu, kun tiettyjen menetelmien jälkeinen cTn-pitoisuus on selvästi pienempi kuin alkuperäisessä näytteessä. Lisäksi epäily vahvistuu, jos havaitaan, että molekyylien koot näytteessä ovat normaalia suurempia. Epäily kumoutuu, jos on olemassa näyttöä siitä, että kohonneet cTn-tasot eivät ole yhteydessä makrotroponiinin läsnäolon kanssa, oli kyse sitten pitoisuudesta tai molekyylien koosta.

Muut menetelmät, jotka auttavat häiriöepäilyn selventämisessä ovat pyöräytyspylväät, polyetyleeniglykolisaostus (engl. *polyethylene glycol*, PEG), geelisuodatus ja sakkaroosigradientsentrifugointi. Koska makrotroponiinit ovat molekulaarisesti painavampia kuin cTn, osa menetelmistä auttaa määrittämään näytteen häiriötekijöiden kokoa. Osa menetelmistä poistaa näytteestä vasta-aineet ja vasta-ainekompleksit, minkä jälkeen niitä verrataan näytteen alkuperäiseen vasta-ainepitoisuuteen. Proteiinipyöräytyspylvästä (kuva 3) käytetään poistamaan näytteestä vasta-aineet ja vasta-ainekompleksit. Näytteen vasta-aineet tarttuvat pylväässä olevaan proteiini A:han tai proteiini G:hen, joka on kiinnitetty pylvään helmiin tai geeliin. Molemmat proteiinit kiinnittyvät vasta-aineiden vakioiseen Fc-osaan. Potilaan näyte lisätään pylväaseen ja pylväs sentrifugoidaan. Näytteen vasta-aineet ja makrotroponiinit jäävät pylväaseen ja pylvään läpi tullut liuos sisältää näytteen vapaan cTn:n. cTn-pitoisuuden selkeä väheneminen pylväskäsittelyn jälkeen johtuu yleensä vasta-ainevälitteisestä häiriöstä (Hammarsten ja muut 2023.)



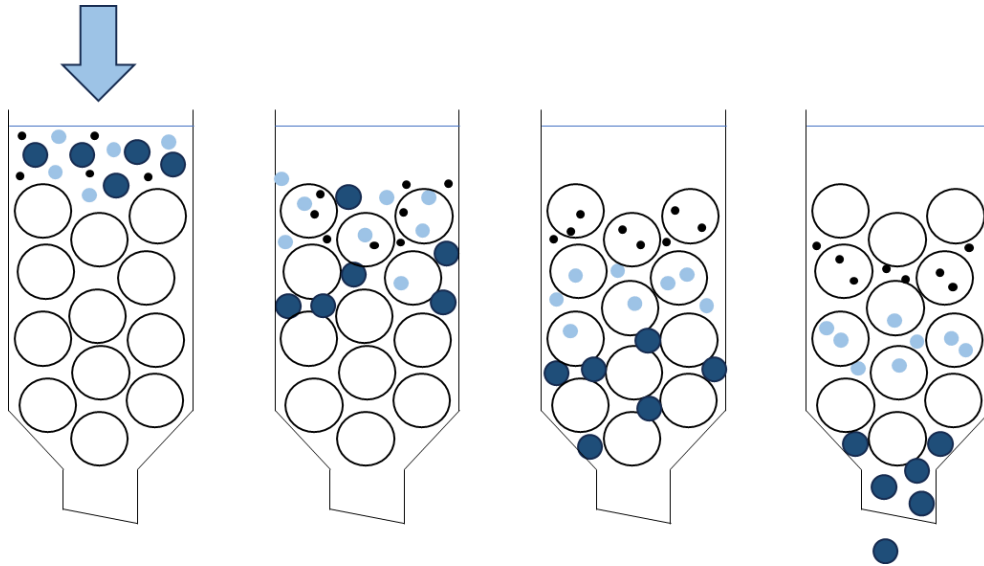
Kuva 3. Pyöräytyspylväs -menetelmä. Menetelmä, joka käytetään makrotroponiinin havaitsemiseen. Menetelmässä näytteen cTn-pitoisuus analysoidaan ennen pylväskäsittelyä ja sen jälkeen. Näytteessä olevat vasta-aineet tarttuvat pylväässä olevaan proteiini A:han tai G:hen, jotka ovat kiinnitettynä pylvään helmiin tai geeliin. Kuvan esimerkissä oikealla pylvään hartsiin lisätään potilaan plasmaa, joka valuu pylvästä läpi. Läpivaluneen näytteen cTn-pitoisuus mitataan ja sitä verrataan alkuperäiseen pitoisuuteen (Hammarsten ja muut 2023.)

PEG-saostus (kuva 4) on epäspesifinen menetelmä, joka saostaa suurimman osan plasman proteiineista, mukaan lukien vasta-aineet ja muita suuria molekyylejä. Se erottelee proteiinit niiden liukoisuuden perusteella. PEG on vesiliukoinen polymeeri, joka ei muuta proteiinien luonnollista rakennetta. Se toimii kuin sienä vedessä, ottamalla tilaa ja vähentämällä veden määrää, johon proteiinit ovat liuenneet. Kun proteiinit kohtaavat PEG:n, ne eivät mahdu yhtä helposti rajoitettuun tilaan, joten ne alkavat kasautua yhteen ja laskeutua saostuneina putken pohjaan (Fahie-Wilson ja muut 2008). Näytteen cTn-pitoisuus määritetään ennen PEG-saostusta ja jälkeen. Kun makrotroponiinit saostuvat, liuokseen jää vapaa cTn. Samalla tavalla kuin pyöräytyspylväät, jos jälkimmäinen cTn-pitoisuus on paljon pienempi kuin alkuperäinen, potilaalla on vasta-ainevälitteinen häiriö.



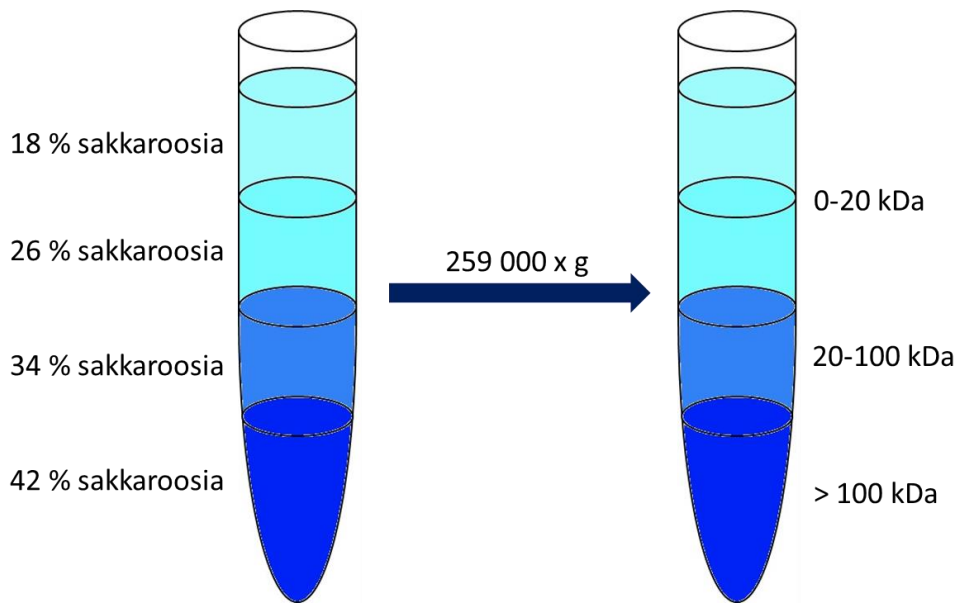
Kuva 4. PEG-saostus. Kuvassa A on potilaan plasmanäyte, joka sisältää proteiineja, kuten troponiineja, makrotroponiineja ja vasta-aineita. Kuvan A näytteeseen lisätään PEG:iä, joka erottaa proteiinit niiden liukoisuuden perusteella. PEG-pitoisuuden kasvaessa huonommin liukenevat proteiinit alkavat saostua (kuva B). Kuvan B liuos kerätään, sen troponiinipitoisuus mitataan ja pitoisuutta verrataan ennen PEG-käsittelyä näytteestä mitattuun pitoisuuteen (Fahie-Wilson ja muut 2008.)

Geelisuodatusta (kuva 5) kutsutaan myös molekyyliseulaksi. Geelisuodatusmenetelmää käytetään erottelemaan molekyylejä niiden molekyylikoon perusteella. Molekyylit jakautuvat geelisuodatuspylväessä liikkumattoman ja liikkuvan faasin välillä. Liikkumaton faasi koostuu huokoisesta matriisista helmimuodossa. Näytteen lisäämisen jälkeen staattisen matriisin huokosia suuremmat molekyylit kulkevat helmien lomitse, kiertävät helmet nopeinta reittiä ja suodattuvat ensimmäisinä läpi. Pienemmät molekyylit ja keskikokoiset molekyylit sen sijaan pystyvät menemään liikkumattoman matriisin helmien huokosiin. Tämä hidastaa niiden matkaa matriisin läpi. Molekyylit erottuvat kokonsa mukaisesti isommista molekyyleistä pienempiin (Ó'Fágáin ja muut 2016). Yhdessä geelisuodatuspylvästä läpi tullessa fraktiossa on kooltaan samankaltaisia molekyylejä. Vasta-ainevälitteistä häiriötä voi havaita potilailla, jos molekyylit havaitaan todellista kokoaan selkeästi suuremman kokoluokan fraktiossa, esimerkiksi 100 kDa:in kokoiset molekyylit yli 200 kDa:in fraktioissa (Hammarsten ja muut 2023).



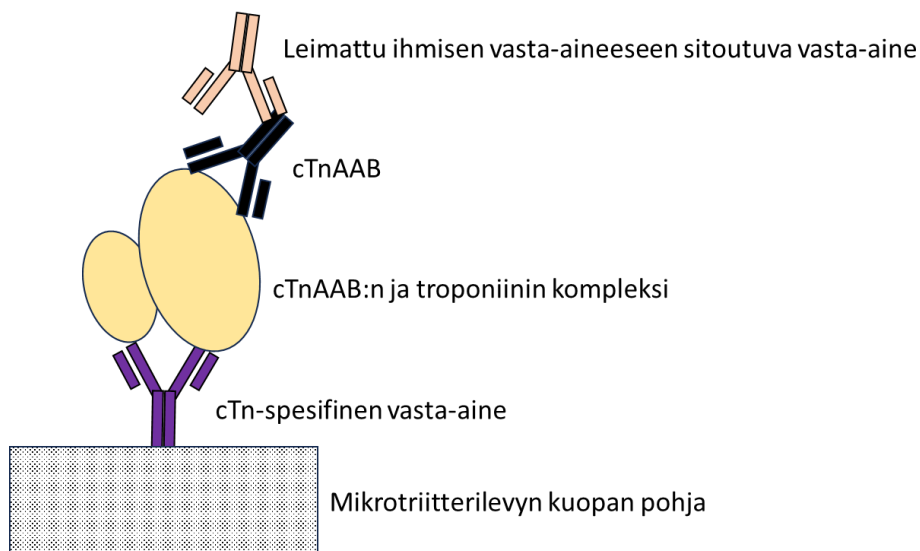
Kuva 5. Molekyylien erottelu geelisuodatuksella molekyylikoon mukaisesti. Stationäärifaasi koostuu huokoisesta geelihelmimatriisista. Huokosilla on tietty kokojakauma. Sekoitus erikokoisia biomolekyyliä lisätään geelipylvään yläosaan. Samalla, kun näyte kulkeutuu pylvään läpi, pienemmät molekyylit pystyvät tunkeutumaan geelimatriisin huokosiin helpommin kuin suuremmat. Tämä hidastaa pienempien molekyylien kulkeutumista. Suuremmat molekyylit liikkuvat nopeammin, koska ne eivät mahdu kaikkiin huokosiin. Pylvästä läpi tullut liuos kerätään ajan kuluessa eriin fraktioihin ja fraktiot edustavat eri kokoisia pylvään läpi tulleita proteiineja. Lopuksi kerättyjen fraktioiden cTnT-pitoisuus analysoidaan (Ó'Fágáin ja muut 2016.)

Sakkarosigradientsentrifugointi (kuva 6) on menetelmä, jolla erotetaan molekyylit niiden tiheyden perusteella. Liuokset, joissa on eri sakkarosipitoisuudet, kerrostetaan päällekkäin sentrifugiputkeen laskevan sakkarosipitoisuuden mukaisesti. Valmiin kerrostetun liuoksen päälle lisätään näyte. Kun sakkarosigradietti sentrifugoidaan voimakkaasti ultrasentrifugissa, molekyylit siirtyvät niiden tiheyttä vastaaville kerroksille. Tämä johtaa vyöhykkeiden muodostumiseen, mikä mahdollistaa molekyylien erottelun niiden molekyylipainon mukaisesti. Lopuksi putken päältä kerätään fraktioita ja niiden cTnT-pitoisuus määritetään, jotta saadaan selvitettyä, minkä kokoiset molekyylit aiheuttavat signaalin cTnT-määrittämisessä. Mikäli kohonnut tulos saadaan suuren molekyylipainon fraktiosta, voidaan kohonneen tuloksen päätellä aiheutuvan makrotroponiinista tai heterofiilistä vasta-aineista.



Kuva 6. Sakkarosigradientsentrifugointi. Sentrifugointiputket valmistetaan 18–42 % sakkarosigradienilla. Potilaan plasmanäyte lisätään sakkarosigradien päälle ja sentrifugoidaan. Putken päältä kerätään näytteitä, joita tutkitaan fluoresenssin tai absorbanssin avulla. Yksinkertaistetussa tutkimuksessa putkista kerätään matala (0-20 kDa), keskikokoinen (20-100 kDa) ja korkea (> 100 kDa) molekyylipainofraktioita (Hammarsten ja muut 2023.)

cTnAAB:t havaitaan kaksoisvasta-aine määrityksellä (kuva 7), jossa cTnAAB:et kiinnitetään ensin troponiiniinikompleksiin. Muodostuneen cTnAAB-kompleksin annetaan sitoutua mikrotiitterilevylle kiinnitettyihin cTn-spesifisiin vasta-aineisiin. Kiinnittyneet cTnAAB:t havaitaan leimatulla ihmisen vasta-aineisiin sitoutuvalla vasta-aineella (Savukoski ja muut 2014).



Kuva 7. cTnAAB:n havaitseminen. Mikrotiitterilevyn kaivon pohjaan kiinnitetään cTn-spesifinen vasta-aine. cTnAAB:t sitoutuvat troponiiniinikompleksiin ja muodostunut cTnAAB-troponiini-kompleksi sitoutuu cTn-spesifiseen vasta-aineeseen, joka on kiinnitetty mikrotiitterilevyn kuopan

pohjaan. Sitoutunut cTnAAB havaitaan leimatulla ihmisen vasta-aineeseen sitoutuvalla vasta-aineella (Savukoski ja muut 2014.)

6. Yhteenveto

Sydäninfarkti on vakava terveysongelma, joka aiheuttaa merkittävää vauriota sydänlihakselle. Tekijät kuten tupakointi, korkea verenpaine, kohonnut kolesteroli, ylipaino, diabetes ja vähäinen liikunta, voivat lisätä sydäninfarktin riskiä. Sydäninfarktin voi saada jopa näennäisesti terve yksilö. Sydäninfarktin diagnosointi on ollut tutkimuksien kohteena, koska määrittämisessä on ilmennyt häiriöitä. Kyseiset häiriöt vaikuttavat diagnoosin pätevyYTEEN. Oikea diagnoosi on tärkein asia potilaiden hoidon kannalta. Sydäninfarktin varhainen diagnosoiminen mahdollistaa nopean aloituksen tehokkaalle hoidolle ja vähentää pysyvän sydänvaurion riskiä. Lisäksi oikea diagnoosi auttaa terveydenhuollon ammattilainen arvioimaan potilaan riskiprofiilin ja suunnittelemaan sopivan jatkohoidon ja mahdollinen kuntoutuksen sydäninfarktin jälkeen. Tämä voi sisältää lääkityksen, elämäntapamuutokset ja säännölliset seurantakäynnit.

Makrotroponiinin suhteen diagnoosin tulisi olla tehokkaampi ja tarkempi. Makrotroponiinin havaitseminen ja erottaminen voi auttaa lääkäreitä tunnistamaan sydänvaurion tarkan laajuuden, mikä voi ohjata tehokkaampaan hoitosuunnitelmaan. Tarkempi diagnoosi voi auttaa vähentämään virheellisiä positiivisia ja negatiivisia tuloksia ja tarpeettomia lisätesteihin ja hoitoihin liittyviä kustannuksia. Tämä hyödyttää sekä potilaita että terveydenhuoltojärjestelmää. Ennen kuin lääkärit voivat vahvistaa potilaan diagnoosin, on useita vaiheita, jotka on suoritettava huolellisesti. Prosessi alkaa sydänperäisiä troponiineja mittaavalla verikokeella. Jos osoittautuu, että verikokeessa on poikkeavuuksia, lääkärit joutuvat toistamaan alkuperäistä menetelmää tai tilamaan lisätestejä, kuten pyöräytyspylväs-menetelmä tai PEG-saostus. Lisäkokeiden avulla terveydenhuollon ammattilaiset saavat kattavamman kuvan potilaan terveydentilasta.

Useimmat sairaalat eivät ole varustettu oikeilla välineillä tai laboratorioilla tarvittaviin lisätesteihin, jotka selventäisivät mahdollisia häiriöitä. Tulevaisuudessa sydäninfarktin diagnosointiin liittyvät pulmat tulisi ratkaista niin, että otetaan huomioon näytteisiin liittyvät häiriötekijät ja parannetaan määrittämisä niin, että nämä häiriötekijät eivät vaikuttaisi tuloksiin. Lisäksi sairaalat tulisi varustaa asianmukaisilla puitteilla lisätestausta varten. On myös tärkeää, että testit standardisoidaan, jotta tuloksia voidaan verrata muihin samankaltaisiin tuloksiin.

7. Lähdeluettelo

- Cheng, Y. & Regnier, M. (2016) Cardiac Troponin Structure-Function and the Influence of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated Mutations on Modulation of Contractility. *Arch Biochem Biophys* **601**:11–21.
- Dzoyem, J. P., Kuete, V. & Eloff, J. N. (2014) 23 - Biochemical Parameters in Toxicological Studies in Africa: Significance, Principle of Methods, Data Interpretation, and Use in Plant Screenings. Teoksessa V. Kuete (Toim.), *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* (ss. 659–715). Elsevier.
- Fahie-Wilson, M. & Halsall, D. (2008) Polyethylene glycol precipitation: Proceed with care. *Ann Clin Biochem* **45**:233–235.
- Hammarsten, O., Becker, C. & Engberg, A. E. (2023) Methods for analyzing positive cardiac troponin assay interference. *Clin Biochem* **116**:24–30.
- Hammarsten, O., Warner, J. V., Lam, L., Kavsak, P., Lindahl, B., Aakre, K. M., ... Apple, F. S. (2023) Antibody-mediated interferences affecting cardiac troponin assays: Recommendations from the IFCC Committee on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. *Clin Chem Lab Med CCLM* **61**:1411–1419.
- Lam, L., Ha, L., Gladding, P., Tse, R. & Kyle, C. (2021) Effect of macrotroponin on the utility of cardiac troponin I as a prognostic biomarker for long term total and cardiovascular disease mortality. *Pathology (Phila)* **53**:860–866.
- Lam, L., Tse, R., Gladding, P. & Kyle, C. (2023) Effect of MacroTroponin in a Cohort of Community Patients with Elevated Cardiac Troponin (vol 5, hvac118, 2022). *Clin Chem* **69**:539–539.
- Lu, L., Liu, M., Sun, R., Zheng, Y. & Zhang, P. (2015) Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochem Biophys* **72**:865–867.
- Mair, J. & Hammarsten, O. (2023) Potential analytical interferences in cardiac troponin immunoassays. *J Lab Precis Med* **8**.

Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M. & O'Connor, B. F. (2016) Gel-Filtration Chromatography. *Protein Chromatogr* **1485**:15–25.

Savukoski, T. (2014) Cardiac Troponin Specific Autoantibodies: Analytical Tools for Exploring Their Impact on Cardiac Troponin I Testing. Noudettu osoitteesta <https://www.utupub.fi/handle/10024/99057>

Savukoski, T., Engström, E., Engblom, J., Ristiniemi, N., Wittfooth, S., Lindahl, B., ... Pettersson, K. (2012) Troponin-Specific Autoantibody Interference in Different Cardiac Troponin I Assay Configurations. *Clin Chem* **58**:1040–1048.

Savukoski, T., Ilva, T., Lund, J., Porela, P., Ristiniemi, N., Wittfooth, S. & Pettersson, K. (2014) Autoantibody prevalence with an improved immunoassay for detecting cardiac troponin-specific autoantibodies. *Clin Chem Lab Med CCLM* **52**:273–279.