

Antti Nurminen

SYDÄNLIHAKSEN ISKEMIA- REPERFUUSIOVAURION MALLINTAMINEN

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatin tutkielma
Huhtikuu 2020

TIIVISTELMÄ

Antti Nurminen: Sydänlihaksen iskemia-reperfuusiovaurion mallintaminen
Kandidaatin tutkielma
Tampereen yliopisto
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Huhtikuu 2020

Sepelvaltimotauti on valtimonkovettumatauti eli ateroskleroottinen sairaus ja merkittävä kuolinsyy maailmanlaajuisesti. Yleinen sepelvaltimotaudin seuraus on sydäninfarkti verenkierron estytyä sepelvaltimotukoksen takia. Tästä seuraa sydänlihaksen ajautuminen hypoksiseen eli iskeemiseen tilaan, jonka seurauksena sydänlihassoluissa tapahtuu monia metabolisia muutoksia. Iskeemisen tilan pitkittyessä sellulaarisen pH:n aleneminen ja metaboliset muutokset vahingoittavat sydänlihassoluja ja johtavat solukuoleman aktivaatioon. Paras hoitokeino rajoittaa infarktin laajuutta on mahdollisimman pikainen verenkierron palauttaminen eli reperfuusio infarktin tapahtumisen jälkeen. Vaikka reperfuusio on välttämätöntä potilaan pelastamiseksi, se lisää sydänlihaksen vaurioita aiheuttamalla reperfuusiovauriota. Näiden eri vauriomuotojen lopputulosta kutsutaan iskemia-reperfuusiovaurioksi.

Iskemia-reperfuusiovaurion merkittävimmät aiheuttajat ovat reperfuusiossa tapahtuva intrasellulaarisen pH:n nopea palautuminen, oksidatiivisen stressin ja Ca^{2+} -ylimäärän muodostuminen. Nämä prosessit risteävät mitokondrion kohdalla, joka on merkittävä tekijä solukuoleman aktivaatiossa. Vaikka iskemia-reperfuusiovaurion muodostumisesta on kattavasti tietoa, sen estämiseksi ei ole kyetty kehittämään hoitokeinoja. Lukuisat koe-eläin- ja solumalleilla lupaavilta vaikuttaneet hoitokeinot ovat osoittautuneet kliinisissä tutkimuksissa tehottomiksi. Kliinisten tutkimusten epäonnistumisille on etsitty syitä ja pääsiallisina syinä pidetään käytettyjä tautimalleja sekä tutkimusten huonoa suunnittelua. Tautimallit eivät ole huomioineet iskemia-reperfuusiovaurion monimutkaisuutta ja sen todellista kliinistä ilmentymistä.

Tästä johtuen on tarvetta uusille malleille, jotka mallintavat iskemia-reperfuusiovauriota tarkemmin ja huomioivat paremmin siihen vaikuttavat tekijät. Monet uusista solumalleista hyödyntävät ihmisen soluja, mikä mahdollistaa ihmisen iskemia-reperfuusiovaurion tutkimisen. Vaikka uusilla solumalleilla voidaan arvioida hoitojen toimivuutta ihmisen soluissa, on silti tarvetta myös koe-eläinmalleille. Solumallien tulokset on validoitava koe-eläinmalleilla ja lisäksi mallit ovat hyödyllisiä iskemia-reperfuusiovaurion mekanismien selvittämiseen. Uudet mallit, etenkin solumallit, jotka hyödyntävät ihmisen soluja, suovat paremmat mahdollisuudet toimivien hoitojen ja lääkkeiden löytämiseen kuin aiemmat mallit.

Avainsanat: Sydänlihaksen iskemia-reperfuusiovaurio, Oksidatiivinen stressi, Ca^{2+} -ylimäärä, Solukuolema, Tautimallinnus

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintutkielma on kirjoitettu Tampereen yliopiston Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekuntaan keväällä 2020. Työn aihe valikoitui oman mielenkiinnon perusteella ja se löytyi sydänryhmästä.

Haluan kiittää ohjaajaani Disheet Shahia ja sydänryhmän professoria Katriina Aalto-Setälää. Sain heiltä arvokkaita ohjeita ja ehdotuksia työn tekoon. Kiitän myös kandidaattiseminaarin vetäjää Anne Kallioniemeä, jonka neuvot auttoivat tämän urakan aloittamisessa. Kiitokset myös ystäväilleni ja perheelleni, jotka ovat tukeneet minua matkan varrella.

Tampereella, 27.4.2020

Antti Nurminen

Sisällysluettelo

1. JOHDANTO	4
2. REPERFUUSIOVAURIO	5
2.1 Oksidatiivinen stressi	5
2.1.1 NADPH-oksidaasi-systeemi	6
2.1.2 Mitokondrionaalinen oksidaasituotanto	7
2.2 Ca ²⁺ -ylimäärä	7
2.3 Intraselulaarisen pH:n palautuminen ja MPTP	8
2.3.1 MPTP:n molekulaarinen rakenne	8
2.3.2 Reperfuusion indusoima MPTP avautuminen	9
2.4 Soluvaurioiden indusoima solukuolema	10
2.4.1 Apoptoosi	11
2.4.2 Nekroosi	11
3. ISKEMIA-REPERFUUSIOVAURION MALLINTAMINEN	12
3.1 Uusien teknologioiden hyödyntäminen mallintamisessa	13
3.2 Solumallit	14
3.2.1 Metabolisesti kypsytettyjen hiPS-CM-solujen IRI-malli	15
3.2.2 3D-bioreaktori IRI-malli	15
3.2.3 Kudosteknologinen ihmisen sydänlihaskudoksen IRI-malli	16
3.3 Koe-eläinmallit	17
3.3.1 hCPC-solujen vaikutusten arvioiminen hiiren IRI-mallissa	17
3.3.2 IRI Opa1-poistogeenisessä hiirimallissa	18
3.3.3 Seeparakalan toukkien IRI-malli	18
4. JOHTOPÄÄTÖKSET	19
5. LÄHDELUETTELO	20

1. Johdanto

Sepelvaltimotautiin (engl. Ischemic heart disease) kuolee vuosittain enemmän ihmisiä kuin mihinkään muuhun sairauteen aiheuttaen esimerkiksi vuonna 2016 maailmanlaajuisesti arviolta 9 miljoonan (<http://who.int>; 22.4.2020) ja vuonna 2012 Suomessa 11 591 ihmisen kuoleman (<http://thl.fi>; 22.4.2020). Taudin vakavat seuraukset johtuvat yleensä sydänlihaksen iskemia-reperfuusiovauriosta (engl. Ischemia-reperfusion injury, IRI) (Hausenloy ja Yellon 2013). IRI muodostuu tavallisesti sydäninfarktipotilaille, kun ensin sepelvaltimon tukkeuma estää verenkierron sydänlihakseen ja ajaa altistuneen alueen hypoksiseen eli iskeemiseen tilaan (Hausenloy ja Yellon 2013, Wu ym. 2018). Paras hoitokeino sydänlihaksen iskeemisen vaurion rajaamiseen on mahdollisimman aikainen reperfuusio eli verenkierron palauttaminen trombolyyttisellä hoidolla tai koronaariangioplastialla (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Vaikka reperfuusio on välttämätöntä potilaan pelastamiseksi, se aiheuttaa sydänlihaksen reperfuusiovauriota indusoimalla sydänlihassolujen solukuolemaa (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016).

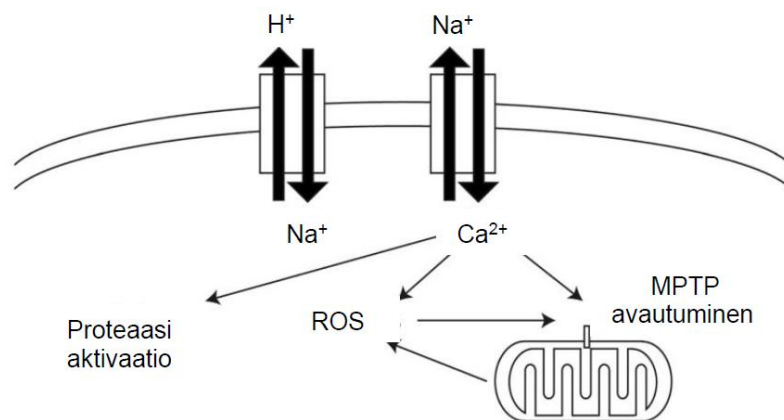
Sydäninfarktissa muodostuva iskemia aiheuttaa hapen ja ravinteiden puutteen, joka johtaa moniin biokemiallisiin ja metabolisiin muutoksiin sydänlihaskudoksessa (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Oksidatiivinen fosforylaatio estyy hapen puutteen vuoksi, josta seuraa mitokondrion membraanin depolarisaatio, ATP-molekyylien ehtyminen ja sydänlihaksen toiminnan heikkeneminen (Hausenloy ja Yellon 2013, Wu ym. 2018). Tilannetta pahentaa mitokondrion ATP-syntaasin käänteinen toiminta, joka alkaa hajottaa ATP-molekyyliä ylläpitääkseen membraanin potentiaalia (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Iskemiassa sellulaarinen energia-aineenvaihdunta alkaa hyödyntää anaerobista glykolyysiä, joka johtaa laktaattipitoisuuden kasvuun soluissa ja siten intrasellulaarisen pH:n alenemiseen (Hausenloy ja Yellon 2013). Sytoplasman happamoitumisen seurauksena natrium-vety-anionivaihtaja aktivoituu, joka pumppaa protoneita soluväliaineeseen ja Na^+ -ioneja soluun (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Samalla ATP-molekyylien ehtyminen estää natrium-kaliumpumpun toiminnan, josta seuraa intrasellulaarinen Na^+ -ylimäärä (Hausenloy ja Yellon 2013, Wu ym. 2018). Lopputuloksena natrium-kalsiumvaihtaja aktivoituu ja intrasellulaarinen Ca^{2+} -ylimäärä alkaa muodostua solun yrittäessä eroon Na^+ -ylimäärästä (Hausenloy ja Yellon 2013, Wu ym. 2018).

Aluksi tässä tutkielmassa esitellään keskeisimmät reperfuusion käynnistämät sellulaariset prosessit, jotka indusoivat solukuolemaa sydänlihaksen IRI:ssä. Tämän jälkeen käsitellään miten aiemmat IRI-mallit ovat onnistuneet ja kuinka uudet teknologiat mahdollistavat paremmat IRI-mallit. Sitten esitellään uusimpia IRI:n solu- ja koe-eläinmalleja, arvioiden samalla niiden hyödyntämisen etuja ja haittoja tutkimuksen kannalta. Vaikka tutkielma keskittyy vain sydänlihassolujen IRI:n olennaisiin

prosesseihin ja sen mallintamiseen, on hyvä huomata, että IRI:n mekanismit ovat samankaltaisia kudoksesta riippumatta (Soares ym. 2019).

2. Reperfuusioaurio

Nykytietämyksen mukaan reperfuusioauriota on olemassa neljää eri muotoa, jotka vaikuttavat soluihin eri tavoin (Hausenloy ja Yellon 2013). Reperfuusion aiheuttamat sydämen rytmihäiriöt ja sydänlihaksen heikentynyt toiminta ovat reperfuusioaurion palautuvia muotoja. Mikrovaskulaarinen tukkeuma ja reperfuusion indusoima sydänlihassolujen solukuolema ovat reperfuusioaurion peruuttamattomia muotoja. Jälkimmäinen reperfuusioaurion muoto on erityisen mielenkiintoinen tutkimuksen kohde, koska sille ei ole tällä hetkellä toimivaa hoitokeinoa ja sen ehkäiseminen voisi arvioiden mukaan vähentää sydämen vaurioita jopa 50 % (Hausenloy ja Yellon 2013). Siksi tämän opinnäytetyön seuraavat osat käsittelevät tämän vauriomuodon keskeisimpiä sellulaarisia prosesseja, jotka lopulta johtavat solukuolemaan ja kudusvaurioon. Kuvassa 1 on havainnollistettu reperfuusion käynnistämiä keskeisimpiä prosesseja, joita käsitellään seuraavissa kappaleissa.



Kuva 1: Reperfuusiossa nopea intrasellulaarisen pH:n palautuminen ja protonien voimakas ulosvirtaus johtavat Ca²⁺ ylimäärään. Verenkierroksen palauttaminen lisää myös solun reaktiivisten happiyhdisteiden (engl. reactive oxygen species, ROS) tuotantoa. Nämä tekijät pahentavat iskemiassa alkanutta tilaa ja johtavat MPTP:n (engl. Mitochondrial permeability transition pore, MPTP) avautumiseen, joka indusoi solukuolemaa (muokattu lähteestä Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b)

2.1 Oksidatiivinen stressi

Sydänlihaksen happipitoisuuden nouseminen reperfuusion alussa johtaa ROS:ien (engl. reactive oxygen species, ROS), kuten superoksidin (O₂⁻) ja vetyperoksidin (H₂O₂), liialliseen tuotantoon (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Tämä johtaa oksidatiivisen stressin muodostumiseen, joka aiheuttaa sytotoksisuutta ja indusoi solukuolemaa (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris

ym. 2016, Wu ym. 2018). Lisäksi iskemiassa vallitsevan anaerobisen metabolian aikana antioksidanttien tuotanto on normaalia alhaisempaa, mikä osaltaan pahentaa muodostuvaa reperfuusiovauriota (Wu ym. 2018). Tässä työssä käsiteltävät merkittävät ROS-lähteet ovat NADPH-oksidaasi-systeemi ja oksidatiivinen fosforylaatio (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Muita merkittäviä ROS-lähteitä IRI:ssä ovat ksantiinioksidaasi-systeemi ja typpioksidisyntaasi-systeemi (Wu ym. 2018).

2.1.1 NADPH-oksidaasi-systeemi

NADPH-oksidaasien fysiologinen tehtävä on tuottaa ROS:eja, joilla on tärkeä rooli solusignaaloinnissa (Cadenas 2018, Wu ym. 2018). IRI:n aikana NADPH-oksidaasien on havaittu tuottavan normaalia enemmän ROS:eja (Cadenas 2018, Wu ym. 2018). Sydämessä ekspressoituvat NADPH-oksidaasit ovat NOX1, 2 ja 4 (Cadenas 2018). Viimeaikaiset tutkimukset ovat raportoineet NOX-entsyymien yliekspressoituvan ja olevan aktiivisempia IRI:ssä (Wu ym. 2018, Zhang ym. 2020). Tämä johtuu IRI:n aikana muodostuvasta positiivisesta takaisinkytkennästä (Wu ym. 2018). Hypoksia saa hypoksian indusoiman tekijän 1A (HIF-1A) aktivoimaan NOX-entsyymeitä ja oksidatiivinen stressi reperfuusiossa lisää HIF-1A:n ekspressiota, jolloin syntyy positiivinen takaisinkytkentä (Wu ym. 2018, Cadenas 2018). Lisäksi reperfuusio saa solut vapauttamaan NADPH-oksidaaseja aktivoivia tekijöitä, kuten tuumorinekroositekijä alfaa (TNF α) ja fosfolipaasi A2:sta (Wu ym. 2018). Näiden tekijöiden vapautuminen aktivoi myös signaalikaskadeja, jotka käynnistävät tulehdusreaktion, mikä pahentaa muodostuvia vaurioita (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018).

Eri NOX-isoformien roolista IRI:ssä on saatu ristiriitaisia tuloksia eri tutkimuksissa (Cadenas 2018). Eräässä tutkimuksessa todettiin, ettei NOX2 poistogeenisillä hiirillä infarktin laajuus kasvanut ja tämän pääteltiin viittaavan siihen, ettei NOX2 osallistu sydänlihaksen IRI:iin. Kuitenkin toisessa tutkimuksessa NOX1 ja NOX2 poistogeenisillä hiirillä havaittiin merkittävästi pienempiä infarkteja kuin kontrolliryhmällä. Samaisessa tutkimuksessa todettiin myös NOX1/NOX2 poistogeenisillä hiirillä muodostuvan pienempiä infarkteja. Lisäksi havaittiin, ettei NOX4:n hiljentäminen vaikuttanut merkittävästi muodostuvaan vaurioon. Tästä pääteltiin NOX1 ja NOX2 geenien hiljentämisen suojaavan vahvasti sydänlihasta IRI:ltä (Cadenas 2018). Kuitenkin eräässä toisessa tutkimuksessa myös NOX4 poistogeenisillä hiirillä havaittiin vähemmän sydänlihaksen vaurioita (Matsushima ym. 2013). Tutkimuksessa käytettiin NOX2 ja NOX4 poistogeenisten hiirten lisäksi sydänlihaksen spesifistä NOX4 poistogeenistä hiirilinjaa. Kaikilla poistogeenisillä hiirillä ROS:ien tuotanto oli matalampaa ja infarktin laajuus laski. Sydänlihaksen vauriot kuitenkin lisääntyivät yllättäen NOX2/NOX4 poistogeenisillä hiirillä. Tämän ehdotettiin viittaavan siihen, että vaikka NOX-entsyymien inhibointi on tehokas keino alentaa oksidatiivista stressiä, niin kuitenkin tietty määrä ROS:eja on tarpeen sydämen suojaamiseksi IRI:ltä (Matsushima ym. 2013).

2.1.2 Mitokondrionaalinen oksidaasituotanto

Normaalitilassa mitokondrio on solujen merkittävin intrasellulaarinen ROS-lähde (Kalogeris ym. 2016, Cadenas 2018). Merkittävimmät ROS-lähteet ovat mitokondrion kompleksit I ja III, joiden kautta tapahtuva ”elektronivuoto” muodostaa normaalisti ROS:eja (Kalogeris ym. 2016, Cadenas 2018). Näiden kompleksien uskotaan olevan myös merkittävä ROS:n lähde IRI:ssä (Kalogeris ym. 2016, Cadenas 2018, Zhang ym. 2020). Joidenkin tutkimuksien mukaan sukki-naatin kerääntyminen iskemian aikana toimii eräänlaisena elektronivarastona (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016). Sukki-naatin kerääntyminen johtuu puriini-nukleotidien hajotuksesta fumaraaiksi, joka saa sukki-naattidehydrogenaasin toimimaan käänteisesti, jolloin se muodostaa sukki-naattia (Kalogeris ym. 2016). Tätä prosessia vahvistaa malaatti-aspartaatti-sukkulan osittainen käänteinen toiminta iskemian aikana (Kalogeris ym. 2016). Reperfuusiossa sukki-naatin ylimäärä ja voimakkaasti pelkistyneet elektroninsiirtäjät johtavat ROS:n tuotantoon kompleksista I käänteisen elektroninsiirtoketjun (engl. reverse electron transport, RET) kautta (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016, Cadenas 2018). Tämän prosessin arvellaan myös stimuloivan kompleksin III ROS-tuotantoa (Cadenas 2018).

Useimmat tutkimukset ovat todenneet kompleksien I ja III olevan merkittävä ROS:n lähde IRI:ssä ja näissä tutkimuksissa ROS-tuotannon on havaittu olevan huomattavasti suurempaa RET:n aikana kuin normaalissa oksidatiivisessa fosforylaatiossa (Cadenas 2018, Zhang ym. 2020). Lisäksi eräässä tutkimuksessa todettiin sukki-naatin ajaman RET:n johtavan voimakkaaseen ROS-tuotantoon reperfuusion alussa ja olevan merkittävä tekijä IRI:ssä (Cadenas 2018). Lisätodisteita tälle on saatu sukki-naatti-dehydrogenaasin inhibiitiolla, joka on vähentänyt sydänlihassolujen ROS-tuotantoa (Cadenas 2018). Kuitenkin joissain tutkimuksissa on saatu ristiriitaisia tuloksia ja esimerkiksi erään tutkimuksen perusteella mitokondrion kompleksilla I ei olisi merkittävää roolia IRI:ssä, koska reperfuusion olosuhteiden todettiin olevan epäsuotuisat RET:lle (Cadenas 2018). Ristiriitaisia tuloksia voi kuitenkin selittää se, että tutkimuksessa käytetty malli erosi muiden tutkimusten malleista (Cadenas 2018).

2.2 Ca²⁺-ylimäärä

Iskemian aikana alkanut Ca²⁺-ylimäärä lisääntyy reperfuusiossa monien prosessien yhteisvaikutuksesta (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Oksidatiivinen stressi vahingoittaa sarkoplastista retikulumia, jonka Ca²⁺-takaisinotto-kyky on heikentynyt alentuneen ATP-tason seurauksena (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Solumembraanin natrium-vety-anionivaihtaja aktiivisuus kasvaa reperfuusiossa, jolloin myös natrium-kalsiumvaih-taja aktiivisuus lisääntyy ja intrasellulaarinen Ca²⁺-pitoisuus nousee (Kalogeris ym. 2016). Reperfuusio käynnistää oksidatiivisen fosforylaation uudelleen ja palauttaa mitokondrion membraanipotentiaalin, joka ajaa Ca²⁺ mitokondrion matrikseen (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Vaikka tämä laskee

sytoplasman Ca^{2+} -pitoisuutta, se stimuloi mitokondrion sisäkalvolla sijaitsevan MPTP:n (engl. Mitochondrial permeability transition pore, MPTP) avautumista (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016).

Intrasellulaarisen Ca^{2+} -ylimäärän aikana muodostuu myös ureahappoa ja kalsiumpyrofosfaattia (Kalogeris ym. 2016). Molemmat yhdisteet toimivat vaarasignaaleina, jotka aktivoivat immuunisysteemin inflammasomeja. Aktivoidut inflammasomit tuottavat interleukiini-1 β (IL-1 β) ja TNF α sytokiineja, jotka lisäävät muiden sytokiinien ekspressiota aktivoimalla lukuisia transkriptiotekijöitä, kuten tumatekijä kappa beeta (NF κ B). Sytokiinien kohonnut ekspressio ja tästä seuraava tulehdusreaktio pahentaa syntyvää IRI:ä (Kalogeris ym. 2016).

Ca^{2+} tärkeys IRI:ssä on havaittu tutkimuksissa, joissa Ca^{2+} -ylimäärän vähentämisen on todettu laskevan huomattavasti sydämen vaurioita (Hausenloy ja Yellon 2013). Tutkimuksissa sarkoplastisen retikulumin Ca^{2+} -kanavan ja mitokondrion Ca^{2+} -uniportterin inhiboiminen reperfuusion alussa alensivat rottien sydäninfarktin aiheuttamia vaurioita jopa 50 %. Kliinisissä tutkimuksissa inhibitiolla ei kuitenkaan ole kyetty vähentämään sydänlihaksen IRI:ä merkittävästi (Hausenloy ja Yellon 2013).

2.3 Intrasellulaarisen pH:n palautuminen ja MPTP

Verenkierron palauttaminen reperfuusiossa huuhtoo sydänlihassoluihin kerääntyneen laktaatin pois palauttaen intrasellulaarisen pH:n nopeasti normaaliksi (Hausenloy ja Yellon 2013, Cadenas 2018). Reperfuusio lisää natrium-vety-anionivaihtajan ja natrium-bikarbonaattikotransportterin toimintaa, joka nopeuttaa solujen pH:n palautumista (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Nopea pH-muutos kuitenkin indusoi sydänlihassolujen solukuolemaa mahdollistamalla MPTP:n avautumisen (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016, Cadenas 2018). Intrasellulaarisen pH:n palautumisen hidastaminen reperfuusiossa on todettu vähentävän sydänlihassolujen solukuolemaa (Hausenloy ja Yellon 2013). Koe-eläin- ja solumalleilla tehdyissä kokeissa on todettu happamassa kasvatusliuoksessa suoritettujen reperfuusion vähentävän muodostuvaa sydänvaurioita inhiboimalla MPTP:n avautumista (Hausenloy ja Yellon 2013, Hidalgo ym. 2018). Yhden teorian mukaan pH:n muutosta voitaisiin hidastaa myös natrium-vety-anionivaihtaja inhibiittoreilla tai hidastamalla reperfuusio-prosessia (Hausenloy ja Yellon 2013). Toimiessaan nämä keinot voisivat olla potentiaalisia IRI:n kliinisiä hoitokeinoja (Hausenloy ja Yellon 2013).

2.3.1 MPTP:n molekulaarinen rakenne

Edellä käsitellyt iskemian ja reperfuusion käynnistämät prosessit risteävät MPTP:n kohdalla, mikä tekee siitä kriittisen tekijän IRI:ssä (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016). MPTP on nonselektiivinen kanava, joka muodostuu IRI:n aikana mitokondrion sisämembraanille lisäten membraanin läpäisevyyttä 1,5 kDa kokoisille molekyyille (Hausenloy ja Yellon 2013, Ong ym. 2015, Cadenas

2018). Vaikka MPTP löydettiin tutkimuksissa jo 1970-luvulla, on sen molekulaarinen rakenne edelleen suurimmaksi osin epäselvä (Ong ym. 2015, Cadenas 2018). Monien tutkimusten perusteella kuitenkin tiedetään, että mitokondrionaalinen syklofiiliini D (CypD) on MPTP:n tärkeä säätelyelementti, koska se lisää kanavan kalsiumherkkyttä (Ong ym. 2015, Cadenas 2018). Eläinkokeissa on todistettu CypD:n olevan tärkeä MPTP:n avautumisessa, koska geenin hiljentäminen hiirillä laski sydäninfarktin laajuutta (Ong ym. 2015). Tutkimuksissa on myös todettu, että MPTP:n avautumista on mahdollista inhiboida siklosporiini A:n (CsA) avulla, jonka molekulaarinen kohde on CypD (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016, Cadenas 2018). Muiksi mahdollisiksi säätelyosiksi on arveltu adeniinukleotiditranslokaattoria ja mitokondrionaalista fosfaattikantajaproteiinia (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016). Pro-apoptoottisten Bax/Bak-proteiinien oletettiin aikaisemmin olevan tärkeä MPTP:n osa, mutta nykyään näiden proteiinien arvellaan lisäävän mitokondrion ulkomembraanin läpäisevyyttä IRI:ssä, joka on tarpeellista MPTP-riippuvaisessa nekroosissa (Ong ym. 2015).

Viimeisimmän teorian mukaan ATP-syntaasin c-alayksikkö muodostaisi MPTP:n varsinaisen kanava komponentin (Ong ym. 2015, Cadenas 2018). Muutamassa tutkimuksessa tälle teorialle on saatu tukea, missä c-alayksikön havaittiin laajentuvan ja irtaantuvan ATP-syntaasista korkeassa Ca^{2+} -pitoisuudessa (Ong ym. 2015, Cadenas 2018). Eräässä toisessa tutkimuksessa taas väitettiin, että kanava muodostuisi ATP-syntaasin kahden monomeerin välille (Cadenas 2018). Kuitenkin erässä tutkimuksessa tämä teoria hylättiin ja tekijät totesivat, ettei mikään ATP-syntaasin alayksiköistä osallistu MPTP:n muodostukseen (Cadenas 2018).

2.3.2 Reperfuusion indusoima MPTP avautuminen

Vaikka Ca^{2+} -ylimäärä ja oksidatiivinen stressi alkavat muodostua iskemian aikana, inhiboi iskemian aikainen matala intrasellulaarinen pH MPTP:n avautumista (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016, Cadenas 2018). Reperfuusiossa pH:n nopea palautuminen yhdessä pahenevan intrasellulaarisen ja mitokondrionaalisen Ca^{2+} -ylimäärän ja oksidatiivisen stressin kanssa aiheuttavat MPTP:n avautumisen (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016, Cadenas 2018). MPTP:n avautumisesta seuraa mitokondrion membraanipotentiaalin romahtaminen, oksidatiivisen fosforylaation pysähtyminen, ATP-molekyylien ehtyminen ja lopulta solukuolema (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016). Toinen merkittävä seuraus on mitokondrion matriksin turpoaminen ja mitokondrion ulkomembraanin puhkeaminen (Ong ym. 2015, Cadenas 2018). Tämä vapauttaa sytoplasmaan pro-apoptoottisia tekijöitä kuten sytokromi c:tä, jotka aktivoivat apoptoottista solukuolemaa (Ong ym. 2015).

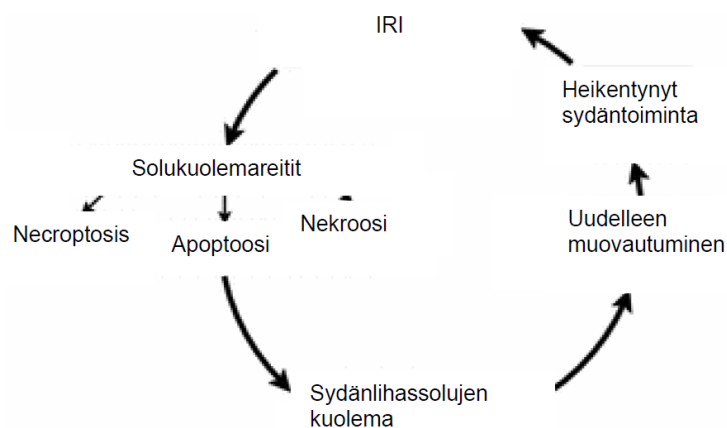
Johtuen lukuisten tutkimusten ristiriitaisista tuloksista on edelleen epäselvää, millainen rooli IRI:n eri prosesseilla on MPTP:n avautumisessa (Ong ym. 2015). Eräässä tutkimuksessa havaittiin, että Ca^{2+} :n sitoutuminen MPTP:hen on edellytys kanavan aukeamiselle (Cadenas 2018). Ca^{2+} -ylimäärän rooli on kuitenkin kyseenalaistettu joissain tutkimuksissa, joissa on ehdotettu oksidatiivisen stressin ja pH:n normalisoitumisen olevan tärkeämpiä MPTP:n avautumisessa (Ong ym. 2015). Lisäksi

yhdessä tutkimuksessa mitokondrion Ca^{2+} -uniporterin geneettinen deleetio ei vaikuttanut sydämen IRI-herkkyyteen, vaikkakin tämä vähensi kalsiumindusoitua MPTP:n avautumista (Ong ym. 2015). ROS-yhdisteiden tärkeyttä taas tukevat eräät tutkimukset, joissa on havaittu MPTP:n avautumisen lisäävän mitokondrionaalista ROS-tuotantoa (Cadenas 2018). Tämän arvellaan mahdollisesti stimuloivan läheisten mitokondrioiden MPTP:n avautumista, mikä johtaisi solukuolemareittien voimakkaaseen aktivointiin (Cadenas 2018).

On myös tärkeä tiedostaa, ettei MPTP toimi vain patologisissa tilanteissa, vaan sillä on myös fysiologinen rooli (Ong ym. 2015). Tutkimuksissa on löydetty toinenkin avautumisen muoto ns. MPTP-värähtely, jonka aikana vapautuu ROS-yhdisteitä ja Ca^{2+} (Ong ym. 2015, Kalogeris ym. 2016). Tämä hetkellinen ja reversiibeli avautuminen saattaa liittyä MPTP:n rooliin Ca^{2+} - ja energia- metaboliassa (Ong ym. 2015). Tuloksien luotettavuus on kuitenkin kyseenalainen, koska tutkimukset ovat tutkineet MPTP:n tehtävää keskittymällä CypD:hen (Ong ym. 2015).

2.4 Soluvaurioiden indusoima solukuolema

Sydänlihassolujen vauriot IRI:ssä käynnistävät monia eri sellulaarisia vasteita, riippuen vaurion vakavuudesta (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Lievästi vaurioituneet solut tuhoataan autofagosytoottisilla, joka samalla aktivoi prosessiin osallistuvien solujen selviytymismekanismeja (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). IRI:n pitkittyessä soluvauriot muodostuvat vakaviksi johtaen solukuolemaan ja lopulta kudosisvaurioon (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Vakavat soluvauriot johtavat apoptoosin tai nekroosin aktivoitumiseen, mutta suurin osa vaurioituneista soluista kuolee nekrootisesti (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Tutkimuksissa on myös saatu todisteita siitä, että tietyissä olosuhteissa IRI aktivoi säädellyn nekroosin (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Inhiboimalla apoptoosin ja säädellyn nekroosin signalointireittejä voisi olla mahdollista vähentää iskeemisessä tilassa olevien solujen solukuolemaa reperfuusiossa (Kalogeris ym. 2016).



Kuva 2: IRI:n aktivoimat solukuolemareitit, jotka johtavat sydänlihassolujen kuolemaan. Tämä aiheuttaa sydänlihaskudoksen uudelleen muovautumista, jonka seurauksena sydämen toiminta heikenee (muokattu lähteestä Adameova ym. 2016)

2.4.1 Apoptoosi

Säädely solukuolema eli apoptoosi voi aktivoitua kahden eri signalointireitin välityksellä. Ensimmäisessä reitissä eli ulkoisessa aktivaatioissa solun membraanilla sijaitsevat kuolemanreseptorit ja niihin sitoutuneet ligandit muodostavat kompleksin. Tämä aktivoi kaspasii-kaskadin, joka johtaa apoptoosin käynnistymiseen. Toinen apoptoosireitti aktivoituu solun sisäisesti ja tämä reitti aktivoituu IRI:n seurauksena (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). IRI aktivoi pro-apoptoottisia Bcl-2 perheen proteiineja, kuten Baxia ja Bakia, jotka insertoituvat mitokondrion ulkomembraaniin (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Tämä lisää ulkomembraanin läpäisevyyttä, jonka seurauksena pro-apoptoottisia proteiineja, kuten sytokromi c:tä, vapautuu sytoplasmaan (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Sytokromi c sitoutuu apoptoottisia proteaaseja aktivoivaan tekijään 1 (APAF-1), joka stimuloi kaspasii-9:n muodostamaan apoptosomin (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Apoptosomi aktivoi kaspasii-kaskadin, joka käynnistää apoptoottisen solukuoleman (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018).

Monet pro-apoptoottisista proteiineista ovat redox-säädelyjä eivätkä aktivoidu iskemian aikana, vaan tarvitsevat aktivoitua kseen reperfuusiossa muodostuvan oksidatiivisen stressin (Kalogeris ym. 2016). Näiden proteiinien rooli IRI:ssä on todettu koe-eläinkokeissa, joissa näiden proteiinien geenien hiljentäminen vähensi apoptoottista solukuolemaa (Kalogeris ym. 2016, Moe ja Marín-García 2016). Yllätyksenä näissä tutkimuksissa on tullut se, että geenien hiljentäminen vähentää IRI:ä huomattavasti (Kalogeris ym. 2016). Tämä voi viitata siihen, että pro-apoptoottisilla proteiineilla on apoptoosin lisäksi rooli muissa IRI:n prosesseissa (Kalogeris ym. 2016). Koe-eläimillä on myös tutkittu apoptoosin inhiboimista pan-kaspaseilla ja näissä tutkimuksissa on havaittu pan-kaspasien vähentävän sydänlihassolujen solukuolemaa merkittävästi (Kalogeris ym. 2016, Moe ja Marín-García 2016). Hyvistä tuloksista huolimatta kaspasii-inhibiittoreiden mahdollisesta terapeuttisesta käytön hyödyistä on epäilyksiä (Kalogeris ym. 2016). Koska mitokondrion toiminta kuitenkin häiriintyy IRI:ssä, on mahdollista, että kaspasien inhibointi johtaa apoptoosin sijaan nekroosiin (Kalogeris ym. 2016). Joissain tutkimuksissa on lisäksi havaittu, että IRI:ssä aktivoituu myös toisenlainen mitokondrionaalinen solukuolema (engl. mitoptosis), joka on apoptoosin kaltainen ohjelmoitu solukuolema, jossa mitokondrio fragmentoituu (Wu ym. 2018). Yksi prosessiin osallistuva proteiini on mitokondrion kristassa sijaitseva OPA1 (engl. optic atrophy 1), jonka yliekspressoitumisen on havaittu vähentävän sydänlihaksen IRI:ä (Wu ym. 2018).

2.4.2 Nekroosi

Soluihin kohdistuva voimakas stressi IRI:n aikana aktivoi myös nekroosia, jonka seurauksena soluorganellit turpoavat ja solumembraani puhkeaa (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Muutamassa tutkimuksessa on havaittu yhteys aktivoituneen solukuolemareitin ja ATP-molekyylien konsentraation välillä (Moe ja Marín-García 2016). Tutkimuksissa ATP-molekyylien nopea ehtyminen IRI:ssä johti

nekroosiin, kun taas ehtymisen hidastaminen aktivoi apoptoosia (Adameova ym. 2016). Solun intrasellulaarinen sisältö purkautuu soluväliaineeseen, mikä käynnistää tulehdusreaktion ja pahentaa syntyvää IRI:ä (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Vaikka nekroottinen solukuolema on yleinen monissa sairauksissa, sen IRI:iin liittyviä mekanismeja on tutkittu vähän (Wu ym. 2018). Nekroosia pidetään yleisesti säätelemättömänä solukuolemana, mutta viimeaikaisissa tutkimuksissa on selvinnyt, että on myös säädelty nekroosi, joka käynnistyy erilaisissa patologisissa tilanteissa (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Säädellyn nekroosin muotoja on monia ja niitä kutsutaan yleisesti nekroptoosiseksi (engl. necroptosis) (Kalogeris ym. 2016). Tämän solukuolema tyyppin uskotaan aktivoituvan erityisesti IRI:n aikana (Kalogeris ym. 2016). Nekroptoosilla on yhteisiä piirteitä nekroosin kanssa ja sitä voidaan inhiboida farmakologisesti tai geneettisesti (Kalogeris ym. 2016, Wu ym. 2018). Tämä viittaa siihen, että nekroptoosin molekulaariset mekanismit ovat tarkoin kontrolloituja toisin kuin nekroosin prosessit, jotka käynnistyvät sellulaarisen stressin seurauksena (Kalogeris ym. 2016).

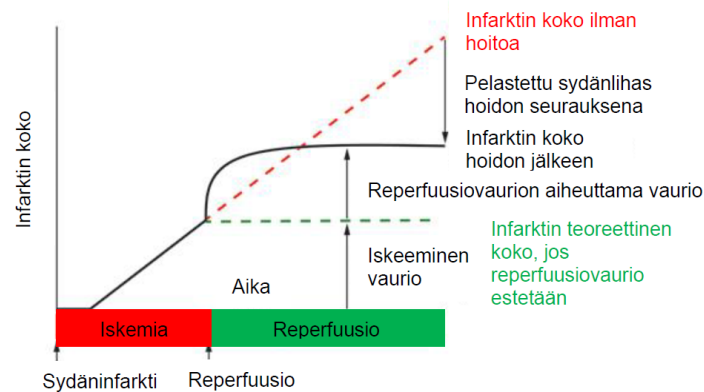
Nekroptoosin mekanismeista tiedetään vähän, mutta tärkeä tapahtuma on necrosomin muodostuminen RIP1 ja RIP3 proteiinien toimesta (Adameova ym. 2016, Wu ym. 2018). Necrosomi nostaa ROS-tuotantoa aktivoimalla NADPH-oksidaaseja ja mitokondrion oksidantin tuotantoa (Kalogeris ym. 2016). Tutkimuksissa on onnistuttu vähentämään solukuolemaa inhiboimalla RIP1:stä necrosotatiini-1:llä (Kalogeris ym. 2016, Adameova ym. 2016). RIP3 poistogeenisillä hiirillä on myös todettu vähemmän IRI:ä (Kalogeris ym. 2016, Adameova ym. 2016). Lisäksi on epäselvää, mikä on nekroptoosin eri muotojen roolit eri kudosten IRI:ssä (Kalogeris ym. 2016). Myös se on epäselvää, kuinka herkkiä eri kudokset ovat nekroptoosin eri muodoille (Kalogeris ym. 2016). Tutkimuksissa on havaittu eri muotojen spesifisten inhibiittoreiden suojaavan soluja vain osittain solukuolemalta (Kalogeris ym. 2016). Inhibiittoreita yhdistelemällä on saatu parempia tuloksia, jotka viittaavat siihen, että eri muotojen signalointireiteissä on päällekkäisyyksiä (Kalogeris ym. 2016).

3. Iskemia-reperfuusioaurion mallintaminen

Tautimallit ovat yksinkertaistuksia sairauksista ja ne ovat tehokas keino tutkia sairauksia soluilla (*in vitro*) tai koe-eläimillä (*in vivo*). IRI:stä on lukuisia tautimalleja, joiden avulla on saatu tietoa vaurion muodostumisesta ja siihen liittyvistä avaintekijöistä (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016, Soares ym. 2019). Tästä huolimatta tutkimukset ovat epäonnistuneet terapeuttisten hoitokeinojen kehittämisessä (Hausenloy ja Yellon 2013, Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Lindsey ym. 2018). Useat eri malleilla toimineet lääkkeineet kuten MPTP-inhibiittori CsA ovat osoittautuneet suurissa kliinisissä tutkimuksissa tehottomiksi (Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Soares ym. 2019).

Kuitenkin pienemmissä kliinisissä tutkimuksissa CsA:n on todettu vähentävän IRI:ä (Ong ym. 2015). Yksi mahdollisuus CsA:n toimivuuden ristiriitaisiin tuloksiin on se, ettei se ole spesifinen MPTP:lle (Ong ym. 2015, Cadenas 2018). Muita syitä kliinisten tutkimusten huonoihin ja ristiriitaisiin tuloksiin on esitetty lukuisia, kuten tutkimusten heikko suunnittelu ja vääränlaisten metodien käyttö (Hausenloy ja Yellon 2013, Lindsey ym. 2018). Lisäksi nykyisten tautimallien ongelmana on ollut se, etteivät ne huomio IRI:n kliinistä asetelmaa (Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Lindsey ym. 2018). Nykyiset tautimallit koostuvat homogeenisestä, nuoresta ja terveestä populaatioista, kun todellisuudessa merkittävä osa sydänsairauspotilaista on iäkkäitä (Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Lindsey ym. 2018). Lisäksi potilailla on monesti erilaisia riskitekijöitä, jotka lisäävät sydänlihassolujen herkkyyttä reperfuusioauriolla ja vähentävät hoidon tehoa (Hausenloy ja Yellon 2013, Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Lindsey ym. 2018).

Hoitomenetelmien kehitys on kuitenkin vähentänyt reperfuusioaurion vakavuutta, vaikkei sen estämiseksi ei ole tehokasta keinoa (Hausenloy ja Yellon 2013, Kalogeris ym. 2016). Useista tutkimuksista tiedetään iskemiaan totuttamisen eli sydämen altistamisen lyhyille iskeemisille jaksoille ja reperfuusiolle vähentävän koe-eläinten infarktin laajuutta tehokkaasti (Kalogeris ym. 2016, Chen ja Vunjak-Novakovic 2019a). Iskemiaan totuttaminen ei kuitenkaan ole mahdollinen hoitokeino, koska se pitäisi suorittaa ennen sydäninfarktin tapahtumista. Kuvassa 3 on havainnollistettu kuinka sydäninfarktin laajuutta olisi mahdollista rajata, jos reperfuusioaurio kyettäisiin estämään.



Kuva 3: Musta viiva kuvaa iskeemisen- ja reperfuusioaurion osuutta IRI:ssä. Vihreä viiva kuvaa vaurion teoreettista kokoa, jos reperfuusioaurio estetään. Punainen viiva kuvaa vaurion kehitystä ilman hoitoa (muokattu lähteestä Hausenloy ja Yellon 2013).

3.1 Uusien teknologioiden hyödyntäminen mallintamisessa

Edistysaskeleet indusoidujen pluripotenttien kantasolujen (engl. human-induced pluripotent stem cells, hiPS) ja kudosteknologian saralla ovat viime vuosina mahdollistaneet ihmislupohjaisten IRI-mallien kehityksen (Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Hidalgo ym. 2018, Sebastião ym. 2020). Useassa tutkimuksessa on näytetty, että hiPS-soluista erilaistetuilla sydänlihassoluilla (engl. human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes, hiPS-CM) on mahdollista mallintaa

sydänlihaksen IRI:ä (Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Hidalgo ym. 2018, Sebastião ym. 2020). Tutkijat ovat todistaneet, että hiPS-CM-solut ilmentävät myös ihmisen mahdollisia riskitekijöitä ja tämä mahdollistaa eri riskitekijöiden vaikutuksien tutkimisen IRI:ssä (Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b). Ongelmana on kuitenkin se, että hiPS-CM-solut muistuttavat enemmän sikiön sydänlihassoluja (Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Lindsey ym. 2018). Tämä on ongelmallista, koska epäkypsät solut eivät ole yhtä herkkiä IRI:lle kuin kypsät solut (Lindsey ym. 2018, Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b). Viime vuosina on kuitenkin onnistuttu kypsyttämään hiPS-CM-solut muistuttamaan enemmän aikuisen sydänlihassoluja kehittämällä soluviljelyolosuhteita ja istuttamalla soluja tukirankaan (Chen ja Vunjak-Novakovic 2018b, Hidalgo ym. 2018, Sebastião ym. 2020).

Toinen mielenkiintoinen solutyyppe on sydämen kantasolut (engl. cardiac stem cells, CSC), jotka normaalisti osallistuvat sydänlihassolujen uusimiseen (Hou ym. 2013, Yu ym. 2017). CSC-solujen alkuperästä ei ole täyttä varmuutta, mutta niiden tiedetään sijaitsevan spesifisissä paikoissa sydämessä ja aktivoituvan myös IRI:n seurauksena. Proliferoituessaan CSC-solut kykenevät erilaistumaan sydänlihassolujen lisäksi sydänkudoksen muiksi solutyypeiksi ja niitä kutsutaan yleisesti hCPC-soluiksi (engl. human cardiac progenitor cells, hCPC). Aikuisen sydänlihaskudoksessa CSC-soluja on liian vähän, jotta ne kykenisivät korvaamaan IRI:ssä kuolleita sydänlihassoluja. hCPC-solujen vaikutuksia IRI:iin on tutkittu koe-eläimillä ja hCPC-solujen injektioimisen vaurioituneelle alueelle on havaittu vähentävän sydämen uudelleen muovautumista ja parantavan sydän toimintaa. Lupaavista tuloksista huolimatta hCPC-solujen vaikutus on liian paikallinen ja lyhytkestoinen, jotta menetelmästä olisi apua IRI:n hoidossa (Hou ym. 2013, Yu ym. 2017). Taulukossa 1 näkyy seuraavissa kappaleissa käsiteltävät uusimmat tautimallit, jotka hyödyntävät edellä käsiteltyjä asioita IRI:n mallintamisessa.

Taulukko 1: Käsiteltävät sydänlihaksen IRI tautimallit

Solumallit	Koe-eläinmallit
Metabolisesti kypsytettyjen hiPS-CM-solujen IRI-malli	hCPC-solujen vaikutusten arvioiminen hiiren IRI-mallissa
3D bioreaktori IRI-malli	IRI Opa1 poistogeenisessä hiirimallissa
Kudosteknologinen ihmisen sydänkudoksen IRI-malli	Seeprakalan toukkien IRI-malli

3.2 Solumallit

In vitro IRI-mallit perustuvat eristettyihin tai viljeltyihin sydänlihassoluihin ja ovat hyödyllisiä etenkin lääkeaineiden vaikutuksien tutkimuksissa (Lindsey ym. 2018). Solumallien etuna on olosuhteiden

hyvä hallittavuus ja solujen IRI:ä on helppo simuloida hypoksialla ja uudelleen hapetuksella (Lindsey ym. 2018).

3.2.1 Metabolisesti kypsytettyjen hiPS-CM-solujen IRI-malli

Metabolisesti kypsytettyjen hiPS-CM-solujen IRI-malli tutkimus on yksi ensimmäisistä onnistuneista yrityksistä hyödyntää hiPS-CM-soluja IRI:n mallintamisessa (Hidalgo ym. 2018). Merkittävin ero aikaisempien solumallien ja tämän uuden solumallin välillä on se, että tässä tutkimuksessa hiPS-CM-solut kypsytettiin, jolloin ne muistuttivat metabolialtaan ja fenotyypiltään enemmän aikuisen sydänlihassoluja. Solut kypsytettiin galaktoosi-pitoisessa viljelyliuoksessa, jolla stimuloitiin metabolian muutosta glykolyysisistä oksidatiiviseen fosforylaatioon. Kypsytyksessä soluissa havaittiin tyypillisiä kypsymisen piirteitä, kuten mitokondrionaalisen massan kasvua ja mitokondrioiden uudelleen järjestäytymistä sytoplasmassa. Myös sydänlihasspesifisten geenien ekspressio lisääntyi. Soluilla suoritetut kokeet tehtiin erilaisissa viljelyolosuhteissa, joissa iskemiaa simuloitiin 2 tunnin hypoksialla ja reperfuusiota 4 tunnin uudelleen hapetuksella. Solujen kuolleisuutta arvioitiin vapautuneen laktaattidehydrogenaasin määrän perusteella. Tuloksista selvisi, että kypsytyt hiPS-CM-solut, viljelyliuoksen alhainen pH ja glukoosipitoisuus ovat välttämättömiä tekijöitä onnistuneeseen IRI:n mallintamiseen tässä *in vitro* mallissa. Myös CsA:n vaikutusta tutkittiin ja sen todettiin vähentävän merkittävästi IRI:stä kärsivien hiPS-CM-solujen kuolemaa (Hidalgo ym. 2018).

Nykyinen käsitys IRI:n mekanismeista ja etenemisestä on saatu pitkälti koe-eläinmalleilla eikä sitä ole tutkittu ihmisen fysiologiaa muistuttavassa asetelmassa (Hidalgo ym. 2018). Tällä tautimallilla on mahdollista tutkia ihmisen IRI:ä helposti ja kustannustehokkaasti. Mallia voidaan hyödyntää uusien lääkkeiden testaamisessa ja ihmisen IRI:n mekanismien tutkimuksissa. Mallilla voidaan toistaa aiemmin koe-eläimillä tehdyt tutkimukset ja selvittää, kuinka sellulaariset vasteet mahdollisesti eroavat ihmisessä. Mallin luotettavuuteen voi kuitenkin vaikuttaa se, ettei malli tällaisenaan huomioi muiden solutyypien vaikutusta IRI:ssä. Esimerkiksi tutkimuksessa havaittu CsA:n solukuolemaa alentava vaikutus on ristiriidassa laajojen kliinisten tutkimusten kanssa ja mallin puutteet voivat selittää tätä ristiriitaisuutta (Hidalgo ym. 2018).

3.2.2 3D-bioreaktori IRI-malli

Tässä tutkimuksessa kehitetty 3D-bioreaktori IRI-malli arvioi hiPS-CM-solujen vasteita 3D-ympäristössä ja näiden solujen vuorovaikutusta hCPC-solujen kanssa (Sebastião ym. 2020). Tutkimuksessa iskemiaa simuloitiin viljelemällä soluja hypoksisisessa viljelyliuoksessa 5 tunnin ajan, jonka jälkeen reperfuusiota simuloitiin 16 tunnin ajan vaihtamalla bioreaktoriin happea sisältävä liuos. Simuloidun IRI:n vaikutuksia hiPS-CM-soluihin tutkittiin analysoimalla solujen elinkelpoisuutta, ultrarakennetta ja proteiinien eritystä. Lisäksi hCPC-soluja viljeltiin hiPS-CM-solujen viljelyliuoksessa, koska haluttiin

tutkia viljelyliuoksen parakriinisten tekijöiden vaikutuksia hCPC-soluihin. Saaduista tuloksista havaittiin, että 3D-bioreaktori malli onnistui mallintamaan sydänlihaksen IRI:n tyypillisiä piirteitä. Myös tyypillisten sytokiinien ja kasvutekijöiden vapautumisen havaittiin vaurion eri vaiheissa. Lisäksi hCPC-solujen viljely hiPS-CM-solujen viljelyliuoksessa aktivoi signaalintireittejä, joiden on todettu aktivoituvan CM/CPC-solujen parakriinisten vuorovaikutusten seurauksena sydänvaurioissa. Tällaisia ovat esimerkiksi proliferaation ja migraatioon liittyvät signaalintireitit. Aiemmin samankaltaisia tuloksia on raportoitu rottien ja hiirien *in vivo* ja *in vitro* tautimallien tutkimuksissa, mutta näiden mallien huonona puolena ovat erot eläinten ja ihmisen fysiologiassa (Sebastião ym. 2020).

Tässä tutkimuksessa kuvattu 3D-bioreaktori IRI-malli on uudenlainen tapa tutkia IRI:ä soluilla (Sebastião ym. 2020). Mallin vahvuus on 3D-ympäristö, joka parantaa solujen kypsymistä mahdollistamalla paremmat olosuhteet solu-solu ja solu-ECM vuorovaikutuksille. Malli voi toimia vaihtoehtona 2D-solumalleille ja koe-eläinmalleille. Lisäksi malli voi toimia hyvänä perustana jatkotutkimuksille, koska sillä on mahdollista tutkia muidenkin solutyypin, kuin hCPC-solujen, roolia IRI:ssä. Vaikka malli on edistysaskel ihmisen sydänlihassolujen natiivin ympäristön mallintamisessa, se ei kuitenkaan imitoi sydänkudoksen rakennetta eikä sisällä muita solutyyppejä (Sebastião ym. 2020).

3.2.3 Kudosteknologinen ihmisen sydänlihaskudoksen IRI-malli

Kudosteknologinen IRI-malli hyödyntää myös hiPS-CM-soluja, mutta merkittävin ero edellisiin malleihin on se, että tämä malli yrittää lisäksi imitoida sydänlihaskudoksen rakennetta (Chen ja Vunjak-Novakovic 2019a). Tutkimuksessa epäkypsät hiPS-CM-solut istutettiin hydrogeeliin, joka siirrettiin tämän jälkeen bioreaktoriin. Bioreaktori oli erityisesti suunniteltu edistämään solujen kypsymistä ja sydänlihas konstruktien muodostumista. Muodostetut sydänlihaskonstruktit altistettiin simuloidulle IRI:lle, missä iskemiaa simuloitiin inkuboimalla bioreaktoreita hypoksisessa olosuhteissa 6 tunnin ajan ja reperfuusiota simuloitiin uudelleen hapetuksella 3 tunnin ajan. Lisäksi tutkimuksessa arvioitiin iskemiaan totuttamisen ja CsA:n vaikutuksia muodostuvaan vaurioon. Konstruktien solukuolemaa arvioitiin vapautuneen laktaattidehydrogenaasin ja mitokondrion membraanin läpäisevyyden muutoksen perusteella. Simuloidulle IRI:lle altistetuissa sydänlihaskonstrukteissa havaittiin solukuoleman lisääntyneen merkittävästi. Lisäksi mitokondrion membraanin läpäisevyyden havaittiin kasvaneen, mikä viittaa MPTP:n avautumiseen. Myös konstruktien solujen apoptoosi-aktiivisuuden todettiin olevan kasvanut. Kuten metabolisesti kypsytettyjen hiPS-CM-solujen mallin tutkimuksessa, myös tässä mallissa CsA:n havaittiin vähentävän solukuolemaa. (Chen ja Vunjak-Novakovic 2019a).

Tutkimuksessa kehitetty kudosteknologinen ihmisen sydänlihaskudoksen IRI-malli onnistui mallintamaan IRI:n keskeisiä sellulaarisia vasteita (Chen ja Vunjak-Novakovic 2019a). Tämä malli antaa hyvät lähtökohdat tutkia IRI:ä ihmisolukonstrukteilla, jotka imitoivat sydänlihaskudoksen rakennetta. Vaikka mallissa käytetyt viljelyolosuhteet ja bioreaktori paransivat hiPS-CM-solujen kypsyysastetta, ovat ne kuitenkin suhteellisen epäkypsiä aikuisen sydänlihassoluihin verrattuna. Tämä pätee myös

edellä käsiteltyihin solumalleihin ja tämän takia jokaisen mallin tutkimuksessa simuloitu iskemia ja reperfuusio ovat olleet kestoiltaan useita tunteja. Parantamalla solujen kypsyyssastetta ja muodostamalla eri riskitekijöitä sisältäviä malleja, on mahdollista kehittää tautimalleja, jotka muistuttavat enemmän IRI:n kliinistä asetelmaa (Chen ja Vunjak-Novakovic 2019a).

3.3 Koe-eläinmallit

Vaikka solumallit ovat kustannustehokas ja tehokas väline tutkia sairauksien mekanismeja, on niistä saatavat tulokset validoitava koe-eläinmalleilla (Lindsey ym. 2018). Tärkeitä IRI:n tautimalleja ovat etenkin pienten koe-eläinten mallit, koska ne ovat suhteellisen halpoja ja niitä on helppo muokata geneettisesti (Deddens ym. 2017). Näillä malleilla saadaan tärkeää tietoa terapeuttisten hoitokeinojen toimivuudesta ennen kliinisiin tutkimuksiin siirtymistä (Deddens ym. 2017).

3.3.1 hCPC-solujen vaikutusten arvioiminen hiiren IRI-mallissa

Tämä hCPC-soluja hyödyntävä hiiren IRI-mallin tarkoitus on toimia lähtökohtana soluterapiahoitojen IRI:n liittyvien mekanismien selvittämisessä (Deddens ym. 2017). Paremmat mallit ovat tarpeen, koska soluterapiahoitojen kehityksestä huolimatta kliinisten tutkimusten tulokset ovat edelleen huonoja. Tutkimuksessa käytettiin immuunipuutoksisia hiiriä (engl. immune compromised mice, NOD-SCID), koska tutkittiin hCPC-solujen vaikutusta sydänlihaksen uudelleen muovautumiseen. IRI aiheutettiin 60 minuutin mittaisella vasemman sepelvaltimon sitomisella ja 28 päivän kuluttua tästä hiiriin injektointiin hCPC-soluja. 28 päivän kuluttua hiirten sydämistä otettiin histologiset näytteet ja niistä tutkittiin hCPC-solujen vaikutuksia sydänlihaksen uudelleen muovautumiseen. Näytteistä havaittiin hCPC-solujen injektion johtavan paikalliseen ja pitkäaikaiseen vaikutukseen. hCPC-solujen rajallisesta vaikutuksesta huolimatta sydämen toiminta palautui injektointialueella kohtalaisesti ja paikallinen muovautumisen nopeus parani. Samankaltaisia tuloksia on raportoitu muissa koe-eläintutkimuksissa ja eräissä kliinisissä tutkimuksissa (Deddens ym. 2017).

Muutamassa koe-eläinmallissa hCPC-solujen on todettu johtavan merkittävään sydäntoiminnan palautumiseen, mutta tässä hiirimallissa ei kuitenkaan havaittu tämänkaltaista vaikutusta (Deddens ym. 2017). Erot tämän hiirimallin ja aikaisempien mallien tutkimusten tuloksista voivat johtua eri menetelmien käytöstä, kuten koe-eläinmallista ja hCPC-solujen alkuperästä. Myös NOD-SCID hiirien käyttö voi selittää ristiriitaisia tuloksia, koska eräissä raportissa on todettu, ettei IRI NOD-SCID hiirissä aiheuta tarpeeksi vakavia vaurioita, jotka johtaisivat sydämen uudelleen muovautumisen aktivoitumiseen. Tästä huolimatta tässä tutkimuksessa IRI johti sydämen uudelleen muovautumiseen NOD-SCID hiirissä. Tämä hiirimalli antaa kuitenkin hyvät lähtökohdat tutkia soluterapian mekanismeja ja sen avulla on mahdollista tutkia hCPC-solujen vaikutusta sydämen vaurioihin. Malli ei

kuitenkaan ole tarpeeksi tarkka, jotta sillä voitaisiin saavuttaa kliinistä merkittävyyttä ja käytetty hiirilinja saattaa vaikuttaa mallin luotettavuuteen. Luotettavuutta on kuitenkin mahdollista parantaa lisäämällä mallin hiiriin eri riskitekijöitä ja ihmisen immuunijärjestelmän piirteitä (Deddens ym. 2017).

3.3.2 IRI Opa1-poistogeenisessä hiirimallissa

Opa1-poistogeenisellä hiirimallilla on mahdollista tutkia mitokondrion dynamiikan roolia sydänlihaksen IRI:ssä (Le Page ym. 2016). Aiemmat Opa1-geenin tutkimukset *in vivo* ovat tuottaneet ristiriitaisia tuloksia ja tämän tutkimuksen tarkoituksena olikin tutkia, mikä rooli geenillä on IRI:ssä. Lisäksi tutkimuksessa suoritettiin erilaisia mittauksia sydänlihassoluilla, jotka eristettiin eläinmallin hiiristä IRI:n aiheuttamisen jälkeen. Koska Opa1:n vajavaisen ekspression tiedetään aiheuttavan sydäntoiminnan heikentymistä hiirten vanhetessa, suoritettiin kaikki kokeet ennen tämän tapahtumista. IRI aiheutettiin samalla metodilla kuin edellisessä hiirimallissa. Iskeeminen jakso kesti 45 minuuttia ja reperfuusion pituus oli 120 minuuttia. Tämän jälkeen valmistettiin histologiset näytteet ja analysoitiin sydänvaurioita. Tutkimuksen tulosten perusteella todettiin Opa1:n suhteen heterozygoottien hiirten olevan herkempiä IRI:lle. Vaikka sydäninfarktien laajuus kasvoi, muutoksia ei havaittu MPTP:n avautumisherkkydessä. Lisäksi mittauksissa mitokondrion Ca^{2+} :n oton todettiin olevan heikentynyt, jota voi selittää natrium-kalsiumvaihtaja aktiivisuuden kasvu, joka mahdollisesti aiheuttaa epätasapainoa solun Ca^{2+} -virtauksissa (Le Page ym. 2016).

Lopulta jäi kuitenkin epäselväksi, miksi Opa1-geenin vajavainen ekspressio herkistää hiiret IRI:lle (Le Page ym. 2016). Yksi mahdollisuus on, että havaitut muutokset Ca^{2+} -virtauksissa ja natrium-kalsiumvaihtajan aktiivisuudessa selittävät tätä herkistymistä. Opa1-poistogeeninen hiirimalli on hyödyllinen mitokondrion dynamiikan roolin tutkimiseen IRI:ssä ja tämä tutkimus selitti hieman geenimutaation vaikutusta IRI:n mekanismeihin. Tämä hiirimalli sisältää samoja heikkouksia kuin aiemmin käsitelty malli. Lisäksi Opa1-geeniin aiheutettu mutaatio on voinut vaikuttaa moniin sellulaarisiiin prosesseihin ja tämä saattaa vaikuttaa mallilla saataviin tuloksiin (Le Page ym. 2016).

3.3.3 Seeprakalan toukkien IRI-malli

Toisin kuin huomattava osa nykyisistä malleista, tämä koe-eläinmalli ei hyödynnä nisäkkäitä vaan transgeenisen seeprakalalinjan toukkia (Zou ym. 2019). Aikuisilla seeprakaloilla on aiemmin todistettu sydämen IRI:n johtavan oksidatiiviseen stressiin ja solukuolemaan. Seeprakalan toukilla tätä ei ole kuitenkaan tehty paljoa ja tämän tutkimuksen tarkoitus olikin tutkia, voiko kalan toukilla mallintaa IRI:ä. Vauriota mallinnettiin pistämällä toukat 24-72 tunniksi hypoksiseen veteen, jonka jälkeen toukat siirrettiin happipitoiseen veteen. Tämän jälkeen toukkien sydämen toimintaa kuvattiin ja toukista mitattiin sydänvauriolla spesifisiä biomarkkereita. Tuloksista selvisi mallin onnistuneen tuottamaan IRI:lle tyypillisiä piirteitä. Altistus hypoksialle ja uudelleen hapetukselle laski seeprakalojen

sydäntoimintaa ja nosti sydänvauriospesifisten biomarkkereiden ekspressioita. Myös veren punasolujen määrä oli merkittävästi kohonnut (Zou ym. 2019).

Tutkimuksessa kehitetty malli on täysin uudenlainen tapa mallintaa IRI:ä *in vivo* ja sitä voidaan hyödyntää hoitojen toimivuuden arvioinnissa (Zou ym. 2019). Seeparakalamallin vahvuudet ovat sen kustannustehokkuus ja helppokäyttöisyys verrattuna muihin olemassa oleviin koe-eläinmalleihin. Seeparakalojen käytöllä on myös muita etuja, kuten kalojen läpinäkyvyys elinkaaren alussa ja suuri geneettinen ortologisuus ihmisen kanssa. Myös seeparakalan sydämen syke on samankaltainen kuin ihmisellä. Mallin heikkoutena on kuitenkin hypoksian toteutus, joka ei ole sydänspesifistä, vaan vaikuttaa koko alkioon. Lisäksi, toisin kuin nisäkkäiden, seeparakalojen sydän kykenee uudistumaan tehokkaasti vaurioituessaan (Zou ym. 2019). Tämäkin malli sisältää samankaltaisia heikkouksia kuin edellä käsitellyt koe-eläinmallit, kuten mallien populaatioiden yksipuolisuus ja riskitekijöiden puuttuminen.

4. Johtopäätökset

Sepelvaltimotauti on maailmanlaajuisesti merkittävä kuolinsyy, minkä takia sitä on tutkittu kattavasti. Nykyään tehokkain hoitokeino on reperfuusion suorittaminen mahdollisimman nopeasti sydäninfarktin tapahtumisen jälkeen. Jo vuosikymmeniä on tiedetty, että sydänlihaksen reperfuusio kuitenkin indusoi solukuolemaa aiheuttamalla reperfuusioauriota. Hoitokeinojen kehityksestä huolimatta nykyään ei ole edelleenkään tehokasta keinoa reperfuusioaurion estämiseen. Yhdessä sydäninfarktin alussa muodostuva iskeeminen vaurio ja verenkierron palautumisesta aiheutuva reperfuusioaurio johtavat yhdessä sydänlihaskudoksen IRI:iin. Lukuisista tutkimuksista tiedetään nykyään, että oksidatiivinen stressi, Ca^{2+} -ylimäärä ja pH:n nopea palautuminen ovat merkittävimmät IRI:n indusioijat. Näiden tekijöiden käynnistämät prosessit risteävät MPTP:n kohdalla, jonka avautuminen johtaa solukuoleman aktivaatioon. Vaikka IRI:n useat potentiaaliset hoitokeinot ovat osoittautuneet tehokkaiksi koe-eläin- ja solumalleilla, ovat useimmat kliiniset tutkimukset epäonnistuneet. Merkittävimmäksi syyksi tähän on epäilty käytettyjä malleja, jotka epäonnistuvat kliinisen asetelman monimuotoisuuden mallintamisessa. Useimmat mallit koostuvat homogeenisestä, terveellisestä ja nuoresta populaatiosta, kun taas todellisuudessa IRI:stä kärsivät potilaat ovat iäkkäitä ja sairastavat riskitekijöitä. Kehitys hiPS-solujen saralla on viime vuosina mahdollistanut uusien solumallien kehitykseen, joilla voidaan mallintaa ihmisen IRI:ä. Ihmissolujen käyttö mahdollistaa myös riskitekijöiden ja geneettisen taustan huomioimisen malleissa. Tässä työssä esitelty solumallit eivät tätä mahdollisuutta hyödyntäneet, mutta kehittämällä niitä lisää nämä seikat on mahdollista saada malleihin. Lisäksi vaikka uudetkaan solumallit eivät kykene mallintamaan sydänlihaskudoksen rakennetta ja lukuisten

solutyyppien vuorovaikutuksia, ovat ne kuitenkin merkittävä edistysaskel ja antavat paremman asetelman uusien hoitokeinojen tutkimukselle. Tästä kehityksestä huolimatta on kuitenkin tarvetta koe-eläinmalleille, koska solumalleilla saatavat tulokset on validoitava ennen kliinisiä tutkimuksia. Myös koe-eläinmallien tulisi ottaa huomioon kliininen asetelma. Tässä työssä käsitellyt koe-eläinmallit eivät tätä vaatimusta täyttäneet, mutta ne ovat kuitenkin hyödyllisiä uusien hoitokeinojen ja lääkkeiden vaikutusten arvioinnissa. Kokonaisuudessaan tätä aihetta on tärkeä tutkia lisää, koska se avaa uusia mahdollisuuksia hoitokeinojen kehitykselle. Yksi tärkeä tutkimuksen kohde on edelleen MPTP, jolla on keskeinen rooli solukuoleman aktivaatiossa. Nykyisestä MPTP-inhibiittorista CsA:sta on saatu ristiriitaisia tuloksia ja yksi mahdollinen selitys on tälle se, ettei se ole spesifinen itse kanavalle vaan CypD:lle. MPTP:n molekulaarisen rakenteen selvittäminen mahdollistaisi parempien inhibiittoreiden suunnittelun, jotka vähentäisivät IRI:ä merkittävästi. Tällöin sydämen toimintakyky ei heikentyisi merkittävästi ja tämä parantaisi sydäninfarkti potilaiden ennustetta.

5. Lähdeluettelo

Adameova A, Goncalvesova E, Szobi A, ym. Necroptotic cell death in failing heart: relevance and proposed mechanisms. *Heart Failure Reviews* 2016;21(2):213–221.

Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radical Biology and Medicine* 2018;117:76–89.

Chen T, Vunjak-Novakovic G. Human Tissue-Engineered Model of Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury. *Tissue Engineering Part A* 2019a;25(9-10):711–724.

Chen T, Vunjak-Novakovic G. In Vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* 2018b;4(3):142–153.

Deddens JC, Feyen DA, Zwetsloot PP, ym. Targeting chronic cardiac remodeling with cardiac progenitor cells in a murine model of ischemia/reperfusion injury. *PLoS ONE* 2017;12(3):e0173657

Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation* 2013;123(1): 92–100.

Hidalgo A, Glass N, Ovchinnikov D, ym. Modelling ischemia-reperfusion injury (IRI) in vitro using metabolically matured induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *APL Bioengineering* 2018;2(2):026102.

Hou J, Wang L, Jiang J, ym. Cardiac Stem Cells and their Roles in Myocardial Infarction. *Stem Cell Reviews and Reports* 2013;9(3):326–338.

Kalogeris T, Baines C.P, Krenz M, ym. Ischemia/Reperfusion. *Comprehensive Physiology* 2016;7(1):113–170.

- Le Page S, Niro M, Fauconnier J, ym. Increase in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injuries in Opa1^{+/-} Mouse Model. *PLoS ONE* 2016;11(10):e0164066.
- Lindsey M, Bolli R, Canty J, ym. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2018;314(4):H812–H838.
- Matsushima S, Kuroda J, Ago T, ym. Broad Suppression of NADPH Oxidase Activity Exacerbates Ischemia/Reperfusion Injury Through Inadvertent Downregulation of HIF-1 α and Upregulation of PPAR α . *Circulation Research* 2013;112(8):1135–1149.
- Moe G, Marín-García J. Role of cell death in the progression of heart failure. *Heart Failure Reviews* 2016;21(2):157–167.
- Ong S, Samangouei P, Kalkhoran SB, ym. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2015;78:23–34.
- Sebastião MJ, Gomes-Alves P, Reis I, ym. Bioreactor-based 3D human myocardial ischemia/reperfusion in vitro model: a novel tool to unveil key paracrine factors upon acute myocardial infarction. *Translational Research* 2020;215:57–74.
- Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, ym. Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(20):5034
- Wu M, Yiang G, Liao W, ym. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018;46(4):1650–1667.
- Yu H, Lu K, Zhu J, ym. Stem cell therapy for ischemic heart diseases. *British Medical Bulletin* 2017;121(1):135–154.
- Zhang Y, Murugesan P, Huang K, ym. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nature Reviews. Cardiology* 2020;17(3):170–194.
- Zou X, Liu Q, Guo S, ym. A Novel Zebrafish Larvae Hypoxia/Reoxygenation Model for Assessing Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Zebrafish* 2019;16(5):434–442.