

Nelli Kallioma ja Laura Parviainen

# Sydäninfarktin jälkeisen vaurion mallintaminen sikakoe-eläinmallilla

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Syyslukukausi 2017

Nelli Kallioma ja Laura Parviainen

# Sydäninfarktin jälkeisen vaurion mallintaminen sikakoe-eläinmallilla

Sydäntutkimuskeskus, Turun yliopistollinen keskussairaala

Syyslukukausi 2017

vastuhenkilö: Jarmo Gunn

# SISÄLLYS

JOHDANTO	4
SIAN SYDÄMEN ANATOMIA	5
VEREN HYYTYMINEN	6
<b>Trombosyyttien adheesio, aktivaatio ja aggregaatio</b>	<b>6</b>
<b>Hyytymiskaskadi</b>	<b>7</b>
<b>Hyytymisen säätely</b>	<b>8</b>
<b>Fibrinolyysi</b>	<b>9</b>
<b>Veren hyytymisen ja fibrinolyysin mittaaminen</b>	<b>9</b>
VEREN HYYTYMINEN IHMISILLÄ JA SIOILLA	9
ISKEMIA-REPERFUUSIOVAURIO	11
ISKEMIA-REPERFUUSIOVAURION MEKANISMIT	11
INTERFERONI-BEETA-1A JA ECTO-5'-NUKLEOTIDAASI	13
TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN	14
LÄHTEET	17

## JOHDANTO

Sydänlihaksen iskemia-reperfuusioaurio on sydänkirurgiassa hyvin tunnettu ilmiö. Sen vaikutukset ovat nähtävissä päivittäin kliinisessä työssä. Ilmiön periaatteet, etenkin molekyyllitasolla, ovat kuitenkin osittain edelleen epäselviä. Ecto-5'-nukleotidaasi (CD73) on entsyymi, joka säätelee vaskulaarista permeabiliteettia adenosiinimetabolian kautta (Bellingan ym. 2014). CD73:n ilmentymisen on osoitettu olevan aktiivista sydänlihaskudoksessa iskeemisessä vauriossa (Bönner ym. 2012). Tässä tutkimuksessa on tarkoitus tutkia suonensisäisen CD73-aktivaattorin, interferoni-beeta-1a:n, vaikutusta iskemia-reperfuusioaurion syntyyn sikaeläinkokeellisessa mallissa. Kirjallinen opinnäytetyö on osa projektia, jossa sikakoe-eläinmalli pystytetään tutkimustyöhön. Tämä kirjallinen osuus pohjustaa käytännön koe-eläinlaboratoriotyötä esittelemällä sikaa koe-eläimenä sekä käsittelee sydäninfarktin jälkeisen vaurion mallintamista sikakoe-eläinmallilla.

## SIAN SYDÄMEN ANATOMIA

Sian sydämen anatomia lähes samanlainen ihmisen sydämeen verrattuna. Sian ja ihmisen sydämessä sepelvaltimoiden jakautuminen tietyille sydämen alueille ja rakenteille on hämmästyttävän samankaltainen, joten sian sydän toimii erinomaisena mallina sydänkirurgisissa tutkimuksissa. Kuitenkin sian sydämessä on myös muutamia merkittäviä anatomisia eroavaisuuksia, jotka tulee sikakoe-eläintutkimuksissa ottaa huomioon.

Ihmisen sydämeen verrattuna sian sydän on kiertyneenä pitkittäisakselinsa mukaan enemmän oikealle, jolloin anteriorinen kammiodenvälinen uurre osoittaa selkeämmin eteenpäin. Sian sydän on myös voimakkaammin kallistuneena selälleen. Nouseva aortta sijaitsee suoraan melko prominentin keuhkovaltimorungon takana. Sian sydämen kärki muodostuu yksinomaan vasemmasta kammioista, toisin kuin ihmisellä sydämen kärjen muodostaa sekä vasen että oikea kammio.

Sialla ylä- ja alaonttolaskimot (v. cava superior et inferior) laskevat toisiaan vastaan kohtisuorassa oikeaan eteiseen, kun taas ihmisellä ylä- ja alaonttolaskimot kulkevat yhdensuuntaisesti. Sian vasempaan eteiseen laskee vain kaksi keuhkolaskimoa (v. pulmonalis), kun taas ihmisellä niitä yleensä on neljä. (Weaver ym. 1986, Crick ym. 1998.)

Sialla on huomattavasti paksumpi vasen kammio kuin ihmisellä. Sian ja ihmisen sydämiä vertailevissa dissektioissa voitiin osoittaa eroavaisuuksia eteisten ja kammioden morfologisissa jakautumissuhteissa. Sian sydänleikkeestä 2/3 edusti sydämen vasenta puolta (vasen kammio ja eteinen), mikä osoitti kammioväliseinän sijaitsevan enemmän sydämen oikealla puolella. Tämä selittää myös sian sydämen apexin koostuvan yksinomaan vasemmasta kammioseinästä. Vastaavat leikkeet ihmisen sydäimestä taas osoittivat, että sekä vasen (eteinen ja kammio) että oikea puoli sydäimestä edustivat yhtä suurta osaa leikkeestä ja että kammioväliseinä sijaitsi melkein keskilinjassa. (Crick ym. 1998.)

Sian sepelvaltimot vastaavat erinomaisesti ihmisen sydämen suonitusta. Sialla sekä sepelvaltimoiden anatomia että niiden suonitusalueiden jakautuminen tietyille

sydänlihasalueille ovat hyvin samankaltaisia kuin ihmisellä. Niin kuin ihmiselläkin, vasen sepelvaltimo on oikeaan verrattuna pidempi ja halkaisijaltaan suurempi kuin oikea sepelvaltimo. Kuten ihmisellä, myös suurimmalla osalla sioista (78 %) oikea sepelvaltimo (RCA = right coronary artery) on dominantti ja haarautuu posterioriseen laskevaan sepelvaltimeen (posterior descending coronary artery) ja suonittaa vasemman kammion posteriorista osaa, takaväliseinää ja eteiskammiosolmuketta. (Weaver et al. 1986.)

Suurimmat eroavaisuudet ihmisen ja sian sydämien verisuonten välillä ovat sydämen laskimoissa. Sialla varsin prominenttina laskimona on vasen v. azygos (vastaava ihmisen v. oblique), joka laskee koronaarisinukseen. Hämmennystä aiheuttaa se, että suoni on nimetty v. azygoksi sialla, vaikka ihmisen anatomiassa nimetty v. azygos laskee parietaalisiin rakenteisiin. Ihmisellä sian vasenta v. azygosta vastaava suoni on vasemman eteisen v. oblique, joka on huomattavasti pienempi rakenne tuoden vain pienen osan vasemman eteisen lihaseinämän laskimopaluusta koronaarisinukseen. (Crick ym 1998.)

## VEREN HYYTYMINEN

Verihiutaleiden adheesio, aktivaatio ja aggregaatio

Veren hyytyminen on tarkoin säädelty paikallinen reaktio. Hyytymisreaktio aktivoituu esimerkiksi sepelvaltimossa olevan ateroomaplakin repeämisen seurauksena aiheuttaen sepelvaltimeen trombin.

Hyytymisreaktio käynnistyy verisuonen seinämän vauriossa, kun endoteelin alta paljastunut kollageeni sitoo plasmasta von Willebrandin tekijän (vWF). Verihiutaleet tunnistavat spesifeillä reseptoreillaan (GPIb ja GPIIb/IIIa) vW-tekijän, mikä johtaa verihiutaleiden adheesioon eli tarttumiseen suonen seinämään vauriokohtaan. Verihiutaleiden adheesio käynnistää niiden aktivaation, jolloin ne vapauttavat autoaktivaattoreina toimivia välittäjäaineita, kuten adenosiinidiforfaattia (ADP), tromboksaania ja serotoniinia. Nämä

välittäjäaineet edelleen kiihdyttävät aktivaatiota sekä saavat aikaan suonien supistumisen. Reaktio on itse itseään voimistava. Verihiutaleissa on myös immuunipuolustukseen osallistuvia tekijöitä, kuten CD40-ligandi ja P-selektiini, jotka aktivoivat plasman hyytymistekijöitä sekä ehkäisevät samalla fibrinolyysin käynnistymistä.

Verihiutaleiden aktivaatiota seuraa niiden aggregaatio eli toisiinsa takertuminen. Ne kiinnittyvät toisiinsa vW-tekijän avulla nopeassa virtauksessa ja fibrinogeenin avulla hitaassa virtauksessa. vW-tekijä ja fibrinogeeni tarttuvat verihiutaleihin GPIIb/IIIa-reseptorin välityksellä ja toimivat niitä toisiinsa liimaavina molekyyleinä. Paikalliset verihiutaleista vapautuneet ADP, tromboksaani ja serotoniini kiihdyttävät aggregaatiota. Verihiutaleiden sisältämän plasminogeeniaktivaattorin estäjän (PAI-1) avulla fibrinolyysi samanaikaisesti estyy.

Verisuonivirtauksen nopeus vaikuttaa trombin muodostumiseen. Valtimotukoksessa on voimakkaampi virtaus, jolloin adheesio kiihtyy ja syntyy niin kutsuttu valkoinen trombi, joka sisältää runsaasti toisiinsa kiinnittyneitä verihiutaleita. Valkoinen trombi on nähtävissä muun muassa verisuonikirurgiassa. ADP on punasoluista, valkosoluista ja verihiutaleista vapautuva agonisti, joka lisää verihiutaleaktivaatiota. Verihiutaleiden GPII/b/IIIa- ja ADP-reseptorien estäjiä käytetäänkin lääkkeinä muun muassa sepelvaltimotukoksen hoidossa ja sekundaaripreventiossa. Verenkierron hitaan virtauksen alueilla, kuten alaraajalaskimoissa tai sydämen eteiskorvakkeessa, verisuonitukos on fibriinipitoinen hyytymä, jota kutsutaan punaiseksi trombiksi fibriiniin kiinnittyneiden punasolujen vuoksi. Se voi syntyä ilman verisuonivauriotakin esimerkiksi perinnöllistä laskimotukostaipumusta aiheuttavan hyytymistekijä V:n mutaation (FV Leiden) vuoksi.

### Hyytymiskaskadi

Hyytymisjärjestelmässä keskeisessä asemassa ovat plasman hyytymistekijät, joiden tehtävä on tuottaa entsyymaattisella kaskadireaktiolla fibriinistä koostuva verkko hyytymään. Hyytymistekijöiden entsyymaattisen reaktiketjun seurauksena protrombiinista muodostuu trombiinia, joka saa aikaan liukoisien fibrinogeenin muuttumisen fibriiniverkoksi hyytymässä.

Toisaalta trombiini myös aktivoi hyytymän liukenemisen fibrinolyysin. Hyytymistekijöistä tekijät VII, IX, X sekä protrombiini ovat K-vitamiiniriippuvaisia maksassa tuotettuja proteiineja. Lisäksi hyytymistekijöihin kuuluvat plasmaperäiset hyytymistekijät V ja VII sekä verisuonen seinämästä peräisin oleva trombomoduliini ja kudostekijä (tissue factor, TF). Hyytymistekijät kiertävät veressä inaktiivisessa muodossa, kunnes suonivauriossa trombiini saa aikaan hyytymisjärjestelmän aktivaation.

Trombiinin muodostus etenee niin kutsutussa sisäisessä aktivaatiossa hyytymistekijäkompleksin tenaasin (tekijät IXa, VIIa ja X) sekä protrombinaasin (tekijät Va, Xa, II) avulla. Tenaasi aktivoi hyytymistekijä X:n, ja protrombinaasi tekee protrombiinista trombiinin. Ulkoisessa aktivaatiossa kudostekijä (TF) ja trombomoduliini toimivat solukalvoissa. TF tarttuu tekijään VIIa, mikä aktivoi tekijän X. Esimerkiksi angioplastia lisää TF-synteesiä. Lopullinen hyytymä syntyy, kun trombiini pilkkoo fibrinogeenin fibrinomonomeereiksi, jotka sitten polymerisoituvat hyytymäksi. Trombiinin aktivoima XIII stabiloi hyytymän.

### Hyytymisen säätely

Verenhyytymisen säätelijänä toimii endoteeli. Muun muassa typpioksidia ja prostasykliiniä tuottamalla se aiheuttaa vasodilataation ja näin verenvirtauksen hidastumisen ja trombosyyttien adheesion vaimenemisen. Endoteeli säätelee trombosyyttiaktivaatiota erittämällä CD39:ää, ektoADPaasi-entsyymiä, joka hajottaa ADP:tä ja hillitsee verihiutaleaktivaatiota.

Terveessä suonessa endoteeli säätelee trombiinin muodostumista trombomoduliinin, hepariinisulfaatin ja kudostekijäperäisen hyytymisen estäjän TFPI (tissue factor pathway inhibitor) avulla. Endoteelin antitrombiini inaktivoi trombiinin sekä muita hyytymistekijöitä (IX, X, XI ja XII). Endoteelin solukalvon pinnalla oleva hepariinisulfaatti tehostaa antitrombiinin hyytymisenestovaikutusta. Hyytymisen estämiseksi sian suolesta eristettyä hepariinia käytetään myös hoidollisesti. Fraktoimaton hepariini estää etupäässä trombiinia, kun taas pienimolekyylinen hepariini (LMWH) faktoria Xa.



Trombiini säätelee myös omaa muodostumistaan liittymällä endoteelisolukalvon trombomoduliiniin, joka aktivoi proteiinin C:n, joka taas inaktivoi tekijät Va ja VIIIa proteiini S:n avulla. Kaskadi saa aikaan trombiinin muodostumisen vähenemisen. Inflammatorisessa tilassa hepariinisulfaatin ja trombomoduliinin määrä vähenee.

## Fibrinolyysi

Jo hyytymisen aikana käynnistyy myös sen liukenemisreaktio, fibrinolyysi. Fibrinolyysi aktivoituu, kun hyytymän fibrini ja trombiini vapauttavat endoteelistä plasminogeenin kudosaktivaattoria tPA:ta (tissue-type plasminogen activator). tPA ja plasminogeeni kiinnittyvät fibriniin, mikä saa aikaan plasminogeenin aktivoitumisen plasmiiniksi. tPA:ta käytetään myös liuotushoidossa.

## Veren hyytymisen ja fibrinolyysin mittaaminen

Laboratoriokokein mitatut hyytymisaika-arvot antavat suuntaa hyytymisstatusta arvioitaessa. Tromboplastiiniaika TT (prothrombin time) ja siitä laskettu INR-arvo kuvaavat ulkoisen reitin käynnistämää hyytymisaikaa. TT ja INR kuvaavat K-vitamiiniriippuvaisten hyytymistekijöiden toimintaa. Aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika (APTT) kuvaa sisäisen reitin käynnistämää plasman hyytymisaikaa, ja se riippuu pääasiassa tekijöiden V, VIII, IX, X, XI ja XII pitoisuuksista. Kliinisessä työssä sitä käytetään fraktiomattoman hepariinin annostelussa sekä hyytymishäiriöiden diagnostiikassa.

## VEREN HYYTYMINEN IHMISILLÄ JA SIOILLA

Sian veren hyytymisjärjestelmän ja fibrinolyysin on oletettu olevan hyvin samanlainen kuin ihmisellä, mikä osaltaan puoltaa sikojen käyttöä koe-eläinmallina sydänkirurgiassa. Sian veren

tromboositaipumusta on tutkittu, mutta haasteelliseksi on osoittautunut eri tutkimusten vertaaminen toisiinsa, sillä tutkimuksissa on eroja reagenssien ja kalibraatioiden käytössä sekä pre-analyttisissä toimissa. Kokeellisia tutkimuksia tehdessä huomioonotettavaa on myös se, että useiden eri anestesia-aineiden on raportoitu vaikuttavan hyytymiseen ja fibrinolyysiin (Gross 1994). Kuitenkin yleisenä käsityksenä vallitsee edelleen, että sialla olisi hyperkoagulaatiotaipumusta.

Ihmisen verinäytteiden analysoinnissa käytetyt mittaussuomenetelmät soveltuvat osin myös sian veren analysointiin. Münster ym. (2002) tutkivat veren hyytymistä ja fibrinolyysiä mittaavien 22 eri vakiintuneen analyysin toimivuutta sian plasmanäytteillä ja osoittivat yhdentoista kahdestatoista tutkitusta funktionaalista analyysistä olevan toimivia myös sian plasmalla. Sen sijaan immunologiset analyysit (kuten D-dimeerin määrittäminen) eivät yleisesti ottaen osoittautuneet käyttökelpoisiksi sian plasmanäytteiden analysoinnissa. Immunologisten menetelmien heikkous sian plasman analysoinnissa saattaa selittyä lajispesifisillä eroilla sian ja ihmisen antigeeneissä. Tutkimuksessa analysoitiin 43 sian plasmanäytteistä hyytymisarvoja (mm. protrombiiniaika (PT), aktivoitu tromboplastiiniaika (APTT) ja kudofaktori (TF)) sekä verrattiin niitä ihmisen viitearvoihin. Ihmisen ja sian hyytymisarvoissa havaittiin pääosin yhtäläisyyksiä, mutta myös joitakin eroavaisuuksia. Sioilla aktiivinen partiaalinen tromboplastiiniaika (APTT) oli lyhyempi verrattuna ihmisiin, mikä viittaa kiihtyneeseen sisäisen kaskadin aktiivisuuteen sioilla. Tulos oli linjassa myös aiempiin tutkimustuloksiin, mikä tukee hyperkoagulaatio-oletusta. Tutkimuksessa sioilla havaittiin nelinkertainen kudofaktori-pitoisuus (TF) ihmisiin verrattuna. Kuitenkin aiemmissä tutkimuksissa (Fareed ym. 1995, Münster ym. 2001) kudofaktorikonsentraatiot sian ja ihmisen plasmassa ovat olleet samaa luokkaa. Proteiini C -aktiivisuus sialla osoittautui puolet pienemmäksi kuin ihmisellä ja fibrinogeenipitoisuus vastasi ihmisen veren pitoisuutta, mikä tuki aiempia tutkimustuloksia. (Münster ym. 2002.)

Myös antitrombiinin (AT) aktiivisuus sialla on todettu vastaamaan ihmisen AT-aktiivisuutta (Münster ym. 2001, Karges ym. 1994, Reverdiau-Moalic ym. 1996).

Kessler ym. (2011) tutkivat tromboelastometrillä sian ja ihmisen koagulaation eroavaisuuksia. Sian hemoglobiinikonsentraatio (mediaani 89 g/l CI 95 % 87-90 g/l) oli huomattavasti pienempi kuin ihmisellä (128 g/l; 124-140 g/l) ( $P < 0,001$ ), mutta verihiutaleiden pitoisuudet olivat toisiinsa verrattavissa. Tutkimuksen päähavaintona oli, että sialla hyytyminen alkaa hitaammin kuin ihmisellä, mutta etenee sen jälkeen nopeammin sekä saavuttaa yhtä lujan hyytymän kuin ihmisellä. Nämä tulokset eivät sen sijaan tue yleistä käsitystä sian veren hyperkoagulaatiotaipumuksesta. Tässäkin anestesia-aineilla havaittiin olevan vaikutusta hyytymiseen.

## ISKEMIA-REPERFUUSIOVAURIO

Iskemiareperfuusioaurio syntyy, kun hapen puutteesta kärsivän kudoksen verenkierto palautuu iskeemisen vaiheen jälkeen (Malmberg ym. 2012). Iskemian aikana kudoksessa vallitsee hapen ja ravintoaineiden puute, ja verenkierron palautuminen johtaa inflammaatioon sekä oksidatiiviseen stressiin. Sydänlihaksen iskemia-reperfuusioaurion patofysiologinen mekanismi on monimutkainen ja edelleen osittain epäselvä. Seuraavassa on kuitenkin esitetty iskemia-reperfuusioaurion oletettuja mekanismeja.

## ISKEMIA-REPERFUUSIOVAURION MEKANISMIT JA VAIKUTUKSET

Sydänlihas vaatii paljon energiaa supistuakseen. Sydänlihassolut tuottavat energiaa mitokondrioidensa sisäkalvoilla oksidatiivisen fosforylaation seurauksena. Oksidatiivisessa fosforylaatiossa elektronien siirtäminen substraatilta hapelle tuottaa energiaa ATP:n valmistukseen. Iskemian aikana mitokondrioiden oksidatiivinen fosforylaatio pysähtyy hapenpuutteen vuoksi. Tämän seurauksena ATP-taso romahtaa nopeasti, ja energia-aineenvaihdunta muuttuu anaerobiseksi glykolyysiksi. Laktaattipitoisuus nousee, ja samalla

intraselulläärinesteen pH laskee. Tällöin protonien lisääntynyt määrä sytoplasmassa johtaa natrium-protoni-vaihtajan ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) aktivoitumiseen ja edelleen solusisäisen natriumpitoisuuden kasvamiseen. Tästä johtuen natrium-kalium-vaihtajan toiminta inhiboituu sekä lisäksi solunsisäinen ja mitokondriaalinen kalsiumpitoisuus laskee. (Malmberg ym. 2012.)

Reperfuusiossa kudosten verenvirtaus ja happipitoisuus nousevat, ja reaktiivisia happiyhdisteitä, kuten hydroksidia ( $\text{OH}^-$ ), hydroksidiperoksidia ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ja superoksidia ( $\text{O}_2^-$ ), syntyy reperfuusion alussa. Nouseva pH, kalsiumin korkea pitoisuus ja reaktiiviset happiyhdisteet aiheuttavat mitokondrion sisäkalvon läpäisevyyden lisääntymisen. Normaalisti mitokondrion sisäkalvo on läpäisemätön kalvo sytoplasman ja mitokondrion sisemmän tilan välissä. Läpäisevyyden kasvaminen johtaa reaktiivisten happiyhdisteiden lisääntyneeseen vapautumiseen, ATP-molekyylien ehtymiseen ja sytokromi C:n ja muiden pro-apoptoottisten yhdisteiden muodostumiseen solun sytoplasmassa. Mitokondrioiden sisäkalvon läpäisevyyden lisääntymisen onkin ajateltu olevan avainasemassa iskemia-reperfuusioaurion muodostumisessa. Reperfuusioauriossa vauriokohdan sydänlihassolut ajautuvat apoptoosiin tai pahimmillaan nekroosiin. (Malmberg ym. 2012.)

Lisäksi reperfuusion alkuvaiheessa syntyvät reaktiiviset happiyhdisteet ja kalsium itsessään vaurioittavat suoraan sydänlihassoluja. Happiyhdisteet alkavat tuhota soluissa proteiineja, nukleiinihappoja sekä solukalvoa. Solukalvon tuhoutuminen tuottaa jälleen uusia vapaita happiradikaaleja, jotka edelleen pahentavat suoraa solutuhoa sydänlihaksessa. (Malmberg ym. 2012.)

Iskemia-reperfuusioaurio aiheuttaa myös sydänlihakseen inflammaation. Nopeasti reperfuusion jälkeen vaurioituneessa sydänlihaksessa neutrofiilit aktivoituvat ja niitä alkaa kertyä. Neutrofiilit ja muut tulehdussolut aktivoituvat ja tuottavat vapaita happiradikaaleja, proteaaseja ja pro-inflammatorisia molekyyliä, kuten interleukiini-8:aa (IL-8). Endoteelisolujen inflammaatioreaktio lisää niiden adheesiomolekyylien synteesiä, jotka säätelevät leukosyytti-endoteelisolu-adheesiota. Leukosyyttien kertyminen johtaa kapillaarien pieniin mikroembolisaatioihin, joiden seurauksena verenkierto ei pysty palautumaan normaalilla tavalla kudokseen. Tämä johtaa sekundaariseen iskemiaan, iskemian pahentumiseen, joka edelleen lisää endoteelivauriota. (Malmberg ym. 2012.)

Inflammaatioreaktion seurauksena lisäksi veren komplementtijärjestelmä aktivoituu, mikä johtaa tulehdussolujen ja tulehdusvälittäjäaineiden lisääntymiseen sekä suoraan kudostuhoon. (Malmberg ym. 2012)

Iskemiareperfuusioaurion klinisiä ilmentymiä ovat esimerkiksi rytmihäiriöt, sydänlihaksen mikrovaskulaarinen dysfunktio ja sydänlihaksen supistumishäiriö sekä palautumaton sydänlihassolujen kuoleminen eli nekroosi (Malmberg ym. 2012). Aiempien sikakoe-eläinmallinnusten perusteella tiedetään, että ongelmaksi sikaeläinkoemalleissa muodostuukin juuri sikojen rytmihäiriöherkkyys.

## INTERFERONI-BEETA-1a ja ECTO-5'-NUKLEOTIDAASI

Ecto-5'-nukleotidaasi (CD73) on entsyymi, joka säätelee verisuonten läpäisevyyttä adenosiinin aineenvaihdunnan avulla (Kiss ym. 2007). Ecto-5'-nukleotidaasia muodostuu verisuonten endoteelisoluissa, epiteelisoluissa ja osassa leukosyyttejä. Interferoni-beeta-1a lisää CD73:n synteesiä. Anti-inflammatorisen adenosiinin tuotanto CD73:n välityksellä auttaa ylläpitämään endoteelin läpäisemättömyyttä (Bönner ym. 2012). Anti-inflammatorinen adenosini sitoutuu A2B-reseptoriin, jota esiintyy useissa kudoksissa, esimerkiksi juuri sydänlihaksessa. Se säätelee anti-inflammatorisia ilmiöitä, kuten verisuonten läpäisevyyden vähentymistä ja leukosyyttien houkuttelemisen vähentämistä inflammoituneeseen kudokseen (Kiss ym. 2007). Tämän seurauksena vaurioituneeseen kudokseen pääsee vähemmän reaktiivisia happiyhdisteitä ja tulehdussoluja, jolloin oletettavasti keskeiset iskemia-reperfuusioaurion mekanismit vaimentuvat.

CD73:n ilmenemisen on havaittu olevan aktiivinen sydänlihaskudoksessa iskeemisessä vauriossa, jossa sen on ajateltu toimivan suojamekanismina (Bönner ym. 2012). CD73-

riippuvaisen adenosiinin puute on liitetty sydänlihaksen ödeeman muodostukseen sydänlihaksen palautuessa iskemia-reperfuusioauriosta hiirimalleissa (Bönner ym. 2013).

Aikaisemmin on osoitettu, että interferoni-beeta-1a vähentää verisuonten läpäisevyyttä säätelemällä CD73:n ilmentymistä ja aktiivisuutta endoteelisoluissa. ARDS-potilailla laskimonsisäisestä interfeeroni-beta-1a:sta onkin saatu jo lupaavia tuloksia (Bellingan ym. 2014).

## TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA HYPOTEESI

Tässä tutkimuksessa on tarkoitus tutkia sikaeläinmalleissa laskimonsisäisesti annetun CD73:n aktivaattorin, interferononi-beeta-1a:n, vaikutusta sydänlihaksen iskemia-reperfuusioaurioon. Oletuksena on, että se vähentää sydänlihaksen kapillaarien läpäisevyyttä sekä vähentää veren leukosyyttien tungosta reperfuusiopaikalle ja näin ollen vähentää iskemia-reperfuusioaurion laajuutta.

## TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

Tutkimuksen suorittamiseen käytetään sikoja. Sikoja on kaksikymmentä kappaletta (n=20) ja ne painavat keskimäärin 28 kg. Siat rauhoitetaan lihaksensisäisellä 25 mg:n midatsolaami- ja 100 mg:n ksylatsiini-injektioilla. V. jugularis externa ja a. femoralis kanyloidaan monitorointia ja verinäytteiden ottoa varten. Perifeerinen kanyyli asetetaan eläinten korvaan ja sedaatiota ylläpidetään jatkuvalla propofoli-, midatsolaami- ja fentanyyli-infuusioilla. Siolle tehdään trakeostomia ja kytketään respiraattoriin. Tässä vaiheessa otetaan nollaverinäyte. Interferoni-lääkeannokset on sokkoutettu toimenpiteen tekijöiltä, ja ensimmäinen lääkeaineannos annetaan kahdeksan tuntia ennen iskemian alkua. Kokeen aikana seurataan ja monitoroidaan hemodynaamisia suureita, happisaturaatiota, verenpainetta, sykettä sekä EKG:ta. Noradrenaliini-infuusioilla (80-160 ug/H) varmistetaan tarvittaessa sikojen riittävä verenpaine. Laskimonsisäistä lidokaiinia annetaan tarvittaessa sydämen rytmihäiriöriskin pienentämiseksi. 1. verinäyte otetaan kahdeksan tunnin päästä edellisestä annoksesta, eli

juuri ennen iskemian alkua. Operaatiot suoritetaan sternotomiasta. Perikardium avataan ja kohotetaan. Sydänlihaksen iskemia saadaan aikaan ligeeraamalla vasemman sepelvaltimon laskevan haaran distaalinen osa, C-osa, 30 minuutin ajaksi. Toinen verinäyte otetaan 30 minuuttia iskemian alusta. Jotta varmistetaan tarkoituksenmukainen sydänlihasiskemia, monitoroidaan myös EKG-muutoksia. Kun iskemia-aikaa on kulunut 30 minuuttia, vasemman laskevan haaran verenvirtaus palautetaan purkamalla ligatuura. Verinäyte 3. otetaan kuuden ja puolen tunnin kohdalla iskemian alusta. Aortta preparoidaan pihditystä varten. Reperfuusion jälkeen eläimet lopetetaan. Heti lopetuksen jälkeen aortta pihditetään ja sinne injektoidaan metyleenisineä, jotta kudospäytteen tutkiminen olisi helpompaa. Sydän irrotetaan ja tutkimuksen lopuksi kerätään kudospäytteen.

Falcon-putkeen kerätään kudospäytteenä 1,5 cm x 1,5 cm kokoinen alue: 1) keskeltä sydämen infarktialuetta ("umpi-infarktialue"), 2) täysin infarktialueen vastakkaiselta puolelta (terve alue), 3) sydämen kärjestä (rajaseutua infarktin ja terveen rajalta), 4) munuaiskudosta keskeltä (ei munuaisallasta) sekä 5) keuhkosta. Näytteet laitetaan hiilihappojäähän. Lopuksi sydän laitetaan PAD-purkkiin formaliiniin.

Tutkimusryhmään kuuluville sioille (n=10) annetaan sedatoinnin jälkeen, kahdeksan tuntia ennen toimenpidettä, laskimonsisäisesti 10ug interferoni-beeta-1:stä ja lisäksi lisäannos juuri ennen operaation aloittamista. Kontrolliryhmässä (n=10) eläimille annetaan placebo-läkettä. Kaikki eläimet operoidaan saman protokollan mukaan ja ryhmien jakautuminen on sokkoutettu operaatioiden suorittajilta. Tutkimusprotokolla on hyväksytty kansallisessa koe-eläintutkimuslautakunnassa.

Nollanäytteet sikojen verestä otetaan heti sedatoinnin jälkeen. Ensimmäinen verinäyte otetaan kahdeksan tuntia lääkkeen antamisesta, eli juuri operaation alkaessa. Toinen verinäyte otetaan 30 minuuttia iskemian alusta, kolmas kuusi tuntia iskemian alusta, juuri ennen sikojen lopettamista.

## TUTKIMUKSEN HAASTEET

Vaikka sikakoe-eläinmalli peilaa oletettavasti paremmin ihmisen patofysiologiaa kuin pieneläinkoemalli, ei sikojen käyttö sydäninfarktin mallintamisessa on ongelmaton. Haasteita luo sian herkkyys kehittää muun muassa rytmihäiriöitä kesken tutkimuksen. Lisäksi sian hengitysteiden anatomiasta johtuen intubointi on osoittautunut haasteelliseksi ja näin ollen protokollassa käytetään trakeostoomaa intuboinnin sijasta.



## LÄHTEET

**Bellingan G, Maksimow M, Howell DC, Stotz M, Beale R, Beatty M, Walsh T, Binning A, Davidson A, Kuper M, Shah S, Cooper J, Waris M, Yegutkin GG, Jalkanen J, Salmi M, Piippo I, Jalkanen M, Montgomery H, Jalkanen S.** The effect of intravenous interferon-beta-1 a (FP-1201) on lung CD73 expression and on acute respiratory distress syndrome mortality: an open-label study. *Lancet Respir Med.* 2014 Feb;2(2):98-107

**Bönner F, Borg N, Burghoff S, Schader J.** Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PLoS One.* 2012;7(4):e34730.

**Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH.** Anatomy of the pig heart: comparison with normal human cardiac structure. *J Anat* 1998 193:105-19.

**Fareed J, Callas DD, Hoppensteadt D, Bermes EW Jr.** 1995. Tissue factor antigen levels in various biological fluids. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 6:32-36.

**Florian Bönner, Nadine Borg, Christoph Jacoby, Sebastian Temme, Zhaoping Ding, Ulrich Flögel, Jürgen Schrader.** Ecto-5'-Nucleotidase on Immune Cells Protects From Adverse Cardiac Remodeling. 2013 Jul 19;113(3):301-12

**Gross, D.** 1994. Iatrogenic models for studying heart disease, p. 421-463. *In* D. Gross (ed.), Anonymous animal models in cardio-vascular research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Karges, HE, Funk KA, Rönneberger H.** 1994. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittel- Forschung/ Drug Res.* 44:793-797.

**Kessler U, Grau T, Gnonchi F, Bergen S, Brandt S, Bracht H, Marcucci C, Zachariou Z, Jakob SM.** Comparison of porcine and human coagulation by thrombelastometry. *Thromb Res.* 2011 Nov;128(5):477-82.

**Kiss J, Yegutkin GG, Koskinen K, Savunen T, Jalkanen S, Salmi M.** IFN-beta protects from vascular leakage via up-regulation of CD73. 2007 Dec;37(12):3334-8.

**Malmberg M., Savunen T., Saraste A., Vähäsilta T., Vento A., Rimpiläinen J., Laurikka J.** Clinical experimental studies on cardiomyocyte apoptosis on ischemia-reperfusion injury and myocardial protection during cardiac surgery. January 2012.

**Münster A-M, Ingemann Jensen J, Bech B, Gram J. 2001.** Activation of blood coagulation in pigs following lower limb gunshot trauma. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 12:477-485.

**Münster A-M, Olsen AK, Bladbjerg EM.** Usefulness of human coagulation and fibrinolysis assays in domestic pigs. *Comp Med.* 2002 Feb;52(1):39-43.

**Porkka K, Lassilla R, Remes K, Savolainen E-R.** Veritaudit, Duodecim, 2015.

**Reverdiau-Moalic P, Watier H, Valleé I, Lebranchu Y, Bardos P, Gruel Y. 1996.** Comparative study of porcine and human blood coagulation systems: possible relevance in xenotransplantation. *Transplant. Proc.* 28:643-644.

**Stark CK, Tarkia M, Kentala R, Malmberg M, Vähäsilta T, Savo M, Hynninen VV, Helenius M, Ruohonen S, Jalkanen J, Taimen P, Alastalo TP, Saraste A, Knuuti J, Savunen T, Koskenvuo J.** Systemic dosing of thymosin beta 4 before and after ischemia does not attenuate global myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Front Pharmacol.* 2016 May 3;7:115.

**Weaver ME, Pantely Ga, Bristow JD, Ladlet HD.** A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res* 1986 20:907-17

