

**NA_v1.5-KANAVAN P.I141V-MUTAATION VAIKUTUS
SYDÄNLIHASSOLUJEN SYKKEESEEN SOLUVILJELYOLOISSA**

Jalmari Tuominen

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Joulukuu 2015

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö

JALMARI TUOMINEN: NAV1.5-KANAVAN P.I141V-MUTAATION VAIKUTUS
SYDÄNLIHASSOLUJEN SYKKEESEEN SOLUVILJELYOLOISSA

Kirjallinen työ,
Ohjaaja: professori Katriina Aalto-Setälä.

Joulukuu 2015

Avainsanat: iPS, SCN5A, rasituksen aiheuttamat kammiolisälyönnit

Sydämen syke perustuu sydänlihassolujen solukalvon lävitse tapahtuviin hallittuihin ja tarkasti säädeltyihin elektrolyyttivirtoihin, jotka aiheuttavat aktiopotentiaaliksi kutsutun ilmiön. Tärkeimmät aktiopotentiaaliin osallistuvat elektrolyytit ovat natrium-, kalsium- ja kaliumionit. Natriumvirta saa aikaan aktiopotentiaalin nopean nousuvaiheen, kalsiumvirta lihassupistuksen ja kalium lopulta lepojännitteen palautumisen ja siten relaksaation.

SCN5A-geeni koodittaa sydänlihassoluissa ekspressoituvaa jänniteherkkää $Na_v1.5$ -natriumkanavaa, joka on natriumioneiden tärkein reitti T-putkesta sydänlihassolun sytoplasmaan. *SCN5A*-geenin mutaatioiden tiedetään liittyvän useisiin vakaviin sydänsairauksiin, kuten pitkä QT oireyhtymän alatyypin 3:een (LQT3), Brugada syndroomaan, sydämen johtumishäiriöön, dilatoivaan kardiomyopatiaan, eteisten sähköiseen toimimattomuuteen ja kätkytkuolemaan. Hiljattain on raportoitu myös $Na_v1.5$ -kanavan p.I141V-mutaation kyvystä aiheuttaa rasituksen yhteydessä ilmeneviä kammiolisälyönnejä. Tällä tutkimuksella oli kaksi tavoitetta: 1) tutkia miten $Na_v1.5$ -kanavan p.I141V-mutaatiota kantavat solut sykkivät *in vitro* suhteessa terveeseen solulinjaan sekä 2) selvittää ilmeneekö niissä adrenaliinin läsnäollessa rytmihäiriöitä.

Tutkimusaineisto koostui mutaation kantajaksi varmistetun yksilön ihonäytteen fibroblasteista valmistetuista sydänlihassoluista. Sydänlihassolut valmistettiin uudelleenohjelmoimalla fibroblastit ensin iPS-soluiksi ja sitten erilaistamalla iPS-solut sykkiviksi sydänlihassoluiksi. Sydänlihassolujen tutkimiseksi käytimme videointilaitteistoa, Beatview-ohjelmistoa sekä adrenaliinia.

$Na_v1.5$ -kanavan p.I141V-mutaatiota kantavat solut käyttäytyivät jo lepotilanteessa poikkeuksellisesti. Kyseisten solujen spontaanien syketaajuuksien keskiarvo oli noin 50 % verrokipopulaation syketaajuuksien keskiarvoa matalampi. Samoin epänormaalisti sykkivien solujen osuus oli mutaatiota kantavilla soluilla verrokkeja tilastollisesti merkitsevästi suurempi. Ikävä kyllä adrenaliinivasteet peittyivät elatusaineessa tapahtuvista pH:n, lämpötilan ja kosteuden muutoksista johtuvan syketaajuuden laskun alle. Tämä tutkimus osoitti, että perfuusiojärjestelmä on välttämätön työkalu, kun tutkimuksessa käytetään syketaajuuteen vaikuttavia lääkkeitä.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
1.1	Sydänlihassolun elektrofysiologia	1
1.1.1	Aktiopotentiali.....	1
1.1.2	Automatia.....	2
1.2	Sydämen natriumaineenvaihdunta	3
1.2.1	<i>SCN5A</i> -geeni.....	3
1.2.2	Na _v 1.5-kanava	3
1.2.3	p.I141V-mutaatio	4
1.3	Kammiolisäyönnit, kammiotakykardia ja kammiovärinä.....	4
1.4	iPS-solut.....	5
2	TUTKIMUSMETODI	6
2.1	Aineisto	6
2.2	Menetelmät	6
2.2.1	iPS-solujen valmistus ja sydänlihassolujen erilaistaminen.....	6
2.2.2	Laitteet ja ohjelmistot	6
2.2.3	Solujen videointi	7
2.2.4	Adrenaliinikokeet.....	8
2.2.5	Olosuhdemuutuskokeet.....	9
2.2.6	Tilastolliset analyysit	9
3	TULOKSET	9
3.1	Syketyyppien laadullinen tarkastelu	9
3.2	Adrenaliinikokeet.....	11
3.3	Olosuhdemuutuskokeet.....	13
4	POHDINTA	14
4.1	Tärkeimmät tulokset	14
4.2	Tulevaisuuden suunnitelmia	14
5	JOHTOPÄÄTÖKSET	15
6	LÄHTEET	16

TAULUKOT

Taulukko 1. Adrenaliinikokeiden tulokset.	12
Taulukko 2. Adrenaliinikokeiden vakioidut tulokset.	12
Taulukko 3. Olosuhdemuutuskokeiden tulokset	13

KUVAT

Kuva 1. Aktiopotentiaalin solukalvojäännitemuutokset sekä ionivirrat	2
Kuva 2. Nav1.5-kanavan rakenne avattuna solukalvolla.	4
Kuva 3. Adrenaliinikokeiden kulkua havainnollistava aikajana.	8
Kuva 4. Luokittelun tulokset sekä syketaajuudet.....	10
Kuva 5. Sykealatyypiesimerkit Beatview-ohjelmistolla havainnollistettuna.....	11
Kuva 6. Adrenaliinikokeiden vakioidut keskiarvot ja keskihajonnat.	12
Kuva 7. Olosuhdemuutuskokeiden vakioidut tulokset.....	13

LYHENTEET

CPVT	katekoliamiiniherkkä polymorfinen kammiotakykardia (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia)
LQTS	pitkä QT-oireyhtymä (long QT syndrome)
LQT3	LQTS alatyyppeistä 3
BrS	Brugada syndrooma
SCN5A	jänniteherkkää natriumkanavaa koodava geeni (sodium channel, voltage gated, type V alpha subunit)
Na _v 1.5	jänniteherkkä natriumkanava
iPS	uudelleen ohjelmoitu erittäin monikyinen kantasolu eli indusoitu pluripotentti kantasolu (induced pluripotent stem cell)
p.I141V	mutaatio, jossa proteiinisekvenssin 141. aminohappo on vaihtunut isoleusiinista valiiniksi
WT-solulinja	terve solulinja (wild type)
SCN5A-solulinja	Na _v 1.5-kanavan p.I141V-mutaatiota kantava solulinja
TdP	käännyvien kärkien kammiotakykardia (torsades de pointes)
DCM	dilatoiva kardiomyopatia (dilatating cardiomyopathy)

1 JOHDANTO

Sydän on nelilokeroinen elin, jonka tehtävä on veren kierrättäminen elimistössä. Sen toiminta perustuu sydänlihaksessa johtoratajärjestelmään välityksellä leviäviin aktiopotentiaaleihin, jotka saavat alkunsa sinussolmukkeesta. (1,2)

1.1 Sydänlihassolun elektrofysiologia

1.1.1 Aktiopotentiaali

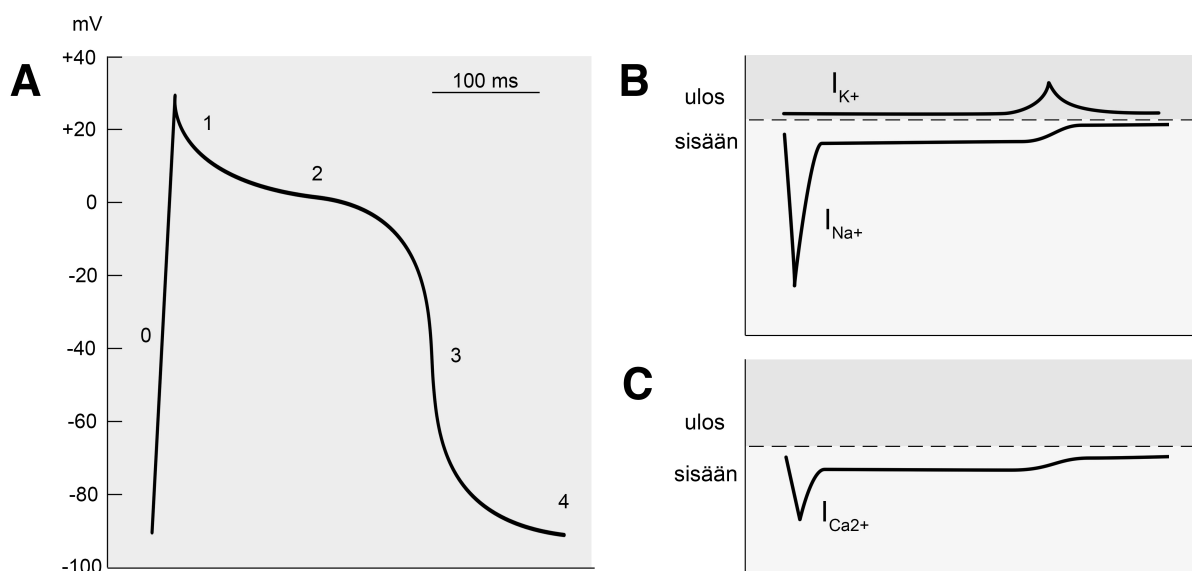
Aktiopotentiaalilla tarkoitetaan solukalvolla etenevää sähköisen latauksen aaltoa, joka perustuu ionikanavien kautta hallitusti tapahtuviin elektrolyyttivirtoihin (1). Aktiopotentiaaliin osallistuvat elektrolyytit ovat natrium-, kalsium- ja kaliumionit, joista kullekin on solukalvolla omat ionikanavansa (1). Aktiopotentiaaleja esiintyy hermo- ja sydänlihassoluissa (1). Sydänlihassoluissa aktiopotentiaali saa aikaan kalsiumin vapautumisen solunsisäisistä varastoista ja siten lihassupistuksen (1). Tähän perustuu sydämen mekaaninen pumppaustoiminta. Tässä yhteydessä puhumme aktiopotentiaalista nimenomaan sydänlihassoluissa.

Sydänsolun aktiopotentiaali voidaan jakaa viiteen vaiheeseen, jotka ovat 0) nopean nousun vaihe 1) nopean repolarisaation vaihe, 2) plateuvaihe, 3) repolarisaatiovaihe ja 4) lepopotentiaali (1). (Kuva 1)

Lepotilassa sydänlihassolun kalvojännite on noin -90 mV (2). Kalvojännitteen pienentyessä -60 mV:n tapahtuu välitön depolarisaatio (vaihe 0) (2). Tämän kynnysjännitteen ylittyminen johtaa jänniteherkkien natriumkanavien aukeamiseen, joka mahdollistaa positiivisesti varautuneiden natrium-ioneiden virtauksen sytoplasmaan (kts. kpl 1.2.1) (2). Natriumkanavien lävitse tapahtuvan ionivirran ansiosta sydänlihassolun kalvojännite nousee nopeasti +30 mV:iin, jolloin natriumkanavat sulkeutuvat (2). Paikallinen jännitemuutos laukaisee myös viereiset natriumkanavat, jotka edelleen levittävät jännitemuutosta pitkin solukalvoa (1). Aukkoliitosten välityksellä aktiopotentiaali etenee kammiolihaksessa sydänlihassolusta toiseen saavuttaen viimeisenkin solun noin 100 ms:ssa (1).

Depolarisaation saavutettua huippunsa natriumvirta pysähtyy ja repolarisaatio alkaa (vaihe 1) (1). Repolarisaatiolla tarkoitetaan kalvopotentiaalin palautumista kohti negatiivista lepopotentiaalia (1). Nopeiden natriumkanavien sulkeuduttua solunsisäinen kalium alkaa välittömästi virrata ulos ja

vastaavasti solunulkoinen kloridi sisään (2). Tämä aiheuttaa aktiopotentialikäyrässä nähtävän notkahduksen (2). Huomionarvoisempaa on kuitenkin L-tyypin jänniteherkkien kalsiumkanavien aukeaminen, joka mahdollistaa kalsiumionien virtauksen sytoplasmaan (1). Sytoplasmassa kalsiumionit aktivoivat sarkoplastisen kalvoston ryanodiinireseptorin, joka vapauttaa solunsisäiset kalsiumvarastot (1). Tämä kalsiumvirta on riittävän voimakas aiheuttamaan troponiinimolekyylissä myosiinin sitoutumiseen vaadittavat konformaatiomuutokset ja siten aloittamaan solun supistumisen (2). Vaiheen kaksi aikana sisäänpäin suuntautunut kalsiumvirta ja ulospäin suuntautunut kaliumvirta tasapainottavat toisiaan ja repolarisaatio on suhteellisen hidasta (2). Aktiopotentialikäyrässä tämä havaitaan selkeänä tasanteena. Tasannevaiheen jälkeen alkaa kaliumvirta kasvamaan ja sen myötä repolarisaatio nopeutuu (vaihe 3) (2). Kaliumkanavat sulkeutuvat, kun lepotentiaali (-90 mV) on saavutettu (1). Lopulta lepotilan ionikonsentraatiot palautetaan Na^+/K^+ -vaihtajalla ja Ca^{2+} -pumpulla ATP:tä käyttäen (vaihe 4).



Kuva 1. Aktiopotentialin solukalvojännitemuutokset sekä ionivirrat sydämen kammiolihasoluissa.

A) Aktiopotentialin eri vaiheet. y-akselilla solukalvojännite, x-akselilla aika. Numerot kuvaavat aktiopotentialin vaihteita seuraavalla tavalla: 0) nopea depolarisaatio, 1) repolarisaatio, 2) tasannevaihe, 3) nopea repolarisaatio ja 4) lepotentiaali.

B) Natrium- ja kaliumvirrat ajan funktiona aktiopotentialin eri vaiheissa.

C) Kalsiumvirta ajan funktiona aktiopotentialin eri vaiheissa. (1,2)

1.1.2 Automatia

Toisin kuin hermosolu, sydänlihassolu ei tarvitse ulkoista stimulaatiota aktiopotentialin laukaisijana. Sen sijaan toistuvista aktiopotentiaaleista sydämessä vastaa elimistön oma tahdistin, sinussolmuke

(2). Sinussolmukkeen P-solujen spontaanit aktiopotentiaalit perustuvat vuotaviin kalsiumkanaviin (ns. funny current), jotka johtavat toistuviin diastolisiin depolarisaatioihin (2). On huomionarvoista, että sinussolmukkeen kalvojännitteen muutos kohti positiivista tapahtuu ainoastaan kalsiumkanavien välityksellä, eikä muissa sydänlihassoluissa tavattavia nopeita natriumkanavia ole sinussolmukkeen P-soluissa lainkaan (1). Ilman hermostollista tai humoraalista vaikutusta sinussolmukkeen aktiopotentiaalitaajuus on noin 60/min (1). Sinussolmuke tahdistaa oikeasta eteisestä käsin koko sydämen johtoratajärjestelmän välityksellä (1).

1.2 Sydämen natriumaineenvaihdunta

1.2.1 *SCN5A*-geeni

SCN5A-geeni on $Na_v1.5$ -kanavaa koodittava geeni, joka sijaitsee kromosomissa 3p21(3). Se kuuluu natriumkanavageeniperheeseen yhdessä *SCN1A-SCN4A* sekä *SCN8A-SCN11A*-geenien kanssa (1). Vuodesta 1995 lähtien liki 200 *SCN5A*-geenin pistemutaatiota on kytketty johonkin sydänsairauteen (4). Näitä sairauksia ovat pitkä QT-oireyhtymä (LQT), dilatoiva kardiomyopatia (DCM), eteisvärinä, sairas sinus –oireyhtymä, sydämen johtumishäiriö, Brugada oireyhtymä (BrS), kätkeytuolema sekä imeväisen äkkikuolema (4). Vuoden 2014 lopulla dosentti Heikki Swan tutkimusryhmineen raportoi uudesta *SCN5A*-geenin pistemutaatiosta, jonka hän osoitti olevan yhteydessä rasituksessa esiintyviin kammiotakykardiakohtauksiin (5). Kyseinen mutaatio johtaa isoleusiinin korvautumiseen valiinilla $Na_v1.5$ -kanavan aminohapposekvenssin 141. asemassa (p.I141V) (5).

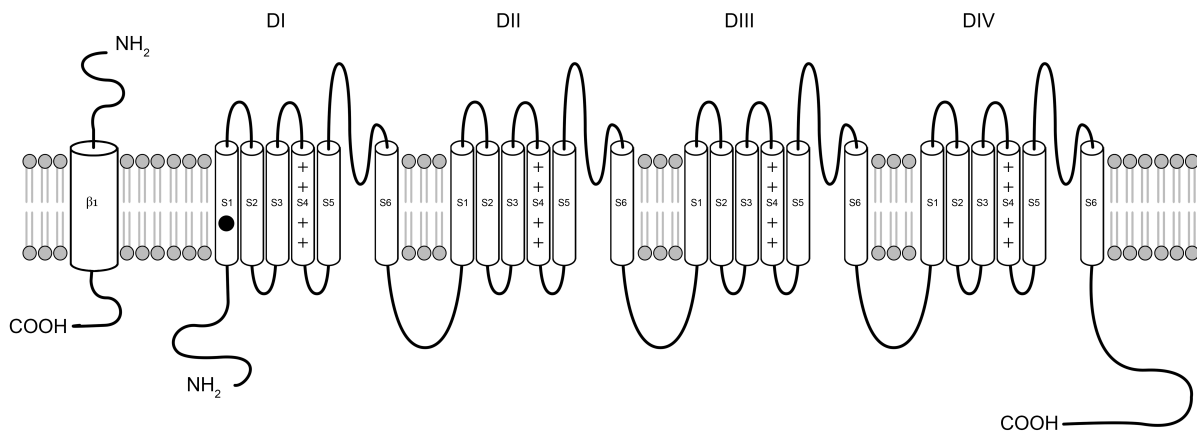
1.2.2 $Na_v1.5$ -kanava

Kuten aiemmin todettu, sydänlihassolun nopean aktiopotentiaalilin depolarisaatiovaihe tapahtuu $Na_v1.5$ -kanavan kautta tapahtuvan natriumvirran ansiosta (1). $Na_v1.5$ -kanava (Kuva 2) koostuu neljästä osasta (DI-DIV) ja kukin osa edelleen kuudesta membraanin läpäisevästä α -kierteestä (S1-S6) (1). Proteiini laskostuu solukalvolle siten, että segmentit S5-S6 muodostavat varsinaisen ionikanavan, segmentit S1-S3 muodostavat ulkokuoren ja jänniteherkät S4-segmentit sijaitsevat näiden välissä (6). Ionikanavakokonaisuuteen kuuluu myös neljä yksittäistä alfa-kierrerakennetta,

joita nimitetään β 1-4 rakenteiksi ja jotka osallistuvat varsinaisen ionikanavan toiminnan säätelyyn (6). $\text{Na}_v1.5$ -kanavaa kooditaa *SCN5A*-geeni (1).

1.2.3 p.I141V-mutaatio

$\text{Na}_v1.5$ -proteiinin p.I141V-mutaatiossa proteiinisekvenssin aminoterminaalista päästä laskettuna 141. aminohappo on vaihtunut isoleusiinista valiiniksi (Kuva 2) (5). Mutaatio johtaa merkittäviin muutoksiin sekä $\text{Na}_v1.5$ -kanavan rakenteessa että fysiologiassa (5). Mutaation seurauksena kanavan läpäisevyys kasvaa, joka siten altistaa kammiolisälyönneille sekä kammiovärinälle (5).



Kuva 2. $\text{Nav}1.5$ -kanavan rakenne avattuna solukalvolla. p.I141V-mutaation sijainti merkitty mustalla ympyrällä. $\text{Nav}1.5$ -proteiini koostuu neljästä samankaltaisesta osasta (DI-DIV), joista kukin koostuu kuudesta alfakierrerakenteesta (S1-S6). Varsinaisen kanavaproteiinin lisäksi kompleksiin kuuluu myös neljä kanavan toimintaan osallistuvaa proteiinia (β 1-4), joista kuvaan on merkitty ensimmäinen.

1.3 Kammiolisälyönnit, kammiotakykardia ja kammiovärinä

Kammiolisälyönnit johtuvat sinussolmukkeen ulkopuolelta kammioiden puolelta alkunsa saaneista depolarisaatioaaltoista (7). Nämä aktivaatiot tapahtuvat normaalista sinusrytmistä riippumattomasti ja aiheuttavat ylimääräisen, ennenaikaisen sydänlihaksen supistumisen (2). EKG:ssä havaitaan poikkeuksellisen leveä QRS-kompleksi, jota ei edellä P-aalto ja jota seuraa käänteinen T-aalto (2). Syntypaikkansa mukaan kammiolisälyönnit voidaan jakaa unifokaaliseen ja multifokaaliseen

alatyyppeihin (2). Nimensä mukaisesti unifokaaliset lisälyönnit saavat alkunsa aina samasta paikasta, kun taas multifokaalisten lisälyöntien synty paikka vaihtelee (2). Terveessä sydämessä levon aikana esiintyvät kammiolisälyönnit ovat yleisiä ja niitä pidetään harmittomina, vaikka ne saattavatkin aiheuttaa epämiellyttävän muljahduksentunteen rinnan alueella (8). Kliinisesti tärkeitä ovat rasituksessa esiintyvät kammiolisälyönnit, jotka ovat tyypillisiä monissa perinnöllisissä rytmihäiriöissä, kuten LQT:ssa, BrS:ssa sekä katekoliamiiniherkässä monimuotoisessa kammiotakykardiassa (CPVT) (5). Tällaiset kammiolisälyönnit ovat hengenvaarallisia, sillä ne altistavat kammiotakykardialle (ns. kääntyvien kärkien kammiotakykardiassa (TdP)), ja mahdollisesti kammiövärinälle (5). Kammiövärinä johtaa verenpaineen romahtamiseen, tajunnanmenetykseen ja kuolemaan ilman ulkoisia elvytystoimenpiteitä (5).

1.4 iPS-solut

Vuonna 2007 Shinya Yamanaka osoitti tutkimusryhmineen, että aikuisen somaattinen solu on mahdollista palauttaa erittäin monikykyiseksi kantasoluksi viemällä soluihin virusvektorin avulla neljä alkion kantasoluille tärkeää transkriptiotekijää (9). Nämä keinotekoiset alkion kantasolujen tavoin käyttäytyvät solut nimettiin uudelleenohjelmoituiksi kantasoluiksi (induced pluripotent stem cells, iPS). iPS-solut kykenevät jakautumaan rajattomasti sekä muodostamaan kaikkia elimistön solutyyppejä alkion kantasolujen tavoin (9). iPS-soluja voidaan kuitenkin valmistaa esimerkiksi mutaatiota kantavan potilaan ihonäytteen fibroblasteista ja näin tuotetut solut edelleen erilaistaa halutuksi toimivaksi solukoksi. Näin mutaation sisältävä genotyyppi säilyy ja tautifenotyyppiä on mahdollista tutkia laboratorio-oloissa. Tämä on osoittautunut erinomaiseksi välineeksi erityisesti sydänsairauksia tutkittaessa. Kypsiä sydänlihassolujen hankkimiseksi vaadittava sydänbiopsia ei ole riskitön toimenpide ja näin ollen toimivien potilasspesifisten sydänlihassolujen saaminen puhtaasti tutkimuskäyttöön on ollut hyvin rajoitettua. Lisäksi potilaasta otetut kypsät kardiomyosyytit sykkivät *in vitro* vain rajoitetun ajan, joka osaltaan vaikeuttaa niillä tehtävää tutkimusta merkittävästi. iPS-solut tarjoavat turvallisen, eettisen ja käytännöllisen vaihtoehdon suoraan sydänbiopsiasta peräisin oleville kypsille kardiomyosyyteille.

2 TUTKIMUSMETODI

2.1 Aineisto

Aineisto koostui *SCN5A*-geenin p.I141V-mutaatiota kantavan yksilön ihonäytteen fibroblasteista iPS-soluteknologialla ja pienmolekyyliomenetelmällä tuotetuista sykkivistä kardiomyosyyteistä (solulinja *UTA.11705.SCN5A*) sekä terveeseen yksilön samoin menetelmin käsitellyistä verrokkisoluista (solulinjat *UTA.14511.WT* sekä *UTA.04602.WT*). Tutkimuksessa käytetyt iPS-solut valmistettiin BioMediTechillä Tampereen Yliopistossa Pirkanmaan sairaanhoitopiirin luvalla (R08070). Tutkimukseen osallistuneilta henkilöiltä pyydettiin kirjallinen suostumus ennen ihonäytteen ottamista. Tässä raportissa *UTA.11705.SCN5A*-solulinjan soluihin viitataan tästedes *SCN5A*-soluina ja *UTA.14511.WT*- sekä *UTA.04602.WT*-solulinjojen soluihin WT-soluina.

2.2 Menetelmät

2.2.1 iPS-solujen valmistus ja sydänlihassolujen erilaistaminen

Tässä tutkimuksessa hyödynnettiin ryhmässämme aiemmin valmistettuja iPS-soluja. iPS-solut valmistettiin altistamalla ihonäytteellä hankitut fibroblastit virusvektorin avulla neljälle transkriptiofaktorille, jotka olivat Oct4, Sox2, c-myc ja Klf4 (9). Tämän jälkeen iPS-solut uudelleenerilaistettiin kardiomyosyyteiksi ns. pienmolekyyliomenetelmää käyttäen. Pienmolekyyliomenetelmä on tehokas erilaistusmenetelmä, jossa iPS-solut erilaistetaan kardiomyosyyteiksi seerumi- ja kasvutekijävapaissa olosuhteissa säätelemällä Wnt-signaalireittiä pienmolekyyleillä (10).

2.2.2 Laitteet ja ohjelmistot

Solut videoitiin käyttäen Nikon Eclipse TS100 –mikroskooppia okulaarina C-10xB/22 ja objektiivina 20x/0.40 Ph1 ADL (Nikon, Japani, Tokio). Mikroskooppiin oli kytkettynä lämpölevy. Videoiden

tallennus tapahtui Imperx IGV-B1620M-KC000-kameralla (Imperx, Yhdysvallat, Florida). Kameraa hallinnoitiin JAI Control Tool -ohjelmistolla.

Videoinnin jälkeen käytimme solujen sykkeen analysoinnin apuvälineenä Beatview-ohjelmistoa (versio 1.12). Beatview tuottaa solun supistumis- ja rentoutumisnopeuden kuvaajan ajan funktiona sekä laskee useita solun supistustoimintaa kuvaavia tunnuslukuja. Ohjelmisto on suunniteltu yksittäisten sydänlihassolujen supistustoiminnan analysoimiseksi, mutta mahdollistaa myös solurykelmien tutkimisen. Se on kehitetty Tampereella Sydänryhmän (Tampereen yliopisto) ja Laskennallisen biofysiikan ja kuvantamisen ryhmän (Tampereen teknillinen yliopisto) yhteistyönä.

2.2.3 Solujen videointi

Ennen videointia solut dissosioitiin eli irroitettiin mekaanisesti sekä kasvatusmaljastaan että toisistaan. Tämä mahdollisti yksittäisten solujen kuvaamisen ja analysoimisen. Dissosioidut solut siirrettiin uudelle maljalle koostumukseltaan seuraavanlaiseen elatusaineeseen:

77,5 %	KO-DMEM
20 %	FBS
1 %	NEAA
1 %	Glutamax
0,5 %	Pen/Strep

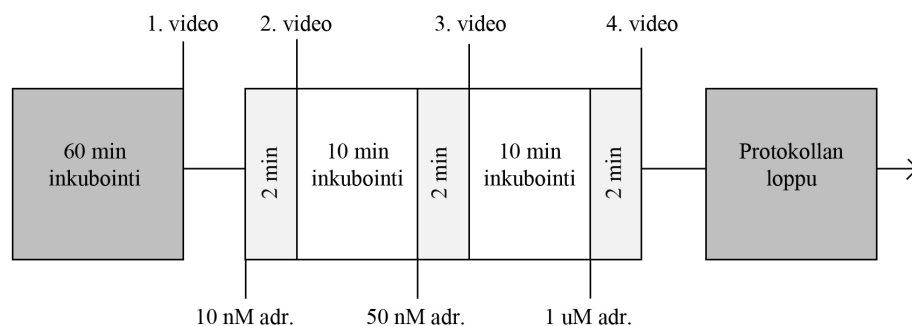
Dissosioinnin jälkeen solujen annettiin laskeutua elatusmaljan pohjalle ja kiinnittyä siihen, jonka jälkeen solut muuttuivat kuvauskelpoisiksi. Tämä kesti 2-3 päivää. Elatusaine vaihdettiin viikoittain soluille välttämättömien ravinteiden takaamiseksi sekä adrenaliinikokeita edeltävästi. Adrenaliinikokeissa käytetty elatusaine oli muutoin identtinen yllä kuvatun kanssa, mutta sen FBS-pitoisuus oli 5 % ja vastaavasti KO-DMEM-pitoisuus 92,5 %. Matalammalla FBS-pitoisuudella pyrittiin välttämään adrenaliinin liiallinen sitoutuminen seerumin proteiineihin.

Kunkin videon kesto oli kaikissa kokeissamme 30 sekuntia, kuvataajuus 60 fps (frames per second) ja koko 1608 x 604 pikseliä. Videointi tapahtui kappaleessa 2.2.2 kuvatulla laitteistolla ja mikroskoopin lämpölevy oli asetettu lämpötilaan 38 °C fysiologisen 37 °C:een saavuttamiseksi solumaljalla.

2.2.4 Adrenaliinikokeet

Tutkimuksemme toisena tavoitteena oli selvittää aiheuttaako adrenaliini *SCN5A*-soluissa rytmihäiriötä. Tätä tutkiaksemme altistimme kahdeksan sekä *SCN5A*- että WT-solulinjan solua kolmelle eri adrenaliinikonsentraatiolle, jotka olivat 10 nM, 50 nM ja 1 µM. Nämä konsentraatiot valittiin tutkimusryhmämme aiempien kokemusten perusteella (julkaisematon data). Verroksi suoritimme vastaavan protokollan myös ilman adrenaliinia siten, että kahdeksan WT-solun elatusaineeseen pipetoitiin vastaavat tilavuudet pelkkää steriiliä vettä. Hypoteesimme mukaan adrenaliini nostaa yksittäisten solujen syketaajuutta ja konsentraation kasvaessa provosoi rytmihäiriötä.

Käytännössä koejärjestely eteni seuraavalla tavalla. Kappaleessa 2.2.3 esiteltyjen esivalmistelujen jälkeen valitsimme analyysin kannalta riittävän hyvin sykkivän solun ja merkitsimme sen. Tämän jälkeen valitun kaivon elatusaine vaihdettiin kappaleessa 2.2.3 kuvatulla tavalla. Elatusaineen vaihdon jälkeen kuoppalevy palautettiin inkubaattoriin 60 minuutiksi, jotta solu sai tottua aiheutettuun ympäristönmuutokseen. Inkuboinnin jälkeen solusta tallennettiin välittömästi ensimmäinen video. Tämän jälkeen solumaljalle lisättiin ensimmäinen adrenaliiniannos ja kun adrenaliinilisäyksestä oli kulunut kaksi minuuttia, tallennettiin toinen video. Tämän jälkeen solu palautettiin inkubaattoriin 10 minuutiksi ja koetta jatkettiin kuvan 3 osoittamalla tavalla.



Kuva 3. Adrenaliinikokeiden kulkua havainnollistava aikajana.

2.2.5 Olosuhdemuutokset

Elatusaineessa tapahtuvat kemialliset ja fysikaaliset muutokset vaikuttavat solujen syketaajuuteen. Kontrolloidaksemme tätä adrenaliinikokeidemme sekoittavaa tekijää halusimme selvittää, missä määrin syketaajuus muuttuu inkubaattorista poistamisen jälkeen. Tämä toteutettiin seuraavalla tavalla. Solumalja poistettiin inkubaattorista ja asetettiin mikroskoopin lämpölevylle. Välittömästi lämpölevylle asettamisen jälkeen solusta videoitiin 30 sekunnin tallenne, jonka jälkeen videointi toistettiin 4 minuutin ja 30 sekunnin välein 40 minuutin ajan siten, että kustakin solusta kertyi 9 tallennetta. Tallenteiden avulla kunkin aikapisteen hetkellinen syketaajuus laskettiin. Koe toistettiin yhteensä neljälle WT-solulle, joiden syketaajuuksista laskettiin keskiarvot.

2.2.6 Tilastolliset analyysit

Sykealatyypitulosten tilastollinen merkitsevyys tutkittiin Pearsonin X^2 -testillä ja syketaajuuksien keskiarvojen erotusten tilastollinen merkitsevyys epäparametrisella Mann-Whitneyn U-testillä. Tilastolliset analyysit suoritettiin IBM SPSS Statistics 23 –ohjelmistolla (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

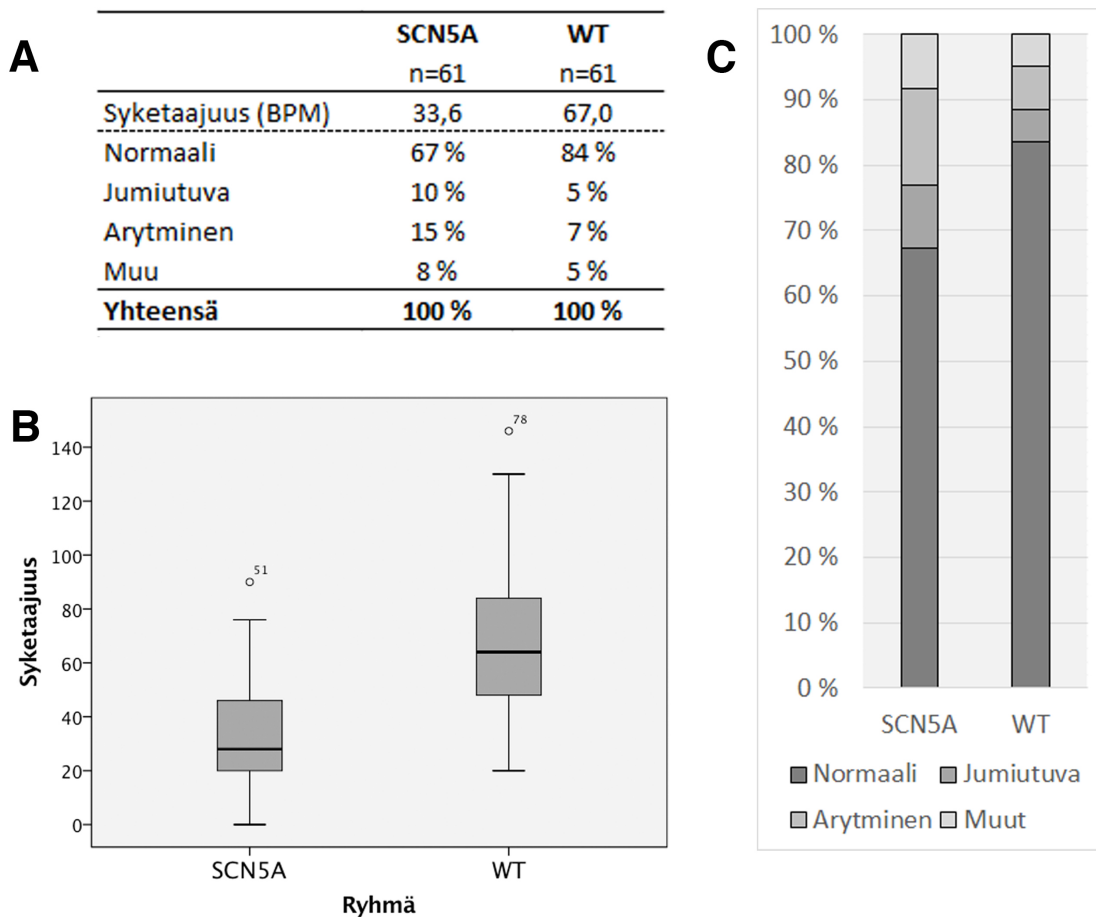
3 TULOKSET

3.1 Syketyyppien laadullinen tarkastelu

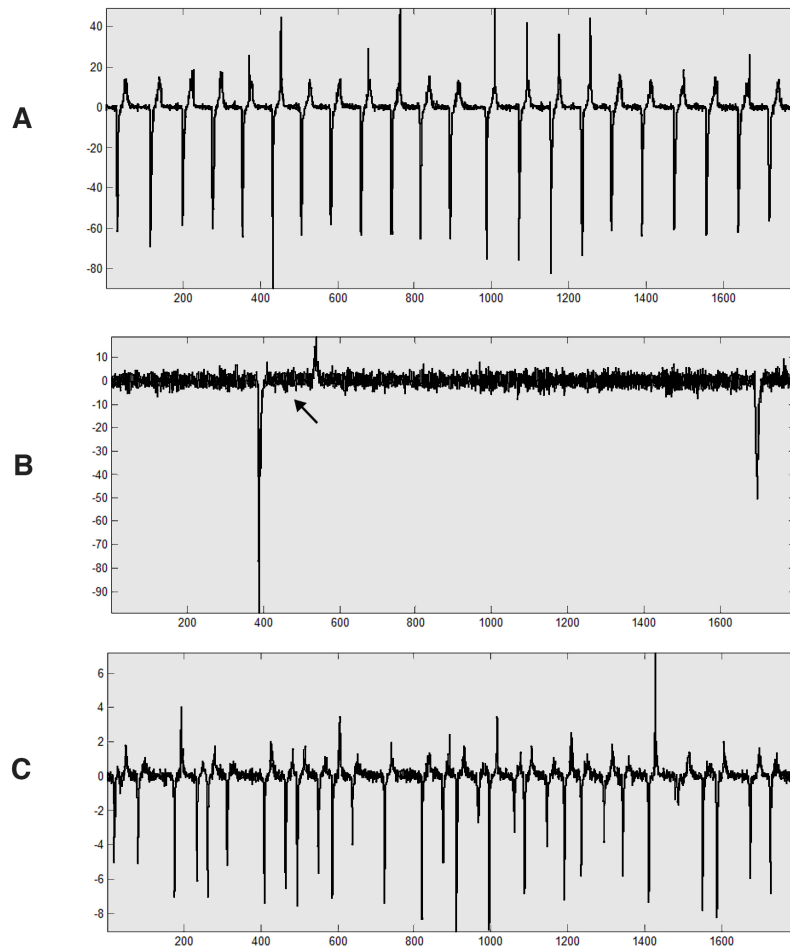
Beatview-ohjelmiston käyttö *SCN5A*-solujen analysoimiseksi osoittautui haastavaksi, sillä poikkeuksellisesti sykkivät solut eivät olleet analysointikelpoisia. Näin ollen ohjelmiston käytöstä luovuttiin ja syketyyppien laadullinen luokittelu suoritettiin silmämääräisesti. Tätä varten 97:stä satunnaisesta *SCN5A*-solusta tai -solurykelmästä sekä 61:stä satunnaisesta WT-solusta tallennettiin 30 sekunnin video yllä kuvatulla laitteistolla. Videotallenteiden perusteella solut jaettiin silmämääräisesti neljään alaryhmään: 1) normaaleihin, 2) arytmiisiin, 3) jumiutuviin ja 4) muihin. Normaalit-ryhmään luokiteltiin kaikki tasaisin väliajoin supistuvat solut riippumatta syketaajuudesta. Arytmiset-ryhmään sijoitettiin solut, joiden supistumisrytmi oli selvästi epäsäännöllinen. Jumiutuvat-ryhmä koostuu soluista, joiden rentoutuminen tapahtuu viiveellä eli ne jumiutuvat supistuneeseen

tilaan ennen rentoutumistaan. Muut-ryhmässä puolestaan on esimerkiksi poikkeuksellisesti värähteleviä soluja, jotka eivät asettuneet mihinkään muuhun yllä kuvatuista ryhmistä. Kuvassa 5 on graafisesti havainnollistettu kunkin sykeryhmän eroavaisuuksia. Jaottelun lisäksi kunkin solun syketaajuus laskettiin.

Epänormaaleja soluja oli *SCN5A*-populaatiossa tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,05$) enemmän, kuin WT-populaatiossa: *SCN5A*-soluissa epänormaalien osuus oli 33 % ja WT-soluilla 16 %. *SCN5A*-soluilla jokaista epänormaalisti sykkivien alaryhmää oli WT-soluja enemmän. Myös syketaajuudet erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ($p < 0,001$). *SCN5A*-soluilla keskimääräinen spontaani syke oli 33,6 bpm, kun taas WT-soluilla keskimääräinen spontaani syketaajuus oli 67 bpm. WT-solulinjan keskimääräinen spontaani syketaajuus oli siis noin kaksinkertainen suhteessa *SCN5A*-populaation.



Kuva 4. Luokittelun tulokset sekä syketaajuudet.
A) Syketyypit prosentteina sekä syketaajuudet
B) Syketaajuuksien keskiarvot luottamusväleineen.
C) Syketyypit.



Kuva 5. Sykealatyypiesimerkit Beatview-ohjelmistolla havainnollistettuna. x-akselilla ruudut, y-akselilla solun liikettä kuvaava laskennallinen arvo.

A) Normaali solu. Syke on tasaista ja jokaista supistusta seuraa välitön relaksaatio. Supistumis- ja relaksoitumisnopeudet pysyvät muuttumattomina.

B) Jumiutuva solu, joka on lisäksi huomattavan bradykardinen (4 bpm). Jumiutuminen on nähtävissä selkeänä plateuna nuolen osoittamassa kohdassa.

C) Arytminen solu. Syke on selkeästi epäsäännöllinen ja supistumis- ja relaksoitumisnopeudet vaihtelevat. Muut-alaryhmään luokitelluista soluista ei ole esimerkkiä niiden analyysikelvottomuuden vuoksi.

3.2 Adrenaliinikokeet

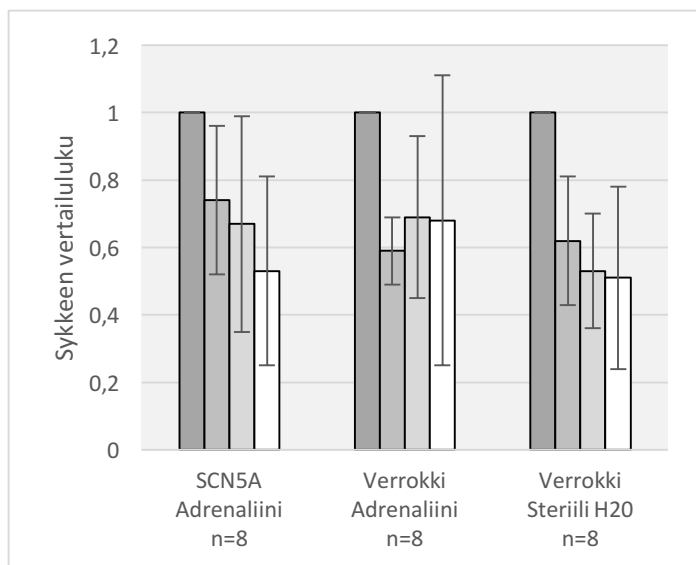
Sekä *SCN5A*- että WT-solujen sykkeet yllättäen laskivat adrenaliinikonsentraation kasvaessa. *SCN5A*-soluilla adrenaliinikonsentraatioita 10 nM, 50 nM ja 1 μ M vastaavien mittaustulosten keskiarvot olivat prosentteina alkuperäisestä sykkeestä 74 %, 67 % ja 53 %. WT-soluilla vastaavat keskiarvot olivat 59 %, 69 % ja 68 %. WT-soluille steriilillä vedellä tekemissämme kontrollikokeissa saamamme tulokset olivat 62 %, 53 % ja 51 %. Mittaustuloksissa oli huomattavia solukohtaisia vaihteluita.

Taulukko 1. Adrenaliinikokeiden tulokset. KA = keskiarvo, KH = keskihajonta. x=puuttuva arvo.

Solulinja	Lääke	1	2	3	4	5	6	7	8	KA	KH
SCN5A Adrenaliini n=8	lähtötilanne	64	40	54	50	44	44	22	38	44,5	11,57
	10 nM adrenaliini	54	x	58	36	12	34	16	28	34	16,14
	50 nM adrenaliini	54	24	20	20	14	32	30	28	27,75	11,38
	1 µM adrenaliini	64	28	24	26	16	32	0	18	26	17,06
Verrokki Adrenaliini n=8	lähtötilanne	42	36	78	68	36	40	76	52	53,5	16,76
	10 nM adrenaliini	24	24	48	50	16	20	50	26	32,25	13,54
	50 nM adrenaliini	38	42	40	57	18	20	40	28	35,38	12,01
	1 µM adrenaliini	16	52	28	78	18	32	0	40	33	22,54
Verrokki Steriili H ₂ O n=8	lähtötilanne	8	118	124	78	86	50	48	50	70,25	36,52
	7,58 µl steriili vesi	4	78	90	46	66	38	38	60	52,5	25,27
	38,5 µl steriili vesi	2	76	86	40	66	38	36	38	47,75	25,19
	83,3 µl steriili vesi	0	84	92	46	68	34	38	48	51,25	27,73

Taulukko 2. Adrenaliinikokeiden vakioidut tulokset. KA = keskiarvo, KH = keskihajonta. x=puuttuva arvo.

Solulinja	Lääke	1	2	3	4	5	6	7	8	KA	KH
SCN5A Adrenaliini n=8	lepsyke	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	10 nM adrenaliini	0,84	x	1,07	0,72	0,27	0,77	0,73	0,74	0,74	0,22
	50 nM adrenaliini	0,84	0,6	0,37	0,4	0,32	0,73	1,36	0,74	0,67	0,32
	1 µM adrenaliini	1	0,7	0,44	0,52	0,36	0,73	0	0,47	0,53	0,28
Verrokki Adrenaliini n=8	lepsyke	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	10 nM adrenaliini	0,57	0,67	0,62	0,74	0,44	0,5	0,66	0,5	0,59	0,1
	50 nM adrenaliini	0,9	1,17	0,51	0,84	0,5	0,5	0,53	0,54	0,69	0,24
	1 µM adrenaliini	0,38	1,44	0,36	1,15	0,5	0,8	0	0,77	0,68	0,43
Verrokki Steriili H ₂ O n=8	lepsyke	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	7,58 µl steriili vesi	0,5	0,66	0,73	0,59	0,77	0,76	0,79	1,2	0,62	0,19
	38,5 µl steriili vesi	0,25	0,64	0,69	0,51	0,77	0,76	0,75	0,76	0,53	0,17
	83,3 µl steriili vesi	0	0,71	0,74	0,59	0,79	0,68	0,79	0,96	0,51	0,27



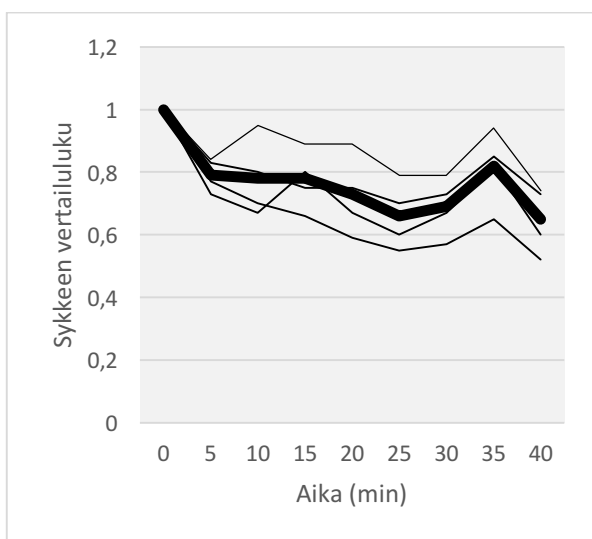
Kuva 6. Adrenaliinikokeiden vakioidut keskiarvot ja keskihajonnat. Syketaajuudet laskivat adrenaliinikonsentraation sekä H₂O-lisäyksen jälkeen.

3.3 Olosuhdemuutokset

Poikkeavien adrenaliinivasteiden takia tutkimme tarkemmin kasvatus ja analysointiolosuhteet. Olosuhdemuutokskeissa syketaajuus laski 40 minuutin aikana keskimäärin 35 %. Nopeinta lasku oli ensimmäisen viiden minuutin aikana, jolloin laskua tapahtui 21 %. Viiden minuutin kuluttua lasku hidastui ja jatkui melko tasaisena aikavälillä 5-30 min, jonka jälkeen taajuus oli tippunut keskimäärin 31 % alkuperäisestä. 35 minuutin kohdalla havaitsimme keskimäärin 13 %:n syketaajuuden nousun suhteessa edelliseen mittauspisteeseen, jonka jälkeen hidastuminen jatkui. Solujen välillä oli suurta vaihtelua: esimerkiksi solun 4 syke laski 10 minuutin kuluttua vain 5 % alkuperäisestä syketaajuudestaan, kun taas solun 2 syke putosi vastaavassa ajassa 33 %.

Taulukko 3. Olosuhdemuutokskeiden tulokset

Aikapiste (min)	Tulokset (BPM)						Vakioidut tulokset					
	Solut				KA	KH	Solut				KA	KH
	1	2	3	4			1	2	3	4		
0	88	30	80	38	59,00	22,65	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
5	68	22	66	32	47,00	18,18	0,77	0,73	0,83	0,84	0,79	0,04
10	62	20	64	36	45,50	16,46	0,70	0,67	0,80	0,95	0,78	0,10
15	58	24	60	34	44,00	13,80	0,66	0,80	0,75	0,89	0,78	0,07
20	52	20	60	34	41,50	13,94	0,59	0,67	0,75	0,89	0,73	0,10
25	48	18	56	30	38,00	13,33	0,55	0,60	0,70	0,79	0,66	0,08
30	50	20	58	30	39,50	13,59	0,57	0,67	0,73	0,79	0,69	0,07
35	44	18	56	30	37,00	12,81	0,65	0,82	0,85	0,94	0,82	0,09
40	46	18	58	28	37,50	13,88	0,52	0,60	0,73	0,74	0,65	0,08



Kuva 7. Olosuhdemuutokskeiden vakioidut tulokset. Neljän tutkitun solun mittaustulokset merkitty ohuella viivalla ja näiden keskiarvo paksulla viivalla. Huomaa ensimmäisen viiden minuutin aikana tapahtuva nopea lasku sekä tulosten suurehko solukohtainen vaihtelu. Mielenkiintoisena yksityiskohtana solujen syketaajuus nousee hetkellisesti 35 minuutin aikapisteessä.

4 POHDINTA

4.1 Tärkeimmät tulokset

Lepotilassa *SCN5A*-solut sykkivät poikkeuksellisesti suhteessa WT-solulinjaan: niistä suurempi osa sykki epänormaalisti ja niiden keskimääräinen leposyke oli noin puolet verrokeita matalampi. On hyvin mahdollista, että nämä solutason löydökset tavalla tai toisella kytkeytyvät p.I141V-mutaatiota kantavien potilaiden vakaviin sydänperäisiin oireisiin. Poikkeaviin ionivirtoihin liittyy tavallisesti poikkeavia varhais- tai jälkipotentiaaleja ja näihin tyypillisesti liittyy epätasainen syke (11). Löydösten taustalla vaikuttavia solubiologisia mekanismeja on tämän tutkimuksen perusteella kuitenkin mahdotonta spekuloida ja näin ollen jatkotutkimusten tarve on ilmeinen. Tähän vaaditaan tarkempia solubiologisia menetelmiä, kuten patch clamp –menetelmää (12).

Adrenaliinikokeidemme tulokset olivat yllättäviä. Vastoin odotuksiamme adrenaliini ei nostanut syketaajuutta *SCN5A*- eikä WT-soluissa, saati aiheuttanut niissä rytmihäiriöitä. Sen sijaan adrenaliinikokeidemme tulokset vastasivat pelkällä vedellä tekemämme kontrollikokeen tuloksia. Tämä viittaa siihen, että adrenaliinikokeissa mittaamamme tulokset eivät suinkaan olleet vasteita adrenaliinille, vaan vasteita muuttuville olosuhteille (pH, lämpötila, kosteus). Tämän johtopäätöksen puolesta puhuvat myös olosuhdemuutuskokeissa saamamme tulokset: WT-soluilla noin 30 minuuttia kestäneen adrenaliinikoesarjan jälkeen mitattu keskimääräinen syketaajuuden lasku (-32 %) vastasi erinomaisesti olosuhdemuutuskokeissa 30 minuutin aikapisteessä mitattua laskua (-31 %). Mielenkiintoisena yksityiskohtana nostattakoon esille, että *SCN5A*-soluilla adrenaliinikokeen jälkeen mitattu keskimääräinen syketaajuuden lasku oli huomattavasti WT-soluja suurempaa (-47 %). Suuren hajonnan vuoksi on kuitenkin mahdotonta sanoa, onko kyseessä tautifenotyypin ilmentymä vai sattuma. Metodologisena yksityiskohtana voimme myös todeta, että adrenaliinikokeissa käytetyt 10 minuutin väli-inkubaatiot eivät ehkäisseet ei-toivottuja olosuhdemuutoksia elatusaineessa ja osoittautuivat näin ollen hyödyttömiksi.

4.2 Tulevaisuuden suunnitelmia

SCN5A-solujen rytmihäiriöiden sekä matalan syketaajuuden syyn tarkempi selvittäminen vaatii perinpohjaisia elektrofysiologisia jatkotutkimuksia esimerkiksi patch clamp -menetelmällä. Patch

clamp -menetelmä mahdollistaa yksittäisen solun kalvopotentiaalain analysoinnin ja se on edelleen perusmenetelmä solujen elektrofysiologisissa tutkimuksissa.

Tutkimuksessamme suurimmaksi ongelmaksi muodostui se, että videokuvantamisessa solujen kasvatusolosuhteet muuttuivat, jolloin sykkeen nousun rytmihäiriöille altistava vaikutus jäi näkemättä. Mikäli solujen vaste syketaajuuteen vaikuttaviin lääkkeisiin halutaan saada esille videomenetelmällä, on tuloksia sekoittavat ympäristömuutokset jatkossa eliminoitava. Käytännössä tämä tarkoittaa perfuusiojärjestelmän käyttöönottoa. Perfuusiojärjestelmässä soluja on mahdollista tutkia mikroskoopin alla siten, että elatusaineen lämpötila, pH sekä kosteus pysyvät fysiologisissa rajoissa. Lisäksi lääkeaineen lisääminen sekä poistaminen on nopeampaa, tarkempaa ja lääkeaine diffundoituu elatusaineeseen tasaisemmin. Muut sydänsolujen toiminnallisuutta mittaavat menetelmät, kuten sähköistä toimintaa analysoiva patch clamp –menetelmä sekä kalsiumvirtauksia analysoiva kalsiumkuvantaminen tehdään perfuusiojärjestelmän avulla. Perfuusion ansiosta näissä menetelmissä ei kuvaamamme olosuhdemuutosongelmaa ole havaittu. Tämän työn tulosten ansiosta tutkimusryhmämme muutti tutkimusprotokollansa vastaavanlaisissa lääkeainetutkimuksissa.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen perusteella kykenemme vetämään seuraavat johtopäätökset:

1. *SCN5A*-solujen keskimääräinen spontaani syketaajuus on noin puolet verrokeita matalampi.
2. *SCN5A*-solujen joukossa epänormaalisti sykkivien solujen osuus on verrokeita tilastollisesti merkitsevästi suurempi.
3. Inkubaattorista poistaminen aiheuttaa elatusaineessa fysiologisia ja kemiallisia muutoksia, jotka johtavat syketaajuuden merkittävään laskuun. Tämä lasku on riittävä peittääkseen mahdollisen adrenaliinivasteen täydellisesti.
4. Perfuusiojärjestelmä on analyysimenetelmästä riippumatta välttämätön työkalu syketaajuuteen vaikuttavien lääkkeiden tutkittaessa.

6 LÄHTEET

- (1) W. F. Boron and E. L. Boulpaep, *Medical Physiology: a Cellular and Molecular Approach*, 2nd editio. Saunders Elsevier, 2009.
- (2) J. Heikkilä, M. Kupari, J. Airaksinen, H. Huikuri, M. S. Nieminen, and K. Peuhkurinen, *Kardiologia*, 2. painos. Kustannus Oy Duodecim, 2008.
- (3) C. A. Remme, ‘Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects.’, *J. Physiol.*, vol. 591, no. Pt 17, pp. 4099–116, 2013.
- (4) J. Tfelt-Hansen, B. G. Winkel, M. Grunnet, and T. Jespersen, ‘Inherited cardiac diseases caused by mutations in the Nav1.5 sodium channel.’, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 107–115, 2010.
- (5) H. Swan, M. Y. Amarouch, J. Leinonen, a. Marjamaa, J. P. Kucera, P. J. Laitinen-Forsblom, a. M. Lahtinen, a. Palotie, K. Kontula, L. Toivonen, H. Abriel, and E. Widen, ‘Gain-of-Function Mutation of the SCN5A Gene Causes Exercise-Induced Polymorphic Ventricular Arrhythmias’, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, vol. 7, no. 6, pp. 771–781, 2014.
- (6) A. a M. Wilde and R. Brugada, ‘Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel’, *Circ. Res.*, vol. 108, no. 7, pp. 884–897, 2011.
- (7) A. C. Guyton and J. E. Hall, *Textbook of medical physiology*, 12th Editi. Saunders Elsevier, 2011.
- (8) P. Raatikainen, ‘Kammoliolisälyönnit’, in *Lääkäriin käsikirja*, Kustannus Oy Duodecim, 2009.
- (9) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, ‘Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors’, *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, 2007.
- (10) X. Lian, C. Hsiao, G. Wilson, K. Zhu, L. B. Hazeltine, S. M. Azarin, K. K. Raval, J. Zhang, T. J. Kamp, and S. P. Palecek, ‘PNAS Plus: Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling’, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 27, pp. E1848–E1857, 2012.
- (11) C. B. Jung, A. Moretti, M. Mederos y Schnitzler, L. Iop, U. Storch, M. Bellin, T. Dorn, S.

Ruppenthal, S. Pfeiffer, A. Goedel, R. J. Dirschinger, M. Seyfarth, J. T. Lam, D. Sinnecker, T. Gudermann, P. Lipp, and K.-L. Laugwitz, 'Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia', *EMBO Mol. Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 180–191, 2012.

- (12) M. Mansor and M. Ahmad, 'Single Cell Electrical Characterization Techniques', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 12686–12712, 2015.