

Antti Paananen

SYDÄMEN JA VERISUONITUKSEN YH- DISTÄMINEN ORGAN-ON-A-CHIPILLÄ

Kirjallisuuskatsaus

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta

Kandidaatintutkielma

Huhtikuu 2023

TIIVISTELMÄ

Antti Paananen: Sydämen ja verisuonituksen yhdistäminen Organ-on-a-chipillä

Kandidaatintutkielma

Tampereen yliopisto

Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan tutkinto-ohjelma

Huhtikuu 2023

Sydän- ja verisuonisairaudet ovat yleisiä terveysongelmia maailmalla ja pahimmissa tapauksissa johtavat kuolemaan. Sydämen ja verisuonten toiminnan ja tautikuvien mallinnukseen sekä lääke-testaukseen on kehitetty organ-on-a-chip-tekniikka aiemmin käytettyjen ongelmallisten eläinkokeiden tilalle. Tämä työ on kirjallisuuskatsaus tutkimusartikkeleihin, joissa on kehitetty erilaisia ratkaisuita organ-on-a-chipeille ja tutkittu niiden soveltuvuutta sydämen ja verisuonten mallintamisessa. Työn tarkoituksena on löytää keskeinen jako mallien välille ja selvittää jaon jälkeisten osa-alueiden hyödyt ja haasteet.

Organ-on-a-chip on *in vitro* tekniikan läpimurto, joka on kehitetty mallintamaan ihmiskehon organellien toimintaa pienoisokoossa. Organ-on-a-chipissä käytettävät mikrosirut toimivat monipuolisina alustoina pienten solumäärien kasvatukselle ja solujen toiminnan seuraamiselle ympäristössä, joka on muokattavissa tutkimusten tarpeen mukaan. Organ-on-a-chipillä voidaan käyttää yhtä tai useampaa solutyyppeä samanaikaisesti, mikä mahdollistaa solutyypin mallintamisen tutkittaessa niiden itsenäistä toimintaa tai yhteisiä vuorovaikutuksia.

Työ voidaan jakaa kolmeen osaan. Ensimmäisessä osassa annetaan yleiskatsaus sydämen ja verisuonten fysiologiasta sekä niiden solujen erilaistumisen ja toiminnallisuuden edellytyksistä. Toisessa osassa annetaan esimerkkejä tutkimusryhmien tavoista mallintaa erikseen sydäntä ja verisuonia organ-on-a-chipillä. Sydämen organ-on-a-chipit on lisäksi jaettu mekaanisiin ja elektrofyysiologisiin malleihin. Kolmannessa osassa otetaan selvää, miten sydän sekä verisuonet on yhdistetty organ-on-a-chipillä. Työssä keskitytään kolmeen eri lähestymistapaan: staattisiin yhteisviljelmiin, mikrofluidisiin malleihin ja 3D biotulostukseen.

Katsauksessa selviää, että staattiset yhteisviljelmät sopivat sydämen kardiomyosyyttien ja verisuonen endoteelisolujen vuorovaikutusten tutkimiseksi, mutta viljelmää on työlästä ylläpitää ja solut eivät saa kaikkia tarvitsemiaan ympäristötekijöitä kypsyäkseen oikein. Mikrofluidiset mallit omaavat staattisten viljemien hyvät puolet ja fluidiikan lisääminen tukee solujen kypsymistä sekä oikeaa toimintaa. Mikrofluidisten mallien haasteena on pienien nestemäärien hallitseminen. 3D biotulostuksen vahvuus muihin lähestymistapoihin verrattuna on mahdollisuus luoda monimutkaisia rakenteita. Toistaiseksi 3D biotulostuksen haasteena on pienimpien yksityiskohtien tarkka tulostaminen. Optimaalisen organ-on-a-chipin kehittämiseksi mallintamaan sydäntä ja verisuonia olisi optimaalisinta kehittää hybridimalli, joka hyödyntää kaikkien lähestymistapojen ominaisuuksia ja ratkaisee yksittäisten lähestymistapojen haasteita.

Avainsanat: Mikrofluidiikka, heart-on-a-chip, organ-on-a-chip, in vitro

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä tutkielma on tehty osana Bioteknologian ja biolääketieteen tutkinto-ohjelmaa.

Haluan kiittää Joonaa Valtosta tutkielman aiheen antamisesta ja opastuksesta prosessin kaikissa vaiheissa.

Tampereella, 18.4.2023

Antti Paananen

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	4
2. SYDÄMEN JA VERISUONTEN FYSIOLOGIA	5
2.1 Sydän	5
2.2 Verisuonet	6
3. SOLUJEN ERILAISTUMINEN	8
4. MALLINNUS	12
4.1 Sydänmallit	13
4.2 Verisuonimallit	14
5. SYDÄN JA VERISUONET YHDISTETYSSÄ CHIPISSÄ	17
5.1 Staattiset yhteisviljelmät	17
5.2 Mikrofluidiset mallit	18
5.3 Bioprintatut mallit	18
5.4 Mitä ongelmia/haasteita	21
6. YHTEENVETO	23
7. LÄHTEET	24

1. JOHDANTO

Sydän on ihmiselle elintärkeä elin ja sen toiminnallisista ongelmista johtuvat sydänsairaudet ovat olleet WHO:n listaamien yleisimpien kuolinsyiden joukossa maailmalla (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, 13.04.2023). Tämä herättää kysyntää ongelman tutkimisessa ja ratkaisujen löytämisessä. Aiemmin asiaa on lähestytty eläinkokeilla tai pitkälle edistyneiden kokeiden kohdalla ihmisillä, mutta molempien keinojen eettisyys on kyseenalaista. Eläinten kohdalla tehdyissä kokeissa törmätään myös ongelmaan eläinten fysiologian, genetiikan ja erilaisen solujen elinympäristön poiketessa ihmisen vastaavista ominaisuuksista. Tämän takia tuloksien käyttökelpoisuus rakoilee sovellettaessa niitä ihmisten kohdalla. Ihmisillä testaus tuottaisi käytettävämpiä tuloksia, mutta epäeettisyyden lisäksi lainsäädäntö rajoittaa mitä ja missä vaiheessa saa testata ihmisellä (<https://www.nordictrialalliance.org/clinical-trials-explained/>, 13.04.2023) ja itse testien tekeminen sydämessä tuottaa omat hankaluutensa vaikean saavutettavuutensa vuoksi.

Organ-on-a-chip (OAC) on *in vitro* mallinnuskeino, jolla voidaan tutkia ja testata eri elinten toimintaa pienoiskoossa. OAC:llä yhdistetään ihmisen soluja mikrofluidisella synteettisellä sirulla, jossa ympäristöä muokkaamalla etsitään solutypeille niille ominaiset ympäristöolosuhteet, jolloin solut pystyvät sekä kypsymään, että toimimaan kuin *in vivo* vastineensa. Mikrofluidiikalla tarkoitetaan järjestelmää, jossa pyritään hallitsemaan pienikokoisia nestemääriä esimerkiksi kuljettamalla sitä kudoksen läpi, eli perfusoimalla (Whitesides 2006). Pienen kokonsa ja mallin muovattavuuden vuoksi OAC:n tutkiminen on helpompaa kuin ihmisten tai eläinten *in vivo*, tarjoten potentiaalisen vaihtoehdon näiden korvaamiseksi. OAC:llä on mahdollista tutkia taudinkuvia, lääkkeiden toimivuutta ja sillä voidaan löytää personalisoituja hoitoratkaisuja käytettäessä potilaan omia soluja. (Ingber 2022)

Sydänsolujen eli kardiomyosyyttien toiminnan tutkiminen on itsessään tuonut paljon tutkimustuloksia, mutta suuremman kuvan saavuttamiseksi on kardiomyosyytit yhdistettävä muun muassa niiden kanssa tiukassa vuorovaikutuksessa toimivien verisuonten kanssa. Tässä kirjallisuuskatsauksessa selvitetään, minkälaisia ratkaisuita on löydetty sydämen ja verisuonten yhdistämiseksi OAC:llä.

2. SYDÄMEN JA VERISUONTEN FYSIOLOGIA

2.1 Sydän

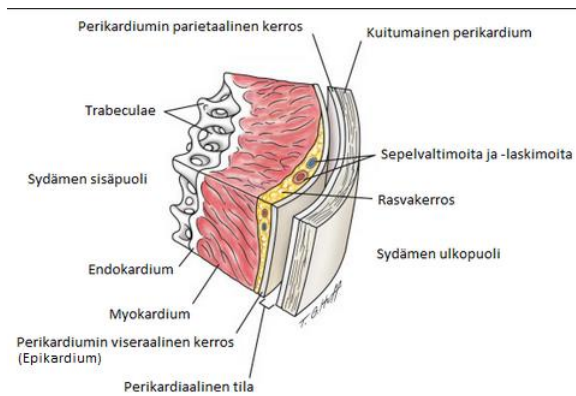
Sydän on lihaksikas elin, joka ihmisellä vastaa hapekkaan veren ja erilaisten vereen liuenneiden aineiden kuten ravinteiden kuljetuksesta elimistöön, hapettoman veren kuljetuksesta keuhkoihin ja verenpaineen ylläpidosta. Sydän koostuu neljästä lihaksikkaasta lokerosta; kahdesta eteisestä ja kahdesta kammiosta, joita erottaa veren väärään suuntaan kulkeutumista estävät läpät. Lokeroiden supistumisen saa aikaan sydämen läpi kulkeva aktiopotentiaali. (Miller ja Gal 2017)

Sydämen lokeroita ympäröivä seinämä koostuu kolmesta kerroksesta, jotka sisimmästä uloimpaan ovat endokardium, myokardium ja epicardium (kuva 1). Sisimpänä kerroksena endokardiumin tehtävä on linjata sydämen lokeroita ja toimia kiinnittymäpaikkoina trabeculaelle, jotka ovat lihaksikkaita pylväitä ja kaaria, jotka antavat mekaanista tukea kammiolle ja muodostavat myokardiumin alkiossa. Endokardium koostuu ohuesta epiteelikerroksesta, verisuonista, hermoista ja sidekudoksesta. Kammioiden endokardiumista löytyvät myös Purkinjen säikeet, jotka liittyvät sydänlihasten organisoidun supistumisen ohjaamiseen. Endokardiumista seuraava kerros myokardium on kardiomyosyyteistä koostuva kerros ja se vastaa sydämen pumppausliikkeestä. (Miller ja Gal 2017)

Sydämen lakkaamaton pumppaus edellyttää paljon happea, joten sepelvaltimot ja niistä haarautuvat myokardiumin sisäiset valtimot tuovat kardiomyosyyteille hapekasta verta suoraan aortasta. Myokardiumin paksuus vaihtelee kammioiden ja eteisten välillä; kammioiden myokardium on paksumpi kuin eteisissä, sillä eteisten tarvitsee vain pumpata veri kammioiden, mutta kammiot pumpaavat veren koko muuhun elimistöön. Sydämen vasemmalla puolella myokardium on paksumpi kuin oikealla, koska oikean puoli pumpkaa verta keuhkoverenkiertoon ja vasen puoli pumpkaa veren laajemmalle muualle elimistöön tarviten suuremman pumppausvoiman. (Miller ja Gal 2017)

Myokardiumin lihassolujen supistumista hallitaan sinussolmukkeesta lähtevillä aktiopotentiaaleilla. Aktiopotentiaali kulkee impulssijohtojärjestelmää pitkin levittäen aktiopotentiaalia ympäröiviin kardiomyosyyteihin aikaansaaden supistumisen. Supistumisten tahtia ohjaa sinussolmuke, mutta ydinjatke voi muuttaa tahtia elimistön hapentarpeen mukaan sympaattisesti tai parasympaattisesti. Sinussolmukkeen normaali tahti on 60–100 iskua minuutissa ja se aikaansaa aktiopotentiaalit spontaanisti. (Oberman ja Bhardwaj 2023)

Sydämen uloimpana kerroksena epikardium linjaa sydämen ulkopintaa ja koostuu mesoteliumista, sidekudoksesta, rasvakudoksesta, verisuonista, imusuonista ja hermoista. Epikardiumin tehtävä on suojata sydäntä hankaukselta ja törmäyksiltä perikardiumia vasten. (Miller ja Gal 2017)

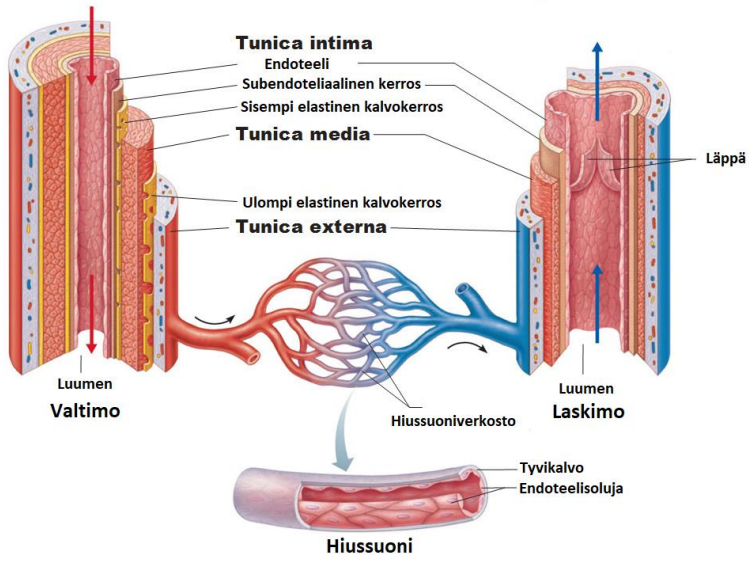


Kuva 1. Sydämen seinämän rakenne. (muokattu lähteestä Miller ja Gal 2017).

2.2 Verisuonet

Verisuonisto on ihmisen läpi levittäytynyt verkosto putkia, joiden tehtävä on kuljettaa kaasuja, aineenvaihdunnan tekijöitä, solujätettä ja osallistua lämmönsäätelyyn. Verisuonet jaetaan kolmeen luokkaan; valtimoihin, laskimoihin ja hiussuoniin, joiden välillä on eroja rakenteessa (kuva 2) ja tehtävässä. Valtimoissa veri liikkuu pois sydäimestä ja laskimoissa veri liikkuu sydäntä kohti. Vaihto valtimosta laskimoksi tapahtuu hiussuonissa, joissa tapahtuu kaasujen ja muiden aineiden vaihtoa suonien ja ympäröivän kudoksen välillä. (Satish ja Tadi 2023)

Verisuonen seinämä rakentuu pääosin endoteelisoluista, sileistä lihassoluista, perisyhteistä, fibroblasteista ja näitä ympäröivästä elastaanista ja kollageenista. Näiden tekijöiden pitoisuudet vaihtelevat eri verisuonten välillä olosuhteiden erilaisuuden, kuten verenpaineen tai aineenvaihdunnan vuoksi. Aortan seinämät ovat paksut kestääkseen sydämen aiheuttamaa suurta verenpainetta ja virtausta, kun taas hiussuonien seinämät koostuvat pelkistä endoteelisoluista ja tyvikalvosta aineenvaihdunnan helpottamiseksi verenpaineen ollessa matala. Verisuonten seinämien sileät lihakset voivat säädellä veren kulkua ja painetta supistamalla ja täten kaventamalla suonien luumenia. (Satish ja Tadi 2023)



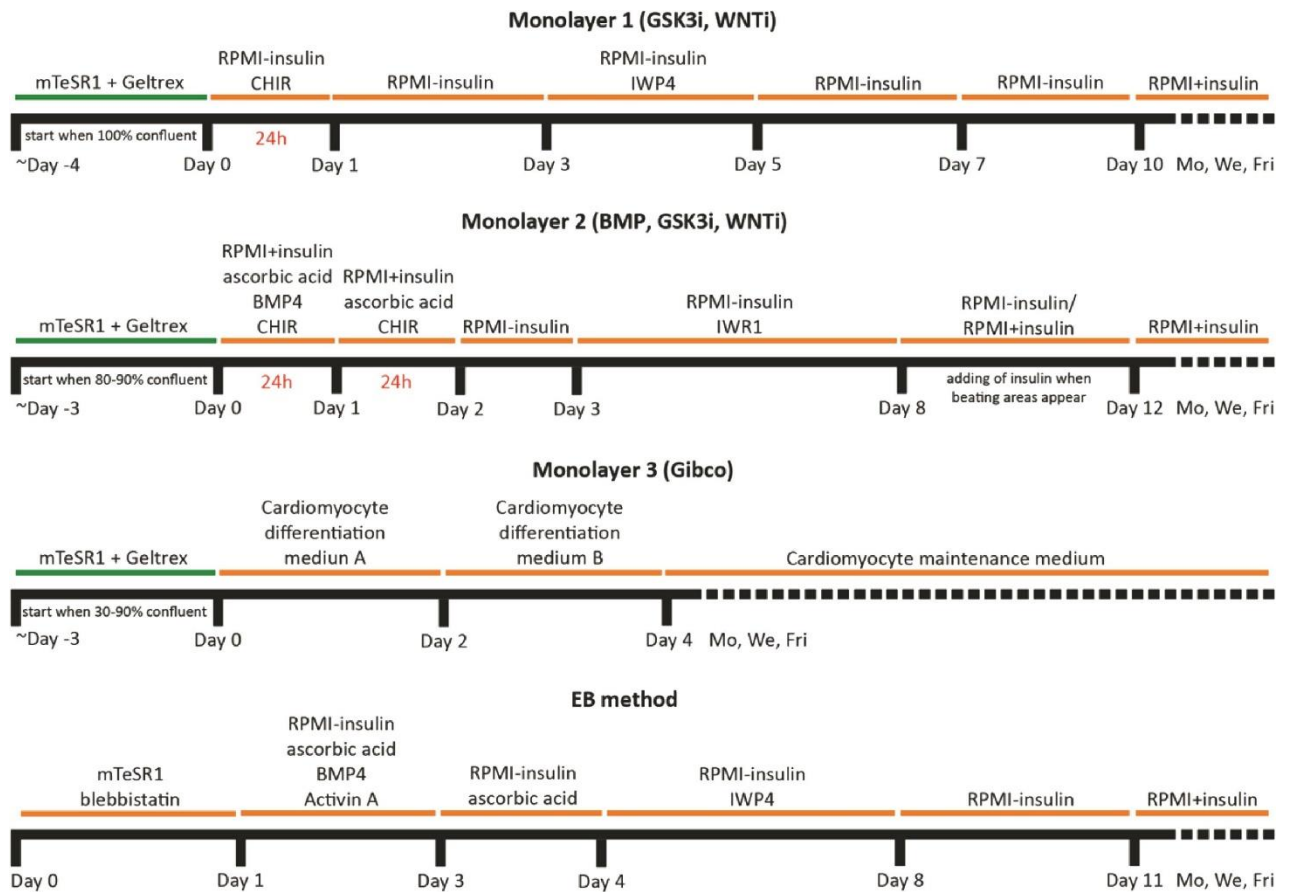
Kuva 2. Verisuonten rakenne (muokattu lähteestä Humagain 2017).

3. SOLUJEN ERILAISTUMINEN

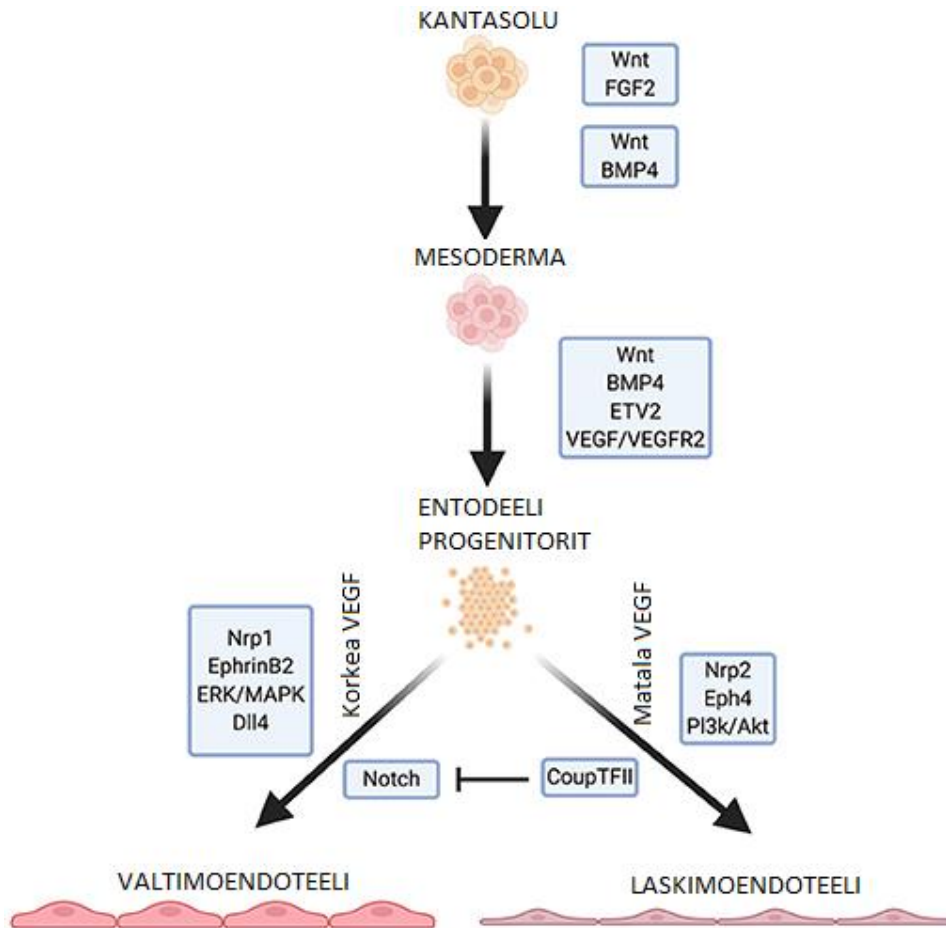
Tutkimuskäyttöön ja hoitomenetelmien testaamiseen tarvitaan soluja, joiden toiminta ja ominaispiirteet vastaavat *in vivo* soluja. Teoriassa solut voitaisiin kerätä ihmisestä, mutta se ei usein ole ideaalia. Varsinkin kardiomyosyyttien kohdalla kerääminen edellyttäisi kirurgisia operaatioita, jotka ovat suuri riski potilaalle. Tämä ongelma voidaan ratkaista käyttämällä alkion kantasoluja tai potilaan omista soluista indusoituja pluripotentteja kantasoluja (induced pluripotent stem cells, iPS), joita on mahdollista erikoistaa halutuiksi solutyypeiksi altistamalla kantasolut oikeanlaisille kasvutekijöille ja viestiaineille (kuvat 3 ja 4). Kardiomyosyytit ja endoteelisolut ovat keskeisiä solutyyppejä tässä katsauksessa, jotka tarvitsevat kuitenkin erikoistumisen lisäksi oikeanlaisen ympäristön saavuttaakseen toiminnallisuutensa.

Erilaistettujen kardiomyosyyttien toiminnallisuuteen vaikuttaa moni tekijä, kuten kiinnittyminen kasvatusalustaan, vuorovaikutus ympäröiviin kardiomyosyytteihin, ravinteiden saanti, aineenvaihdunnan jätteiden poisto ja mekaaniset voimat. Kardiomyosyytit tarvitsevat ekstrasellulaariseen matriisiin (extracellular matrix, ECM) ja muihin kardiomyosyytteihin kiinnittymistä toimiakseen niille tyypillisellä tavalla, jossa lihassolu tuottaa kiinnittymiskohteisiinsa vetoa supistuessaan. Ilman kasvuympäristön aktivoivaa vaikutusta kardiomyosyytti muuttuu pallomaiseksi, dedifferoituu tai menee apoptoosiin (Zhu ym. 2021). Kiinnittymisympäristön ominaisuuksilla pystytään määrittelemään solun käyttäytymistä vaihtelemalla ympäristön jäykkyyttä ja muotoja. (Curtis ja Russell 2009)

Linkittyminen toisiin kardiomyosyytteihin tapahtuu solun päissä sijaitsevien interkaloitujen levyjen avulla. Nämä levyt sisältävät kiinnittymiskohtia ja aukkoliitoksia, joiden kautta mekaaniset voimat, viestiaineet ja sähköiset signaalit välittyvät. Kardiomyosyytit muiden solujen tapaan tarvitsevat ravinteita ja tuottavat jätettä. Tämän aineenvaihdunnan ylläpitämiseksi tarvitaan sydämen vähän yli senttimetrin paksuiseen kerrokseen tunkeutuvaa verisuonitusta (Zhang ym. 2016). Mekaaniset voimat ohjaavat kardiomyosyyttien ominaisuuksia kuten kasvua ja selviytymistä ja muokkaavat solun tukirakenteita ja kiinnittymistä. (Curtis ja Russell 2009) *In vitro* olosuhteissa myös kasvatusmediumin on havaittu olevan tärkeässä asemassa kardiomyosyyttien kypsymisessä. Tutkimuksissa glukoosittomien ja rasvahapollisten mediumien havaittiin kehittävän solujen metaboliaa, elektrofysiologiaa ja mekaanisia ominaisuuksia tuoden solut lähemmäksi aikuisen sydänsolujen fenotyyppiä ("Abstract 16287: Fatty Acid-Based Medium Promoted Metabolic Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes" 2023) (Feyen ym. 2020).

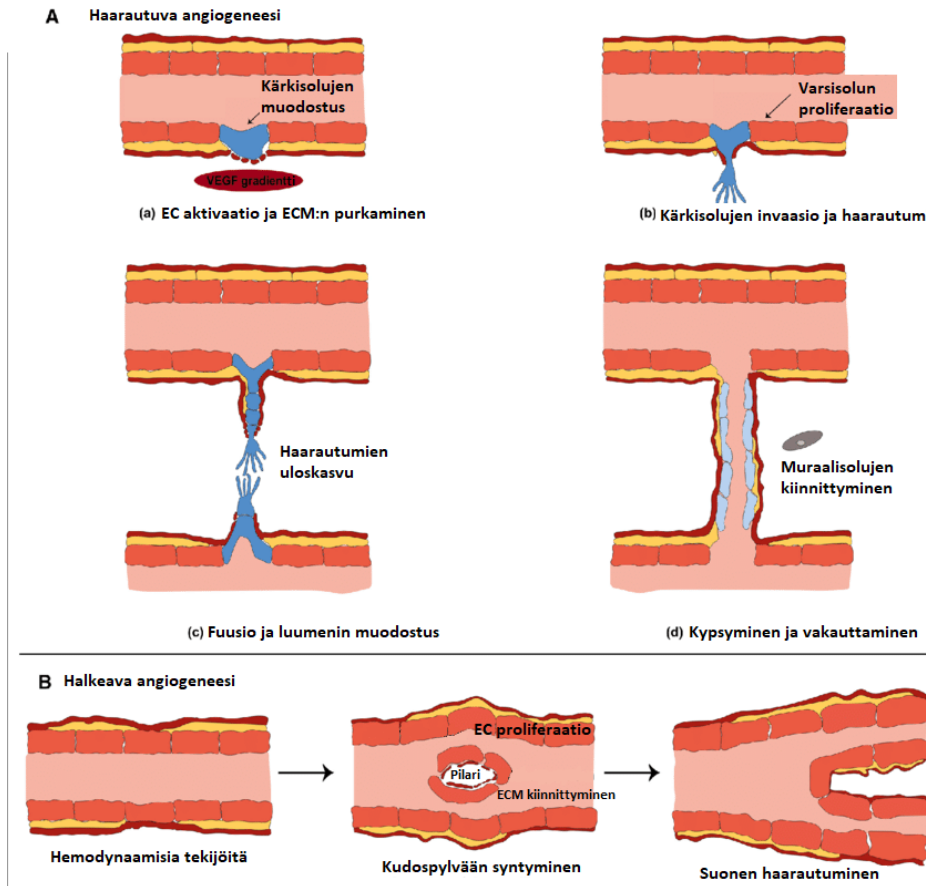


Kuva 3. Sydämen solujen erilaistaminen hiPSC:sta neljällä eri tavalla. Kolme ensimmäistä perustuvat kasvutekijöiden ja pienmolekyylien käyttöön ja viimeinen embryonaalisiin aggregaatteihin perustuvaan erilaistamismenetelmään. (Prajapati ym. 2021)



Kuva 4. Endoteelisolujen kehittyminen. (muokattu lähteestä Kennedy ym. 2021).

Uuden verisuonikudoksen muodostuminen jaetaan vaskulogeneesiin ja angiogeneesiin. Vaskulogeneesissä verisuonikudosta syntyy angioblastien erilaistuessa endoteeliksi, josta muodostuu verisuonia. Tätä erilaistumista ohjaa eri kasvutekijät kuten VEGF (vascular endothelial growth factor) perheen jäsenet. Angiogeneesi on uusien verisuonien kasvua jo olemassa olevista verisuonista. Tämä tapahtuu kahdella eri tavalla, intussusseptiolla ja itämisellä (kuva 5). Intussusseptiossa suoni jakaantuu kahtia seinämien kuroutuessa kiinni toisiinsa keskellä suonta muodostaen haarauman suoneen. Itämisessä verisuonen seinämästä alkaa kasvamaan endoteelisoluista uloke kasvutekijägradientin suuntaan. Kummankin tavan kasvua ja stabilisointia ohjataan kasvutekijöillä. (Vailhé, Vittet, ja Feige 2001) (Wimmer ym. 2019)



Kuva 5. Angiogeneesin toimintamekanismit. (muokattu lähteestä Ahmadi ja Rezaie 2020).

Verisuonten endoteelisolujen muodostumista, erilaistumista ja kypsymistä ohjaa kasvutekijöiden lisäksi niihin vaikuttavat mekaaniset voimat. Mekaaniset voimat aiheuttavat signaaleja solussa muuttaen solun geeniekspressiota ja tätä kautta käyttäytymistä. Tämä muuntunut geeniekspressio voi aiheuttaa solumäärän lisääntymistä kudoksessa, yksittäisten solujen muodon muuntumista, sidosten muutoksia ympäristöön tai kantasolujen kohdalla vaihtelevan erikoistumisen rasiituksen mukaan. (Diop ja Li 2011) (Rokhaya Diop and Song Li. Biophysical Regulation of Vascular Differentiation and Assembly. 2011. s. 227-228, 231-237)

Sydämessä kardiomyosyytit ovat massaltaan suurin soluryhmä ja endoteelisolut määrällisesti suurin soluryhmä, joten näiden väliset vuorovaikutukset ovat suuressa roolissa sydänkudoksen toimivuuden kannalta. Endoteelisolut ovat herkkiä mekaaniselle rasiitukselle ja kardiomyosyyttien supistumiset aiheuttavat mekaanisia voimia keskuudessaan kulkevien verisuonten endoteelisoluihin syklisenä puristuksena ja veren virtauksen aiheuttamana rasiituksena. Verisuonet puolestaan avustavat kardiomyosyyttejä aineenvaihdunnassa, supistusten, kasvun ja rytmin säätelyssä sekä ylläpidossa. (King, Sunyovszki, ja Terracciano 2021) Endoteelisolujen vaikutus kardiomyosyyttien toimintaan ja verisuonten homeostasiaan perustuu erinäisten signaalintimolekyylien tuottamiseen, aktivointiin ja erittämiseen. Kardiomyosyytteihin vaikuttavia aineita on mm. NO, endotheliini, prostaglandiini I₂ ja angiotensiini II. Endoteeli vaikuttaa verisuonten homeostasiaan mm. suonen

tilavuuteen, veren hyytymiseen, thromboosiin, kasvutekijöihin, angiogeneesiin, kudoksen muunte-
luun ja immuunireaktioihin vaikuttavilla tekijöillä. (Brutsaert 2003)

Tutkimuksiin ja mallintamiseen käytetään primaarisia soluja ja kantasoluista erilaistettuja soluja. Eri solutyypit vaativat erilaisia kasvutekijöitä ja ympäristötekijöitä erilaistukseen ja kypsyäkseen toiminnallisiksi soluiksi. Tällaisia tekijöitä ovat usein interaktiot muiden solujen kanssa ja erilaisten molekyylien vaikutukset ja mekaaniset voimat, jotka yhdessä vaikuttavat solun geeniekspressioon ja täten erilaistumiseen ja maturoitumiseen.

4. MALLINNUS

Verisuonten tai sydämen solujen toimintaa tutkiessa ei ole mielekästä suorittaa tutkintaa *in vivo* tutkittavan aiheen vaikean saavutettavuuden ja operaatioiden terveydellisten riskien vuoksi. Lisäksi, *in vivo* -malleissa kustannukset nousevat helposti korkeiksi. Vaihtoehtoiseksi menetelmäksi on kehitetty *in vitro* -menetelmiä, joista OAC mikrosirut ovat lupaava menetelmä pienen tarvittavan solumäärän, muokattavuuden ja valmistusnopeutensa vuoksi. (Ingber 2022)

OAC-mallien etuna on se, että mikrosiruihin pohjautuvat mallit valmistetaan yleensä polydimetyylisiloksaanista (PDMS) tai lasista, johon on helppo kasausvaiheessa asentaa mittareita. Sirujen pintamuotoja voidaan muokata litografialla, elektrospinningillä, laserilla tai additiivisilla menetelmillä, kuten biotulostuksella ja solujen tarttumista sirulle voidaan kannustaa päällystämällä pinta plasamalla, ECM molekyyleillä tai ECM:a matkivilla aineilla. (Kitsara ym. 2019)

Soluina OAC-mallinnuksessa voidaan käyttää primäärisoluja, mutta usein käytetään ihmisen kantasoluista johdettuja kohdesoluja. Kantasolut voivat olla embryonaalisia kantasoluja tai ihmisen indusoituja kantasoluja (human induced pluripotent stem cell, hiPSC). Jos kyseessä on tiettyyn henkilöön kohdistuva tutkimus tai testaus, niin hänen kypsistä soluistaan voidaan indusoida kantasoluja tapauskohtaisten tulosten saavuttamiseksi. Kantasolujen käytössä on myös etuna mahdollisuus geneettiseen muokkaukseen, jolloin voidaan tutkia eri genotyyppien toimintaa. (Bai 2020)

On todettu, että sydämen mallintamisessa endoteelisolujen ja kardiomyosyyttien tiivis yhteiselo on asia, joka on hyvä ottaa huomioon. Toisen solutyypin tuomien vuorovaikutusten korvaaminen muilla tavoilla, kuten ulkoisesti lisätyillä kasvutekijöillä tai dynaamista voimaa tuottavalla ympäristöllä on mahdollista, mutta onnistuneesti yhdessä käytettynä ne voisivat antaa translationaalisia testituloksia. Käydään ensin läpi, miten kudostyyppjä erikseen on mallinnettu mikrosiruilla.

4.1 Sydänmallit

OAC sydänmallit voidaan karkeasti jaotella kolmeen kategoriaan: mekaaniset mallit, elektrofysiologiset mallit ja näiden yhdistelmät. Yleinen solutyyppi sydänmalleissa on kardiomyosyytit niiden toiminnallisen roolin vuoksi. (Kitsara ym. 2019) Kardiomyosyytit altistuvat sydämessä pituussuuntaiselle sykliselle jännitteelle solujen supistuessa ja rentoutuessa sykkeen aikana. Tämän mekaanisen voiman replikoiminen on monien mekaanisten sydänmallien keskiössä, jonka vuoksi mekaanisissa malleissa pyritään stimuloimaan kardiomyosyytteja erilaistumisen ja solukypsytymisen edistämiseksi. (Kitsara ym. 2019) Sydämen OAC-malleja on kehitetty tähän mennessä useita erilaisia ja niiden keskeinen pyrkimys on mallintaa kardiomyosyyttien mekaanista ja sähköistä toimintaa tuottamalla kypsymistä ja järjestäytymistä edesauttavia mekaanisia ja sähköisiä ärsykejä.

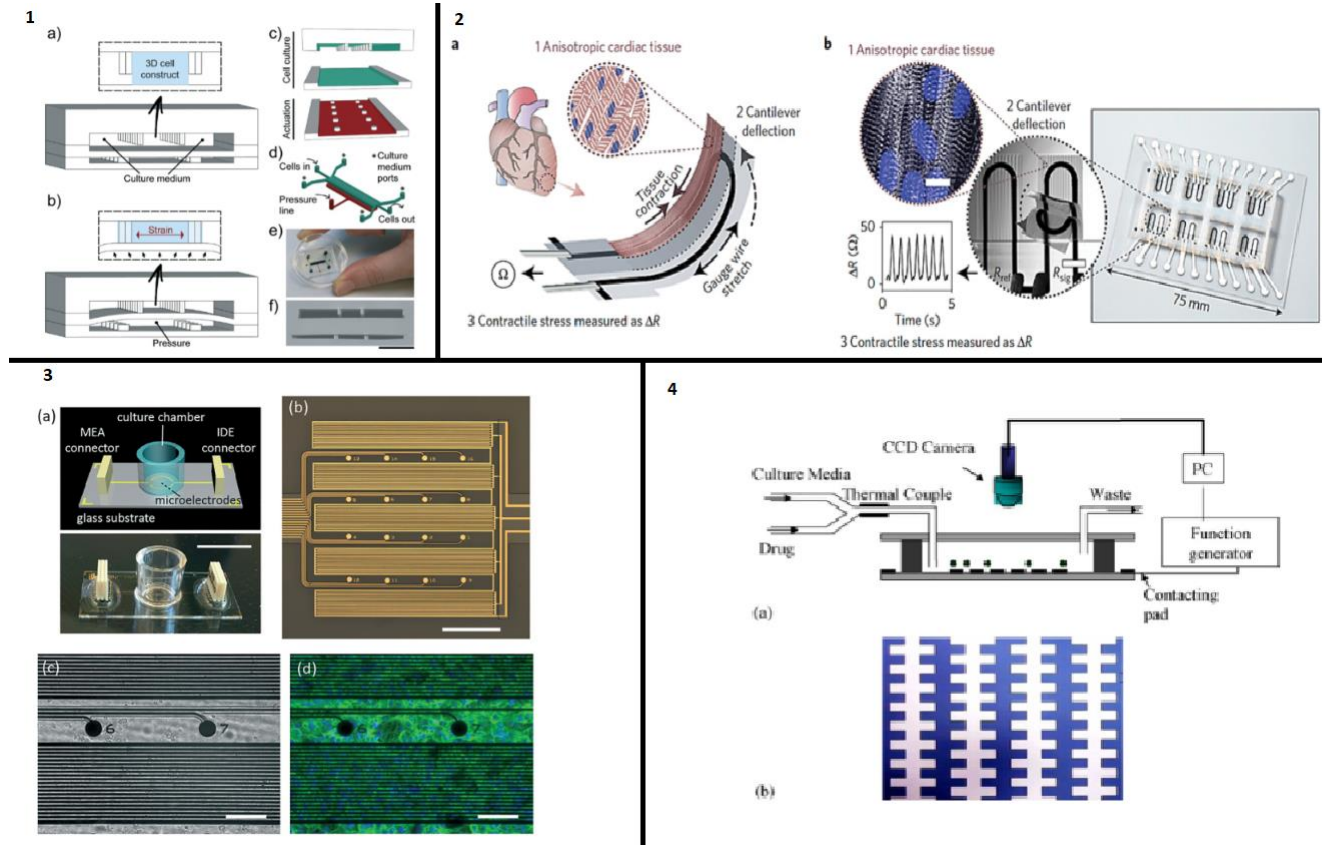
Marsano et. al lähestymistapa mekaanisesti stimuloitusta sydänmallista (Marsano ym. 2016) perustui kardiomyosyyttien suspensoimisesta geeliin, johon kohdistettiin syklistä painetta levyn puristaessa geeliä (kuva 6, kohta 1). Paine levitti geeliä ympäröiviä tolppia vasten, jolloin geeli työntyi tolppien väliin venyttäen yhdensuuntaisesti sisällään olevia kardiomyosyytteja. Käsittelyn jälkeen kardiomyosyytit osoittivat spontaania sykkimistä ja parantunutta supistusvastetta sähköiseen ärsykeeseen.

Bioprinttaus on toinen vaihtoehto sydänmallin rakentamiseen ja J. U. Lind työryhmineen (Lind ym. 2017) käytti menetelmää nelikerroksisen taipuvaisen levyn rakentamiseen. Malli koostui pohjakerroksesta, musteella printatusta lankamaisesta sensorista, mikrouritetusta kerroksesta ja päällimmäisestä kardiomyosyyttikerroksesta (kuva 6, kohta 2). Uritettu kerros ohjasi kardiomyosyyttien anisotrooppista eli samansuuntaista järjestäytymistä ja lihassolujen supistuminen taivutti levyä aiheuttaen mitattavan resistanssin muutoksen sensorin taipuessa. hiPSC-kardiomyosyyttien (hiPSC-CM) stimulointi mallissa lisäsi huomattavasti solujen supistumisen voimakkuutta ja lisäsi sekä sarkomeerien eli lihaksen toiminnallisten yksiköiden, että myofibrillien eli lihassäikeiden muodostumista.

Elektrofysiologisissa malleissa solujen järjestäytymistä ja erilaistumista parannetaan malliin asennetuilla mikroelektrodeilla ja malleilla tutkitaan toiminnan ja fenotyypin lisäksi kardiomyosyyttien elektrofysiologista toimintaa esimerkiksi mittaamalla solujen ulkopuolista kenttäpotentiaalia kardiomyosyytin supistumisen aikana. (Kitsara ym. 2019)

F. Qian rakensi ryhmänsä kanssa lasiselle mikrolevylle mikrosirun (Qian ym. 2017), jossa sähköimpulsseilla ohjattiin hiPSC-CM järjestäytymistä ja kypsymistä vahvemman supistusvoiman ja koon saavuttamiseksi (kuva 6, kohta 3). Yksisolukerroksena kasvatettujen hiPSC-CM:n alettua sykkimään spontaanisti, sen sykkimistä mitattiin muutoksessa kudoksen bioimpedanssissa, joka aiheutui solun morfologian muuttuessa supistuksen aikana ja aktiopotentiaalien aiheuttamana kenttäpotentiaalina. Toinen vaihtoehto on käyttää dielektriforeesia perfluusiokammiossa (kuva 6, kohta 4),

jota hyödyntämällä M. Yangin ja X. Zhangin työryhmä (Yang ja Zhang 2007) ohjasi kardiomyosyytien järjestäytymistä muuttamalla malliin johdetun jännitteen frekvenssiä sekä mediumin johtavuutta. Tuloksena kardiomyosyytit saatiin kontrolloidusti asettumaan pitkittäin kudospaiseksi rakenteeksi mikroelektrodien väliin sähkökentän mukaisesti.



Kuva 6. Sydänmalleja mikrosirulla. 1: (Marsano ym. 2016), 2: (Lind ym. 2017) 3: (Qian ym. 2017) 4: (Yang ja Zhang 2007).

4.2 Verisuonimallit

Verisuonten mallintaminen on tärkeä työkalu selvittäessä verisuonten toimintaa ja miten se muuttuu erilaisissa tautikuvissa, mutaatioissa ja lääkkeiden vaikutuksen alaisena. OAC sopii tähän mallintamiseen koska OAC:llä pystytään luomaan verisuonille tarvittavat ympäristökijät. OAC:illa verisuonille pystytään rakentamaan ideaalin ympäristön, jossa pintojen muodot tukevat solujen kypsymistä ja mikrofluidisesti voidaan tuottaa verisuonien tarvitsemat hemodynaamiset voimat. Verisuonimalleilla on tutkittu muun muassa angiogeneesiä, lääkeaineiden vaikutuksia ja verisuonten seinämien permeabiliteettia.

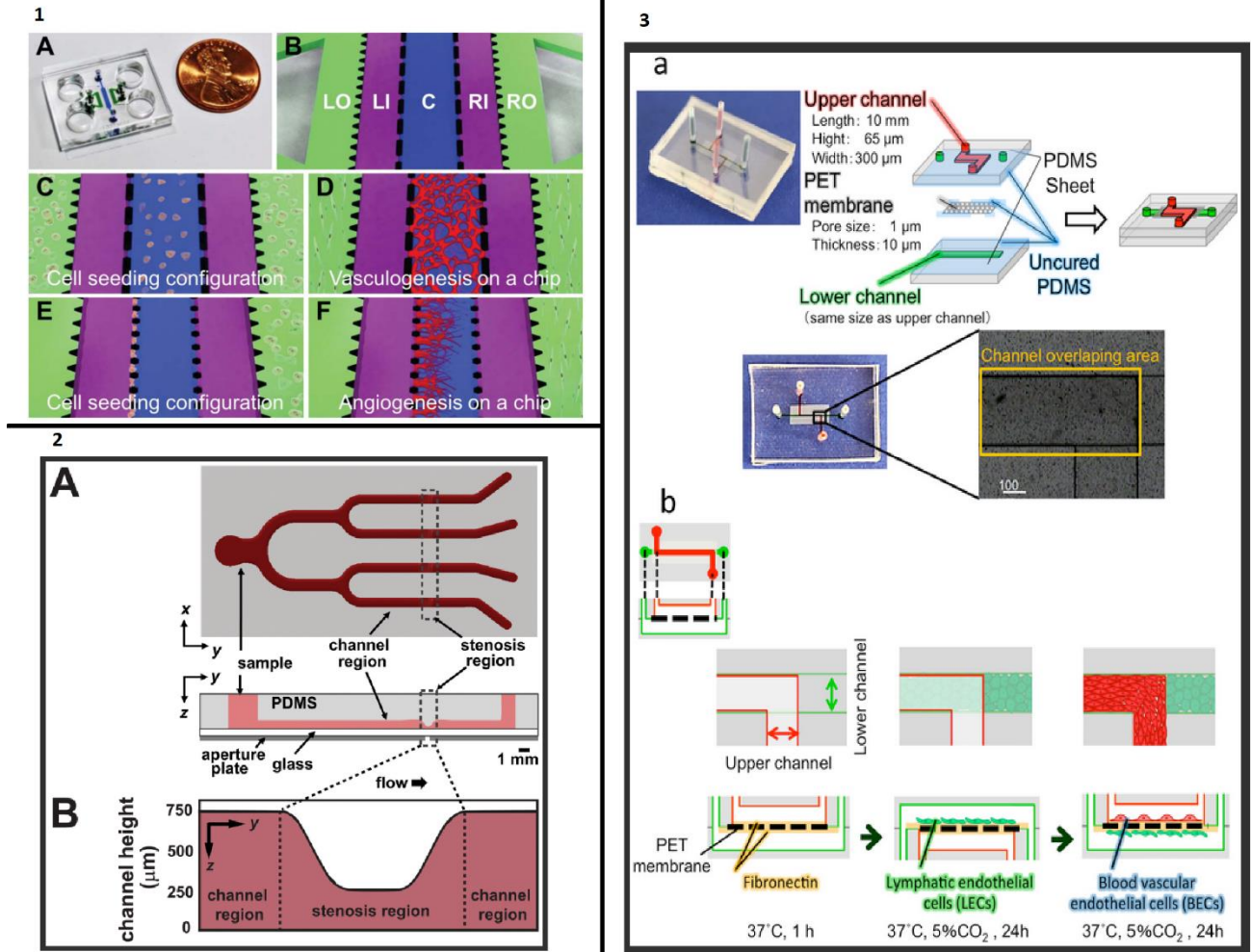
Verisuonten mallintamisessa tärkeitä tekijöitä, jota ottaa huomioon ovat muun muassa ECM koostumus, verisuonen seinämän ulkoisen ja sisäisen paine-eron aiheuttama voima, veren virtauksen aiheuttama voima ja venytysvoima. Verisuonen rakenne vaihtelee riippuen siitä, onko kyseessä

valtimo, laskimo vai hiussuoni ja kuinka paksu seinämän täytyy olla erilaisia voimia kestääkseen. Näiden hemodynaamisten voimien olemassaoloa *in vitro* verisuonissa pyritään mallintamaan mikrosirulla mikrofluidiikalla. (Ribas ym. 2016) Verisuonen solut reagoivat mekaaniseen rasitukseen asettumalla virtauksen tai rasituksen suuntaisesti ja tätä ilmiötä voidaan tehostaa alustalla, jossa on uria mekaanisen voiman suuntaisesti. Tämä myös vaikuttaa minkälaisiksi solutyypeiksi kantasolut erilaistuvat, tehostaen esimerkiksi verisuonen solutyypeiksi muuntumista. (Diop ja Li 2011)

K. Sudong ym. valmistivat PDMS:lle mikrofluidisen verisuonimallin (Kim ym. 2013) vaskulogeneesin ja angiogeneesin tutkintaan 3D fibriinimatriisiympäristössä (kuva 7, kohta 1). Ihmisen napalaskimon endoteelisoluja (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) ja keuhkojen fibroblasteja altistettiin perfluusiolle ja mitattiin kasvavien verisuonten peittämää aluetta, verisuoniulokkeiden pituutta ja joidenkin aineiden kuten typpioksidin (NO) ja F-aktiinin pitoisuuksien muutosten virtauksessa ja staattisessa tilassa. Malli havaittiin toimivaksi ja verisuonet levittyivät perfusioiviksi verkostoiksi virtauksen parantaessa NO:n ja F-aktiinin määrää ja muokaten endoteelisolujen tukirakkaa. Endoteelisoluilla testattiin myös perisytytien ja syöpäsolujen vaikutusta solujen toimintaan ja angiogeneesiin.

Tutkiessaan verisuonten tukkeutumista M. Li ym. valmistivat PDMS:stä haarautuvan mikrofluidisen verisuonimallin (Li ym. 2014), joka kiinnitettiin lasille kiinnittymistä edistävän plasman avulla (kuva 7, kohta 2). Mallin verisuonikanavat päällystettiin fibrillimäisellä kollageenilla verihiutaleiden tarttumiseksi ja kanaviin tehtiin paikallisia kavennuksia, johon verihiutaleet alkoivat kasaantua tukokseksi. Mallin samankaltaisuus verrattaessa *in vivo* verisuoniin poikkesi rakenteeltaan ja ympäristöltään, mutta mallilla onnistuttiin testaamaan eri lääkeaineiden vaikutusta tukosten liuottamisessa.

M. Sato ym. valmisti verisuonimallin veri- ja imusuonten läpäisykyvyn tutkimiseksi (Sato ym. 2015). Malli valmistettiin kaksikerroksisesta PDMS:stä, jossa kummassakin kerroksessa oli oma kanavansa (kuva 7, kohta 3). Kanavat kulkivat päällekkäin osan matkasta välissään huokoinen membraani. Ylempään kanavaan viljeltiin verisuonten endoteelisoluja ja alempaan imusuonten endoteelisoluja. Ylempään kanavaan aiheutettiin virtausta, jonka havaittiin lisäävän endoteelisolujen välisiä liitoksia ja täten vähentävän läpäisevyyttä. Läpäisyn määrää testattiin kahdella eri aineella ja miten eri lääkeaineet vaikuttavat tähän läpäisyyn todentaen mallin käyttökelpoisuuden verisuonimallinnuksessa.



Kuva 7. Verisuonimalleja mikrosirulla. 1: (Kim ym. 2013), 2: (Li ym. 2014), 3: (Sato ym. 2015).

5. SYDÄN JA VERISUONET YHDISTETYSSÄ CHIPISSÄ

Sydämen ja verisuonten mallintamisesta saadaan tarkkaa tietoa näiden toiminnasta, mutta varsinkin sydämen kohdalla tarvitaan molempia kudostyyppisiä translationaalisemman mallin aikaansaamiseksi. Seuraava askel sydämen ja verisuonten mallinnuksesta onkin yhdistää molemmat mallit toimivaksi kokonaisuudeksi.

Sydämen ja verisuonten yhteismallia valmistaessa on hyvä ottaa huomioon neljä osa-aluetta biometiikan saavuttamiseksi: monisoluisuus ja solujen interaktiot, mekanotransmissio, hemodynaamiikka ja järjestäytyminen. Kuten sydämessä niin myös *in vitro* malleissa mikrovaskulaaristen endoteelisolujen (microvascular endothelial cells, MVEC) ja CM täytyy olla lähekkäin ja tiiviisti 3D ympäristössä vuorovaikutuksen aikaansaamiseksi. Ympäristöllä on myös merkitystä mekanotransmission kannalta sillä sen materiaalin täytyy sallia solujen ja kudosten järjestäytymiset ja mekaanisten voimien leviäminen. Hemodynaamikaltaan malleissa täytyy olla osana järjestelmä, joka tuottaa malliin veren kulkua imitoivan virtauksen, jotta endoteelisolut saisivat tarvitsemiaan mekaanisia ärsykeitä. Virtauksen mahdollistamiseksi mallin läpi ja mekaanisten voimien kuten supistusten oikean toiminnan aikaansaamiseksi täytyy mallin solut saada oikeaan järjestykseen. Endoteelisolujen täytyy muodostaa eheä putkisto kardiomyosyyttien läpi, jossa metaboliset aineet tai muut tutkittavat aineet pääsevät kulkemaan. Kardiomyosyyttien täytyy olla järjestyneinä samansuuntaisesti viereisiin kardiomyosyytteihin nähden ja päät vastakkain edessä ja takana olevan solun kanssa supistusten ja aktiopotentiaalien kulun toimimiseksi. (King, Sunyovszki, ja Terracciano 2021)

Toimivaa sydämen ja verisuonituksen yhdistelmämallia on lähdetty tavoittelemaan mm. bioprintauksella, mikrofluidiikalla ja staattisilla yhteisviljelyillä. Lähestymistavoilla on omat puolensa, mutta myös useita samankaltaisia ominaisuuksia, esimerkiksi useamman solutyyppin käyttäminen; yleensä kardiomyosyyttien ja endoteelisolujen. Eroina tavoilla on esimerkiksi, onko mallissa käytetty perfuusiota, miten malli kasataan ja minkälaista dataa saadaan. (Kitsara ym. 2019)

5.1 Staattiset yhteisviljelmät

Staattisissa yhteisviljelmissä sydämen ja verisuonten soluja viljellään yhdessä, mutta mallissa ei ole perfuusiota. Perfuusion ollessa olennainen osa verisuonten *in vivo* ympäristöä (Satish ja Tadi 2023) Staattisen mallin kasvu ympäristö ei välttämättä ole riittävä solujen oikeanlaisen kypsymisen ja toiminnan saavuttamiseksi. Lisäksi kasvatusmediumin manuaalinen vaihtaminen ravinteiden ja aineenvaihdunnan ylläpitämiseksi lisää työtaakkaa. Malli on kuitenkin teknisesti yksinkertainen valmistaa sillä kasvatusalustaksi riittää kasvatusmalja tai mikrosiru, jonka pintaa voidaan muotoilla

solujen järjestäytymisen ohjaukseksi. Mallissa sydämen solut ja verisuonten solut voidaan kasvatua kasvatusalustalla päällekkäin kerroksiksi tai sekoittaa keskenään ja seurata solujen toimintaa sekä kudoksien kehitystä (Garzoni ym. 2009). Mallin yksinkertaisen rakenteen vuoksi solujen toiminnan tutkiminen kuvantamalla ja mikroskopoimalla on mahdollista. Erilaisten värjäysten avulla kuvantamisella voidaan seurata esimerkiksi solujen vuorovaikutusta, lääkeaineiden vaikutusta, metaboliikkaa, geenien ilmentymistä tai solumorfologiaa (King, Sunyovszki, ja Terracciano 2021).

5.2 Mikrofluidiset mallit

Mikrofluidiset mallit hyödyntävät perfuusiota ravinteiden kuljetukseen soluille ja virtauksen mekaanisen rasituksen tuottamiseen. Tämä luo soluille luonnollisemmat elinolosuhteet, mutta nestejärjestelmän sisältäminen malliin tuo haasteita kasaamiseen. Hallittavat nestemäärät ovat pieniä ja niiden kuljetusreittien valmistaminen siruille on pikkutarkkaa. Kasaamisen hankaluudesta huolimatta siirtyminen kasvatusmaljoilta muokattaville mikrofluidisille siruille tuo paljon mahdollisuuksia erilaisten mallien valmistamiseen, sillä mallin muodot ja nesteiden virtausreitit ovat täysin tutkijan päätettävissä. Mikrofluidisten mallien hyvänä puolena on myös se, että nestemäärien ollessa pieniä tarvittava solumäärä on myös pieni. Tämä vähentää solujen kasvatuksen työtaakkaa, mutta samalla mallien soveltuminen suuremmille volyymeille on haastavaa. Pienien solumäärien vuoksi kuvantamiseen perustavat tutkimusmahdollisuudet ovat samoja kuin staattisissa yhteisviljelyissä, mutta perfuusio mahdollistaa virtauksen aiheuttamien vaikutusten tutkimisen. Tutkimusten suorittaminen sirulla myös mahdollistaa erilaisten antureiden asentamisen alustaan ja niiden mittaaman datan tutkimisen. (Whitesides 2006)

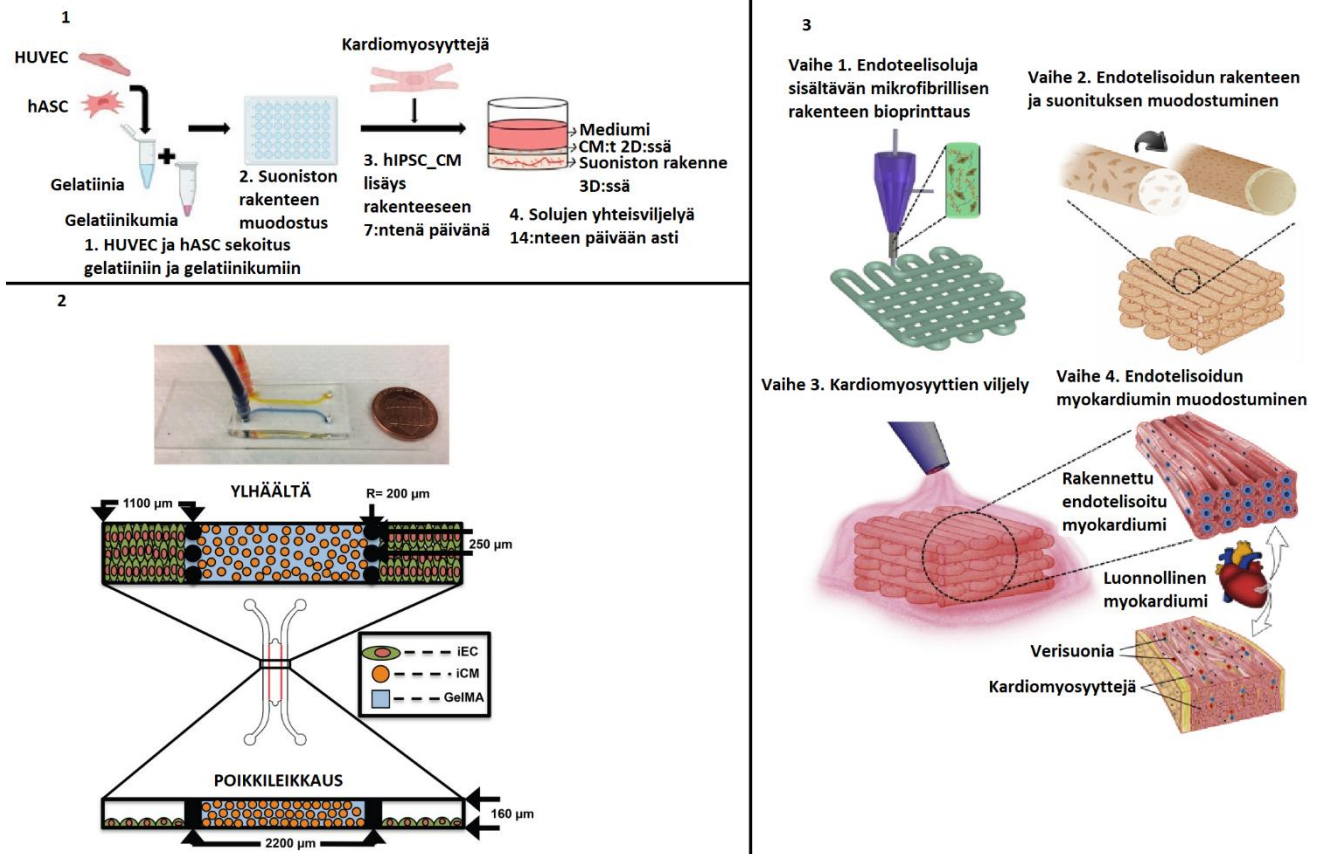
B. W. Ellis ym. suunnittelemassa mallissa (Ellis ym. 2017) hiPSC:stä erilaistettiin endoteelisoluja ja kardiomyosyyttejä, jotka yhdistettiin mikrofluidisessa mallissa kolmeen vierekkäin kulkevaan kammioon. Keskimäiseen kammioon istutettiin kardiomyosyyttejä ja hieman endoteelisoluja ja reunimmaisiiin kammioihin vain endoteelisoluja (kuva 8, kohta 2). Kammiot erotettiin toisistaan pylvällä, joiden välistä kudokset pääsivät vuorovaikuttamaan toisiinsa. Mallin läpi kulkeva virtaus sai endoteelisolut järjestäytymään suurilta osin virtauksen suuntaisesti ja endoteelit muodostivat putkimaisia verkostoja kardiomyosyyttien sekaan samantapaisesti kuin *in vivo* sydämessäkin. Malli soveltuu sydänkudoksen fysiologiseen, toksikologiseen ja geenimanipuloituun tutkintaan.

5.3 Bioprintatut mallit

Bioprintattujen mallien vahvuus on solumassan kasaamisessa haluttuun rakenteeseen. Bioprintauksessa soluista ja biomateriaaleista voidaan biomusteeseen sekoitettuna tulostaa tarkasti määritettyjä 2D tai 3D kudostarkenteita ja ympäristöjä. Vapaasta muotoilusta huolimatta haasteita bioprintauksessa tuottaa sydämen pienimmät verisuonet, joita voi olla vaikea printata tarkasti. Vas-

tapainona tarkan kasaamisen haasteelle on, että tehtävä automatisoidaan koneelle, jolloin vähennetään inhimillisten virheiden mahdollisuutta. 3D bioprinttauksen ohjelmoiminen vaatii silti teknistä osaamista ja soluille täytyy löytää ideaalit tulostusolosuhteet kuten lämpötila ja mikä biomuste sopii solutyypille. Lisäksi itse biotulostin on hintava laite, mutta riittävällä osaamisella 3D bioprinttauksella avautuvat mahdollisuudet verisuonitetun sydämen mallien valmistuksessa tekevät bioprinttauksesta erittäin potentiaalisen mallien rakennusmenetelmän. Tarkasti valmistettuja biomimeettisiä rakenteita sydämestä voidaan käyttää useissa OAC mallinnustutkimuksissa, mutta erityisesti biotulostetut mallit sopivat tutkimukseen, jossa selvitetään solujen toimintaa erilaisissa ympäristöissä ja rakenteissa ja mitkä rakenteet imitoisivat parhaiten *in vivo* sydänkudosta. (Kitsara ym. 2019)

Y. S. Zhang ym. kehittivät 3D bioprinttausmenetelmällä valmistetun mikrofluidisen mallin (Zhang ym. 2016), jossa yhdistettiin endoteelisoluja ja kardiomyosyyttejä. Menetelmässä HUVEC printattiin mikrofibrillieinä kerrokselliseksi ristikoksi (kuva 8, kohta 3). Endoteelisolut liikkuvat fibrillien ulkoreunoille muodostaen ontton verisuonen. Rotan ja ihmisen kardiomyosyyttejä annosteltiin eri kokeissa ristikon päälle ja inkuboitiin tarttumisen aikaansaamiseksi. Mallia kasvatettiin bioreaktoriin ja siihen kohdistettiin perfuusiota virtauksen aiheuttamien elintärkeiden voimien aikaansaamiseksi sekä ravinteiden ja hapen toimittamiseksi. Kasvatuksen aikana kardiomyosyytit alkoivat sykkimään itsenäisesti ja mallia voitiin käyttää lääkeaineiden testauksessa.



Kuva 8. Malleja sydämen ja verisuonten yhdistämisestä. 1: (muokattu lähteestä Koskimäki 2022), 2: (muokattu lähteestä Ellis ym. 2017), 3: (muokattu lähteestä Zhang ym. 2016).

Taulukko 1 Yhteenveto sydämen ja verisuonen yhdistävistä malleista

Tyyppi	Yleiskuvaus	Tutkimuskohteet	Vahvuudet	Heikkoudet
Staatinen yhteisviljely	Eri solutyyppejä kasvatetaan yhteisessä staattisessa ympäristössä	Solujen vuorovaikutuksia Solujen selviytymistä Toksikologiaa Solujen morfologiaa	Solutyypit pääsevät vaikuttamaan toisiinsa Yksinkertainen toteutus	Ei verisuonen endoteelille tärkeitä virtausvaikutuksia Solut eivät maturoidu ärsykkeiden puutteessa Mediumin vaihto lisää työmäärää
Mikrofluidiikka	Soluviljelmään on asennettu pienikokoinen nestevirtaussysteemi	Virtauksen vaikutuksia solujen ja kudosten käyttäytymiseen	Mahdollistaa veren virtauksen mekaaniset vaikutukset Mahdollistaa ravinteiden ja hapen	Nestesysteemin valmistuksen tuomat tekniset vaikeudet

			kuljetuksen kudoksiin	Suuria volyymejä vaikea valmistaa
Bioprinttaus	Soluja ja biomateriaaleja 3D printataan biomusteseen sekoitettuna halutuiksi rakenteiksi	Erialaisten rakenteiden ja ympäristöjen vaikutukset kudoksen ja solujen toimintaan Printattuja biomi-meettisiä rakenteita käytetään useissa tutkimuksissa	Kudoksen rakenteet, ympäristö ja viljelmän muoto voidaan määritellä tarkasti Automatisointi ja inhimillisten virheiden vähentyminen	Printtauslaitteiston hinta ja käytön vaikeus Pienimpiä rakenteita vaikeaa printata tarkasti Materiaalien ominaisuuksien valinta printattavuuden ja kudoksen toiminnallisuuden kannalta

Sydämen ja verisuonten yhteismallinnuksessa täytyy ottaa huomioon monia asioita kuten solutyyp-
pien välinen vuorovaikutus, mekanotransmissio, hemodynamiikka ja järjestäytyminen (King, Suny-
ovszki, ja Terracciano 2021). Nämä seikat mielessä on lähdetty etsimään toimivaa mallia muun
muassa staattisilla yhteisviljelyillä, mikrofluidiikalla ja 3D bioprinttauksella. Kullakin lähestymistä-
valla on omat ominaisuutensa (taulukko 1) ja eroavaisuutensa, mutta yhdistettynä ne luovat moni-
puolisen sydän-verisuonimallin. Monissa sydämen ja verisuonten OAC yhteismallissa on käytetty
useampaa näistä tavoista ja malleilla on pystytty tutkimaan rakenteita, morfologiaa, toksisuutta,
vuorovaikutuksia ja ympäristön vaikutuksia (Kitsara ym. 2019).

5.4 Mitä haasteita löytyy

OAC mallit, jossa yhdistetään sydän ja verisuonet ovat edistyksellisiä teknologian sovelluksia,
mutta tekniikassa on vielä joitakin haasteita. Kuten on aiemmin tekstissä tuotu ilmi, on olemassa
useita eri ratkaisuja sydämen ja verisuonten yhteismallille. Tämä johtuu siitä, ettei ole vielä löytynyt
yhtä parasta ratkaisua, joka sopisi kaikille, vaan jokainen taho rakentaa mallinsa omien resurssien,
haasteidensa ja tutkimustavoitteidensa rajoittavien valintojen mukaan. (Ribas ym. 2016) (Ingber
2022)

Malleissa yleensä joudutaan valitsemaan, halutaanko mallista mahdollisimman biomimeettistä vai
helposti valmistettavaa ja tutkittavaa. Biomimetikkaa tavoitellessa kudoksen paksuus ja moniker-

roksisuus kasvaa monien solutyypin lisäämisessä. Jokaisen solutyypin tai kudoksetyypin lisääminen vaatii oman aikansa, työvaiheensa ja uusia ympäristötekijöitä hidastaen lopullisen mallin valmistumista, lisäten hintaa ja monimutkaista teknisiä vaatimuksia. Samalla mallin eri ominaisuuksien tutkiminen vaikeutuu esimerkiksi monikerroksisuuden estäessä joidenkin sisäisten ominaisuuksien kuvaamisen. Tällöin kuitenkin saavutetaan todennäköisempiä tutkimustuloksia kuin yksinkertaisemmissa malleissa. Tavoiteltaessa helppoa valmistettavuutta ja tutkittavuutta mallit voivat olla pienempiä ja yksinkertaisempia mahdollistaen nopeat valmistukset halvalla ja erilaiset tutkimusmenetelmät. Vaikka yksinkertaisemmilla malleilla suoritettaisiin suuria määriä tutkimuksia, joudutaan silti miettimään voiko tuloksilla perustella uuden hoitomuodon tai lääkkeen käyttöönoton, koska malli ei täysin vastaa *in vivo* kudoksia ja näiden reaktiot voivat olla erilaisia kuin *in vitro* kokeissa. (Ribas ym. 2016)

Vaikka jotkin mallit ovatkin nopeampia valmistaa kuin toiset, niin moni malli edellyttää ajanjaksoa solujen kasvamiselle, erilaistumiselle ja toiminnallisuuden aikaansaamiselle ennen kuin mallia pystyy käyttämään lääkkeiden, hoitomuotojen tai fysiologioiden tutkimisessa. Tällaista ajanjaksoa tarvitaan varsinkin iPS solujen käytössä ja niiden käytössä on myös suurempi riski teratoomien muodostumiseen ja dedifferoitumiseen verrattaessa primäärisolujen tai aikuisen kantasolujen käyttämiseen. Pluripotenttien kantasolujen induktio voi myös aiheuttaa ei-toivottua geneettistä aktivoitumista, joka vaikuttaa harhaanjohtaviin tuloksiin mallissa, ellei muutosta huomata. (Batalov ja Feinberg 2015)

Muita haasteita sydämen ja verisuonten mallinnuksessa on muun muassa oikeanlaisen ympäristön luominen solutyypin erikoistumisen ja toiminnallisuuden aikaansaamiseksi sekä ylläpitämiseksi (Ribas ym. 2016) Lisäksi, mallintamisen eettisyys embryonaalisia kantasoluja käytettäessä ja paljonko solut vuorovaikuttavat *in vivo* ympäristöstä poikkeavan sirun pintamateriaalin kanssa on otettava huomioon OAC malleja suunniteltaessa (Ribas ym. 2016).

Sydämen ja verisuonten yhdistävälle OAC mallille ei siis vielä löydy yhtä ainoaa oikeaa ratkaisua erilaisten valintojen ja haasteiden vaihdellessa. Valinnat voivat liittyä mallin biomimeettisyyden ja yksinkertaisuuden väliseen valintaan tai valmistustahon resurssien rajoitukseen. Haasteina malleilla on ollut solujen kasvatukseen ja kypsymiseen kuluva aika sekä solujen toiminnallisuuden ylläpidon hallinta eri ympäristötekijöiden oikealla valinnalla.

6. YHTEENVETO

Sydän- ja verisuonisairauksien määrä on suuri maailmassa ja niihin liittyvän tiedon puute luo kysyntää keinolle, millä voidaan mallintaa sydämen toimintaa. Organ-on-a-chip menetelmällä pystytään turvallisesti tutkimaan miten sydän ja sen verisuonet toimivat yhdessä ja miten tämä toiminta muuttuu taudeissa tai lääkkeiden vaikutuksesta. Sydämen ja verisuonten yhdistäminen mikrosirulla edellyttää solujen vuorovaikutusta, nestevirtausta, aineenvaihduntaa, erilaisia kasvutekijöitä ja ärsykyttä solujen kypsymiseksi toimivaksi kudokseksi. Näiden tekijöiden yhteisvaikutuksesta syntyvä monimutkainen *in vitro* kokonaisuus tekee hankalaksi valmistaa täydellistä verisuonitettua heart-on-a-chip mallia, mutta jokainen valmistettu malli ja siitä saatu tieto vie tekniikkaa lähemmäksi tätä tavoitetta.

Yhteisviljelyt, mikrofluidiset mallit ja 3D bioprintatut mallit tuovat yksinkin käytettäviä tuloksia solujen toiminnasta, vuorovaikutuksista tai geenien ilmentämisestä, mutta niillä jokaisella tavalla on omat hankaluutensa. Yhteisviljelyt ovat liian yksinkertaisia mallintaakseen monimutkaista *in vivo* sydäntä täydellisesti, mikrofluidiset mallit saattavat keskittyä nesteiden kulun vaikutuksiin sivuuttaen rakenteen tärkeyden ja 3D printatut mallit vaativat teknistä osaamista sekä tarkkaa materiaalien ja ympäristön valintaa. Malli, jossa lähestymistapoja yhdistetään, voisi ratkaista osan ongelmista ja saada aikaan realistisimmat tulokset. Yhdistämällä 3D printtausta tarkan rakenteen luomiseksi, yhteisviljelyä solutyypin interaktion luomiseksi ja mikrofluidiikkaa aineenvaihdunnan sekä virtauksen aikaansaamiseksi saadaan aikaan monia ratkaisuja tarjoava malli, jolla on potentiaalia olla yleispätevä heart-on-chip verisuonineen yleisessä käytössä. Näin tehtyä biomimeettistä mallia voitaisiin käyttää sydämen eri ongelmien tutkintaan ja ratkaisun etsimiseen sekä kudosten koon kasvaessa tekniikalla voitaisiin valmistaa kudossiirteitä tai mahdollisesti kokonaisia sydämiä.

7. LÄHTEET

- "Abstract 16287: Fatty Acid-Based Medium Promoted Metabolic Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes". 2023. 9. huhtikuuta 2023. <https://oce-ovid-com.libproxy.tuni.fi/article/00003017-201811061-03122/HTML>.
- Ahmadi, Mahdi, ja Jafar Rezaie. 2020. "Tumor Cells Derived-exosomes as Angiogenic Agents: possible therapeutic implications". *Journal of Translational Medicine*, kesäkuuta. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02426-5>.
- Bai, Xiaowen. 2020. "Stem Cell-Based Disease Modeling and Cell Therapy". *Cells* 9 (10): 2193. <https://doi.org/10.3390/cells9102193>.
- Batalov, Ivan, ja Adam W Feinberg. 2015. "Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture". *Biomarker Insights* 10 (Suppl 1): 71–76. <https://doi.org/10.4137/BMI.S20050>.
- Brutsaert, Dirk L. 2003. "Cardiac Endothelial-Myocardial Signaling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity". *Physiological Reviews* 83 (1): 59–115. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2002>.
- Curtis, Matthew W., ja Brenda Russell. 2009. "Cardiac Tissue Engineering". *The Journal of cardiovascular nursing* 24 (2): 87–92. <https://doi.org/10.1097/01.JCN.0000343562.06614.49>.
- Diop, Rokhaya, ja Song Li. 2011. "Effects of Hemodynamic Forces on the Vascular Differentiation of Stem Cells: Implications for Vascular Graft Engineering". Teoksessa *Biophysical Regulation of Vascular Differentiation and Assembly*, toimittanut Sharon Gerecht, 227–44. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7835-6_10.
- Ellis, Bradley W., Aylin Acun, U. Isik Can, ja Pinar Zorlutuna. 2017. "Human iPSC-derived myocardium-on-chip with capillary-like flow for personalized medicine". *Biomicrofluidics* 11 (2): 024105. <https://doi.org/10.1063/1.4978468>.
- Feyen, Dries A. M., Wesley L. McKeithan, Arne A. N. Bruyneel, Sean Spiering, Larissa Hörmann, Bärbel Ulmer, Hui Zhang, ym. 2020. "Metabolic Maturation Media Improve Physiological Function of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes". *Cell Reports* 32 (3): 107925. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107925>.
- Garzoni, Luciana R., Maria Isabel D. Rossi, Ana P. D. N. de Barros, Virgínia Guarani, Michelle Keramidas, Luciene B. L. Balottin, Daniel Adesse, ym. 2009. "Dissecting Coronary Angiogenesis: 3D Co-Culture of Cardiomyocytes with Endothelial or Mesenchymal Cells". *Experimental Cell Research* 315 (19): 3406–18. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.09.016>.
- Humagain, Sushil. 2017. "Blood Vessels (Types, Structure and Functions)". *Online Science Notes* (blog). 27. heinäkuuta 2017. <https://onlinesciencenotes.com/blood-vessels/>.
- Ingber, Donald E. 2022. "Human Organs-on-Chips for Disease Modelling, Drug Development and Personalized Medicine". *Nature Reviews Genetics* 23 (8): 467–91. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00466-9>.
- Kennedy, Crystal C., Erin E. Brown, Nadia O. Abutaleb, ja George A. Truskey. 2021. "Development and Application of Endothelial Cells Derived From Pluripotent Stem Cells in Microphysiological Systems Models". *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 8: 625016. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.625016>.
- Kim, Sudong, Hyunjae Lee, Minhwan Chung, ja Noo Li Jeon. 2013. "Engineering of Functional, Perfusable 3D Microvascular Networks on a Chip". *Lab on a Chip* 13 (8): 1489–1500. <https://doi.org/10.1039/c3lc41320a>.
- King, Oisín, Ilona Sunyovszki, ja Cesare M. Terracciano. 2021. "Vascularisation of Pluripotent Stem Cell-Derived Myocardium: Biomechanical Insights for Physiological Relevance in Cardiac Tissue Engineering". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 473 (7): 1117–36. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02557-8>.

- Kitsara, Maria, Dimitrios Kontziampasis, Onnik Agbulut, ja Yong Chen. 2019. "Heart on a Chip: Micro-Nanofabrication and Microfluidics Steering the Future of Cardiac Tissue Engineering". *Microelectronic Engineering* 203–204 (tammikuuta): 44–62. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2018.11.001>.
- Koskimäki, Sanna. 2022. "Maturation and Morphology of Human Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes and Vascular Structures in 3D Cardiovascular Construct: Towards Modelling Myocardial Ischemia". <https://trepo.tuni.fi/handle/10024/139536>.
- Li, Melissa, Nathan A. Hotaling, David N. Ku, ja Craig R. Forest. 2014. "Microfluidic Thrombosis under Multiple Shear Rates and Antiplatelet Therapy Doses". *PLOS ONE* 9 (1): e82493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082493>.
- Lind, Johan U., Travis A. Busbee, Alexander D. Valentine, Francesco S. Pasqualini, Hongyan Yuan, Moran Yadid, Sung-Jin Park, ym. 2017. "Instrumented Cardiac Microphysiological Devices via Multimaterial Three-Dimensional Printing". *Nature Materials* 16 (3): 303–8. <https://doi.org/10.1038/nmat4782>.
- Marsano, Anna, Chiara Conficconi, Marta Lemme, Paola Occhetta, Emanuele Gaudiello, Emiliano Votta, Giulia Cerino, Alberto Redaelli, ja Marco Rasponi. 2016. "Beating Heart on a Chip: A Novel Microfluidic Platform to Generate Functional 3D Cardiac Microtissues". *Lab on a Chip* 16 (3): 599–610. <https://doi.org/10.1039/c5lc01356a>.
- Miller, Lisa M., ja Arnon Gal. 2017. "Chapter 10 - Cardiovascular System and Lymphatic Vessels1". Teoksessa *Pathologic Basis of Veterinary Disease (Sixth Edition)*, toimittanut James F. Zachary, 561-616.e1. Mosby. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00010-2>.
- Oberman, Rob, ja Abhishek Bhardwaj. 2023. "Physiology, Cardiac". Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526089/>.
- Prajapati, Chandra, Marisa Ojala, Henna Lappi, Katriina Aalto-Setälä, ja Mari Pekkanen-Mattila. 2021. "Electrophysiological Evaluation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Obtained by Different Methods". *Stem Cell Research* 51 (maaliskuuta): 102176. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102176>.
- Qian, Fang, Chao Huang, Yi-Dong Lin, Anna N. Ivanovskaya, Thomas J. O'Hara, Ross H. Booth, Cameron J. Creek, ym. 2017. "Simultaneous Electrical Recording of Cardiac Electrophysiology and Contraction on Chip". *Lab on a Chip* 17 (10): 1732–39. <https://doi.org/10.1039/C7LC00210F>.
- Ribas, João, Hossein Sadeghi, Amir Manbachi, Jeroen Leijten, Katelyn Brinegar, Yu Shrike Zhang, Lino Ferreira, ja Ali Khademhosseini. 2016. "Cardiovascular Organ-on-a-Chip Platforms for Drug Discovery and Development". *Applied in Vitro Toxicology* 2 (2): 82–96. <https://doi.org/10.1089/aivt.2016.0002>.
- Satish, Mohan, ja Prasanna Tadi. 2023. "Physiology, Vascular". Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542252/>.
- Sato, Miwa, Naoki Sasaki, Manabu Ato, Satoshi Hirakawa, Kiichi Sato, ja Kae Sato. 2015. "Microcirculation-on-a-Chip: A Microfluidic Platform for Assaying Blood- and Lymphatic-Vessel Permeability". *PLOS ONE* 10 (9): e0137301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137301>.
- Vailhé, Bruno, Daniel Vittet, ja Jean-Jacques Feige. 2001. "In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis". *Laboratory Investigation* 81 (4): 439–52. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780252>.
- Whitesides, George M. 2006. "The Origins and the Future of Microfluidics". *Nature* 442 (7101): 368–73. <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- Wimmer, Reiner A., Alexandra Leopoldi, Martin Aichinger, Dontscho Kerjaschki, ja Josef M. Penninger. 2019. "Generation of Blood Vessel Organoids from Human Pluripotent Stem Cells". *Nature Protocols* 14 (11): 3082–3100. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0213-z>.
- Yang, Mo, ja Xin Zhang. 2007. "Electrical Assisted Patterning of Cardiac Myocytes with Controlled Macroscopic Anisotropy Using a Microfluidic Dielectrophoresis Chip". *Sensors and Actuators A: Physical*, Special Issue of The Micromechanics section of Sensors and Actuators (SAMM, based on contributions revised from the Technical Digest of the IEEE 19th International conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2006), 135 (1): 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2006.06.071>.

- Zhang, Yu Shrike, Andrea Arneri, Simone Bersini, Su-Ryon Shin, Kai Zhu, Zahra Goli-Malekabadi, Julio Aleman, ym. 2016. "Bioprinting 3D Microfibrous Scaffolds for Engineering Endothelialized Myocardium and Heart-on-a-Chip". *Biomaterials* 110 (joulukuuta): 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.003>.
- Zhu, Yike, Vinh Dang Do, A. Mark Richards, ja Roger Foo. 2021. "What We Know about Cardiomyocyte Dedifferentiation". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 152 (maaliskuuta): 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.11.016>.