

HIIREN SISÄKORVAN MAGNEETTIKUVANTAMINEN GEENINSIIRRON YHTEYDESSÄ

MRI imaging of mouse inner ear during gene transfer

Ignat Kovero

Tutkielma

Lääketieteen koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Kliinisen lääketieteen yksikkö / korva-, nenä- ja kurkkutaudit

Helmikuu 2013

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma

KOVERO, IGNAT: Hiiren sisäkorvan magneettikuvantaminen geeninsiirron yhteydessä

Opinnäytetutkielma, 29 sivua

Tutkielman ohjaaja: professori Heikki Löppönen

Helmikuu 2013

Avainsanat: sisäkorva, geeniterapia, geeninsiirtotekniikat, magneettiresonanssikuvaus, hiiret

Kuulovika on yleisin ihmisellä esiintyvä aistivamma. Iän myötä kuulo heikkenee lähes kaikilla, mutta on muitakin riskitekijöitä, jotka johtavat ei-geneettiseen sensorineuraaliseen kuulonalenemaan. Näitä ovat melu, korvaa vaurioittavat lääkkeet, virus- ja bakteeriperäiset infektiot, sisäkorvan traumat, sisäkorvan epämuodostumat sekä edellä mainittujen tekijöiden yhteisvaikutus. Yleisin kuulonaleneman syy on sisäkorvan karvasolujen vaurio, ja sisäkorvan geeniterapian tutkimukset ovat pääasiassa keskittyneetkin karvasolujen tuhoutumisen estoon sekä niiden uusimiseen.

Hiirimallit ovat nykyisin vakiintunut käytäntö sisäkorvan geeniterapian tutkimuksessa ja histologia taas vakiintunut käytäntö solutason rakenteita tutkittaessa. Kuvantamistekniikoiden, kuten magneettiresonanssikuvauksen tai tietokonetomografian, käyttö on ollut erityisesti pienillä koe-eläimillä vähäistä laitteiden huonon erotuskyvyn vuoksi. Luonnollisesti vuosien varrella laitteiden tekniikka on parantunut ja resoluutio otetuissa kuvissa kasvanut. Tästä huolimatta sellaisten hyvien anatomisten kuvien tuottaminen, jotka voisivat olla histologiaan verrattavissa, vaatii sisäkorvan irrottamista koe-eläimestä. Kirjallisuudessa on hyvin vähän elävien koe-eläinten sisäkorvan kuvantamista käsitteleviä töitä. Geeninsiirron yhteydessä tehtävistä MRI- tai TT-kuvantamisista hiiren sisäkorvasta ei ole lainkaan.

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, pystyykö magneettikuvantaminen tarjoamaan lisäapua hiiren sisäkorvan geeninsiirron tutkimuksessa. Erityisesti tämä lisäapu olisi merkittävä, mikäli tarkka kuvantamismenetelmä voisi korvata työlään histologian. Työssä käytettiin koe-eläiminä hiiriä, joille tehtiin geeninsiirto sisäkorvaan. Geeninsiirron jälkeen hiiret kuvattiin MRI:llä in vivo. Työ suoritettiin vuoden 2007 lopulla. Tuolloin kirjallisuudessa ei ollut mainintoja hiiren sisäkorvan kuvantamisesta in vivo.

Tutkimuksessa käytetyllä kuvantamistekniikalla ja MRI-laitteistolla saatiin hiiristä onnistuneesti kuvattua molemmat sisäkorvat in vivo. Kuvien tarkkuus ei kuitenkaan riittänyt erottamaan toisistaan sisäkorvan scala tympania, scala vestibulia tai scala mediaa eikä näiden sisältämiä tarkempia rakenteita. Tästä syystä tutkimuksessa käytetty kuvantamistekniikka ei tällä hetkellä pysty tarjoamaan merkittävää lisäapua sisäkorvan geeninsiirtotutkimuksissa. Lisätutkimuksia hiiren sisäkorvan in vivo -kuvantamisesta sekä tarkempia magneettikuvuslaitteita tarvitaan, jotta geeninsiirron kannalta tärkeät endolymfan rakenteet saataisiin selkeästi näkyviin.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Medicine

Medicine

KOVERO, IGNAT: MRI imaging of mouse inner ear during gene transfer

Thesis, 29 pages

Tutor: Heikki Löppönen, professor

February 2013

Keywords: Ear, Inner, Genetic Therapy, Gene Transfer Techniques, Magnetic Resonance Imaging, Mice

Hearing loss is the most common sensory impairment in humans. By ageing hearing decreases with almost everyone, but there are also other risk factors that affect non-genetic sensorineural hearing loss. These include noise, ototoxic drugs, viral and bacterial infections, inner ear traumas, inner ear malformations and combined effects of the above-mentioned. The damage of the inner ear hair cells is usually behind the hearing loss. Thus gene therapy studies have mainly been focused on preventing the destruction of the hair cells and to their renewal.

To date mouse models are a well-established practice in the inner ear gene therapy research while histology is the best method to examine small cellular structures. Application of the imaging techniques such as MRI or CT has been less popular due to the low resolution especially when scanning small structures of the small animals. Naturally technology of the imaging devices has improved over the years and resolution has increased. Nevertheless, to produce good anatomical images, which could possibly be compared to histological images, requires dissecting the inner ear out of the animal before imaging. There are only few studies in the literature that describes in vivo imaging of the inner ear in animal models. Imaging of the mouse inner ear during gene therapy has yet to be described in the literature.

The aim of this study was to examine the ability of magnetic resonance imaging to provide additional assistance in the gene transfer research of mouse inner ear. In particular, this additional assistance could be important in terms of histology as accurate imaging technique could potentially replace laborious histology. In this study we used mice, which underwent gene transfer to the inner ear. After the gene transfer mice were imaged in vivo using the MRI. The study was carried out in the late 2007. At that time there was no mention of mouse inner ear in vivo imaging in the literature.

Used MRI equipment and imaging parameters in this study provided us with successful images of the mouse inner ear in vivo. However the resolution of the images was not sufficient to separate the scala tympani, scala vestibuli or scala media in the cochlea, not to mention any small structures within those spaces. Thus the imaging technique used in this study is currently not able to provide substantial assistance in the inner ear gene transfer studies. Further studies of the in vivo mouse inner ear imaging, as well as better technology in MRI equipment, are needed to view the important structures of the endolymph considering gene transfer.

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	6
2.1 SISÄKORVAN TOIMINTA JA ANATOMIA	6
2.2 HIIREN SISÄKORVAN KUVANTAMINEN	7
2.3 SISÄKORVAN GEENINSIIRTO	10
2.3.1 Soluvaurioiden hoito	10
2.3.2 Geeninsiirtotekniikat	12
2.3.3 Geeninsiirtovektorit	13
3 OMA TUTKIMUS	14
3.1 ELÄINAINIESTO	15
3.2 LEIKKAUS- JA INJEKTIOOTEKNIikka	15
3.3 KUVAUSTEKNIikka	16
4 TULOKSET	17
4.1 KUVAUKSET	17
4.2 MRI-KUVAT	18
4.3 KUVIEN TULKINTA	21
5 POHDINTA	22
6 LÄHTEET	24

1 JOHDANTO

Kuulovika on yleisin ihmisellä esiintyvä aistivamma. Esiintyvyys lisääntyy ikääntymisen myötä, ja Suomessa 37 % yli 65-vuotiaista ja 64 % yli 75-vuotiaista on vähintään lievästi (>20 dB BEHL_(0,5 - 4,0KHz)=better ear hearing level, paremman korvan kuulokynnyks) kuulovikainen (Uimonen ym. 1999). Maailmanlaajuisesti yli 60-vuotiaista 62 miljoonaa ihmistä on vähintään lievästi kuulovikaisia (WHO World report on disability, 2011).

Iän myötä kuulo heikkenee, mutta kuulonalenemalle on muitakin riskitekijöitä. Yleisimmät ei-geneettisen sensorineuraalisen kuulonaleneman riskitekijät ovat altistuminen melulle, ikä, ototoxiset lääkkeet, virus- ja bakteeriperäiset infektiot ja edellä mainittujen tekijöiden yhteisvaikutus. Muita syitä ovat sisäkorvan epämuodostumat sekä sisäkorvan trauman jälkeiset tilat. Yleisin kuulonaleneman syy on sisäkorvan karvasolujen vaurio Cortin elimesssä. Sisäkorvan geeniterapian tutkimukset ovat tähän asti pääasiassa keskittyneet sisäkorvan karvasolujen uusimiseen ja niiden tuhoutumisen estoon. Lopullisena päämääränä on löytää tapa, jolla sisäkorvan geenivirhe saataisiin korvattua terveellä geenillä (Di Domenico ym. 2009, Lustig ja Akil 2012).

Hiirimallit ovat nykyään avain kuulo- ja tasapainoelimen tutkimisessa (Van Spaendonk ym. 2000), ja histologia tarjoaa puolestaan luotettavan, mutta työlään tavan tutkia sisäkorvan rakenteita (Harada ym. 1990). Ihmisen kohdalla lääketieteeseen tarkoitettuja kuvantamistekniikoita, kuten tietokonetomografia (CT/TT) ja magneettinen resonanssikuvaus (MRI), on käytetty pitkään sisäkorvan morfologian tutkimiseen ja kliiniseen diagnostiikkaan. Näiden tekniikoiden haittana on kuitenkin ollut huono resoluutio, etenkin sisäkorvan pienten rakenteiden kohdalla, ja kuvattaessa pieniä koe-eläimiä ongelma korostuu entisestään (Reisser ym. 1996, Isono ym. 1997, Van Spaendonk ym. 2000).

Tämän työn pääasiallisena tavoitteena oli selvittää, voiko magneetikuvantaminen tarjota lisäapua hiiren sisäkorvan geeninsiirtotutkimuksessa. Geeninsiirron yhteydessä kuvantamistekniikoita ei juurikaan olla yritetty hyödyntää histologian apuna tai jopa sen korvaajana. Tässä työssä käytettiin koe-eläiminä hiiriä, joille tehtiin geeninsiirto adeno- ja AA-virusta käyttämällä. Sen jälkeen hiiret kuvattiin MRI:llä in vivo. Työ suoritettiin vuonna 2008 ja se oli osa laajempaa tutkimusta, joka suoritettiin vuosina 2007–2009. Kirjallisuudessa ei tuolloin ollut mainintoja hiiren in vivo MRI-kuvauksista.

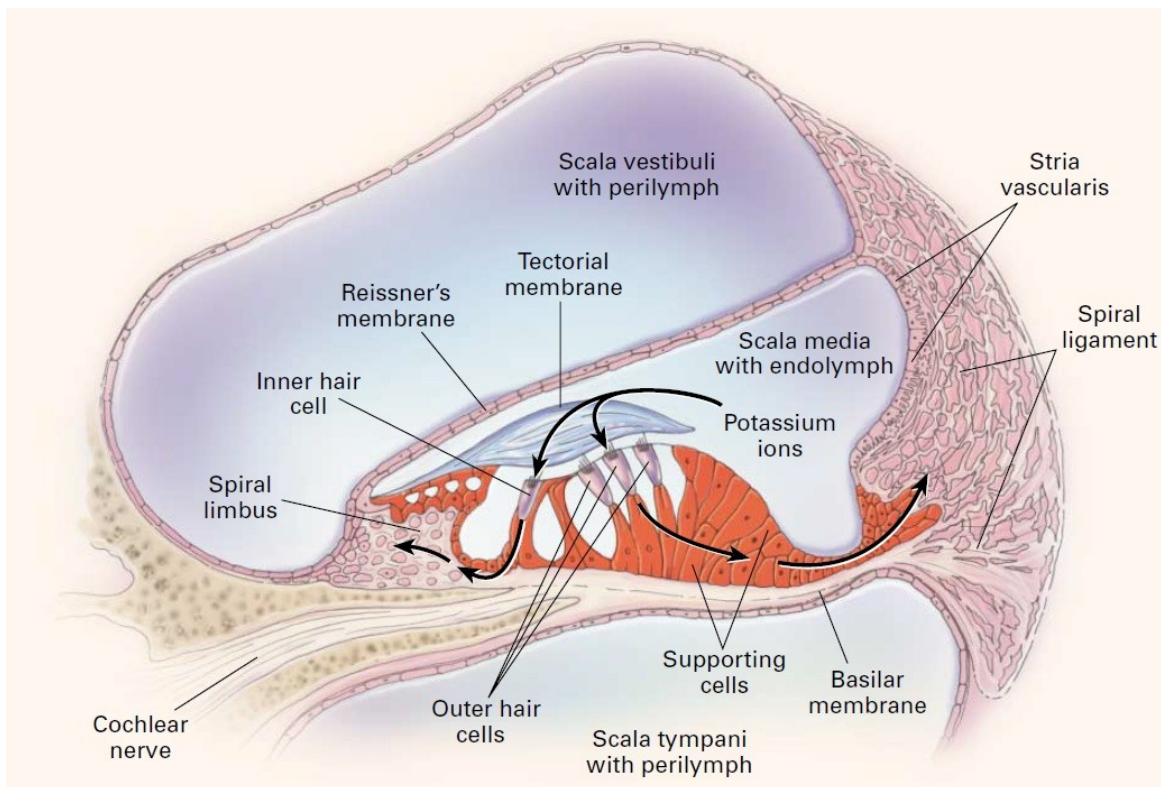
2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 SISÄKORVAN TOIMINTA JA ANATOMIA

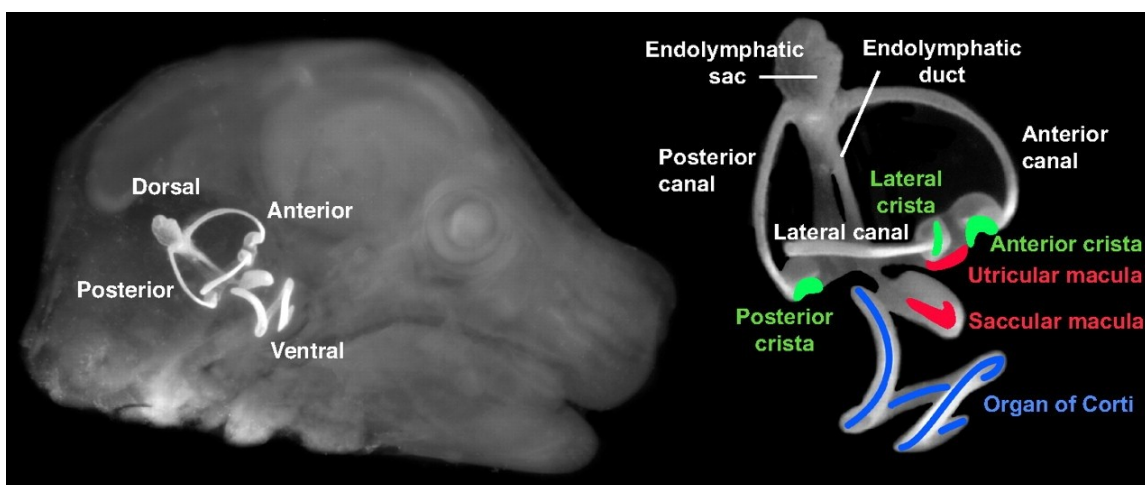
Kuulojärjestelmän tarkoituksena on vahvistaa ja muuttaa ääniaallot hermosignaaleiksi. Ensimmäinen ääni kerätään ja siirretään ulkokorvasta tärykalvolle, minkä jälkeen tärykalvon värähtely liikuttaa välikorvan kuuloluuketjua. Kuuloluuketjun liike siirtyy simpukan soikeaan ikkunaan ja saa aikaan sisäkorvan nestetilan värähtelyn. Simpukan sisäosa muodostuu kalvoisesta labyrintista ja ulkoinen osa luisesta labyrintista. Kalvoisen labyrintin sisältämä neste, endolymfa, muistuttaa ionikoostumukseltaan intrasellulaarinnestettä (korkea K⁺, matala Na⁺). Kalvoista labyrinttia ympäröi ekstrasellulaarinnestettä muistuttava neste, perilymfa (korkea Na⁺, matala K⁺). Simpukka on kärkeään kohti kapeneva kierteinen käytävä. Perilymfatilan muodostavat soikeaan ikkunaan yhteydessä oleva scala vestibuli ja pyöreään ikkunaan yhteydessä oleva scala tympani. Scala vestibuli ja scala tympani ovat yhteydessä toisiinsa simpukan kärjessä olevan helicoterma-aukon kautta. Perilymfatilojen välissä sijaitsee kuuloaistin kalvoinen pääte-elin scala media. Scala median ulkoseinän muodostaa stria vascularis, jonka endolymfaan pumppaamien kaliumionien avulla syntyy kuuloaistimuksen edellytyksenä oleva jännite-ero endolymfatilan ja kuuloelimen välille. Toisen yläsivuseinämän muodostaa Reissnerin membraani, joka erottaa perilymfan ja endolymfan. Pohjan muodostaa basilaarimembraani. Basilaarimembraanin päällä sijaitsee varsinainen kuuloelin, Cortin elin (Willems 2000, Gao ym. 2011, Nuutinen ym. 2011) (ks. kuva 1).

Cortin elin muodostuu tukisoluista sekä sisemmistä ja uloimmista karvasoluista. Karvasolujen yläpäässä sijaitsevat niiden aistinkarvat stereosiliat. Ääniaallon seurauksena basilaarimembraani ja stereosiliat taipuvat, jolloin karvasolu depolarisoituu. Cortin elintä kattaa gelatiinimainen kalvo, membrana tectoria, johon ulkokarvasolut ovat kiinnittyneenä. Ulkokarvasolujen tehtävänä on säädellä basilaarimembraanin liikettä ja siten herkistää kuuloelintä. Minkä tahansa näiden rakenteiden vaurioituminen johtaa sensorineuraaliseen kuulovikaan (Willems 2000, Gao ym. 2011, Nuutinen ym. 2011) (ks. kuva 1).

Hiiren sisäkorvan fysiologia on lähes täysin samanlainen kuin ihmisillä ja muilla nisäkkäillä (Oghalai ym. 1998). Hiiren sisäkorvan anatomia on hyvin samankaltainen kuin ihmisellä, ja hiiren sisäkorvassa on samat rakenteet kuin ihmisenkin sisäkorvasta (Parkinson ja Brown 2002, Brown ym. 2008, Kikkawa ym. 2012) (ks. kuva 2). Lisäksi ihmisellä ja hiirellä 80 % genomista on sama (Pennacchio 2003).



KUVA 1. Poikkileikkaus luisesta simpukasta. Mustilla nuolilla osoitettu kaliumionien (Potassium ions) virtaussuunta. Stria vascularis pumpkaa kaliumioneja endolymfätilaan. Ääniärsyke saa aikaan uloimpien karvasolujen (kolme riviä) ja sisempien karvasolujen (yksi rivi) stereocilioiden taipumisen membrana tectoriaa vasten, mikä aiheuttaa karvasolujen depolarisaation ja kaliumionien sisäänvirtauksen karvasoluihin. Cochlear nerve = kuulohermo, Inner hair cell = sisemmät karvasolut, Outer hair cells = uloimmat karvasolut, Supporting cells = tukisolut (muokattu lähteestä Willems 2000).



KUVA 2. Hiiren sisäkorvan sijainti ja anatomia. Sininen = Cortin elin (muokattu lähteestä Groves ym 2012).

2.2 HIIREN SISÄKORVAN KUVANTAMINEN

Denk ym. (1992) esittivät MRI-kuvaustekniikan, jolla he mittasivat reaaliajassa sisäkorvanesteiden liikkeen rotassa in vivo. Tutkimuksessa käytettiin 18 mm:n pintakelaa. Menetelmänä oli stimuloida sisäkorvaa yhdellä äänitaajuudella ja käyttää magneettista gradienttia, joka oskilloi kyseisen äänitaajuuden mukaan. Kuvia yhdistelemällä saatiin erotettua signaalit, joissa spinit liikkuvat samaan suuntaan kuin stimulus. Tämä tuotti kuvan, jossa scala tympani ja scala vestibuli saatiin eroamaan muista sisäkorvan rakenteista. Tutkimuksessa todettiin, että annettavan äänitaajuuden äänenvoimakkuus piti olla voimakas (n. 100 dB), jotta signaali olisi kuvissa ollut tyydyttävä. Tämä heikensi menetelmän käyttöä kliinissä tutkimuksissa. Itse MRI-tekniikan mainittiin olevan soveltuva kuvaamaan sisäkorvanesteiden liikettä.

Thorne ym. (1999) kuvasivat ihmisen, marsun, lepakon, hiiren ja gerbiilin sisäkorvat magneettiresonanssimikroskopialla (MRM) ex vivo ja määrittivät rakennetuista kolmiulotteisista kuvista kunkin lajin scala tympanin, scala vestibulin ja endolymfatilan (scala media) tilavuudet sekä pituudet. He fiksoivat sisäkorvablokit elohopeaa sisältävällä Heidenhain-Susa-liuoksella, jonka avulla Reissnerin membraani sekä basilaarimembraani erottuivat mustana MRI-kuvissa kaikilla muilla lajeilla paitsi ihmisellä. Tämä mahdollisti endolymfa- ja perilymfatilojen erottamisen kuvissa. Toisaalta Cortin elintä he eivät huomioineet scala median pituutta ja tilavuutta laskettaessa. Tutkimuksessa ei myöskään mainita, näkyikö MRI-kuvissa stria vascularis, joka muodostaa scala median ulkoseinän. Magneettikuvaustekniikkana tutkimuksessa käytettiin 7.1T:n magneettikenttää, suojattua gradienttikalustoa, jonka gradienttikentän maksimivoimakkuus oli 85 G/cm. Kelana he käyttivät lähetys-vastaanotin-kelaa, jonka läpimitta oli 15 mm. Työssä käytettyyn Heidenhain-Susa-fiksaattiin on toisaalta yhdistetty in vitro -tutkimuksissa Reissnerin membraanin huomattava kutistuminen (Brunschwig ja Salt 1997), joka vääristäisi sisäkorvanesteiden todellista tilavuutta ja pituutta. Tätä ei Thornen ym. (1999) työssä otettu huomioon vaan ero oletettiin pieneksi.

Zou ym. (2010a) tutkivat gadolinium (Gd-DOTA) -varjoaineen käyttäytymistä ja sen läpäisykykyä hiiren sisäkorvan simpukassa magneettikuvauksen avulla. He vertasivat myös, onko varjoaineen antotavalla (pyöreän ikkunan kalvon läpi injektoituna tai häntälaskimoon annettuna) merkitystä sen jakautumiseen simpukassa. Tavoitteenaan heillä oli osoittaa MRI-kuvauksen rajallisuus kuvattaessa hiiren sisäkorvan eri rakenteita in vivo kolmi- ja kaksiulotteisilla kuvilla. He käyttivät 4.7T:n magneettikenttää sekä hiiren päälle optimoitua voluumikelaa (dedicated mouse head coil), jonka läpimitta oli 38 mm yli 50 g:n hiirille ja

23 mm alle 25 g:n hiirille. He havaitsivat, että T2-painotteisissa kuvissa pystyttiin erottamaan vaaleana perilymfaneste scala vestibulissa, scala tympanissa, vestibulumissa ja kaarikäytävissä käyttämällä Gd-DOTA-varjoainetta. Ilman varjoainetta T2-painotteisissa kuvissa kaikki rakenteet olivat tummemmat ja vaikeammin erotettavissa (paitsi scala media, jonka kontrasti pysyi samana riippumatta siitä, annettiinko varjoainetta tai ei). Vastaavasti T1-painotteisissa kuvissa varjoaineen kanssa kaarikäytävien ampullat jäivät tummaksi, kun taas perilymfa scala vestibulissa ja scala tympanissa näkyi hyvin vaaleana. Endolymfa scala mediassa näkyi edelleen tummana. Ilman varjoainetta T1-painotteisissa kuvissa kaikki rakenteet olivat diffuusisti tummia. 38 mm:n kelalla T1-painotteisissa kuvissa pystyttiin paremmin erottamaan scala tympani ja scala vestibuli scala mediasta. Kolmiulotteisissa T1-painotteisissa varjoainekuvissa oli parempi kontrasti ja tarkkuus verrattuna kaksiulotteisiin kuviin. Scala tympani ja scala vestibuli saatiin selkeästi esille. Scala median endolymfaneste näkyi mustana ja sen vieressä oleva simpukan lateraaliseinä saatiin kuvissa harmaana esille. Tutkimuksessa todettiin, että varjoaineen (Gd-DOTA) anto injektiona suoraan pyöreän ikkunan kalvon läpi näkyi perilymfatilassa, mutta ei läpäissyt perilymfaendolyfaestettä eikä siis näkynyt endolymfatilassa.

Samaan tulokseen Zou ym. (2005, 2009) pääsivät tutkiessa MRI:lla marsun ja ihmisen sisäkorvaa. Myös hiiren häntälaskimoon annettuna varjoaine ei läpäissyt perilymfaendolymfaestettä, mutta läpäisi veri-perilymfaesteen. Tämäkin tulos vastaa samoja löydöksiä kuin ihmisellä ja marsulla (Counter ym. 2000, 2003; Zou ym. 2009). Tutkimuksessa epäillään vielä, että scala tympanin ja simpukan lateraaliseinämän välissä näkyvä musta ohut reuna voisi sisältää rakenteet, joihin varjoaine ei päässyt, kuten stria vascularis. T2-painotteisia kolmiulotteisia kuvia ei tutkiuksessa otettu. Samankaltainen tutkimus on suoritettu myös rotan sisäkorvalle, mutta siinä varjoaineena käytettiin superparamagneettista rautaoksidia (SPION). SPION-varjoaine näkyi perilymfatilassa, mutta ei siirtynyt perilymfaendolymfaesteen läpi endolyfatilaan. SPION oli gadoliniumia parempi T2-painotteisia kuvia käyttäessä eikä vaatinut yhtä voimakasta magneettikenttää. Yksittäisiä sisäkorvan nestetilöjen rakenteita ei saatu tälläkään menetelmällä esille (Zou ym. 2010b).

Tietokonetomografiakuvauksella on myös kirjallisuuden mukaan kuvattu hiiren sisäkorvaa, tosin tuloksekkaita in vivo -kuvantamisia ei kirjallisuudesta löydy.

Van Spaendonck ym. (2000) kuvasivat mikrotomografialaitteella hiiren sisäkorvaa ex vivo ja saivat laitteella leikepaksuudeksi 8 mikrometriä. Tarkoituksena heillä oli keksiä mene-

telmä, jolla sisäkorvan luisia rakennehäiriöitä voitaisiin tutkia. He saivat kuvattua koko sisäkorvan, erotettua hyvin simpukan sekä kaarikäytävien luiset rakenteet ja mainitsevat myös saaneensa erotettua kuvista pehmeitä kudoksia, kuten stria vasculariksen, mutta ne eivät näkyneet selvästi, koska tarkoitus oli kuvata luisia rakenteita. He eivät mainitse, olisiko heidän käyttämä mikrotomografialaite soveltuva myös pehmytkudosten kuvantamiseen.

Uusimpana menetelmänä Gao ym. (2011) tutkivat optisella koherenssitomografialla (OCT) hiiren sisäkorvaa ex vivo tarkoituksenaan saada näkyviin sisäkorvan pehmytkudoksia. He saivat tuloksiksi korkearesoluutioisia kuvia, joista pystyi erottamaan Reissnerin membraanin, basilaarimembraanin, membrana tectoria sekä osittain karvasoluja. He myös totesivat, että vaikka sisäkorvan ympärillä oleva luu aiheutti häiriötä kuvissa, häiriö ei ollut niin voimakas, että se peittäisi pehmytkudosrakenteet. Menetelmä heidän mukaan on oivallinen sisäkorvan pehmytkudosrakenteiden tutkimiseen histologian lisäksi ja voisi tarjota hyödyllistä informaatiota anatomisista rakenteista, jotka on vaikea saada esille histologialla. Heidän käyttämänsä menetelmän hyötyä in vivo -kuvantamisessa ei ole vielä osoitettu.

2.3 SISÄKORVAN GEENINSIIRTO

2.3.1 Soluvaurioiden hoito

Alun perin linnuilla osoitettiin akustisen trauman jälkeen sisäkorvassa karvasolujen uudismuodostusta. Uudistuneet solut olivat lähtöisin karvasolujen alla olevasta tukisolukosta (Corwin ja Cotanche 1988). Sen jälkeen karvasolujen uudiskasvukapasiteetti osoitettiin nisäkkään tasapainoelimen sensorisessa epiteelissä aminoglykosidilla vammautuneessa sisäkorvassa (Forge ym. 1993). Sisäkorvan Cortin elin ei kuitenkaan kykene spontaaniin karvasolujen uusimiseen (Savary ym. 2007). Tyypillisesti ulkoiset karvasolut ovat herkempiä vahingoille kuin sisemmät karvasolut (Dallos ym. 1972), ja mitä vakavampi kuulovika on, sen enemmän vahingoittuvat sisemmätkin karvasolut (Brigande ja Heller 2009). Birmingham ym. (1999) osoittivat, että sisäkorvan karvasolut tarvitsevat Atoh1-geenin ilmentymää, jotta karvasolut ylipäänsä kasvaisivat. Tähän asti runsaiden tutkimusten kohde onkin ollut transkriptiofaktoria koodaava atonaalinen geeni Atoh1 (ennen Math1), joka saa aikaan karvasolujen uudiskasvun alla olevasta tukisolukosta (Cotanche ja Kaiser 2010).

Izumigawa ym. (2005) raportoivat onnistuneen karvasolujen uudiskasvun sekä kuulokynnyksen paranemista aminoglykosidilla kuuroutetuissa hiirissä adenovirusta ja Atoh1-geeniä käyttämällä. Myös tasopainoelimen karvasolujen uudiskasvua Atoh1-geenin avulla aminoglykosidilla vahingoitetussa korvassa on osoitettu (Staecker ym. 2007, Baker ym. 2009). Izumikawa ym. (2008) totesivat, että Cortin elimessä karvasolut tarvitsevat alleen erilaistuneen tukisolukon kasvaakseen uudestaan. Täysin tuhoutuneet sisäkorvat, joissa jäljellä oli vain yksinkertaista levyepiteeliä tukisolukon alla, eivät pystyneet tuottamaan uusia karvasoluja, vaikka niissä Atoh1 saatiin ilmentymään. Lisäksi he havaitsivat osittaisista hermojen tunkeutumista levyepiteeliin vaikka karvasoluja ei siellä ollut. He spekuloidivat, että pitäisi keksiä menetelmiä, joilla saataisiin estettyä myös karvasolujen alla olevan tukisolukon tuhoa ja menetelmiä, joilla yksinkertaisesta levyepiteelistä voisi kasvattaa tukisolukkoa. Tuoreen tutkimuksen mukaan (Lewis ym. 2012) Atoh1 ilmentyy vain noin puolessa tuhoutuneen sisäkorvan tukisoluissa geeninsiirron jälkeen eikä geenin pitoisuuden lisääminen lisää karvasolujen uudismuodostusta. Tutkimuksessa todetaan, että pelkkä Atoh1:n runsas ilmentyminen tukisoluissa ei riitä käynnistämään solujen erilaistumista karvasoluiksi.

Sisäkorvan spiraaliganglion neuronien tuhoutumista on tutkittu geeninsiirtotekniikoilla. Wise ym. (2006) tutkivat sisäkorvan neuronien tuhoa spiraaligangliossa aminoglykosidilla vahingoitetussa korvassa. Käyttämällä AA-virusta vektorina he siirsivät aivojen neurotrofiinifaktoria (BDNF) scala mediaan ja osoittivat sen säästävän enemmän hermosoluja spiraaligangliossa verrokkeihin verrattuna.

Autoimmuunisyyistä johtuvaa kuulon alenemaa ovat tuoreiltaan tutkineet Zhou ym. (2011), jotka totesivat IL-10:n (interleukiini-10) puutteen hiiressä aiheuttavan kuulon alenemaa tuhoamalla karvasoluja. Sisäkorvaan annettu IL-10 suojasi karvasoluja autoimmuunivaurioilta.

Geneettisen kuulonaleneman hoitaminen on ollut hankalampaa kuin sisäkorvan karvasolujen kasvun aikaansaaminen. Vaikka karvasoluja tähän päivään mennessä on onnistuttu osittain kasvattamaan, geenivikaa, joka alun perin aikaansai karvasolujen tuhon, ei ole pystytty vielä hoitamaan. Tällä hetkellä connexin-26-geenivian (GJB2) aiheuttamaan kuulonalenemaan on saatu joitakin tuloksia RNAi-tekniikalla. RNAi on fysiologinen ilmiö, joka heikentää geeniekspressiota. RNAi-tekniikalla ja virusvektorin avulla on saatu heikennettyä viallisen connexin-26-geenin ilmentymää. Tämä tekniikka voisi soveltua

DFNA2 (KCNQ4), DFNA3 (GJB2) ja DFNA5 (DFNA5) -mutaatioiden hoidossa (Maeda ym. 2009).

2.3.2 Geeninsiirtotekniikat

Sisäkorvan geeninsiirrossa on käytetty kirjallisuuden mukaan pääasiassa kahta tapaa geeninsiirtovektorin siirtämiseksi sisäkorvaan: suora geeninsiirtovektorin injektio pyöreän ikkunan kalvon läpi tai intrakokleaari-infuusio sisäkorvan luiseen osaan tehdyn sisäkorva-avanteen (kokleostooman) kautta (Jero ym. 2001). Näihin metodeihin liittyy kuitenkin ongelmia. Suora injektointi pyöreän ikkunan kalvon läpi voi rikkoa pyöreän ikkunan kalvon ja aiheuttaa perilyfaattisen fistulan. Lisäksi sisäkorvan leikkaustrauma, inflammaatio sekä sensorineuraalinen kuulonmenetys ovat olleet haittana, vaikkakin menetelmillä päästään itse geeninsiirron suhteen hyviin tuloksiin (Carvalho ja Lalwani 1999, Stöver ym. 1999, Jero ym. 2001).

Jero ym. (2001) esittivät uuden metodin geeninsiirrolle sisäkorvaan: he laittoivat pyöreää ikkunaa vasten gelatiinisienen, joka sisälsi geeninsiirtovektorin. Tarkoituksena oli siirtää vektori sisäkorvaan atraumaattisesti pyöreän ikkunan kalvon kautta diffusiolla. Tulokset olivat yhtä hyvät gelatiinisientä käyttäen kuin suoralla injektioilla pyöreän ikkunan kalvon läpi. Gelatiinisienimenetelmä oli tosin riippuvainen käytetystä vektorista. Adenovirus läpäisi pyöreän ikkunan parhaiten ja AA-virus huonoiten. Aarnisalo ym. (2006) yrittivät parantaa pyöreän ikkunan kalvon permeabiliteettia, jotta muidenkin vektorien imeytyminen kalvon läpi olisi tehokkaampaa, mutta heidän käyttämänsä aineet vain laskivat permeabiliteettia. Wang ym. (2011) yrittivät myös parantaa marsuilla pyöreän ikkunan kalvon permeabiliteettia kollageenaasiensyymien avulla erityisesti AA-virusta varten. Tuloksena oli AA-viruksen onnistunut atraumaattinen imeytyminen pyöreän ikkunan läpi, ja geeniekspressio simpukan sensorisissa soluissa oli heidän mukaansa samantasoista kuin intrakokleaari-infuusio-tekniikkaa käyttäen. Tutkimuksessa ei todettu käytetyn metodin aiheuttavan haittavaikutuksia.

Tällä hetkellä käytetyimmät geeninsiirtotekniikat ovat kuitenkin edelleen suora geeninsiirtovektorin injektio pyöreän ikkunan kalvon läpi sekä intrakokleaari-infuusio. Näistä intrakokleaari-infuusio tarjoaa helpoimman ja tehokkaimman tavan verrata eri vektoreiden te-

hoa eri solutyyppeihin sisäkorvassa (Konishi ym. 2008, Shibata ym. 2009, Kilpatric ym. 2011). Täydellistä ongelmatonta siirtotapaa, joka takaisi hyvän geeniekspression eikä aiheuttaisi haittoja, ei ole kuitenkaan vielä kehitetty (Brigande ja Heller 2009, Di Domenico 2011, Lustig ja Akil 2012).

2.3.3 Geeninsiirtovektorit

Geeninsiirtovektoreina on käytetty useita virusvektoreita, kuten adenovirusta, AA-virusta (adeno-associated virus), herpes simplex -virusta, vaccinia-virusta, retrovirusta ja lentivirusta. Virusvektoreilla on eroa soluihin hakeutumisessa, immunivasteen aikaansaamisessa ja siinä, kuinka paljon geneettistä koodia ne voivat sisältää (Di Domenico 2009). Näistä virusvektoreista potentiaalisimmaksi on osoittautunut toisten lähteiden mukaan (Konishi ym. 2008, Husseman ja Raphael 2009, Shibata ym. 2009, Wang ym. 2011) AA-virus ja sen modifikaatiot, sillä se on osoittautunut olevan tehokas geeninsiirtäjä ja aiheuttavan hyvin vähän immuunireaktiota tai ototoksisuutta, ja se mahdollistaa pidempiä geeniekspressioita. Kilpatrick ym. (2011) tutkivat AA-viruksen eri serotyyppeiden (1, 2, 5, 6 ja 8) geeniekspressiota normaalissa ja aminoglykosidilla (kanamysiini) kuuroutetussa hiiren korvassa. Tuloksiksi he saivat onnistuneen geeniekspression karvasoluissa, tukisoluisissa, kuulohermossa sekä spiraaliligamentissa. AAV2- ja AAV8-serotyypit osoittautuivat parhaimmiksi vektoreiksi sisempien karvasolujen ekspressiossa.

Toisten lähteiden mukaan (Di Domenico 2009) adenovirukset olisivat tehokkaimmat ja spesifimmät sisäkorvan geeninsiirtovektorit. Adenoviruksella on AA-virukseen verrattuna suurempi geeninsiirtokapasiteetti (Kesser ym. 2009) ja parempi pyöreän ikkunan läpäisevyyskyky (Jero ym. 2001), mutta ongelmana on sen kohde-elimessä aiheuttama tulehdusreaktio (Di Domenico ym. 2009).

Duan ym. (2010) tutkivat lentiviruksen käyttöä geeninsiirtovektorina rotan sisäkorvassa suoraan scala tympaniin injektoituna, ja tulosten mukaan lentivirus ei levinnyt keskushermoston puolelle vähentäen näin sisäkorvan ulkopuolelle aiheutuvaa haittaa.

Vaikka virukset ovat tehokkaita geeninsiirtovektoreita, niitä ei voida luokitella vielä turvalisiksi geeninsiirtomenetelmiksi (Praetorius ym. 2007). Tuoreimpana menetelmänä nanopartikkelit ovat nyt mahdollisesti tarjoamassa ratkaisua tehokkaan ja turvallisen geeninsiir-

tomenetelmän löytämiseksi (Borkholder 2008). Nanopartikkelit ovat syntetisoituja vekto-reita, joiden läpimitta on pienempi kuin 1000nm (Hornyak 2005). Ne pystyvät kuljetta-maan kohdesoluihin lääkeaineita, proteiineja sekä nukleiinihappoja (Pyykkö ym. 2011). Ge ym. (2007) osoittivat tsintsilloilla tehokkaan geeniekspression mm. stria vasculariksessa, uloimmissa ja sisemmissä karvasoluissa sekä tukisoluisa käyttämällä PLGA (polylaktaati- ja glyserolihappo) -koteloituja rautaoksidinanopartikkeleita (10–20 nm). Nanopartikkelit oli tutkimuksessa laitettu pyöreän ikkunan kalvon päälle 40 minuutiksi. Praetorius ym. (2007) käyttivät piioksidi-nanopartikkeleita, jotka oli laitettu hiirille pyöreän ikkunan kal- von päälle. He onnistuivat saamaan geeniekspression spiraaliganglion soluissa sekä si- semmissä karvasoluissa. Zou ym. (2008) puolestaan kehittivät lipidiytymisen nanopartikke- lin (LNC, 50 nm), jota he laittoivat gelatiinisienen avulla rottien pyöreän ikkunan kalvon päälle. Heidän nanopartikkelit siirtyivät onnistuneesti pyöreän kalvon läpi aiheuttaen gee- niekspression spiraaliligamentissa, stria vasculariksessa sekä molemmissa karvasolutyy- peissä. Lupaavista tuloksista huolimatta nanopartikkeleden heikkouksia ovat haastava gee- niekspression kohdentaminen, geeniekspressioteho sekä vaikeus saavuttaa tehokkaasti sca- la media. Nanopartikkelien kehitys on vasta alkuvaiheessa, ja ainakin toistaiseksi virusvek- torit takaavat paremman selektiivisyyden geeniekspressiolle ja tehokkaamman geenieks- pression (Pyykkö ym. 2011).

3 OMA TUTKIMUS

Tämän työn tavoitteena oli selvittää, voidaanko hiiren sisäkorvan in vivo - magneettikuvauksella saada lisäapua hiiren sisäkorvan tutkimisessa geeninsiirron yhtey- dessä. Kuvantaminen suoritettiin vuonna 2008, jolloin kirjallisuudessa ei ollut mainintoja hiiren sisäkorvan in vivo MRI-kuvantamisesta. Kuvantamisen tarkoituksena oli selvittää, miten tarkasti sisäkorvan rakenteet voidaan saada näkyviin. Sen lisäksi kuvista pyrittiin osoittamaan geeninsiirron jälkeiset leikkaustraumat, mahdollinen arpikudos tai inflammaa-

tio sekä puolierot. Geeninsiirtovektoreina käytettiin adeno ja AA-virusta. Virusvektorien sisällä käytettiin LacZ (β -galaktosidaasi) -värjäysmerkkiainetta. Työ on osa laajempaa tutkimusta, jota suoritettiin vuosina 2007–2009. Laajemman tutkimuksen päämääränä oli stimuloida verisuonten kasvua sisäkorvan stria vascularis -alueella geeninsiirron avulla ja selvittää, onko verisuonien uudiskasvulla vaikutusta kuulon paranemiseen.

3.1 ELÄINAINEISTO

Tutkimuksessa käytettiin 22 hiirtä (C57BL/6jA kanta, paino 20–30 g, naaraita), jotka oli jaettu 6 ryhmään. Ryhmässä 2 oli 2 hiirtä, muissa ryhmissä 4 hiirtä. Hiiret leikattiin marras- ja joulukuun aikana 2007 ja leikkauksen yhteydessä tehtiin geeninsiirto. Odotusaika ennen magneettikuvausta leikkauksen ja geeninsiirron jälkeen oli 1 viikko (ryhmät 1–3 ja 6), 2 viikkoa (ryhmä 5) ja 3 viikkoa (ryhmä 4). Kuvausten jälkeen hiiret lopetettiin tainnuttamalla hiilidioksidilla ja molemmat sisäkorvablokit irrotettiin histologista tutkimusta varten.

Histologista osaa laajemmasta tutkimuksesta ei käsitellä tässä työssä.

Tutkimukselle oli myönnetty lupa koe-eläinten käyttöön Etelä-Suomen läänihallitukselta.

3.2 LEIKKAUS- JA INJEKTIOOTEKNIikka

Leikkauksen tarkoituksena oli päästä käsiksi hiirien välikorvan luiseen rakkulaan (bulla), josta saatiin suora yhteys välikorvaan ja sitä kautta pyöreään ikkunaan. Hiiret nukutettiin 100–150 μ l:lla ksylatsiinia (Rompun®) sekä tarvittaessa 20–25 μ l:lla ketamiinia (Ketal®), jotka annettiin ihon alle injektiona.

Hiiret asetettiin selälleen ja teipattiin styroksilevyn päälle. Toimenpide suoritettiin Zeiss® -mikroskooppia apuna käyttäen. Karvojen poiston jälkeen ensimmäinen viilto (2 cm) tehtiin

3 mm alaleukaluun kulmasta alaspäin keskiviivasta hieman oikealle kaulalle. Kudoksia dissekoitiin ja submandibulaarirauhanen saatiin näkyville. Sylkirauhanen siirrettiin sivuun, jotta saataisiin näkyvyys syvempiin kudoksiin, ja sen jälkeen kasvolaskimo siirrettiin myös sivuun. Tämä mahdollisti paremman näkyvyyden korvakäytävän rusto-osaan, fibroottiseen annulukseen sekä digasticus-lihakseen, jonka alla sijaitsee välikorvan luinen rakkula (bul-la). Digastricus-lihas poltettiin kahtia, mikä paljasti välikorvan luisen rakkulan ja sen ympärillä kulkevat kielen liikehermon sekä kasvohermon. Välikorvan luisen rakkulaan poltettiin reikä (varoen kielen liikehermoa, kasvohermoa sekä karotistuppea) n. 1,5 mm:n kohdasta, jossa jyrsijöille tyypillinen stapediaalivaltimo siirtyy välikorvaan. Reikää suurennettiin tarvittaessa poistamalla luuta välikorvan luisesta rakkulasta, jotta alla sijaitseva pyöreä ikkuna saatiin selkeästi näkyviin.

Injektiot suoritettiin mikroinjektoria käyttämällä. Virusvektorina käytettiin ryhmille 1–3 ja 6 adenovirusta sekä ryhmille 4–5 AA-virusta. Kaikki virusvektorit sisälsivät pelkästään LacZ-värjäysmarkkeria. Virusta injisoitiin jokaiselle hiirelle yhteensä 2 x 69 μ l. Puolelle hiiristä (n = 11) geeninsiirto suoritettiin injisoimalla kapillaariputkesta tehdyllä lasisella mikroneulalla 2 kertaa peräkkäin 1 x 69 μ l virusta suoraan pyöreän ikkunan kalvon läpi. Toiselle puoliskolle (n = 11) laitettiin pyöreän ikkunan päälle gelatiinisieni ja sen päälle injisoitiin 2 x 69 μ l virusta. Geeninsiirron jälkeen kaikille hiirille laitettiin pieni pala rasvakudosta, ryhmästä riippuen, pyöreään ikkunan tai gelatiinisienen päälle. Kaikille hiirille annettiin leikkauksen päätteeksi karprofeenia (Rimadyl) 100 μ l kivunhoitoon ihon alle.

3.3 KUVAUSTEKNIikka

Magneettikuvaukset suoritettiin Kuopiossa A.I. Virtanen -instituutissa 11/2007–01/2008. Hiiret nukutettiin ennen magneettikuvausta dityppioksidilla (N₂O). Kaikkien hiirien iholle kiinnitettiin selän ja vatsan puolelle lämpötyyny, joissa kiersi lämmin vesi. Hiirille teipattiin letkut nenän kohdalle, niiden avulla ylläpidettiin tasaista dityppioksidivirtausta kuvauksen ajan. Hiiret laitettiin sen jälkeen kuvauslaitteeseen. Kuvauksen aikana vitaalielin-toimintoja ei seurattu.

Magneettikuvaus suoritettiin 9.4T:n magneettikentässä, vertikaalisessa kapeaytimisessä (89 mm) magneetissa käyttäen Agilent Technologies -magneettikuvauskonsolia ja aktiivisesti suojattua gradienttikelastoa, jonka maksimi gradienttikentän voimakkuus on 100 G/cm. Mittauksessa käytettiin hiiren päälle optimoitua lähetin-vastaanotin-volumikelaa (dedicated mouse head coil). Kuvauksessa käytettiin T2-painotteisia anatomisia kuvia, jotka mitattiin käyttäen spin-kaiku-pulssisekvenssiä. Optimaalisimmat mittauseräparametrit, jotka tuottivat tarkimmat ja kontrastisuhteeltaan parhaimmat kuvat, olivat kaiku-aika (TE) 40 ms, toisto-aika (TR) 2,5 s, kuvauspinta-ala 1,91 cm katettuna 128 x 256 pisteellä (resoluutio) ja leikepaksuus 0,7 mm. Jokaisesta hiirestä kuvattiin 12 aksiaalista leikettä. Magneettikuvauksissa ei käytetty varjoainetta.

Kuvausten jälkeen raaka data analysoitiin MATLAB®-ohjelmistolla. Datan kääntämistä kuvaksi MATLAB®:n sisällä käytettiin Aedes-lisäohjelmistoa. Kuvien kontrasti ja kirkkaus säädettiin Aedes-ohjelman sisällä.

4 TULOKSET

4.1 KUVAUKSET

Kuvauksia saatiin suoritettua kaiken kaikkiaan kymmenen, joista yksi kuva epäonnitui tuntemattomasta syystä (hiiri 1.1, joka kuvattiin uudestaan). Epäonnistunutta kuvasarjaa ei näytetä tässä työssä. Tavoitteena oli kuvata jokaisesta ryhmästä kaksi hiirtä, joista toisella geeninsiirtotekniikka oli suora injektio pyöreän ikkunan kalvon läpi (rw) ja toisella gelatiinisienen kautta (gelatiini). Kaikki neljä hiirtä ryhmästä 3 kuolivat kaksi päivää leikkauksen jälkeen tuntemattomasta syystä eikä niitä voitu kuvata. Ryhmän 2 ensimmäinen hiiri kuoli magneettikuvauksen aikana ja toinen ennen kuvauksia leikkauksen jälkeen tuntemat-

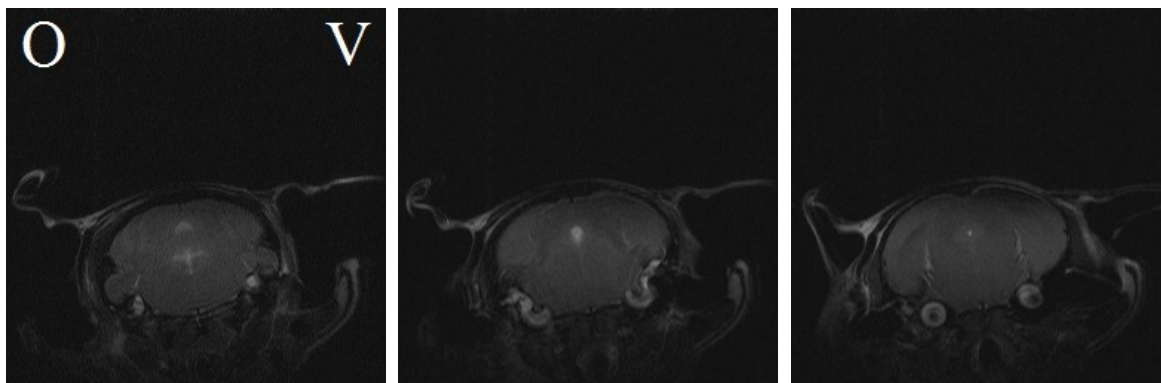
tomasta syystä. Ryhmästä 2 saatiin siksi otettua vain yksi kuvasarja otettua. Leikatut ja kuvatut hiiret on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Kaikki leikatut hiiret (n = 22) ryhmiin jaettuna. Kunkin ryhmän kaikilla hiirillä on ollut sama geeninsiirtovektori. Onnistuneita kuvattuja hiiriä n = 9.

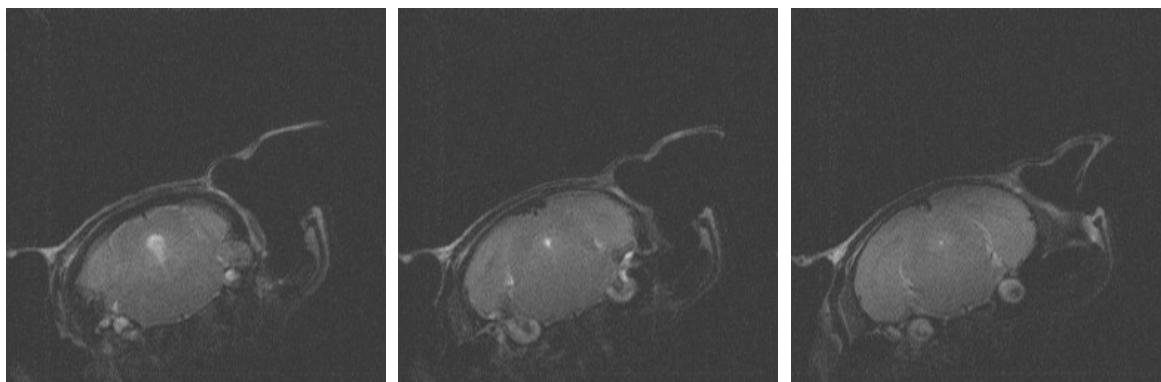
Ryhmä	Virusvektori	Hiiri	Injektioireitti	Kuvattu	Aika leikkauksesta
1	Adeno-LacZ	1.1	rw	kyllä	1 viikko
		1.2	gelatiini	kyllä	1 viikko
		1.3	gelatiini	ei	-
		1.4	rw	ei	-
2	Adeno-LacZ	2.1	rw	kyllä (kuoli kuvauksessa)	1 viikko
		2.2	gelatiini	ei (kuoli ennen kuvausta)	-
3	Adeno-LacZ	3.1	gelatiini	ei (kuoli ennen kuvausta)	-
		3.2	rw	ei (kuoli ennen kuvausta)	-
		3.3	rw	ei (kuoli ennen kuvausta)	-
		3.4	gelatiini	ei (kuoli ennen kuvausta)	-
4	AAV-LacZ	4.1	gelatiini	kyllä	3 viikkoa
		4.2	rw	kyllä	3 viikkoa
		4.3	gelatiini	ei	-
		4.4	rw	ei	-
5	AAV-LacZ	5.1	rw	ei	-
		5.2	gelatiini	ei	-
		5.3	rw	kyllä	2 viikkoa
		5.4	gelatiini	kyllä	2 viikkoa
6	Adeno-LacZ	6.1	rw	kyllä	1 viikko
		6.2	gelatiini	kyllä	1 viikko
		6.3	rw	ei	-
		6.4	gelatiini	ei	-

4.2 MRI-KUVAT

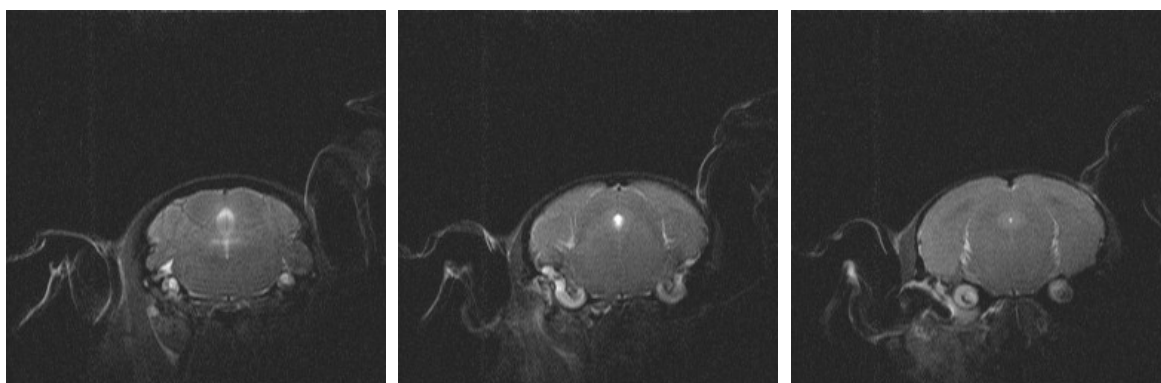
Jokaisesta kuvasarjasta saatiin 12 aksiaalileikettä, joiden paksuus oli 0,7 mm. Kuvasarjoihin on koottu jokaisesta hiirestä kolme kuvaa, jotka kattavat vasemmalta – oikealle katsottuna luisen simpukan basaali-, keski- ja kärkiosan. Jokaisen kuvasarjan alla on esitetty hiiren numero (ryhmä ja hiiren järjestysnumero), käytetty virusvektori, käytetty injektioireitti sekä aika leikkauksen ja kuvauksen välillä.



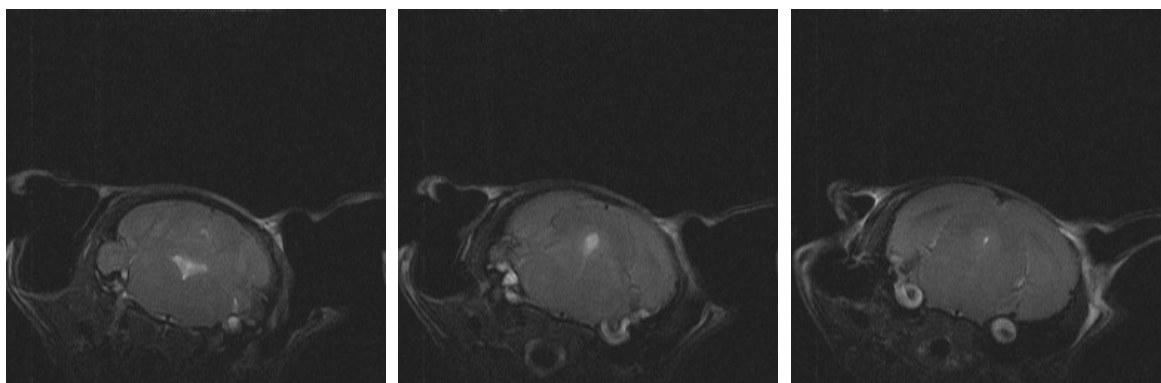
Hiiri 1.1. adeno-LacZ, rw, 1 viikko



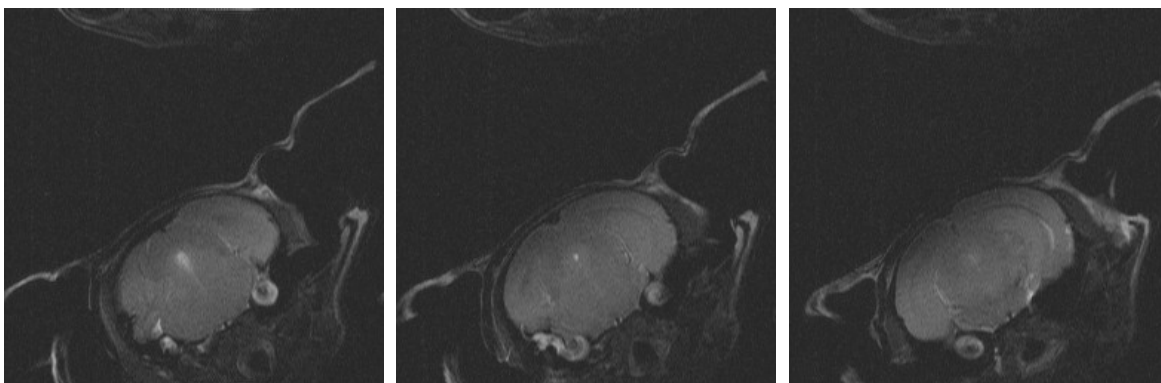
Hiiri 1.2. adeno-LacZ, gelatiini, 1 viikko



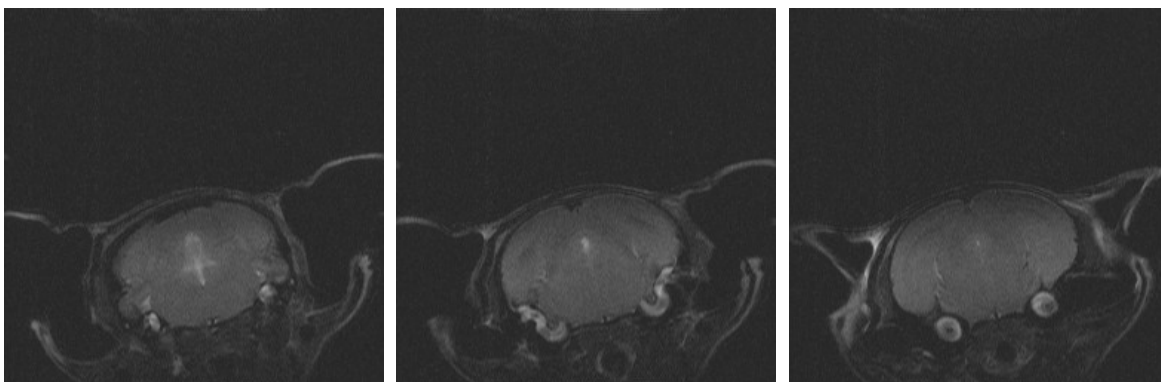
Hiiri 2.1. adeno-LacZ, rw, 1 viikko



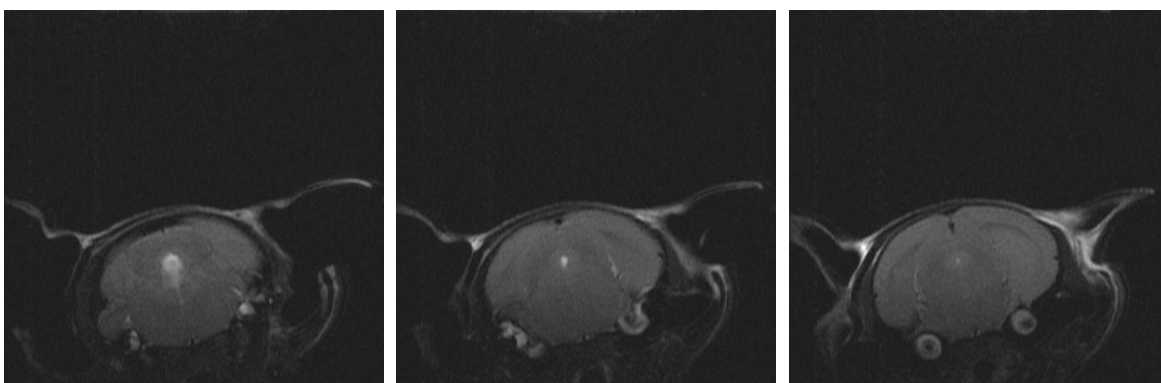
Hiiri 4.1. AAV-LacZ, gelatiini, 3 viikkoa



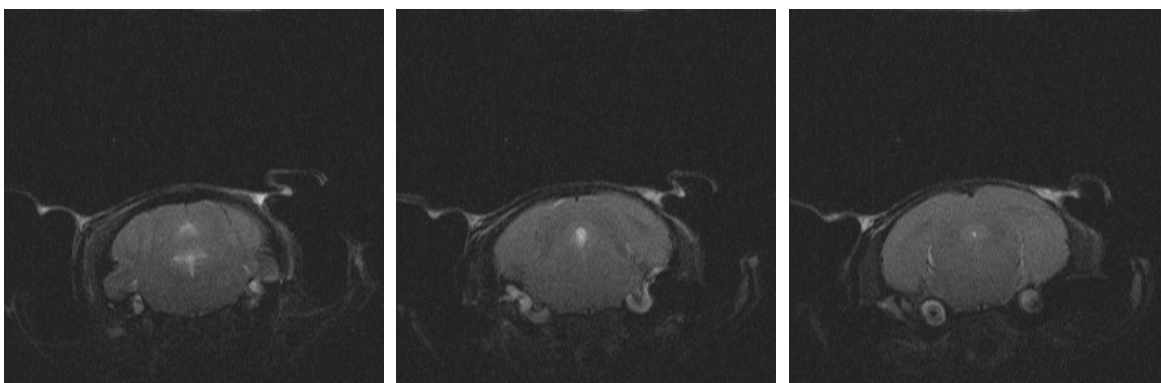
Hiiri 4.2. AAV-LacZ, rw, 3 viikkoa



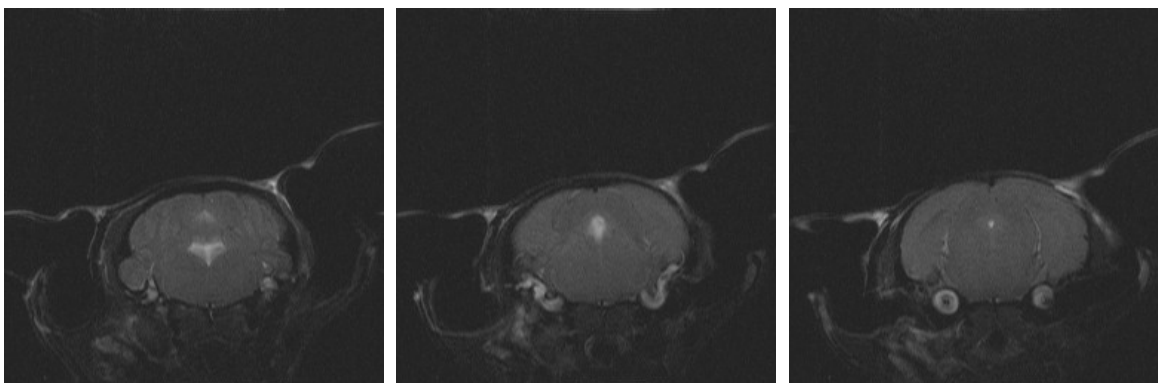
Hiiri 5.3. AAV-LacZ, rw, 2 viikkoa



Hiiri 5.4. AAV-LacZ, gelatiini, 2 viikkoa



Hiiri 6.1. adeno-LacZ, rw, 1 viikko



Hiiri 6.2. adeno-LacZ, gelatiini, 1 viikko

4.3 KUVIEN TULKINTA

Kuvista pystyi käytetyllä resoluutiolla (128 x 256) erottaamaan kaikilta hiiriltä nesteisen simpukan. Tarkempia simpukan rakenteita, kuten endolymfa, perilymfa tai scala media, ei kuvista pystynyt erottamaan. Puolieroja kuvista on hankalaa hahmottaa, sillä hiiriä ei voitu sijoittaa magneettilaitteessa täysin samaan paikkaan, eikä pienempää leikepaksuutta tai korkeampaa resoluutiota ollut mahdollista saada. Tämä on hyvin havaittavissa hiirissä 4.1 ja 4.2, joiden projektiot ovat selkeästi vinommat kuin muilla hiirillä, ja sen vuoksi varsinkin keskimmaisissa kuvissa sisäkorva näyttää toisella puolella poikkeavalta. Aedes-ohjelman sisällä kuvien kontrastin tai kirkkauden muuttaminen ei tuonut tarkempia yksityiskohtia esille.

Käytetty virusvektori

Kuvista ei pysty erottamaan luotettavasti, kumpi virusvektori on ollut käytössä. Kuvien pieni resoluutio sekä leikepaksuuden suuri koko (suhteessa koe-eläimen kokoon) estää tekemästä tarkempia havaintoja nesteisen simpukan pienemmistä rakenteista. Näiden pienempien rakenteiden erottamien kuvista on välttämätöntä, jotta käytettyjen virusvektoreiden aiheuttamia eroja olisi mahdollista arvioida. Tiheyserot nesteisessä simpukassa voisivat mahdollisesti viitata geeniepression vahvuuteen tai viruksen suureen konsentraatioon sisäkorvassa, mutta Aedes-ohjelman sisällä kontrastin ja kirkkauden muuttaminen ei näyttänyt merkittäviä kontrastieroja sisäkorvien välillä.

Injektioireitti

Kuten käytetyn virusvektorin kohdalla, eri geeninsiirtovektorin antamistapojen väliset erot vaativat tarkempien sisäkorvan rakenteiden erottamisen kuvista. Täten käytettyä injektioireittä ei pysty erottamaan pelkästään kuvien perusteella.

Leikkaustrauma

Leikkaustraman arviointi riippuu olennaisesti projektioiden suoruudesta. Hiirillä 4.1 ja 4.2 projektiot ovat vinoimmat, joten sisäkorvan alue näyttää selkeästi erilaiselta. Tätä puolieroa ei voi kuitenkaan yksiselitteisesti arvioida leikkaustramaksi. Parhaista projektiosta (1.1, 2.1, 5.3, 5.4, 6.1) selkeämmät puolierot ovat hiirellä 2.1, mutta lähinnä sisäkorvan ympärillä kuin itse sisäkorvassa. Muissa kuvissa yhtä selkeää puolieroa sisäkorvan ympärillä ei ole ja leikkaustekniikka oli kaikilla hiirillä sama. Hiiri 2.1 oli lisäksi kuollut magneettikuvauksen aikana, ja tämä saattoi myös aiheuttaa artefaktia kuviin. Kuvien tarkkuus ei myöskään riitä arvioimaan mahdollista pyöreän ikkunan kalvon traumaa, joka voi aiheutua geeninsiirtovektorin injektioista. Tässä tutkimuksessa saatujen MRI-kuvien perusteella ei siis pysty luotettavasti arvioimaan mahdollisia leikkaustrauvoja.

Aikaero ryhmien välillä

Otetuista kuvista ei näy merkittävää kontrasti- tai kirkkauseroa eri odotusaikojen välillä. Tästä syystä aikaeron vaikutusta geeniekspression voimakkuuteen eri virusvektorien välillä ei voida luotettavasti arvioida näiden kuvien perusteella.

5 POHDINTA

Tämän työn päätarkoituksena oli osoittaa, voiko magneettikuvantamien tarjota mahdollisesti lisäapua hiiren sisäkorvan geeninsiirron tutkimuksessa. Työ oli tehty 2007 lopulla ja kirjallisuudessa ei tuolloin ollut mainintoja hiiren sisäkorvan in vivo -kuvantamisesta MRI-laitteella. Työ oli myös osa laajempaa sisäkorvan geeninsiirtotutkimusta. Tässä työssä käytetty magneettikuvaustekniikka sekä magneettikuvauslaitteisto ei pysty tarjoamaan tar-

peeksi tarkkaa kuvaa, jotta siitä olisi merkittävää hyötyä geeninsiirtotutkimuksessa solutasolla. Geeninsiirrossa solutasolla tapahtuvat asiat, kuten geeniekspression ilmentymä tai vektorin tehon arviointi, vaativat paljon tarkempaa kuvantamismenetelmää tai histologiaa. Toisaalta tässä työssä käytettyä kuvaustekniikkaa voisi mahdollisesti käyttää sisäkorvan alueen leikkaustraumojen osoittamiseen geeninsiirron aikana. Tämä kuitenkin vaatisi lisätutkimuksia aiheesta ja suuremmat otoskoot, jotta kuvia pystyisi luotettavasti analysoimaan. Tutkimuksessa käytetyn kuvantamismenetelmän hyöty sisäkorvan geeninsiirrossa jää avoimeksi.

Hyvin tarkkoihin kuviin hiiren sisäkorvasta on mahdollista päästä tällä hetkellä, mutta tämä edellyttää sisäkorvablokin irrottamista hiirestä. Kuten Gao ym. (2010) osoittivat, irrallisen sisäkorvablokin kuvantaminen optisella koherenssitomografia (OCT) -laitteella voi tuottaa lähes histologian tasoisia kuvia erottaen mm. membrana tectoriaan sekä osittain karvasolujakin. Nähtäväksi jää, voidaanko tätä tekniikkaa jatkossa soveltaa sisäkorvan geeninsiirron tutkimuksessa.

Nanopartikkelien käyttö sisäkorvan geeninsiirtotutkimuksessa näyttää lupaavalta vaikka se tarvitsee vielä runsaasti lisätutkimuksia. Geeninsiirtovektori, joka on yhtä tehokas geeniekspressiossa kuin virusvektori, pääsee ongelmitta endolyfatilaan, mutta ei aiheuta virusvektorin tasoisia haittavaikutuksia voi muutaman vuoden sisällä saavuttaa korkean suosion sisäkorvan geeninsiirrossa. Erityisesti se takaisi oivallisen tavan siirtää lääkeaineita sisäkorvaan (Pyykkö ym. 2011).

Nanopartikkelitutkimusten yhteydessä hiiren sisäkorvan magneetikuvantaminen on myös noussut viime vuosina hieman enemmän esille. Zou ym. (2010a) ja Zou ym. (2010b) saivat tarkkoja kuvia rotan ja hiiren sisäkorvasta vaikkakaan kummassakaan tutkimuksessa scala mediaan ei näkyvyyttä saatu. Molemmissa töissä magneetikuvantamisella arvioitiin varjoaineen käyttäytymistä sisäkorvassa, koska näillä varjoaineilla voidaan jatkossa tarkastella annettujen nanopartikkelien siirtymistä sisäkorvan nestetiloissa. Kummassakaan tutkimuksessa ei kuitenkaan saatu varjoainetta siirtymään scala mediaan. Nanopartikkeleilla on myös ollut samankaltaisia ongelmia tavoittaa scala media (Pyykkö ym. 2011). Gadoliniumin on lisäksi osoitettu olevan ototoksinen korkeina pitoisuuksina (Kikagi ym. 2008), joten superparamagneettinen rautaoksidi (SPION) vaikuttaa olevan parempi vaihtoehto etenkin T2-painotteisissa kuvissa, kunhan se saadaan siirtymään myös endolymfatilaan. Kliinisessä käytössä tämä mahdollistaisi geeninsiirron avulla sisäkorvaan annettujen nano-

partikkelien jakautumisen arviointia scala mediassa (Zou ym. 2010b). SPION-varjoaineen käyttöä ei kuitenkaan ole tutkittu hiirillä.

Hiiren sisäkorvan magneettikuvantamisen tutkimukset vaikuttavat tällä hetkellä kulkevan käsi kädessä nanopartikkelitutkimusten kanssa. Molempien päämääränä on edistää sisäkorvan geeninsiirtoa. Anatomisten kuvien saaminen kuvantamislaitteilla vaatii ainakin toistaiseksi sisäkorvan irroittamista. Magneettikuvantamisella voidaan nykyisin saada korkearesoluutioisia kuvia, mutta ne eivät vielä riitä erottamaan sisäkorvasta tarkkoja rakenteita, kuten ei riittänyt tässäkin tutkimuksessa. Anatomisten kuvien tuottaminen sisäkorvasta tietokonetomografialla toimii jo tänä päivänä oivallisena apuna histologialle, kuten Gao ym. (2010) osoittivat. In vivo samanlaiseen tarkkuuteen magneettikuvantamisella ei toistaiseksi päästä, mutta ennemmin kuin histologian apukeinona geeninsiirrossa magneettikuvantamisen näyttää kehittyvän nyt arvioimaan geeninsiirron vastetta kliinisellä tasolla. Tulevaisuudessa voitaisiin siis antaa sisäkorvaan nanopartikkeleita sisältävä lääke ja arvioida lääkkeen vaikutus (geeniekspressio) scala mediassa käyttämällä magneettikuvantamista sekä kyseiselle nanopartikkelille soveltuvaa varjoainetta. Ensin täytyy kuitenkin saada todettua nanopartikkelien hyvä teho, aikaansaada geeniekspressio oikeissa kohdesoluissa sekä kehittää turvallinen ja tehokas varjoaine, jotta onnistunut geeniekspressio voitaisiin magneettikuvista todeta. Tällä saralla tarvitaan vielä lukuisia tutkimuksia ja siinä ajassa magneettikuvauslaitteiden tekniikka ehtii myös kehittyä.

6 LÄHTEET

Aarnisalo AA, Aarnisalo P, Pietola L, Wahlfors J ja Jero J. Efficacy of gene transfer through the round window membrane: an in vitro model. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2006;68:220-7.

Baker K, Brough DE ja Staecker H. Repair of the vestibular system via adenovector delivery of Atoh1: a potential treatment for balance disorders. *Adv Otorhinolaryngol* 2009;66:52-63.

Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, ym. Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 1999;284:1837-41.

Borkholder DA. State-of-the-art mechanisms of intracochlear drug delivery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;16:472-7.

Brigande JV ja Heller S. Quo vadis, hair cell regeneration?. *Nat Neurosci* 2009;12:679-85.

Brown SD, Hardisty-Hughes RE ja Mburu P. Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nat Rev Genet* 2008;9:277-90.

Brunschwig AS ja Salt AN. Fixation-induced shrinkage of Reissner's membrane and its potential influence on the assessment of endolymph volume. *Hear Res* 1997;114:62-8.

Carvalho GJ ja Lalwani AK. The effect of cochleostomy and intracochlear infusion on auditory brain stem response threshold in the guinea pig. *Am J Otol* 1999;20:87-90.

Corwin JT ja Cotanche DA. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 1988;240:1772-4.

Cotanche DA ja Kaiser CL. Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration. *Hear Res* 2010;266:18-25.

Counter SA, Bjelke B, Borg E, Klason T, Chen Z ja Duan ML. Magnetic resonance imaging of the membranous labyrinth during in vivo gadolinium (Gd-DTPA-BMA) uptake in the normal and lesioned cochlea. *Neuroreport* 2000;11:3979-83.

Counter SA, Zou J, Bjelke B ja Klason T. 3D MRI of the in vivo vestibulo-cochlea labyrinth during Gd-DTPA-BMA uptake. *Neuroreport* 2003;14:1707-12.

Dallos P, Billone MC, Durrant JD, Wang C ja Raynor S. Cochlear inner and outer hair cells: functional differences. *Science* 1972;177:356-8.

Denk W, Keolian RM, Ogawa S ja Jelinski LW. Oscillatory flow in the cochlea visualized by a magnetic resonance imaging technique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1595-8.

Di Domenico M, Ricciardi C, Martone T, ym. Towards gene therapy for deafness. *J Cell Physiol* 2011;226:2494-9.

Duan M ja Mi Q. Local delivery of reporter gene to the cochlea does not spread to brain tissue in an animal model. *Acta Otolaryngol* 2010;130:25-30.

Forge A, Li L, Corwin JT ja Nevill G. Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 1993;259:1616-9.

Gao SS, Xia A, Yuan T, ym. Quantitative imaging of cochlear soft tissues in wild-type and hearing-impaired transgenic mice by spectral domain optical coherence tomography. *Opt Express* 2011;19:15415-28.

Ge X, Jackson RL, Liu J, ym. Distribution of PLGA nanoparticles in chinchilla cochleae. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137:619-23.

Groves AK ja Fekete DM. Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning. *Development* 2012;139:245-57.

Harada T, Ishii S, Tayama N ja Sugawara M. Computer-aided three-dimensional reconstruction of the osseous and membranous labyrinths. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1990;247:348-51.

Hornyak GL. Nanotechnology in otolaryngology. *Otolaryngol Clin North Am* 2005;38:273,93, vi.

Hussemann J ja Raphael Y. Gene therapy in the inner ear using adenovirus vectors. *Adv Otorhinolaryngol* 2009;66:37-51.

Isono M, Murata K, Aiba K, Miyashita H, Tanaka H ja Ishikawa M. Minute findings of inner ear anomalies by three-dimensional CT scanning. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1997;42:41-53.

Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, ym. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005;11:271-6.

Izumikawa M, Batts SA, Miyazawa T, Swiderski DL ja Raphael Y. Response of the flat cochlear epithelium to forced expression of Atoh1. *Hear Res* 2008;240:52-6.

Jero J, Mhatre AN, Tseng CJ, ym. Cochlear gene delivery through an intact round window membrane in mouse. *Hum Gene Ther* 2001;12:539-48.

Kakigi A, Nishimura M, Takeda T, Okada T, Murata Y ja Ogawa Y. Effects of gadolinium injected into the middle ear on the stria vascularis. *Acta Otolaryngol* 2008;128:841-5.

Kesser BW ja Lalwani AK. Gene therapy and stem cell transplantation: strategies for hearing restoration. *Adv Otorhinolaryngol* 2009;66:64-86.

Kikkawa Y, Seki Y, Okumura K, ym. Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Exp Anim* 2012;61:85-98.

Kilpatrick LA, Li Q, Yang J, Goddard JC, Fekete DM ja Lang H. Adeno-associated virus-mediated gene delivery into the scala media of the normal and deafened adult mouse ear. *Gene Ther* 2011;18:569-78.

Konishi M, Kawamoto K, Izumikawa M, Kuriyama H ja Yamashita T. Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors. *J Gene Med* 2008;10:610-8.

Lewis RM, Hume CR ja Stone JS. Atoh1 expression and function during auditory hair cell regeneration in post-hatch chickens. *Hear Res* 2012;289:74-85.

Lustig LR ja Akil O. Cochlear gene therapy. *Curr Opin Neurol* 2012;25:57-60.

Maeda Y, Sheffield AM ja Smith RJ. Therapeutic regulation of gene expression in the inner ear using RNA interference. *Adv Otorhinolaryngol* 2009;66:13-36.

Nuutinen J. Korva-, nenä- ja kurkkutaudit ja foniatrian perusteet. Tampere: Korvatieto Oy 2011.

Oghalai JS, Holt JR, Nakagawa T, ym. Ionic currents and electromotility in inner ear hair cells from humans. *J Neurophysiol* 1998;79:2235-9.

Parkinson N ja Brown SD. Focusing on the genetics of hearing: you ain't heard nothin' yet. *Genome Biol* 2002;3:COMMENT2006.

Pennacchio LA. Insights from human/mouse genome comparisons. *Mamm Genome* 2003;14:429-36.

Praetorius M, Brunner C, Lehnert B, ym. Transsynaptic delivery of nanoparticles to the central auditory nervous system. *Acta Otolaryngol* 2007;127:486-90.

Pyykko I, Zou J, Zhang W ja Zhang Y. Nanoparticle-based delivery for the treatment of inner ear disorders. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;19:388-96.

Reisser C, Schubert O, Forsting M ja Sartor K. Anatomy of the temporal bone: detailed three-dimensional display based on image data from high-resolution helical CT: a preliminary report. *Am J Otol* 1996;17:473-9.

Savary E, Hugnot JP, Chassigneux Y, ym. Distinct population of hair cell progenitors can be isolated from the postnatal mouse cochlea using side population analysis. *Stem Cells* 2007;25:332-9.

Shibata SB, Di Pasquale G, Cortez SR, Chiorini JA ja Raphael Y. Gene transfer using bovine adeno-associated virus in the guinea pig cochlea. *Gene Ther* 2009;16:990-7.

Staecker H, Praetorius M, Baker K ja Brough DE. Vestibular hair cell regeneration and restoration of balance function induced by *math1* gene transfer. *Otol Neurotol* 2007;28:223-31.

Stover T, Yagi M ja Raphael Y. Cochlear gene transfer: round window versus cochleostomy inoculation. *Hear Res* 1999;136:124-30.

Thorne M, Salt AN, DeMott JE, Henson MM, Henson OW, Jr ja Gewalt SL. Cochlear fluid space dimensions for six species derived from reconstructions of three-dimensional magnetic resonance images. *Laryngoscope* 1999;109:1661-8.

Uimonen S, Huttunen K, Jounio-Ervasti K ja Sorri M. Do we know the real need for hearing rehabilitation at the population level? Hearing impairments in the 5- to 75-year-old cross-sectional Finnish population. *Br J Audiol* 1999;33:53-9.

Van Spaendonck MP, Cryns K, Van De Heyning PH, Scheuermann DW, Van Camp G ja Timmermans JP. High resolution imaging of the mouse inner ear by microtomography: a new tool in inner ear research. *Anat Rec* 2000;259:229-36.

Wang H, Murphy R, Taaffe D, ym. Efficient cochlear gene transfection in guinea-pigs with adeno-associated viral vectors by partial digestion of round window membrane. *Gene Ther* 2012;19:255-63.

World Health Organisation. World Report on Disability 2011. Geneve: WHO 2012.
http://www.who.int/disabilities/world_report/2011/report/en/index.html

Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000;342:1101-9.

Wise AK, Hume CR, Flynn BO, ym. Effects of localized neurotrophin gene expression on spiral ganglion neuron resprouting in the deafened cochlea. *Mol Ther* 2010;18:1111-22.

Zhou B, Kermany MH, Cai Q, ym. Experimental autoimmune hearing loss is exacerbated in IL-10-deficient mice and reversed by IL-10 gene transfer. *Gene Ther* 2012;19:228-35.

Zou J, Pyykkö I, Bjelke B, Dastidar P ja Toppila E. Communication between the perilymphatic scalae and spiral ligament visualized by in vivo MRI. *Audiol Neurootol* 2005;10:145-52.

Zou J, Saulnier P, Perrier T, ym. Distribution of lipid nanocapsules in different cochlear cell populations after round window membrane permeation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;87:10-8.

Zou J, Poe D, Bjelke B ja Pyykkö I. Visualization of inner ear disorders with MRI in vivo: from animal models to human application. *Acta Otolaryngol Suppl* 2009;(560):22-31. doi:22-31.

Zou J, Zhang W, Poe D, Zhang Y, Ramadan UA ja Pyykkö I. Differential passage of gadolinium through the mouse inner ear barriers evaluated with 4.7T MRI. *Hear Res* 2010;259:36-43. a

Zou J, Zhang W, Poe D, ym. MRI manifestation of novel superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the rat inner ear. *Nanomedicine (Lond)* 2010;5:739-54. b