

Jonne Ketola

IPSC-TEKNOLOGIALLA TUOTETTUJEN SYDÄNLIHASSOLUJEN SYKE LÄÄKEAINEVAIKUTUSTEN INDIKAATTORINA

Lääketieteiden ja biotieteiden tiedekunta
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Joulukuu 2018

Tiivistelmä

Jonne Ketola : iPSC-teknologialla tuotettujen sydänlihassolujen syke lääkeainevaikutusten indikaattorina
Lääketieteen syventävien opintojen opinnäytetyö
Tampereen yliopisto
Lääketieteen lisensiaatin tutkinto-ohjelma
Joulukuu 2018

iPSCt eli uudelleen ohjelmoidut kantasolut ovat ihmisen erilaistuneista soluista tuotettuja erittäin monikykyisiä soluja, jotka voidaan uudelleenohjelmoida miksi tahansa solutyypiksi. Tämä teknologia on avannut mahdollisuuden tuottaa soluviljelyolosuhteissa sykkiviä sydänsoluja. Samaan aikaan lääkeaineiden kardiotoksisuus on merkittävä ongelma lääkekehityksessä. Sydänsolujen käyttö sydänvaikutusten testaamisessa vaatii kuitenkin uusia tehokkaita tutkimusmenetelmiä.

BeatView-ohjelmisto on videoavusteinen menetelmä, joka on kehitetty sydänlihassolujen sykeparametrien, kuten syketaajuuden, supistusajan, supistuksen keston, sekä rentoutumis- eli relaksaatioajan määrittämiseen. Tutkimuksissa on havaittu, että kantasolumalleissa sydänsolujen sykeparametreissa on samoja löydöksiä ja muutoksia kuin mitä kliinisesti on havaittavissa. Näin ollen patologiset sydämen rytmissä tapahtuvat muutokset, kuten pitkä QT-aika, voitaisiin potentiaalisesti havaita jo ennen lääkeaineen in vivo –testausta. Tämän tutkimuksen päätavoitteena olikin testata BeatView-ohjelmiston toimivuutta sydänlihassolujen testauksessa lääkeaineilla, joiden vaikutukset tunnetaan. Käytettyjä lääkeaineita olivat adrenaliini, karvediloli (β -salpaaja) sekä E-4031 ($K_v11.1$ (hERG)-salpaaja).

Tutkimusmenetelmässämme terveiden koehenkilöiden iPSC soluista erilaistettuja sydänlihassoluja videoitiin mikroskoopissa lääkeainealtistuksen aikana. Tutkimusaineisto koostui yhteensä 177 kuvaussarjasta, joissa pieni soluaggregaatti altistettiin nouseville lääkeainekonsentraatioille. Videoaineisto analysoitiin BeatView-ohjelmistolla ja saadut sykeparametrit tilastoitiin. Ympäristötekijöiden vaikutus mittaukseen pyrittiin eliminoimaan kuvaamalla referenssisarjoja ilman lääkeainetta.

Solulinjoista 04602.WT ja 04511.WT erilaistettujen sydänlihassolujen sykevasteet olivat pääsääntöisesti vaikutusmekanismiinsa sopivia. Adrenaliinialtistuksessa sykeparametreissa havaittiin syketaajuuden kasvua sekä supistumisajan lyhenemä. Karvedilolin lisääminen sydänlihassolulle sai aikaan huomattavan laskun supistuksen keston. E-4031 aiheutti välittömän pidentymän supistuksen keston ja toisaalta myöhäisvasteena lyhensi supistuksen kestoa. Tulosten valossa videoanalyysimenetelmän toimivuus sykeparametrien määrittämisessä sai vahvistusta ja osaltaan siis vahvistaa käsitystä, että näitä soluja voidaan tulevaisuudessa käyttää ihmisen sydämen mallina soluviljelyoloissa sekä uusien sydänlääkkeiden kehityksessä että sydänsivuvaikutusten analysoinnissa.

Avainsanat: iPSC, kantasolu, sydänlihassolu, adrenaliini, karvediloli, E-4031

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

SISÄLLYS

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------|----|
| 1. | JOHDANTO | 1 |
| 1.1 | Indusoidut pluripotentit kantasolut..... | 1 |
| 1.2 | Sydänlihassolujen käyttö lääkeainetestauksessa | 2 |
| 1.3 | Sydänlihassolujen elektrofysiologia..... | 2 |
| 1.4 | Sykkeensäätelymekanismit | 4 |
| 1.5 | Lääkeaineiden sydänvaikutusten testausmenetelmät | 4 |
| 1.6 | Työn tavoitteet..... | 5 |
| 2. | AINEISTO JA MENETELMÄT | 6 |
| 2.1 | Solulinjat | 6 |
| 2.1.1 | Erilaistumattomat kantasolut..... | 6 |
| 2.1.2 | Erilaistaminen sydänlihassoluiksi | 7 |
| 2.2 | Sydänlihassolujen liikkeen määrittäminen..... | 7 |
| 2.3 | Lääkeainetestaus..... | 8 |
| 2.3.1 | Adrenaliini | 9 |
| 2.3.2 | Karvediloli | 9 |
| 2.3.3 | E-4031 | 9 |
| 2.4 | Tulosten analysointi | 10 |
| 3. | TULOKSET | 10 |
| 3.1 | Adrenaliini | 10 |

| | | |
|-----|-----------------------------------------|----|
| 3.2 | Karvediloli..... | 14 |
| 3.3 | E-4031..... | 17 |
| 4. | POHDINTA | 20 |
| 4.1 | Tutkimuksen luotettavuus..... | 20 |
| 4.2 | Tutkimustulosten merkitys | 21 |
| 4.3 | Videoanalyysimenetelmän tehokkuus | 22 |
| 5. | YHTEENVETO | 23 |
| 6. | Lähteet..... | 24 |

1. JOHDANTO

Lääketurvallisuus on yhteiskuntaa, elinkeinoelämää ja yksittäisen ihmisen elämää koskettava kysymys. Usein se on myös huolenaihe, joka saattaa pahimmillaan nakertaa luottamusta lääkärikuntaa ja lääketiedettä kohtaan. Potilasturvallisuuden vaarantumisen ohella sen taloudellinen merkitys on suuri paitsi yhteiskunnan myös lääkevalmistajan näkökulmasta. Taloudellisen intressin suuruutta kuvaa hyvin se, että yksittäisen lääkkeen kehityskustannus vuonna 2014 oli lääketieteellisyydelle keskimäärin noin 1,3 miljardia euroa [1]. Vuosina 2002–2011 Euroopassa markkinoilta vedetyistä lääkkeistä noin puolet johtui sydän- ja verisuonitapahtumien kohonneesta riskistä [2]. Sydänvaikutukset ovatkin yksi keskeisimmistä lääkkeen turvallisuutta määrittävistä tekijöistä, jotka pyritään osoittamaan lääkekehityksen ensivaiheessa. Sydänvaikutusten merkitystä korostaa entisestään se, että lääkeaineiden sydänvaikutukset saattavat johtaa akuutteihin henkeä uhkaaviin oireisiin joko sydänlihaksen heikkenemisen, sydäninfarktin tai rytmihäiriöiden myötä. Lääketurvallisuuden kohentaminen käytössä olevin menetelmin on kuitenkin ongelmallista ottaen huomioon lääkekehitykseen kohdistuvan sääntelyn ja toisaalta kehitysmenojen paisumisen, joka vaikuttaa lääkkeen kustannuksiin yhteiskunnalle.

1.1 Indusoidut pluripotentit kantasolut

Indusoidut pluripotentit kantasolut (iPSC) eli uudelleen ohjelmoidut kantasolut ovat alkion kantasolujen kaltaisia soluja, jotka on tuotettu ohjelmoimalla geneettisesti jokin elimistön erilaistunut solutyypin takaisin monikykyiseksi kantasoluksi [3] [4] [5] [6]. Ohjelmoinnissa soluun joko siirretään ulkopuolisia geenejä tai aktivoidaan solun omia geenialueita, jotka alkavat ilmentää monikykyisille soluille tyypillisiä, Yamanaka faktoreina tunnettuja, transkriptiotekijöitä Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 ja c-Myc [3] [4]. Transkriptiotekijöiden aktivoimiseen voidaan käyttää sekä integratiivisia että ei-integratiivisia menetelmiä. Integratiivisissa menetelmissä voidaan hyödyntää lenti- ja retroviruksia, plasmideja, Cre/LoxP rekombinaatiota tai transposoneja. Vastaavasti ei-integratiiviset menetelmät kattavat adeno- ja Sendaivirusvektorit, plasmidit, RNA:n ja rekombinanttiproteiinit, joiden välityksellä transkriptiota voidaan säädellä episomaalisesti. Nämä menetelmät eroavat toisistaan lähinnä erilaistustehokkuuden ja niiden aiheuttamien pysyvien geneettisten muutosten suhteen. [7] Ominaisuuksiltaan indusoidut kantasolut muistuttavat alkion kantasoluja siinä, että ne voivat erilaistua miksi tahansa elimistön solutyypeistä, mutta niitä ei kuitenkaan tietävästi löydy

ihmiselimestön omien solujen joukosta [4]. Indusoituja erittäin monikykyisiä kantasoluja voidaan erilaistaa myös sydänlihassoluiksi. IPS-soluja voidaan erilaistaa menetelmillä, kuten embryoid body -formation, END-2 yhteiskasvatus ja kasvutekijäohjaus. [7]

1.2 Sydänlihassolujen käyttö lääkeainetestauksessa

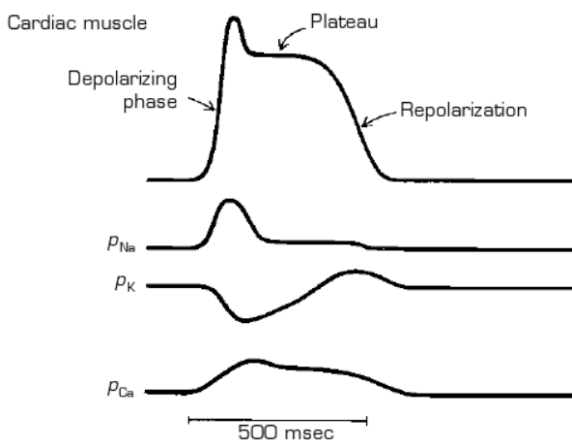
Uusien sydänlääkkeiden ja uusien molekyylien sydänsivuvaikutusten testaus on perinteisesti perustunut eläinkokeisiin tai sydänsolujen kaltaisiin soluihin, joihin on transfektoimalla siirretty tavallisesti yksi sydänspesifinen geeni, jonka tuottamaan proteiiniin lääkeaineiden vaikutusta on haluttu arvioida. Nämä menetelmät eivät kuitenkaan anna todellista kuvaa ihmisen sydänsolujen vasteesta testattavalle lääkeaineelle ja näin ollen useissa tapauksissa sydämen toimintahäiriöt ovat paljastuneet vasta lääkkeen kliinisessä käytössä. Eläinkokeet ovat olleet esillä myös eettisten näkökohtien vuoksi. Niiden vähentämistä ja siten kärsimysten ehkäisyä voidaankin pitää tärkeänä tavoitteena, jota heijastelee myös EU:n direktiivi 2010/63/EU tieteellisiin tarkoituksiin käytettyjen eläinten suojelusta. IPS-solutekniikalla tuotettujen sydänsolujen käyttö lääkeaineiden kliinisessä testauksessa voi mahdollistaa sydänvaikutusten määrittämisen luotettavammin, edullisemmin ja nopeammin nykyisiin menetelmiin verrattuna [8]. Tällaisten solujen avulla on myös mahdollista testata lääkkeen vaikutuksia geneettistä sairautta kantavien sydänpotilaiden omiin soluihin, jolloin saatua tietoa voidaan soveltaa lääkkeen kliiniseen käyttöön tämän riskiryhmän potilailla. Näin ollen sydänsolujen fysiologian tutkimus avaa väylän myös personoidun lääketieteen kehitykselle.

Indusoiduista kantasoluista tuotetut solut kuten sydänlihassolut vastaavat genotyypiltään alkuperäisen isäntänsä soluja ja tarjoavat siten aidon mallin sairauksien, kuten rytmihäiriöiden ja sydänlihassairauksien tutkimukseen. Tähän mennessä on pystytty osoittamaan, että perinnöllisissä sydänsairauksissa potilasspesifiset sydänsolut ilmentävät potilaalla kliinisesti havaittavia muutoksia. [9] [10] Lisäksi tutkimusryhmässämme on havaittu, että joissakin sydänsairauksissa poikkeavuudet sydämen sähköisessä toiminnassa voidaan havaita myös poikkeavuutena solujen sykinnässä. Vastaavasti lääkkeiden aiheuttamat sydänsolujen toiminnan häiriöt ilmentyvät muutoksina solujen sykkeessä. [11] [12] [13]

1.3 Sydänlihassolujen elektrofysiologia

Sydänlihassolut voidaan karkeasti jakaa kolmeen luokkaan: tahdistin-, eteis- ja kammiotyyppin sydänlihassolut. Nämä solutyypit eroavat toisistaan sähköisen toiminnan suhteen. Sydämen

sähköinen toiminta saa alkunsa sinussolmukkeeseen tahdistinsoluissa, joissa hitaan kalsiumin sisäänvirtauksen seurauksena syntyvä sähköinen aktiopotentiaali aiheuttaa solun depolarisaation. Syntynyt depolarisaatioaalto etenee sydämen eteisjohtoratoja pitkin kammioihin eteis-kammiosolmukkeen kautta johtaen eteis- ja kammioityypin sydänlihassolujen synkronoituun supistukseen. Näiden solutyypin depolarisaatio eli nopea sähköisen potentiaalin muutos perustuu intra- ja ekstrasellulaaritulojen välisiin ionivirtoihin natrium-, kalium-, ja kalsiumionikanavien läpi. Depolarisaation alussa eteis- ja kammioityypin sydänlihassolussa tapahtuu jänniteherkkien natriumkanavien avautuminen ja Na^+ -ionien sisäänvirtaus, joka aiheuttaa nopean kalvopotentiaalin nousun negatiivisesta lepopotentiaalista ($\sim -80\text{mV}$) positiiviseksi, kuten esitetty kuvassa 1.1 (*depolarization*). Aktiopotentiaalin seurauksena L-tyypin kalsiumkanavat avautuvat tuoden kalsiumioneja solusisäiseen tilaan. Kalsiumin pääsy soluun laukaisee kalsiumin vapautumisen myös solunsisäisestä varastosta ja koko sarkomeerirakenteen supistumisen. Supistuminen kestää muutamia satoja millisekunteja, jonka aikana solun potentiaali pysyy likimain ennallaan (*plateau*). Lihassupistuksen aikana Ca^{2+} -ioneja pumpataan takaisin solunsisäiseen sarkoplasmakalvostoon, jolloin repolarisaatiovaihe alkaa (*repolarization*). Repolarisaatiossa solukalvon jännite palautuu takaisin lepopotentiaaliin pääasiassa K^+ -ionien ulosvirtauksen myötä. [14] [15] [16]



Kuva 1.1. Sydänlihassolun sähköinen toiminta yksinkertaistettuna mallina. Ylimmässä käyrässä esitettynä kalvopotentiaalin muutokset sydänlihassolun supistuessa. Tämän alapuolella ionivirtojen aiheuttamat kalvopotentiaalin muutokset eriteltyinä natrium-, kalium-, ja kalsiumionivirtojen suhteen. [17]

1.4 Sykkeensäätelymekanismit

Sydämen pumppaustoimintaa säädellään sekä humoraalisesti että hermostollisesti. Hermostollisista säätelyjärjestelmistä tärkeimpiä ovat sympaattinen ja parasympaattinen hermosto, joiden välittäjäaineina ovat noradrenaliini sekä asetyylikoliini. Sykkeen säätelyssä keskeisessä roolissa ovat sydänlihassolun solukalvolla ilmenevät β_1 -tyypin reseptorit, joihin noradrenaliini sitoutuu. Katekoliamiinien kuten adrenaliinin ja noradrenaliinin sitoutuessa β_1 -tyypin reseptoriin aktivoituu adenylyylisyklaasi, joka lisää syklisen AMP:n määrää intrasellulaaritulassa ja aktivoi edelleen proteiinkinaasi A:n. Tämä saa aikaan Ca^{2+} -kanavien konformaatiomuutoksen ja tätä kautta Ca^{2+} -virtauksen myötä lisääntyvän solun supistuvuuden. Toisaalta β_1 -reseptoriaktiiviteetti saa aikaan myös kalsiumin määrän kasvun sarkoplasmakalvostossa sekä automatian lisääntymisen. Näin ollen sympaattisen hermoston aktiviteetin nettovaikutuksena sinussolmukkeen tahdistinsolujen syketaajuus kasvaa, eteis-kammiosolmukkeen ja kammiosolujen automatia lisääntyy, sekä sydänsolujen supistuvoima kasvaa eteis- ja kammiosoluissa. Humoraalisen säätelyn kautta sydänlihaksen pumppaustoimintaan vaikuttavista välittäjäaineista tärkeimpiä on lisämunuaisytimestä erittyvä adrenaliini, jonka kyky sitoutua β_1 -tyypin reseptoriin on kuitenkin huomattavasti noradrenaliinia heikompi. Sen vaikutukset sydänlihassolun toimintaan ovat samansuuntaiset kuin noradrenaliinilla.

Parasympaattisen hermoston vaikutus sydänlihaksen toimintaan on vastakkainen kuin sympaattisella hermostolla. Parasympaattisen hermoston asetyylikoliini vaikuttaa sydänlihassoluissa M_2 -tyypin muskariinireseptorien välityksellä. Sen nettovaikutuksia ovat sinussolmukkeen solujen syketaajuuden hidastuminen, eteis-kammiosolmukkeen johtumisen hidastuminen tai pysähtyminen, sekä supistusvoiman aleneminen.

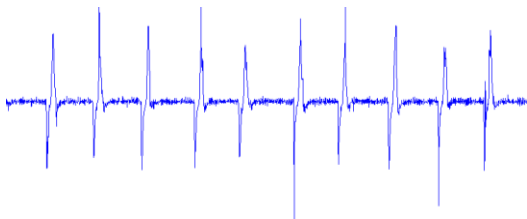
1.5 Lääkeaineiden sydänvaikutusten testausmenetelmät

Sydämellä on tärkeä fysiologinen merkitys: sen häiriötön pumppaustoiminta pitää yllä koko verenkierron jatkuvuutta. Näin ollen sydänvaikutusten arvioinnissa päähuomio kiinnittyy sekä sydänlihassolujen sähköiseen että mekaaniseen toimintaan. Sydänlihassolujen sähköistä toimintaa voidaan mitata yksittäissolusta Patch Clamp –tekniikalla tai soluryhmästä Micro Electrode Array (MEA) –laitteistolla [18]. Sähköistä toimintaa voidaan lisäksi epäsuorasti mitata ionivirtauksien avulla kalsium-kuvantamisessa [18]. Sitä vastoin mekaanisten ominaisuuksien mittaamiseen käytetään useimmiten atomivoimamikroskooppia (AFM) [18]. Näiden melko vakiintuneiden

tutkimusmenetelmien rinnalle on kehitetty joukko uudempia menetelmiä, jotka eivät ole vielä saavuttaneet vakiintunutta asemaa tieteellisissä julkaisuissa. Tähän joukkoon lukeutuvat muun muassa impedanssimenetelmä sähköisen aktiviteetin mittauksessa sekä supistusvoiman määrittäminen videovälitteisesti [18] [19]

Tässä tutkimuksessa keskitytään tutkimusryhmässämme kehitettyyn videopohjaiseen BeatView -sykkeentarkastelumenetelmään [20]. Tämän videoanalyysitekniikan avulla sydänsolujen liike voidaan vektoripohjaista laskentaa käyttäen tunnistaa ja kuvata EKG:n kaltaisena kuvaajana kuten esitetty kuvassa 1.2. Liiketunnistusta varten videoitu sydänsolu jaetaan supistuskeskipisteensä suhteen kahdeksaan radiaalisegmenttiin, joissa liike tapahtuu yksisuuntaisesti. Näin saadut joukko keskenään melko yhdensuuntaisia paikkavektoreita, jotka voidaan esittää summavektorina ajan suhteen kuten kuvassa 1.2. Joitakin vastaavia ohjelmistoja on kehitetty myös muualla. [21] [22] [23] [24] [25] [26]

Perinteisiin tekniikoihin, kuten kalsium-kuvantaminen, MEA, sekä Patch Clamp, nähden videoanalyysitekniikka tarjoaa tarkan ja toistettavan menetelmän sydänsolujen fysiologian tutkimiseen. Ainoana liikkeeseen perustuvana menetelmänä videoanalyysin suurin etu on monipuolisuus: liikesignaalia voidaan hyödyntää sydänsolujen sekä sykeominaisuuksien että sydänsolun supistusvoiman määrittämiseen.



Kuva 1.2. Havainnekuva BeatView-videomenetelmällä kerätystä liikekäyrästä, jossa vaaka-akselilla aika ja pystyakselina siirtymä. Esimerkkikuvaajassa on hyvä signaalinlaatu videoanalyysia varten.

1.6 Työn tavoitteet

Tämä tutkimus on osa hanketta, jonka tavoitteena on kehittää iPSC-soluihin pohjautuva malli sydäntoksisuuden tunnistamiseksi käyttäen videoanalyysimenetelmää. Tässä viitekehyksessä keskeisiä tavoitteita on tunnistaa sydänlihassolun sykkeessä tapahtuvat muutokset ja näitä parhaiten kuvaavat videoanalyysimenetelmällä mitattavat liikeparametrit, sekä määrittää eri

sydänlääkeaineiden aiheuttamat muutokset sydänlihassolun sykkeessä erityisesti relaksaatio- ja supistusajan sekä syketaajuuden suhteen. Edellämainittujen ohella tavoitteena on löytää rytmihäiriöille tyypillisiä muutoksia sydänlihassolujen sykinässä ja tulevaisuuden haavekuvana löytää korrelaatioita yksittäisten solumallien ja todellisten sydämen rytmihäiriöiden välillä videoanalyysin avulla.

Koska sydänlihassolujen laajamittaista fysiologista tutkimusta hidastaa edelleen tutkimusmenetelmien hitaus, tämän osatutkimuksen tavoitteena on selvittää millaisia muutoksia tapahtuu iPS-soluista tuotettujen sydänlihassolujen sykkeessä lääkeainealtistuksen seurauksena ja ovatko supistumisen ja relaksaation kestossa tai syketaajuudessa havaittavat muutokset säännönmukaisia. Tunnistamalla lääkeaineen sydänvaikutukset viljeltyjen sydänlihassolujen sykinän perusteella, voidaan saavuttaa merkittäviä etuja verrattuna tällä hetkellä käytössä oleviin menetelmiin. Kehittämällä videoanalyysiin perustuva solumalli sydämen rytmihäiriöiden ja supistusvoimassa tapahtuvien muutosten toteamiseksi tämä tutkimus tähtää lääketurvallisuuden kohentamiseen, eläinkokeiden vähentämiseen, sekä mahdollistaa lääkekustannusten hillitsemisen parantamalla prekliinisen lääkekehityksen kustannustehokkuutta. Näin ollen tutkimuksella on laaja yhteiskuntaa koskettava eettinen ja taloudellinen merkitys mutta samalla se rakentaa turvallisemman lääkehoidon avulla luottamusta lääketiedettä kohtaan ja edesauttaa siten käytännön potilastyötä.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Solulinjat

Tässä tutkimuksessa käytettiin solulinjoja 04602.WT ja 04511.WT. Nämä solulinjat oli kerätty kahden terveen henkilön ihon fibroblasteista ihobiopsialla. Tutkimusta varten pyydettiin vapaaehtoisten henkilöiden suostumus ihobiopsiaan sekä puoltava lausunto Pirkanmaan Sairaanhoidopiiriin eettiseltä toimikunnalta (R08070).

2.1.1 Erilaistumattomat kantasolut

Erilaistumattomat kantasolut indusoitiin fibroblastisoluista, jotka oli solulinjaa 04602.WT varten otettu ihobiopsialla terveeltä 55-vuotiaalta naiselta. Fibroblasteja viljeltiin liuoksessa, joka sisältää Dulbecco's modified eagle medium:a (DMEM, Lonza, Switzerland), johon on lisätty 10 % FBS:ää,

2 mmol/l L-glutamiinia, ja 50 U/ml penisilliiniä/streptomysiiniä uudelleenohjelmoitiin. Fibroblastit infektoitiin ensin lentiviruksella ja sitten retroviruksella käyttäen seuraavanlaisia soluja, plasmideja ja reagensseja: 293FT-solut, Plat-E-solut, pLenti6/UbC/mSlc7a1-vektori, ViraPower Packaging Mix, Lipofectamine 2000 (Invitrogen), pMX retroviral vector (hOCT3/4, hSOX2, hKLF4, tai hc-MYC, Addgene), Fugene 6 (Roche Diagnostics, Germany). Indusoinnissa noudatettiin menetelmää, jonka on tarkemmin kuvannut Takahashi ym. [4].

Vastaavasti solulinja 04511.WT oli lähtöisin 34-vuotiaan miehen ihon fibroblasteista. Solulinja erilaistettiin Sendai-virusvektorilla käyttäen kaupallista CytoTune-iPS-uudelleenohjelmointijärjestelmää valmistajan ohjeiden mukaisesti. [27]

2.1.2 Erilaistaminen sydänlihassoluiksi

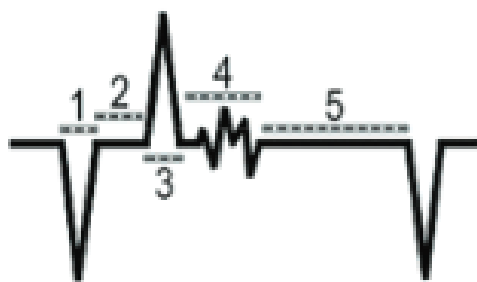
IPS-solujen erilaistaminen toteutettiin viljelemällä niitä yhdessä END-2-solujen kanssa. IPS-soluja irroitettiin viljelmästä muutaman sadan solun kokoisina aggregaateina, jotka siirrettiin END-2 solujen päälle Mitomysiini C:llä käsiteltyyn solumaljaan, jossa niitä viljeltiin KSR-elatusaineessa ilman FBS:ää, seerumin korvausta tai fibroblastikasvutekijää. Elatusaineessa oli lisäksi askorbiinihappoa 2.92mg/ml. Elatusaine vaihdettiin 5., 8. sekä 12. päivänä. 14 vuorokauden jälkeen viljelyä jatkettiin ilman askorbiinihappoa elatusaineessa, johon oli lisätty 10% SR-liuosta. [28] [29]

2.2 Sydänlihassolujen liikkeen määrittäminen

Maljalla olevia yksittäisiä sydänlihassoluja kuvattiin optiseen mikroskooppiin liitetyllä videokameralla, josta videot tallennettiin suoraan arkistoon. Videoiden kuvaus suoritettiin asetuksilla 60 fps (kuvakehystä sekunnissa) x 30 sekuntia. Videoiden analysointiin on tutkimusryhmässämme kehitetty videoanalyysiteknologia, jonka avulla sydänsolujen liike voidaan vektoripohjaista laskentaa käyttäen tunnistaa ja kuvata EKG:n kaltaisena kuvaajana. Tässä menetelmässä mitataan kuitenkin sähköisten suureiden sijasta sydänlihassolujen supistuessa ja palautuessa syntyvää liikettä. Tämän liikkeen määrä voidaan vektorilaskennan avulla kvantifioida, jolloin voidaan tietyltä solualueelta rajatun vektorijoukon pohjalta laskea kokonaisliike ja esittää se graafisesti. Näin muodostettu graafi kuvaa solusegmentin nopeutta ajan suhteen. Tarkasteltavan alueen ulkorajojen määrittely tapahtuu manuaalisesti käyttäjän toimesta, jonka jälkeen valittu alue edelleen rajataan kahdeksaan eri sektoriin. Näiden sektorien sisällä tapahtuvaa liikettä tarkastellaan sekä radiaalisessa että tangentialisessa

suunnassa. Näin muodostetuista graafeista käyttäjä valitsee voimakkaimmin erottuvat liikesuunnat ja segmentit.

Nopeuskuvaajasta määritellään neljä eri aikapistettä: lihassupistuksen alkaminen, lihassupistuksen pysähtyminen, lihasrelaksaation alkaminen ja lihasrelaksaation loppuminen. Näiden pisteiden avulla lasketaan arvio keskimääräisistä lihastoimintojen kestoista, kuten supistukseen kuluva aika eli supistusaika, supistuksen kesto, relaksoitumiseen kuluva aika eli relaksaatioaika, sekä relaksoituneena kulunut aika ennen seuraavaa supistusta. Näitä parametreja tarkkailemalla voidaan määrittää sydänlihassolun toiminnassa tapahtuvia muutoksia lääkeainealtistuksen aikana.



Kuva 2.1. Sydänlihassolun liikekuvaaja, jossa on esitettyinä supistusaika (1), supistuksen kesto (2), relaksaatioaika (3), relaksaation kesto (4+5). Vaiheen 4 aikana nähdään usein lihassolun värähtelyä.

2.3 Lääkeainetestaus

Lääkeaineina sydänlihassolujen altistuksessa käytettiin adrenaliinia, karvedilolia sekä E-3401:ä, joiden vaikutus sydänlihassolujen toimintaan tunnetaan suhteellisen hyvin. Näistä adrenaliinia ja sen vaikutusta salpaavaa karvedilolia oli tarkoitus testata ensin erikseen ja sitten yhdessä, jolloin saataisiin esiin karvedilolille tyypillinen reseptorisalpaus etenkin sydänlihassolujen β_1 -tyyppisissä adrenergisissä reseptoreissa. Mittauksissa käytettiin 24-kaivoista solumaljaa, joista kustakin maljasta valittiin tarkasteluun yksi sykkivä pieni soluaggregaatti. Jokaisesta soluaggregaatista kuvattiin pitkä noin 1,5-2 tunnin mittainen videosarja, jossa oli seitsemän kuvaussykliä. Jokaisessa syklissä kuvattiin kolme kertaa: referenssitaso (*baseline*) ennen lääkeaineen annostelua, välitön (*immediate*) vaikutus 30 sekunnin kuluttua, sekä myöhäinen (*delayed*) vaikutus 5 minuutin kuluttua. Referenssitaso (*baseline*) määritettiin uudelleen jokaisen lääkeainesyklin jälkeen, jolla pyrittiin varmistamaan sydänlihassolun palautuminen edellisen altistussyklin vaikutuksesta. Tietyllä konsentraatiolla mitattujen sykeparametrien muutokset suhteutettiin saman syklin alussa määritettyyn

referenssitason. Referenssitason (*baseline*) videoinnin jälkeen liuokseen lisättiin lääkeaine ja sama soluaggregaatti videoitiin välittömästi vetokaapissa suoritettua lääkeaineen lisäämisen jälkeen 30 sekunnin kohdalla (*immediate effect*). Tämän jälkeen solumaljaa inkuboitiin kunnes sama soluaggregaatti kuvattiin vielä kolmannen kerran 5 minuutin kohdalla (*delayed effect*). Koska yhtä kaivoa kohti voitiin valita kuvattavaksi vain yksi soluaggregaatti, jokaisen kuvaussyklin jälkeen soluille vaihdettiin puhdas EB5%FBS-liuos, jossa soluja inkuboitiin vähintään 10 minuuttia (*wash out period*) ennen uuden kuvaussyklin aloittamista seuraavalla konsentraatiolla. Testisarja aloitettiin pienellä konsentraatiolla ja jatkettiin nousevin konsentraatioin. Samoin kuvattiin erikseen referenssitestisarja käyttäen puhdasta EB5%FBS-liuosta, jotta ympäristön vaikutus testitulokseen saatiin vertailukelpoiseksi. Testit suoritettiin käyttäen videokameralla varustettua optista läpivalaisumikroskooppia sekä lämpöalustallista (38°C) CCD-kamerallista konfokaalimikroskooppia. Videoanalyysi suoritettiin BeatView-ohjelmistolla. Tallennetun datan analysointiin käytetään näihin tarkoitettuja ohjelmistoja.

2.3.1 Adrenaliini

Adrenaliini on hormoni, joka erittyy luonnostaan lisämunuaiskuorelta. Sydänlihassoluissa se saa aikaan β_1 -reseptorivälitteisesti syketaajuuden nousua sekä supistusvoiman lisääntymistä. Kliinisesti voidaan havaita systolisen verenpaineen kasvu sekä diastolisen paineen lasku, jolloin pulssipaine kasvaa. [16]

2.3.2 Karvediloli

Karvediloli on epäselektiivinen beetasalpaaja. Sydänlihassolussa se estää adrenaliinin vaikutuksen β_1 -reseptoreiden kautta, joka saa aikaan sykkeen hidastumisen. Toisaalta suuremmilla konsentraatioilla se on myös kalsiumkanavan antagonisti. [16] [30]

2.3.3 E-4031

Farmakologisessa luokituksessa E-4031 kuuluu ryhmän III antiarytmisiin lääkkeisiin. Se on selektiivinen Kv11.1 (hERG)-kanavan salpaaja, joka estää kaliumvirtausta (I_{Kr}) ja pidentää reversiibelisti aktiopotentiaalin kestoja sydänlihassoluissa vaikuttamatta Na^+ tai Ca^{2+} -ionien sisäänvirtaukseen. [31]

2.4 Tulosten analysointi

Tulokset on esitetty sekä absoluuttisia arvoja käyttäen että suhteellisina arvoina. Mitatuista sykeparametreista taulukoissa on esitetty syketaajuuden muutos, relaksaatioajan muutos, muutos relaksaation kestossa, supistusajan muutos, muutos supistuksen kestossa, sekä supistus-relaksaatiosyklin kokonaiskeston muutos, jotka on normalisoitu kunkin kuvaussyklin sykereferenssitason (*baseline*) suhteen. Näin ollen muutoksina ilmoitetut arvot, jotka on merkitty tunnuksella *c* (*corrected*) ovat vertailukelpoisia keskenään. Syketason korjauksessa on käytetty Bazettin yhtälöä: $\frac{\text{sykeparametri}}{\sqrt{RR}}$. Tämä käsittely suoritettiin, jotta testausmenetelmän aiheuttama säännöllinen syketason lasku 30 sekunnin aikapisteessä, ja tästä johtuva systemaattinen virhe, voitiin eliminoida tuloksista. Käytännössä tämä toteutettiin vertaamalla siis kussakin aikapisteessä havaittua syketason laskua vastaavasti referenssisarjoissa havaittuihin syketason muutoksiin.

3. TULOKSET

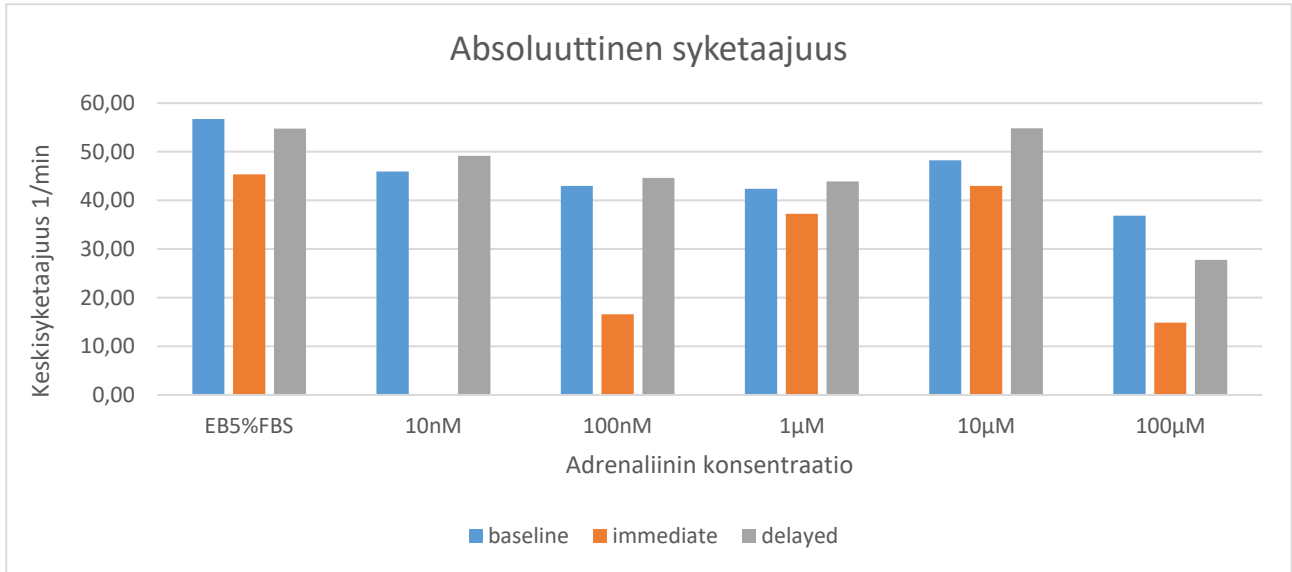
3.1 Adrenaliini

Lääkeainetestauksessa adrenaliinille altistettiin yksitellen yhteensä 34 visuaalisesti analyysikelpoisiksi arvioitua solulinjan 04602.WT-solua edellä kuvatun tutkimusprotokollan mukaisesti. Näistä soluista BeatView-ohjelmiston analyysiin kelpoisia oli 13 eli 38%, joiden joukosta onnistuneiden videoanalyysien nettomäärät on esitetty taulukossa 3.1. Keskeisimmät videoiden hylkäämiseperusteet olivat heikko signaalin laatu kuva-analyysissa (21%), kuvauskohteen tärinä (18%) sekä muut syyt (24%), kuten referenssvideon (*baseline*) hylkääminen tai liikealueen määrittelyn ongelmat.

Taulukko 3.1. Adrenaliinikokeiden pohjalta tehtyjen videoanalyysien määrät eri konsentraatioilla.

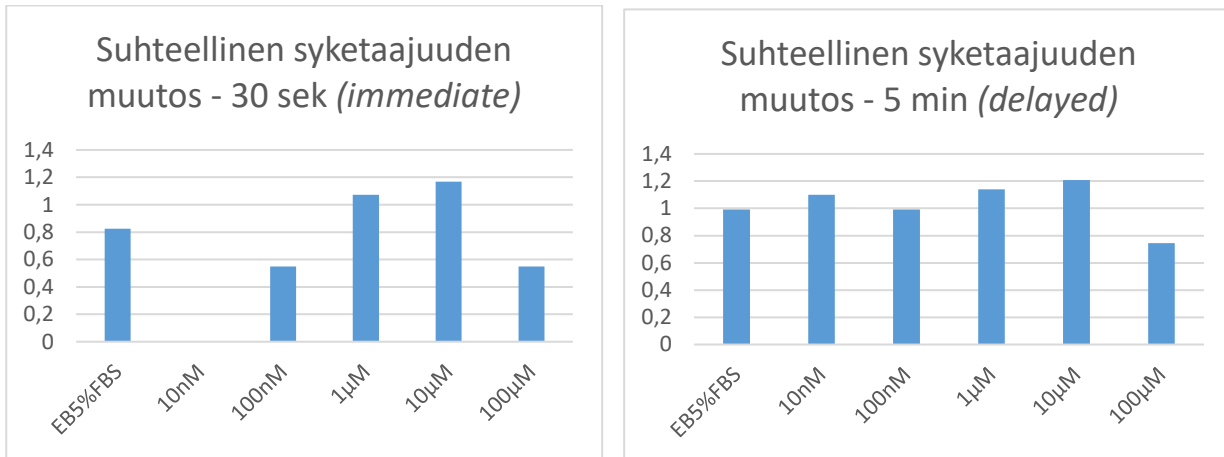
| EB5%FBS | | 10nM | | 100nM | | 1µM | | 10µM | | 100µM | |
|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| immediate | delayed | immediate | delayed | immediate | delayed | immediate | delayed | immediate | delayed | immediate | delayed |
| n=11 | n=9 | n=0 | n=11 | n=1 | n=8 | n=7 | n=10 | n=5 | n=8 | n=4 | n=4 |

Adrenaliinialtistuksen aikana syketaajuus laski yleisesti läpi altistuksen. Adrenaliinin välitön vaikutus (*immediate effect*) syketaajuuteen oli selvästi negatiivinen kun taas myöhäinen vaikutus (*delayed effect*) syketaajuuteen oli lievästi positiivinen. Tässä huomattavaa on myös myöhäisen vaikutuksen tilastollisesti suurempi merkitsevyys verrattuna välittömään vaikutukseen.



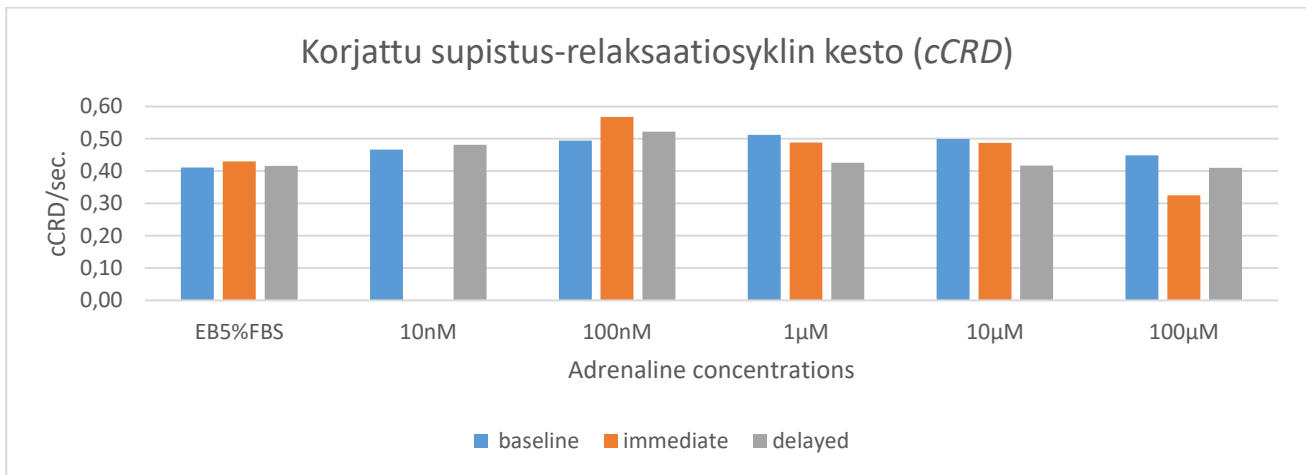
Kuva 3.1. Keskimääräinen syketaajuus adrenaliinialtistuksessa eri konsentraatioilla.

Suhteellinen syketaajuus laskettiin jakamalla syketaajuuden välitön (*immediate*) ja myöhäinen (*delayed*) arvo referenssitason (*baseline*) syketaajuudella. Adrenaliinikokeissa havaittiin välitön +7,3%-yksikön ja +16,8%-yksikön suuruinen syketaajuuden nousu, kuten esitetty kuvassa 3.2. Suhteutettuna pelkässä EB5%FBS-liuoksessa havaittuun -17,4%-yksikön syketaajuuden laskuun referenssisoluissa (n=11) on syketaajuuden nousu vastaavasti +29,9% (n=7) ja +41,4% (n=5). Syketaajuuden lasku konsentraatiolla 100nM havaittiin ainoastaan yhdellä solulla (n=1). Sitä vastoin syketaajuuden huomattava lasku 100µM konsentraatiolla havaittiin sekä välittömästi (n=4) lääkkeen annostelun jälkeen että myöhäisvaikutuksena (n=4). Myöhäisvaikutuksen osalta suhteellinen syketaajuuden muutos oli EB5%FBS-liuokseen verrattuna +10,9% konsentraatiolla 10nM (n=11), +0,1% konsentraatiolla 100nM (n=8), +14,9% konsentraatiolla 1µM (n=10), ja +21,7% konsentraatiolla 10µM (n=8).



Kuva 3.2. Syketaajuuden suhteellinen muutos adrenaliinialtistuksessa välittömästi lääkeaineen lisäämisen jälkeen ja 5 minuuttia lisäämisestä.

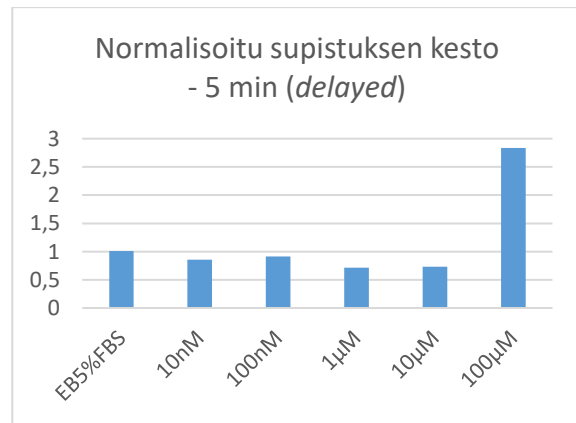
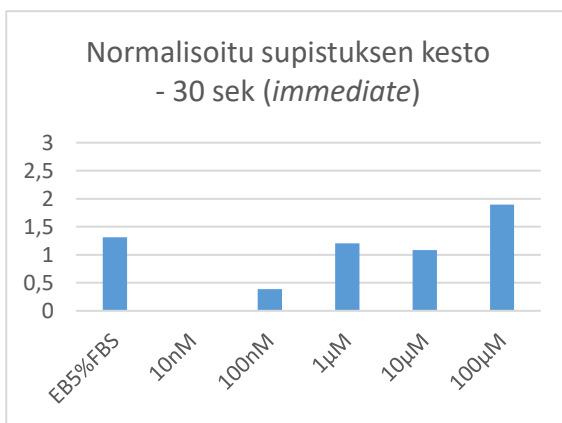
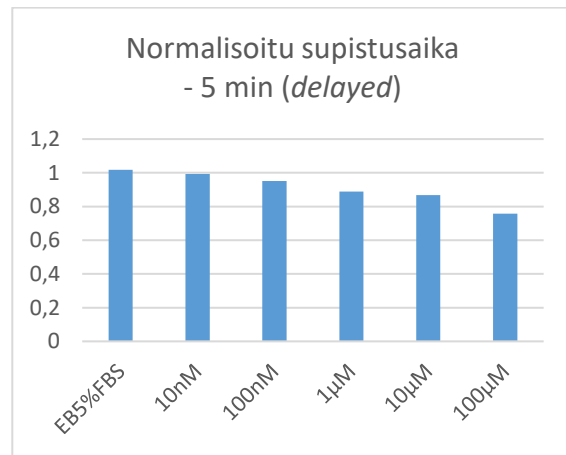
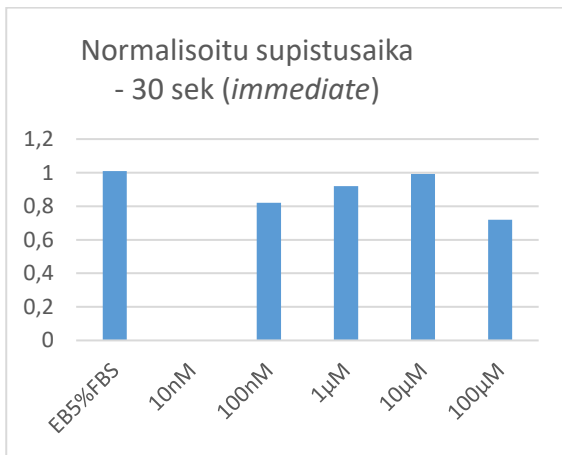
Supistus-relaksaatioisyklin kestoa (*CRD*) tarkasteltiin normalisoiden koko syklin kesto syketaajuuden suhteen käyttäen Bazettin yhtälöä. Konsentraatioilla 1µM (n=10) ja 10µM (n=8) ilmeni 15–20% lyhenemä supistus-relaksaatioisyklin kestossa 5 minuutin kohdalla verrattuna samalla konsentraatiolla mitattuun referenssitasoon, kuten esitetty kuvassa 3.3. Sitä vastoin konsentraatioilla 10nM (n=11) ja 100nM (n=8) normalisoitu supistus-relaksaatioisyklin kesto (*cCRD*) pidentyi noin 5%.

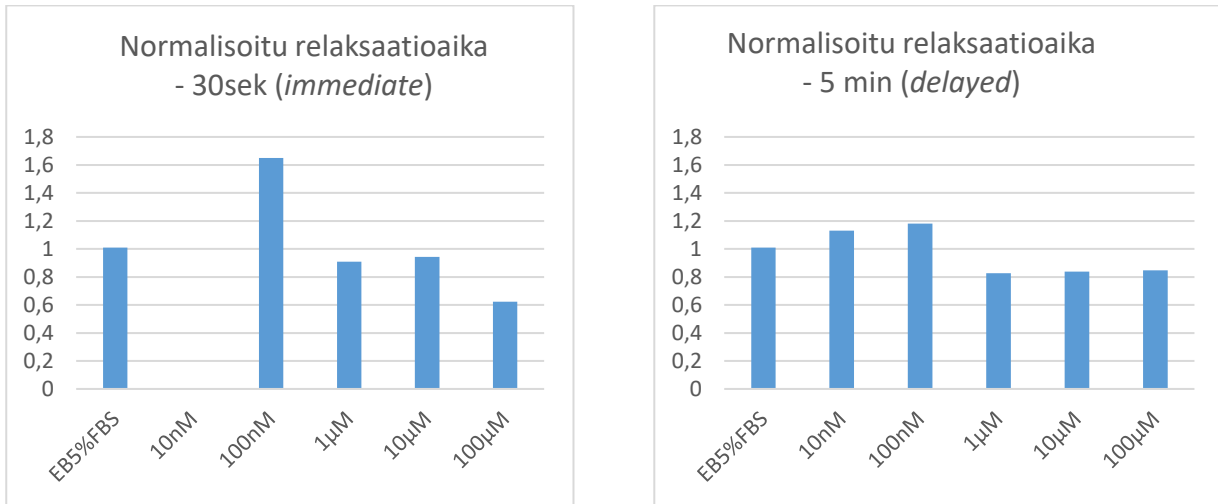


Kuva 3.3. Syketaajuuden suhteen normalisoitu supistus-relaksaatioisyklin kesto eri adrenaliinikonsentraatioissa.

Syketaajuuden suhteen normalisoitu supistusaika on hieman lyhentynyt välittömästi adrenaliinilisäyksen jälkeen konsentraatioilla 100nM ja 1µM. Myöhäisenä vaikutuksena 5 minuutin jälkeen nähdään nousevan adrenaliiniannoksen mukana tasainen supistusajan lyhenemä, joka saattaa

olla yhteydessä myös supistusvoiman lisääntymiseen. Adrenaliinin lisäyksen myötä myös supistuksen kesto lyhenee kaikilla konsentraatioilla lukuun ottamatta suurinta konsentraatiota 100 μ M, jonka jälkeen supistus välittömästi pidentyy. Sama ilmiö on havaittavissa myös 5 minuutin kohdalla, jolloin supistuksen pituus konsentraatiolla 100 μ M on keskimäärin 2,8-kertainen referenssitasoon nähden. Edellisistä poiketen, normalisoidun relaksaatioajan muutos adrenaliinialistuksessa on vaihteleva: Välittömästi 30 sekunnin kohdalla relaksaatioajan muutos oli positiivinen +12,0% (n=11) ja 5 minuutin kuluttua +17,1% (n=8). Sitä vastoin 1 μ M konsentraatio aiheutti relaksaatioaikaan välittömän negatiivisen -9,8% (n=7) muutoksen joka tuli vielä selvemmin esiin viiveellä -18,1% (n=10). Samansuuruinen muutos syntyi myös konsentraatiolla 10 μ M, jolloin relaksaatioajat olivat vastaavasti -6,5% (n=5) ja -16,9% (n=8).





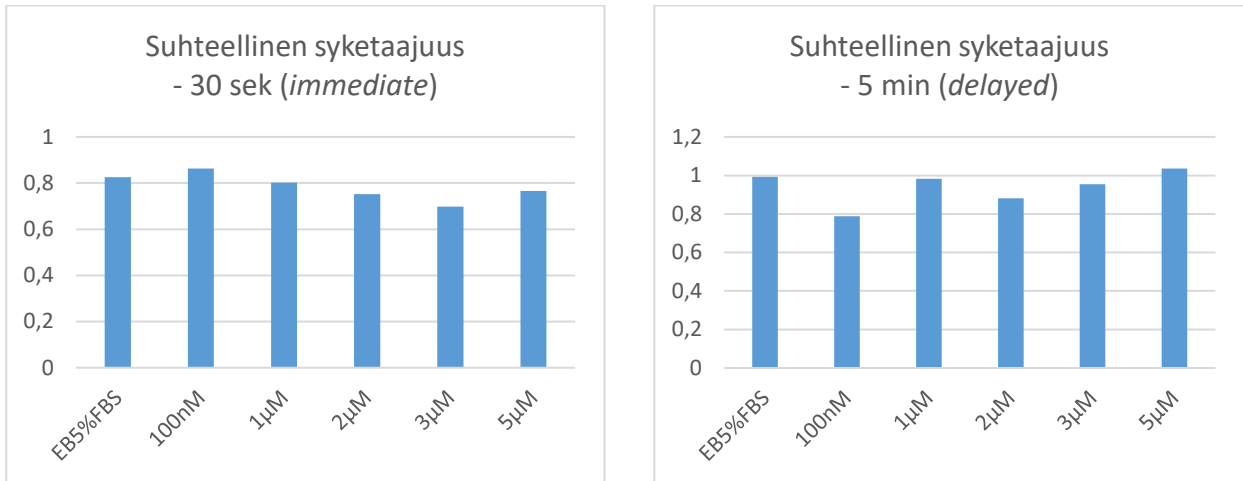
Kuva 3.4. Supistussyklin parametrit normalisoituna syketaajuuden suhteen: Supistusaika, supistuksen kesto, sekä relaksaatioaika esitettynä välittömän (immediate) ja viivästyneen (delayed) vasteen mukaan. Vertailuarvona taulukoissa käytetty lukua 1.

3.2 Karvediloli

Karvedilolin lääkeainealtistus oli tarkoitus suorittaa kahdessa osassa siten, että ensivaiheessa suoritetaan testaus ilman adrenaliinia, jonka vaikutusta karvediloli estää. Toisessa vaiheessa tarkoitus oli testata näitä β_1 -salpauksen osalta yhdessä. Tässä tutkimuksessa esitettävissä tuloksissa karvediloli esiintyy ainoastaan yksinään. Lääkeainealtistuksia tehtiin yhteensä 33 altistussarjaa solulinjan 04511.WT soluilla, jonka tulokset on esitetty olennaisilta osiltaan alla. Videomateriaalista 39,4% oli analyysikelpoisia. Yleisimmät hylkäysperusteet olivat heikko signaalin laatu 25%, sekä liian suuri solujen syketaajuus tai sykkimättömyys 17%. Taulukossa 3.2. on esitetty analysoitujen sydänlihassolujen jakauma eri konsentraatioiluokissa. Kuvassa 3.5. on esitetty karvedilolin lisäämistä seurannut välitön vaste, jossa nähtävissä syketaajuuden lasku referenssinäytteessä ja kaikilla lääkeainekonsentraatioilla. Myöhäisessä vasteessa sitä vastoin syketaajuuden välitön lasku on korjaantunut eikä sykevasteessa havaita johdonmukaista muutosta.

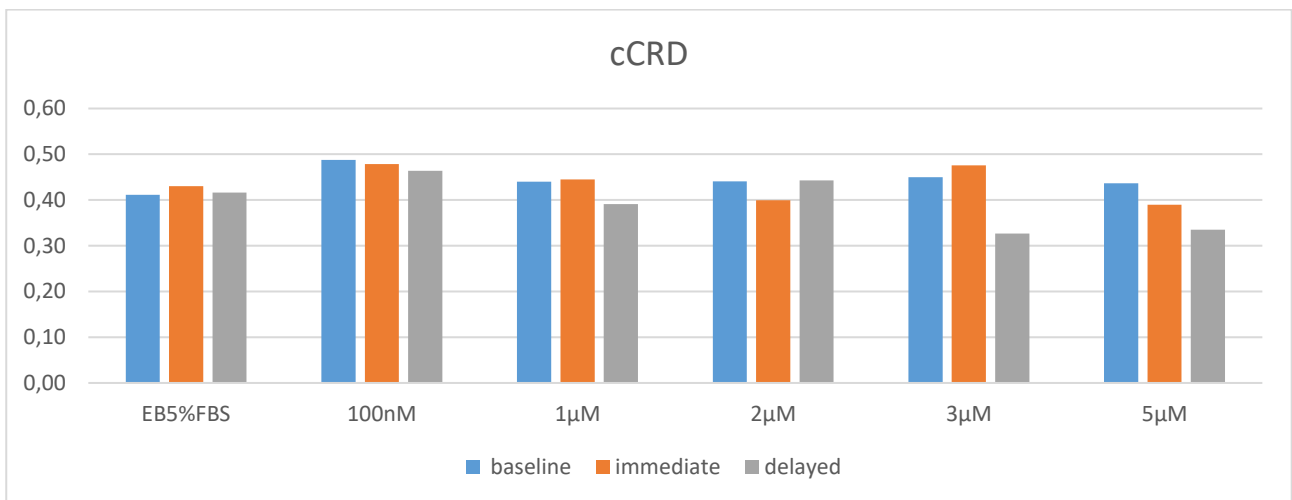
Taulukko 3.2 Karvedilolikokeiden pohjalta tehtyjen videoanalyysien määrät eri konsentraatioilla.

| 100nM | | 1µM | | 2µM | | 3µM | | 5µM | |
|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| immediate | delayed | immediate | delayed | immediate | delayed | immediate | delayed | immediate | delayed |
| n=11 | n=10 | n=11 | n=10 | n=8 | n=10 | n=11 | n=10 | n=8 | n=8 |



Kuva 3.5. Syketaajuuden suhteellinen muutos karvedilolialtistuksessa välittömästi lääkeaineen lisäämisen jälkeen (*immediate*) ja 5 minuutin kohdalla (*delayed*).

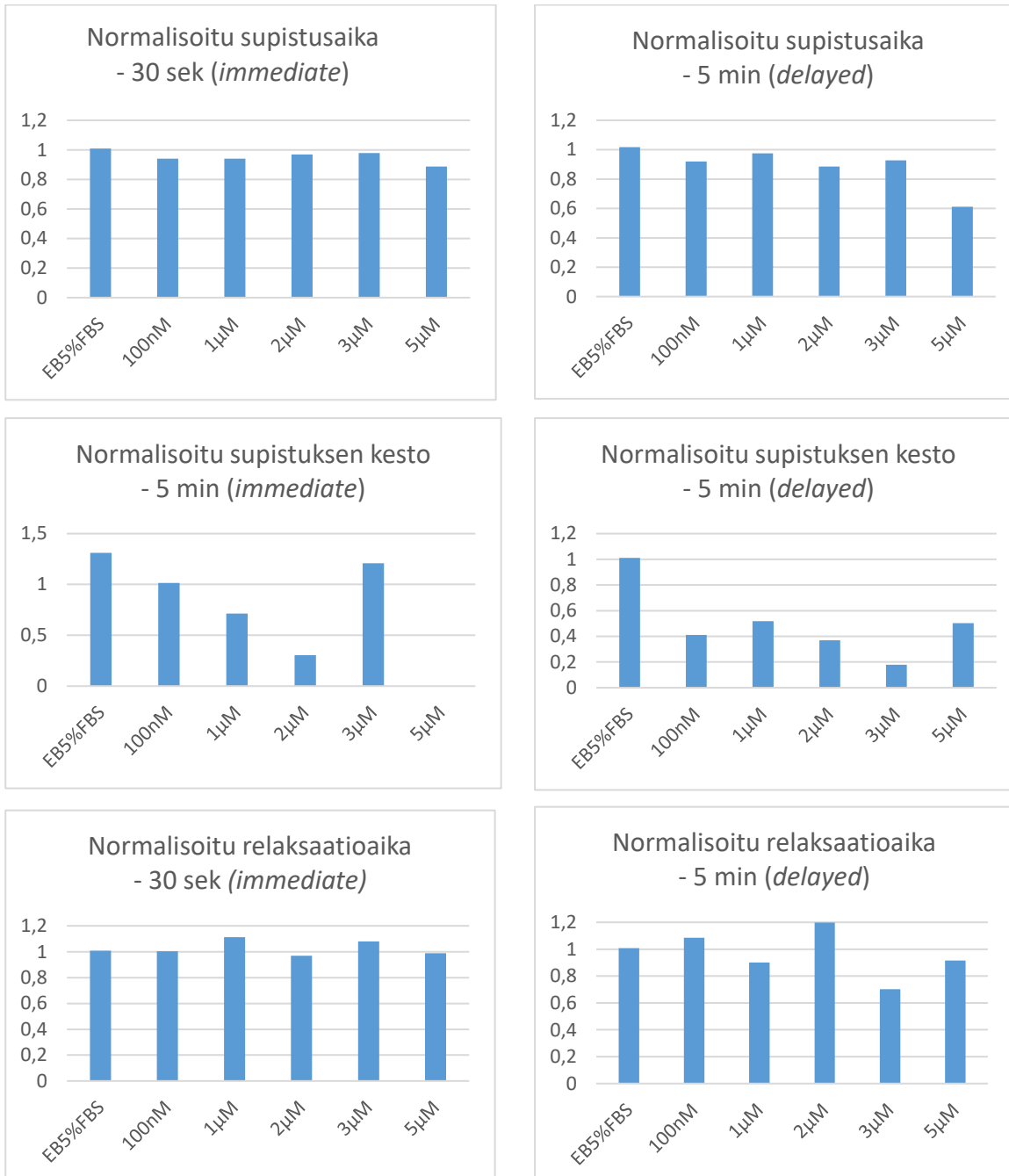
Supistus-relaksaatiosyklin kesto (*CRD*) korjattiin matemaattisesti normalisoimalla tämä syketaajuuden suhteen. Kuvassa 3.6. on koottu diagrammimuotoon eri konsentraatioilla tapahtuneet muutokset korjatun supistus-relaksaatiosyklin kestossa (*cCRD*). Myöhäisenä vasteena nähdään samansuuntaiset -28,2% muutos 3µM konsentraatiolla sekä -24,0% lasku 5µM kohdalla verrattuna referenssiluoksessa tapahtuvaan muutokseen.



Kuva 3.6. Syketaajuuden suhteen normalisoitu supistus-relaksaatiosyklin kesto eri karvedilolikonentraatioissa.

Supistus-relaksaatiosykliä tarkasteltiin osittamalla se vielä eri vaiheisiin. Sekä supistusaika että supistuksen kesto lyhenivät merkittävästi kaikilla konsentraatioilla verrattuna lääkeaineettomaan

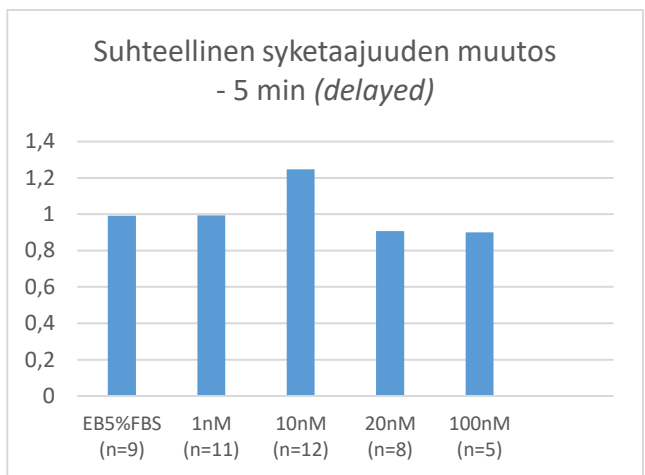
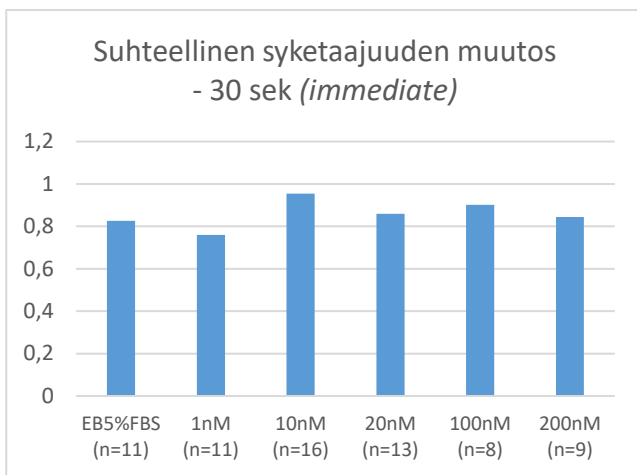
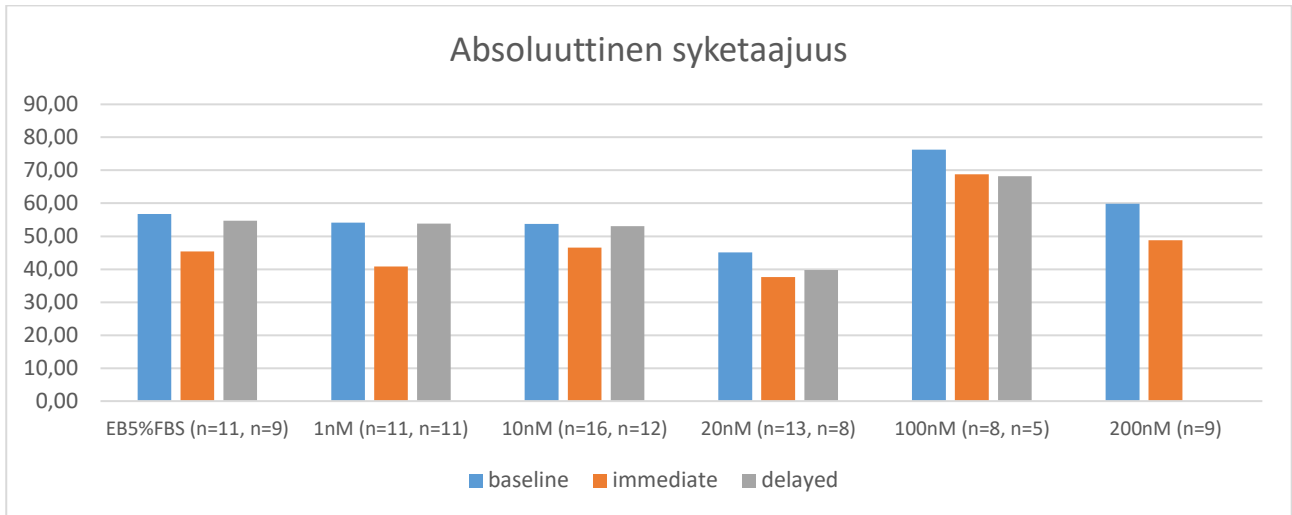
referenssioliuokseen. Sydänlihassolujen supistusnopeuden ja supistuksen keston lyhentyminen tulivat välitöntä vastetta selvemmin esiin myöhäisissä lääkeainevasteissa kuten kuva 3.7. osoittaa. Kaikista selvimmän alentui supistuksen kesto, joka viiden minuutin kohdalla oli muuttunut -59,4% (100nM), -48,9% (1 μ M), -63,4% (2 μ M), -82,4% (3 μ M), ja -50,3% (5 μ M). Sen sijaan vaikutus relaksaatioaikaan oli vähäisempi ja epäyhtenäisempi.



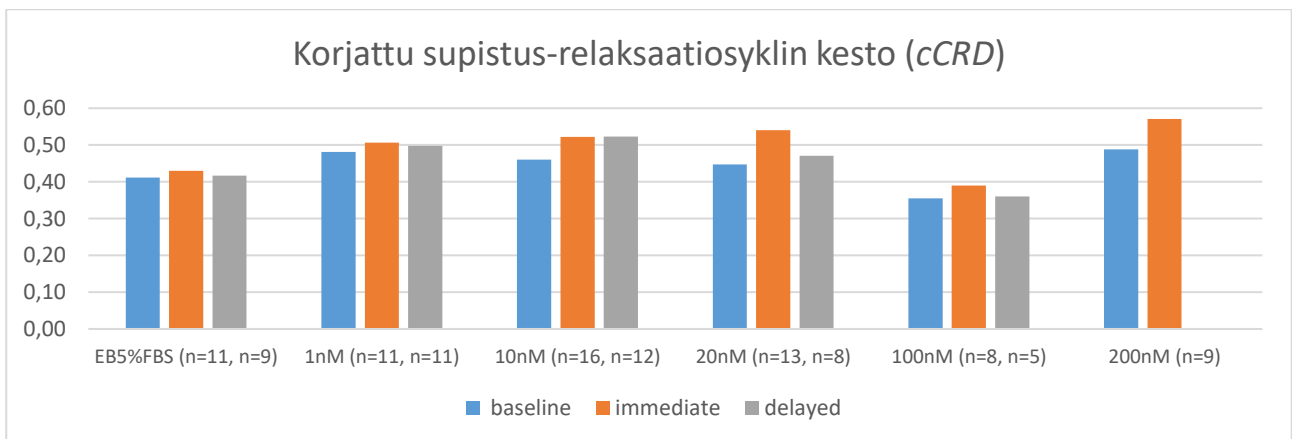
Kuva 3.7. *Supistussyklin parametrit normalisoituna syketaajuuden suhteen: Supistusaika, supistuksen kesto, sekä relaksaatioaika esitettynä välittömän (immediate) ja viivästyneen (delayed) vasteen mukaan. Vertailuarvona taulukoissa käytetty lukua 1.*

3.3 E-4031

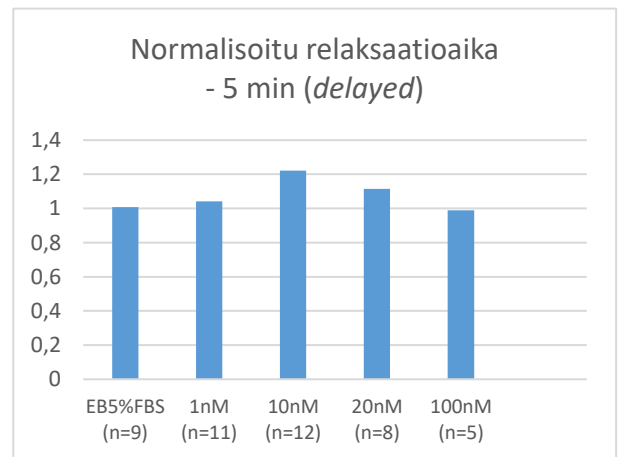
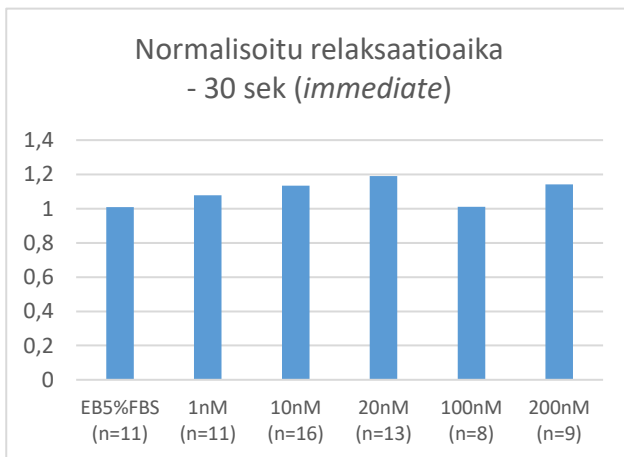
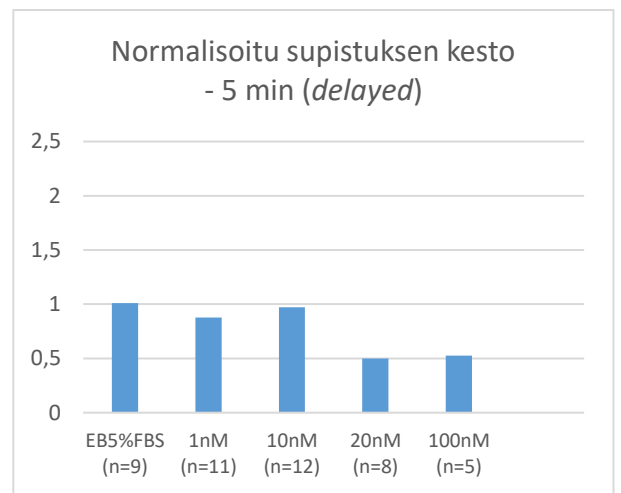
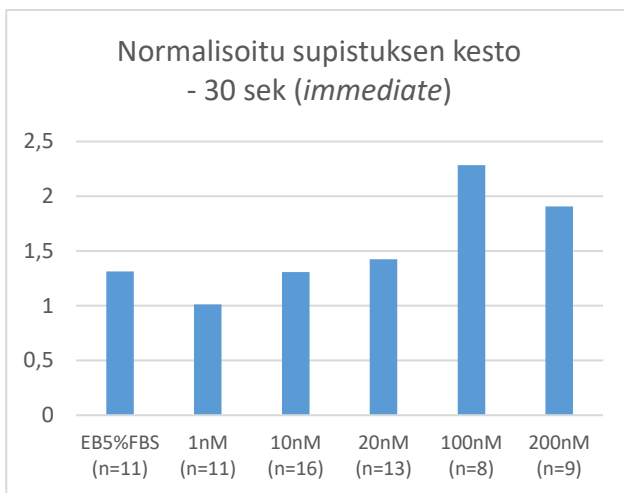
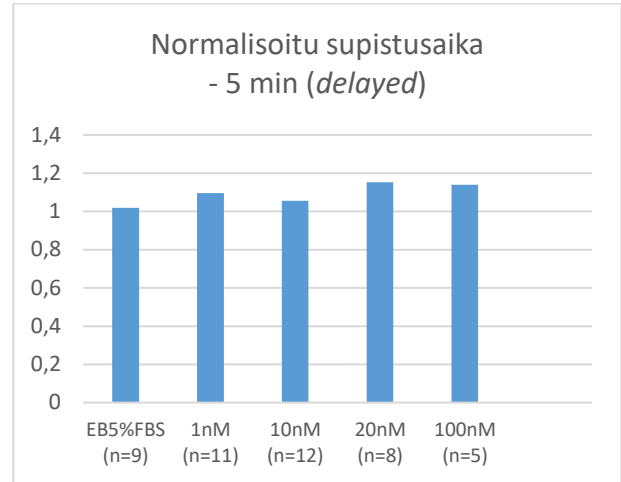
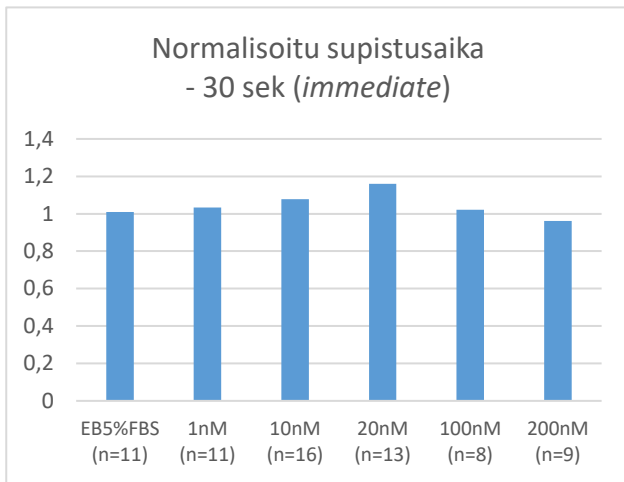
Lääkeainealtistus toteutettiin videoimalla yhteensä 110 solun altistussarjaa, joissa E-4031 konsentraatioina käytettiin 1nM, 10nM, 20nM, 100nM, ja 200 nM lääkeaineliuosta. Referenssisarja kuvattiin ilman lääkeainetta puhtaassa EB5%FBS-liuoksessa. Analysoitujen sydänlihassolujen määrä on ilmoitettu kunkin diagrammin vaaka-akselilla. 110:stä videoidusta sarjasta 74 (67,3%) oli osittain analyysikelpoisia ja mukana tilastollisessa käsittelyssä. Syketaajuuden vaihtelu on tuloksista pyritty häivyttämään määrittämällä joka mittaus syklin alussa sykkeen perustaso (*baseline*) ja normalisoimalla ilmoitetut suuret syketaajuuden suhteen. Ympäristövaikutukset on pyritty eliminoimaan vertaamalla saatuja arvoja referenssisarjan tuloksiin. Absoluuttisessa syketaajuudessa ilmeni jo aiemmissakin kokeissa havaittu säännöllinen syketaajuuden lasku välittömästi lääkeainelisäyksen jälkeen, kuten esitetty kuvassa 3.8. Syketasossa havaittavat muutokset olivat kokonaisuudessaan melko lieviä ja palautuivat 5 minuutin mittauksessa siten, että suurin syketason lasku -9,1% nähtiin suurimmalla 100nM (n=5) konsentraatiolla. Samaten havaittiin ainoastaan kuvassa 3.9. näkyviä lieviä epäspesifisiä muutoksia supistus-relaksaatiosyklin kokonaiskestossa. Myös suhteellinen supistus- ja relaksaatioaika olivat molemmissa aikapisteissä hienoisesti suurentuneet lähes kaikilla konsentraatioilla. Poikkeuksena tähän supistuksen kesto pidentyi suurilla konsentraatioilla +8,7% (20nM), +74,0% (100nM), +45,6% (200nM). Mielenkiintoista kyllä, myöhäinen vaste 5 minuutin kohdalla sen sijaan osoitti supistuksen kestossa aleneman suuruudeltaan -13,2% (1nM), -3,7% (10nM), -50,5% (20nM) ja -47,9% (100nM), kuten esitetty kuvassa 3.10.



Kuva 3.8. Yläkuvassa keskimääräinen syketaajuus lääkkeen E-4031 eri konsentraatioilla. Alhaalla syketaajuuden muutokset perustasoon (baseline) nähden suhteutettuna sykkeen referenssinäytteessä mitattuihin syketaajuuden muutoksiin.



Kuva 3.9. Syketaajuuden suhteen normalisoitu supistus-relaksaatiosyklin kesto.



Kuva 3.10. Supistussyklin parametrit normalisoituna syketaajuuden suhteen: Supistusaika, supistuksen kesto, sekä relaksaatioaika esitettyinä välittömän (*immediate*) ja myöhäisen (*delayed*) vasteen mukaan. Vertailuarvona taulukoissa käytetty lukua 1.

4. POHDINTA

Tutkimuksessamme terveiden koehenkilöiden iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja videoitiin mikroskoopissa lääkeainealtistuksen aikana. Pää tavoitteemme oli löytää BeatView-videoanalyysiohjelmiston avulla tyypillisiä sykeparametrien muutoksia vasteena tunnetuille lääkeaineille. Tutkimusaineisto koostui yhteensä 177 kuvaussarjasta, joissa pieni soluaggregaatti altistettiin nouseville konsentraatioille adrenaliinia, karvedilolia, sekä E-4031:ä. Solulinjoista 04602.WT ja 04511.WT erilaistettujen sydänlihassolujen sykevasteet olivat pääsääntöisesti vaikutusmekanismiinsa sopivia. Adrenaliinialtistuksessa sykeparametreissa havaittiin syketaajuuden kasvua sekä supistumisajan lyhenemä. Karvedilolin lisääminen sydänlihassolulle sai aikaan huomattavan laskun supistuksen kestoon. E-4031 aiheutti välittömän pidentymän supistuksen kestoon ja toisaalta myöhäisvasteena lyhensi supistuksen kestoja.

4.1 Tutkimuksen luotettavuus

Lääkeainealtistuksissa havaittiin kaikilla karvedilolin ja E-4031 konsentraatioilla välitön syketaajuuden lasku, joka todennäköisimmin perustuu ympäristön lämpötilan äkilliseen muutokseen ja sen aikaansaamaan nopeaan shokkivaikutukseen. Tämän shokkivaikutuksen minimoimiseksi elatusaineen lämpötilan tarkempi kontrollointi olisi mahdollistanut vähäisemmän vaikutuksen syketaajuuteen. Toisaalta valitussa koeasetelmassa verrattiin lääkeainealtistuksessa saatuja sykeparametreja puhtaassa elatusaineessa mitattuihin parametreihin, jolloin koeasetelma eliminoi ympäristötekijöiden vaikutuksen saatuihin sykeparametreihin. Ympäristötekijöiden muutoksia pyrittiin hallitsemaan myös määrittämällä jokaisen konsentraatiosyklin aluksi uudelleen syketaajuuden perustaso (*baseline*), johon kyseisellä konsentraatiolla saatuja sykeparametreja verrattiin. Näin menetellen sykeparametrien muutoksista tehtiin vertailukelpoisia keskenään ja pienennettiin yksittäisten sydänlihassolujen syketaajuuden vaihtelujen vaikutusta tuloksiin. Luonnollisen sydänlihassolujen sykkeenvaihtelun ohella perustason (*baseline*) määrittämisellä pyrittiin myös eliminoimaan koesarjan aikana laskevan lämpötilan vaikutusta koetuloksiin. Tutkimussarjan aikana inkubaattorin lämpötila laski tasaisesti 36°C-asteeseen, jossa lämpötila pysytteli suurimmilla konsentraatioilla tehtyjen testien aikana. Tämä ilmiö kuitenkin näkyy esimerkiksi adrenaliinisarjan aikana tapahtuvana syketaajuuden laskuna kuvassa 3.1. Tutkimuksen merkittävimmät rajoitteet liittyvät pieneen otoskoko. Otokoon määrittäminen osoittautui varsin hankalaksi johtuen sekä menetelmään liittyvästä ennustettavuuden vaikeudesta että toisaalta

suhteellisesta vertailutavasta. Suhteellisen vertailutavan vuoksi oli tärkeää saada onnistunut videoanalyysi sekä perustason (*baseline*) määrittävästä videoaineistosta että lääkeainealtistuksen aikaisesta videoaineistosta. Harmillisen usein joko perustason videoanalyysi tai lääkealtistuksen videoanalyysi kärsivät häiriötekijästä, joka esti analyysin suorittamisen. Ratkaisuksi tähän ongelmaan perfuusiojärjestelmän käyttö olisi mahdollistanut kontrolloidun koeympäristön, jossa perustason (*baseline*) uudellenmäärittystä ei välttämättä olisi tarvittu. Lisäksi perfuusiosysteemi mahdollistaisi myös reaaliaikaisen lääkevasteen seurannan.

4.2 Tutkimustulosten merkitys

Tutkimuksen tarkoituksena oli havaita lääkeainealtistuksen aikana sykeparametreissa muutoksia, jotka sopivat vaikutukseltaan tunnetun lääkeaineen aiheuttamiksi. Ennako-oletuksena oli havaita välittömästi adrenaliinin lisäyksen jälkeen syketaajuuden nousu, sekä supistus ajan, supistuksen keston, sekä relaksaatioajan lyhenemä pienimmästä $10\mu\text{M}$ konsentraatiosta alkaen. Tätä vastoin karvedilolin lisääminen ilman adrenaliinia ei sykeparametreihin muutoksia aiheuttaisi. Kuitenkin karvedilolin kalsiumaktiivisuus suurilla konsentraatioilla voisi mahdollisesti tulla esiin supistusajan, supistuksen keston, ja relaksaatioajan pidentymisenä. E-4031 osalta odotettiin kaliumkanavan salpauksen myötä hidastuvaa repolarisaatiota, joka näkyisi pidentyneenä supistuksen kestonä sekä pidentyneenä relaksaatioaikana.

Adrenaliinilla havaittiin selvä syketaajuuden nousu 30 sekunnin kohdalla konsentraatioilla $1\mu\text{M}$ ja $10\mu\text{M}$. Konsentraatiolla 100nM syketaajuus laski, mutta otoksena oli yksittäinen mittausta. Näin ollen adrenaliinin välitön positiivinen sykevaste oli vaikutusmekanismi huomioon ottaen odotetun suuntainen. Syketaajuuden ohella adrenaliini tunnetusti lisää sydänlihassolun supistuvuutta, joka oletetusti kasvattaa supistusnopeutta [16] [32]. Tähän sopien supistusajan lyhenemä esiintyi adrenaliinialtistuksessa kaikilla konsentraatioilla sekä välittömästi 30 sekunnin mittauksessa että myöhäisvaikutuksena 5 minuutin kohdalla. Relaksaationopeus puolestaan tuntemattomasta syystä kasvoi merkittävästi 10nM ja 100nM konsentraatioilla, mutta laski konsentraatioilla $1\mu\text{M}$ ja $10\mu\text{M}$.

Adrenaliinin huippukonsentraatiolla $100\mu\text{M}$ sydänlihassolun supistuksen kesto pidentyi yhtäkkisesti 2–3-kertaiseksi. Adrenaliini vaikuttaa keskeisesti solun kalsiumtalouteen [16] [32] ja ilmiö on mahdollisesti manifestaatio voimakkaasti lisääntyneestä intrasellulaarisen kalsiumin määrästä ja pidentyneestä depolarisaatiosta, joka voi korreloida myös kohonneeseen rytmihäiriöriskiin. Kohonneesta rytmihäiriöriskistä ei kuitenkaan tämän tutkimuksen puitteissa saatu viitteitä.

Yleisesti voidaan sanoa, että adrenaliinikokeiden tuloksissa on nähtävissä välittömän vasteen (*immediate*) pienempi otoskoko verrattuna viivästyneeseen vasteeseen (*delayed*), josta johtuen myös tulosten vaihtelevuus on suurempaa. Yhteenvedona voidaan todeta, että havaitut vasteet kuten syketaajuuden lisääntyminen sekä supistusajan, supistuksen keston ja relaksaatioajan pieneneminen olivat adrenaliinin tunnettujen vaikutusten valossa selitettävissä ja tukevat videoanalyysimenetelmän toimivuutta.

Kuten edellä todettiin, karvedilolin adrenergisen salpauksen nettovaikutus sykeparametreihin ilman adrenaliinia ennakoitiin olevan hyvin pieni. Näin ollen mielenkiinto kohdistui kalsiumantagonismin mukanaan tuomaan mahdolliseen supistusajan, supistuksen keston, ja relaksaatioajan pidentymiseen [16]. Keskeisimmät löydökset olivat hienoinen supistusajan lyhenemä ja etenkin supistuksen kestossa havaittu voimakas lyhenemä. Nämä supistusmuutokset ilmenivät kaikilla konsentraatioilla sekä 30 sekunnin että 5 minuutin kohdalla. Sen sijaan vaikutusta syketaajuuteen ei juuri havaittu. Taustalla vaikuttaa mahdollisesti karvedilolille ominainen kalsiumsalpaus, vaikkakin supistuksen kestossa tapahtuneet muutokset olivat ristiriidassa ennakko-olettamusten kanssa. Kalsiumkanavan salpaus sai aikaan myös silmämääräisesti havaittavan sydänsolujen supistuvuuden alentumisen, joka saattaa olla osatekijänä lyhentyneen supistuksen keston taustalla [16].

Lääkeaineista hERG-tyypin kaliumkanavia salpaava E-4031 on todettu hidastavan repolarisaatiota. Oletettavasti tutkimusaineistossamme tämä näkyisi pidentyneenä supistuksen kestonä sekä pidentyneenä relaksaatioaikana. E-4031 ei juuri osoittanut vaikutusta syketaajuuteen käytetyillä konsentraatioilla. Sen sijaan videoanalyysi paljasti hieman pidentyneet supistus- ja relaksaatioajat. Sykeparametrien osalta mielenkiinto kohdistuu kuitenkin supistuksen keston, jossa havaittiin pidentymä 30 sekunnin kohdalla suurilla konsentraatioilla mutta paradoksaalisesti vielä selvempi lyhentymä 5 minuutin jälkeen kaikilla käytetyillä konsentraatioilla. Välitön supistuksen pidentyminen voidaan ymmärtää E-4031 vaikutusmekanismin pohjalta [16] [31]. Reversiibelin hERG-kanavan salpauksen vuoksi kaliumin sisäänvirtaus estyy pitkittäen aktiopotentialin kestoä, joka selittää supistuksen kestossa havaitun välittömän muutoksen. Sitä vastoin 5 minuutin kohdalla tapahtuva supistuksen kestossa tapahtuva voimakas lyhenemä vaatii lisätutkimusta.

4.3 Videoanalyysimenetelmän tehokkuus

Lääkeainevaikutusten tunnistuksessa videoanalyysillä saadut tulokset ovat pääosin tunnettujen lääkevaikutusten suuntaisia. Tutkimuksessa BeatView-ohjelmisto osoitti käyttökelpoisuutensa

lääkeainetestauksessa sykeparametrien määrittämisessä. Menetelmän laajemman käytön kannalta menetelmän työläys ja ennustettavuus ovat toistaiseksi olleet suurimpia haasteita. Tutkimuksessamme yksittäisellä solulla tehdyn mittausarjan aktiivinen mittausaika oli noin 1,5h/solu. Koska lisäksi videoiden kuvanlaatua ja solujen sopivuutta analysointiin on vaikea ennustaa, vaaditaan tilastollisesti merkittävien sarjojen hankkimiseen kymmenien tai satojen solujen otanta. Keskeisimmiksi kehityskohteiksi voidaan tämän tutkimuksen pohjalta nimetä perfuusiosysteemin rakentaminen, reaaliaikaisen videoanalyysin kehittäminen, sekä solujen supistusvoiman mittauksen yhdistäminen videoanalyysiohjelmistoon.

5. YHTEENVETO

Solulinjoista 04602.WT ja 04511.WT erilaistettujen sydänlihassolujen sykevasteet olivat pääsääntöisesti vaikutusmekanismiinsa sopivia. Adrenaliinialtistuksessa sykeparametreissa havaittiin syketaajuuden kasvua sekä supistusajan lyhenemä. Karvedilolin lisääminen sydänlihassolulle sai aikaan huomattavan laskun supistuksen keston. E-4031 aiheutti välittömän pidentymän supistuksen keston ja toisaalta myöhäisvasteena lyhensi supistuksen kestoja. Nämä tulokset vahvistavat käsitystä videoanalyysimenetelmän toimivuudesta sykeparametrien määrittämisessä. Tulevaisuudessa tulisi kiinnittää huomiota analyysimenetelmän nopeuden, tarkkuuden, ja monipuolisuuden kehittämiseen sekä videoanalyysin sykeparametrien kliinisten korrelaatioiden kartoittamiseen.

6. Lähteet

- [1] IFPMA, "Innovative Financing (2014)," International Federation of of Pharmaceutical Manufacturers and Associations, 2014. [Online]. Available: http://www.ifpma.org/fileadmin/content/Publication/2014/IFPMA_-_Facts_And_Figures_2014.pdf. [Haettu 2015].
- [2] R. McNaughton, G. Huet ja S. Shakir, "An investigation into drug products withdrawn from the EU market between 2022 and 2011 for safety reasons and evidence used to support the decision-making," *BMJ Open*, osa/vuosik. 4, nro 1, 2014.
- [3] K. Takahashi ja S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.," *Cell*, osa/vuosik. 126, pp. 663-676, 2006.
- [4] K. Takahashi, K. Tanabe ja M. Ohnuki, "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors," *Cell*, osa/vuosik. 131, pp. 861-872, 2007.
- [5] M. Wernig, A. Meissner ja R. Foreman, "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state.," *Nature*, osa/vuosik. 448, pp. 318-324, 2007.
- [6] A. Meissner, M. Wernig ja R. Jaenisch, "Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells.," *Nat Biotechnol*, osa/vuosik. 25, pp. 1177-1181, 2007.
- [7] T. Elo, "Evaluation of the pluripotency of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) reprogrammed with integrative and non-integrative protocols and their differentiation into cardiomyocytes," TamPub, Tampere, 2014.
- [8] N. Mordwinkin, P. Burridge ja J. Wu, "A Review of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for High-Throughput Drug Discovery, Cardiotoxicity Screening, and Publication Standards," *Journal of Cardiovascular Translational Research*, osa/vuosik. 6, pp. 22-30, 2013.
- [9] K. Kujala, J. Paavola, A. Lahti, K. Larsson, M. Pekkanen-Mattila, M. Viitasalo, A. M. Lahtinen, L. Toivonen, K. Kontula, H. Swan, M. Laine, O. Silvennoinen ja K. Aalto-Setälä, "Cell Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Reveals Early and Delayed Afterdepolarizations," *PLoS ONE*, osa/vuosik. 7, nro 9, 2012.
- [10] A. Lahti, V. Kujala, H. Chapman, A.-P. Koivisto, M. Pekkanen-Mattila, E. Kerkelä, J. Hyttinen, K. Kontula, H. Swan, B. Conklin, S. Yamanaka, O. Silvennoinen ja K. Aalto-Setälä, "Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture," *Disease Models & Mechanisms*, osa/vuosik. 5, nro 2, pp. 220-230, 2012.
- [11] H. Himmel, "Drug-induced functional cardiotoxicity screening in stem-cell-derived human and mouse cardiomyocytes: effects of reference compounds.," *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods*, osa/vuosik. 68, pp. 97-111, 2013.

- [12] O. Sirenko, E. Cromwelle, C. Crittenden, J. Wignall, F. Wright ja I. Rusyn, "Assessment of beating parameters in human induced pluripotent stem cells enables quantitative in vitro screening for cardiotoxicity," *Toxicology and Applied Pharmacology*, osa/vuosik. 273, pp. 500-507, 2013.
- [13] A. Mathur, P. Loskill, S.-G. Hong, J. Lee, S. Marcus, L. Dumont, B. Conklin, H. Willenbring, L. Lee ja K. Healy, "Human induced pluripotent stem cell-based microphysiological tissue models of myocardium and liver for drug development," *Stem Cell Research & Therapy*, osa/vuosik. 4, nro 1, p. 14, 2013.
- [14] A. Kiviaho, Long QT Syndrome -specific Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells, Acta Universitatis Tamperensis, 2014.
- [15] K. Chatterjee, M. Anderson ja D. Heistad, Manual of Electrophysiology, Jaypee Brothers Medical Publishers, 2015.
- [16] H. Rang, J. Ritter, R. Flower ja G. Henderson, tekijä: *Pharmacology*, Elsevier, 2015.
- [17] G. Matthews, Cellular Physiology of Nerve and Muscle, John Wiley & Sons, 2013.
- [18] E. Laurila, A. H. J. Ahola ja K. Aalto-Setälä, "Methods for in vitro functional analysis of iPSC derived cardiomyocytes—Special focus on analyzing the mechanical beating behavior," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, osa/vuosik. 1863, nro 7(B), pp. 1864-1872, 2016.
- [19] A. Ahola, R.-P. Pölönen, K. Aalto-Setälä ja J. Hyttinen, "Simultaneous Measurement of Contraction and Calcium Transients in Stem Cell Derived Cardiomyocytes," *Annals of Biomedical Engineering*, osa/vuosik. 46, pp. 148-158, 2018.
- [20] A. Ahola, A. Kiviaho, K. Larsson, M. Honkanen, K. Aalto-Setälä ja J. Hyttinen, "Video image-based analysis of single human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte beating dynamics using digital image correlation.," *Biomedical Engineering Online*, osa/vuosik. 13, nro 39, 2014.
- [21] L. Sala, B. van Meer ja e. al., "Muslemotion - A Versatile Open Software Tool to Quantify Cardiomyocyte and Cardiac Muscle Contraction In Vitro and In Vivo," *Circulation Research*, osa/vuosik. 122, pp. 5-16, 2018.
- [22] T. Hayakawa, S. Kunihiro, S. Dowaki, H. Uno, E. Matsui ja M. Uchida, "Noninvasive evaluation of contractile behavior of cardiomyocyte monolayers based on motion vector analysis," *Tissue Engineering Part C Methods*, osa/vuosik. 18, pp. 21-32, 2012.
- [23] N. Huebsch, P. Loskill, M. Mandegar, N. Marks, A. Sheehan ja Z. Ma, "Automated video-based analysis of contractility and calcium flux in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes cultured over different spatial scales," *Tissue Engineering Part C Methods*, osa/vuosik. 21, pp. 467-479, 2015.
- [24] M. Maddah, J. Heidmann, M. Mandegar, C. Walker, S. Bolouki ja B. Conklin, "A non-invasive platform for functional characterization of stem-cell-derived cardiomyocytes with applications in cardiotoxicity testing," *Stem Cell Reports*, osa/vuosik. 4, pp. 621-631, 2015.
- [25] A. Kamgoue, J. Ohayon, Y. Usson, L. Riou ja P. Tracqui, "Quantification of cardiomyocyte contraction based on image correlation analysis," *Cytometry A*, osa/vuosik. 75, pp. 298-308, 2009.

- [26] A. Chen, E. Lee, R. Tu, K. Santiago, A. Grosberg ja C. Fowlkes, "Integrated platform for functional monitoring of biomimetic heart sheets derived from human pluripotent stem cells," *Biomaterials*, osa/vuosik. 35, pp. 675-683, 2014.
- [27] Life Technologies, 2014. [Online]. Available: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/CytoTune_iPS_Reprogramming_Kit_man.pdf. [Haettu 16 11 2018].
- [28] C. Mummery, D. Oostwaard, P. Doevendans, R. Spijker, S. van den Brink ja R. Hassink, "Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells," *Circulation*, osa/vuosik. 107, pp. 2733-2740, 2003.
- [29] T. Takahashi, B. Lord, P. Schulze, R. Fryer, S. Sarang, S. Gullans ja R. Lee, "Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes," *Circulation*, osa/vuosik. 107, pp. 1912-1916, 2003.
- [30] R. Ruffolo, M. Gellai, J. Hieble, R. Willette ja A. Nichols, "The pharmacology of carvedilol," *European Journal of Clinical Pharmacology*, osa/vuosik. 38, pp. 82-88, 1990.
- [31] Tocris, "Product Information E-4031 dihydrochloride," [Online]. Available: https://documents.tocris.com/pdfs/tocris_coa/1808_3_coa.pdf?1542188717. [Haettu 14 11 2018].
- [32] T. O'Connell, B. Jensen, A. Baker ja P. Simpson, "Cardiac Alpha1-Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance," *Pharmacological Reviews*, osa/vuosik. 66, pp. 308-333, 2014.