

Johannes Turkki

**IHMISEN NEUROVERKOSTOJEN
TUTKIMINEN KÄYTTÄEN
MIKROFLUIDISTIIKKA &
MIKROELEKTRODIHILAA**

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatin tutkielma
Elokuu, 2020

Tiivistelmä

Johannes Turkki: IHMISEN NEUROVERKOSTOJEN TUTKIMINEN KÄYTTÄEN
MIKROFLUIDISTIIKKAA & MIKROELEKTRODIHILAA

Kandidaatin tutkielma

Tampereen yliopisto

Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikka

Elokuu, 2020

Tässä kandidaatin tutkielmassa selvitän keskushermoston neuronien ja neuroverkostojen sähköfysiologisia ominaisuuksia ja näiden ominaisuuksien tutkimista erilaisilla tekniikoilla ja laitteilla. Tutkielman tarkoituksena oli perehtyä ajankohtaisiin keskushermoston neuronien ja neuroverkostojen rakennetta ja toimintaa käsitteleviin tutkimuksiin ja kirjallisuuteen. Kandidaatin tutkielma tehtiin Tampereen yliopiston lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnan Neuroryhmälle, bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan koulutusohjelmassa. Tutkielmassa aluksi selvitetään neuronien rakenne ja fysiologia, sekä hermotukisolujen rooli neuroverkostoissa. Neuroverkostojen rakenteen ja toiminnan tutkimus *in vitro* on tutkielmassa keskeisessä roolissa. Tutkielmassa pohditaan myös eri solulähteitä neuroverkostojen tutkimiselle *in vitro* ja niiden hyötyjä ja haasteita. Tämän jälkeen perehdytään neuronien ja neuroverkostojen viljelyyn ja tutkimukseen erilaisin menetelmin. Mikrofluidististen sirujen käyttö neuronien viljelyssä mahdollistaa viljely-ympäristön monipuolisen manipuloinnin, joka johtaa kohti *in vivo* – kaltaista viljely - ympäristöä. Neuronien ja neuroverkostojen sähköisen aktiivisuuden mittaamiseen *in vitro*. Mikroelektrodihila – mittaus on sopiva ja tarkka menetelmä, jossa sähköistä aktiivisuutta mitataan mikroelektrodeilla, joiden materiaali, lukumäärä ja tiheys MEA – levyllä vaikuttaa tutkimukseen. Tutkielman lopuksi esitellään MEA – levyn ja mikrofluidistiikan integroiminen yhdelle alustalle, mikä mahdollistaa entistä tarkemman neuronien ja neuroverkostojen tutkimuksen *in vitro*.

Avainsanat: Neuronit, gliasolut, ihminen, eläin, sähköfysiologia, mikrofluidistiikka, mikroelektrodihila

Alkusanat

Tämä kandidaatin tutkielma on laadittu Tampereen yliopiston Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnan ohjeiden mukaan, Tampereen yliopiston Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnan Neuroryhmälle bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan koulutusohjelmassa. Tutkielma on osa luonnontieteiden kandidaatin opintoja.

Luonnontieteiden kandidaatti laadittiin, käyttäen lähteenä aiheeseen liittyviä tutkimuksia ja kirjallisuutta. Tutkielman ohjaajina toimivat Susanna Narkilahti ja Fikret Emre Kapucu, joita haluan kiittää jatkuvasta ammattimaisesta ohjaamisesta ja ymmärtävyydestä. Kiitos kuuluu myös Tampereen yliopistolle ja Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnalle, mitkä mahdollistivat kandidaatin tutkielman suorittamisen.

Tampereella 20.08.2020

Johannes Turkki

Sisällysluettelo

| | |
|---|----|
| Kansilehti | |
| Tiivistelmä | 1 |
| Alkusanat | 2 |
| Sisällysluettelo | 3 |
| Lyhenteet | 4 |
| 1. Johdanto | 5 |
| 2. Neuronit | 6 |
| 2.1 Neuronien rakenne..... | 6 |
| 2.2 Neuronien sähköfysiologia | 7 |
| 2.3 Neuroverkostot..... | 8 |
| 2.4 Neuronien lähteet..... | 9 |
| 3. Mikrofluidistinen siruteknologia | 13 |
| 3.1 Mikrofluidististen sirujen rakenne ja toiminta | 13 |
| 3.2 Mikrofluidististen sirujen haasteet..... | 15 |
| 4. Mikroelektrodihilalevy (MEA - levy) | 15 |
| 4.1 Rakenne ja toiminta..... | 17 |
| 4.2 Signaalin analyysi ja analyysi | 19 |
| 4.3 MEA – mittauksien haasteet | 20 |
| 5. MEA – integroidut mikrofluidistiset sirut | 21 |
| 5.1 Integroitujen alustojen rakenne..... | 22 |
| 5.2 Integroitujen alustojen toiminta ja käyttö | 23 |
| 6. Yhteenveto | 25 |
| Lähteet | 27 |

Lyhenteet:

MEA = Mikroelektrodihila (eng. Microelectrode array)

PDMS = Polydimetyylisiloksaani (eng. Polydimethylsiloxane)

EEG = Elektroenkefalografia (eng. electroencephalography)

SNR = Signaalin suhde häiriöön (eng. Signal to noise ratio)

KCl = Kaliumkloridi

1. Johdanto

Aivot ovat elimistön monimutkaisin elin, joka omaa moniulotteisia ominaisuuksia informaation vastaanottamiseen ja prosessointiin muualta elimistöstä ja elimistön ulkopuolelta. Aivot koostuvat lukuisista neuroverkostoista, joissa informaation käsittely perustuu erilaisiin neuroneihin, hermotukisoluihin ja näiden yhteiseen toimintaan, pääasiassa kuitenkin ensimmäisenä mainittuun. Neuroneista ja mahdollisesti hermotukisoluista voidaan luoda neuroverkostoja *in vitro*, joiden avulla pyritään selvittämään aivojen toimintaa *in vivo*. Neuroverkostojen monimutkaisen rakenteen ja toiminnan tutkiminen vaatii monipuolisia viljely- ja tutkimusmenetelmiä *in vitro*, jotta verkostojen rakennetta ja toimintaa voidaan verrata aivojen normaaliin kehitykseen ja toimintaan, sairauksiin ja vaurioihin *in vivo*.

Neurologiset sairaudet ja oireyhtymät ovat valtava kuolinsyy ympäri maailman. Nämä vaikuttavat kuolemien lisäksi myös vammaisuuteen ja työkyvyttömyyteen, joilla on yhteiskunnallisesti suuria vaikutuksia. Haring ym. (2017) mukaan pelkästään Yhdysvalloissa neurologisten sairauksien ja vammojen on arvioitu vaikuttavan 6,4 miljoonaan ihmiseen. Esimerkiksi vammoista aiheutuneita neurologisia oireyhtymätapauksia syntyy Yhdysvalloissa vuosittain 1,7 miljoonaa. Lisäksi neurologisia sairauksia, kuten Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden määrän on todettu nousevan (Haring, Sontheimer, & Johnson, 2017). Tarve selvittää aivojen normaaliin toimintaan, sairauksiin ja vaurioihin liittyviä toimintoja on luonut poikkitieteellisen neurotieteen tutkimuksen alueen, jossa sovelletaan esimerkiksi neurobiologiaa, materiaalitekniikka, mikroelektroniikkaa, tietojenkäsittelytieteitä ja matematiikkaa.

Neuroverkostoja on tutkittu erilaisin menetelmin ja tutkimuksien solulähteinä on yleisesti käytetty eläimiä. Vaikka eläinten, kuten rottien neuroneita on helposti saatavilla ja niiden viljelyyn on vakiintunut toimivia protokollia, eivät ne täysin vastaa toiminnaltaan ihmisen neuroneita. Tämän ja esimerkiksi eettisten syiden vuoksi, siirrytään tutkimuksessa kohti ihmissolumalleja, joissa ihmisen neuroneita viljellään ja tutkitaan esimerkiksi mikrofluidistiikan ja MEA – mittauksen avulla. Mikrofluidistiikasta on tullut tärkeä tekniikka, joka mahdollistaa neuronien ominaisuuksien tutkimisen suurella tarkkuudella ja toistettavuudella *in vitro* (Ristola et al., 2019). MEA – mittauksia on sen sijaan käytetty jo yli 25 vuotta tutkittaessa sähköisesti aktiivisten solujen toimintaa (Johnstone et al., 2010). Molempia, mikrofluidistiikkaa ja MEA – mittauksia on neurologisten sairauksien tutkimisen lisäksi hyödynnetty lääkeainetestauksissa. Nykyisin näitä kahta tekniikkaa on mahdollista yhdistää samalle alustalle, mikä luo uusia ulottuvuuksia neuronien ja neuroverkostojen tutkimiselle *in vitro*. Molemmista tekniikoista kuitenkin löytyy haasteita, joiden ratkaiseminen vie neurotiedettä kohti tarkempaa, *in vivo* – kaltaista ihmisaivomallia *in vitro*.

Tämän kandidaatin tutkielman tarkoitus on käydä läpi neuronien ja tarkemmin neuroverkostojen tutkimusta. Aluksi perehdytään neuronien, neuroverkostojen rakenteeseen ja toimintaan ja esitellään

eri lähteitä, joista neuroneita ja hermotukisoluja on mahdollista saada. Tämän jälkeen käydään läpi mikrofluidististen sirujen ja MEA – levyjen rakenne ja toiminta.

Lopuksi esitellään integroitujen mikrofluidististen MEA – levyjen rakennetta ja toimintaa ja pohditaan kyseisten alustojen kehitystä tulevaisuudessa. Jokaisessa osiossa tullaan myös mainitsemaan osioon liittyviä haasteita.

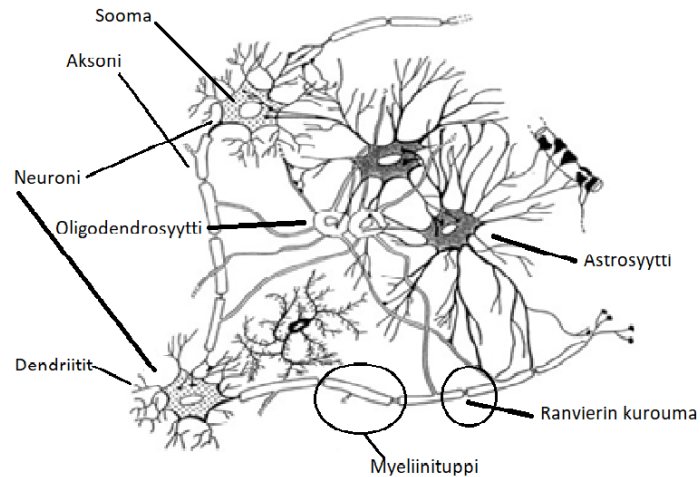
2. Neuronit

Keskushermosto säätelee elimistön toimintoja ääreishermoston kanssa sisäisten ja ulkoisten ärsykkeiden ja signaalien perusteella. Kypsä keskushermosto koostuu aivoista ja selkäytimestä, jotka rakentuvat neuroneista, hermotukisoluista ja niiden muodostamista verkostoista. Verkostojen toiminta perustuu pääosin neuroneiden sähköiseen aktiivisuuteen ja sähköisten jännitemuutosten, eli toimintajännitteen välittymiseen neuronien välillä välittäjäaineiden avulla. Seuraavissa osioissa keskitytään keskushermoston CNS, ja erityisesti aivojen neuronien ja neuroverkostojen ominaisuuksiin.

2.1 Neuronin rakenne

Neuronit ovat pitkälle erilaistuneita, sähköisesti aktiivisia soluja, jotka koostuvat soomasta, eli runkosasta, dendriteistä, eli tuojahaarakkeista ja aksonista, eli viejähaarakkeesta. Ominaisia rakenteita neuroneille ovat kaksi jälkimmäistä (Kuva 1). Sooma, eli neuronin runko, on hyvin samanlainen soluorganelleiltaan muiden solutyypin kanssa. Sooman muoto ja koko kuitenkin vaihtelevat suuresti eri neuronityyppien välillä. Yhteistä kaikille tyypeille kuitenkin on se, että ne sisältävät suurimman osan neuronin soluorganelleista, kuten tuman, ja osallistuvat hermoimpulssin välitykseen. Dendriitit ovat soomasta lähteviä haarakkeita, jotka vastaanottavat impulsseja muilta neuroneilta (Kuva 1). Dendriittien muodostamat haarautuneet verkostot laajentavat neuronin ärsyksen vastaanottopinta-alaa (Jacobson & Marcus, 2011).

Neuronin yksi ominaisimmista rakenteista toimintajännitteen välittämiseen on aksoni, joka on pitkä soomasta lähtevä uloke. Neuronin solukalvo on täynnä jänniteherkkiä ionikanavia, jotka saavat aikaan toimintajännitteen kulkeutumisen aksonissa (Jacobson & Marcus, 2011). Aksonin pää haarautuu (Bucher & Goillard, 2011) ja haaraumat päättyvät synapseihin (Kuva 1, Kuva 2), joista toimintajännite siirtyy kohdesoluun. Synapsit ovat yhteyksiä neuronien ja kohdesolujen välillä ja niiden rakenne voidaan jakaa esisynaptisen solukalvoon, synaptiseen rakoon ja jälkisyntaptiseen solukalvoon (Kuva 2) (Jacobson & Marcus, 2011).



Kuva 1 Keskushermoston neuronit, neuronien osat ja gliasolut. Kuva muokattu lähteestä (Nicole Baumann & Danielle Pham-Dinh, 2001).

2.2 Neuronin sähköfysiologia

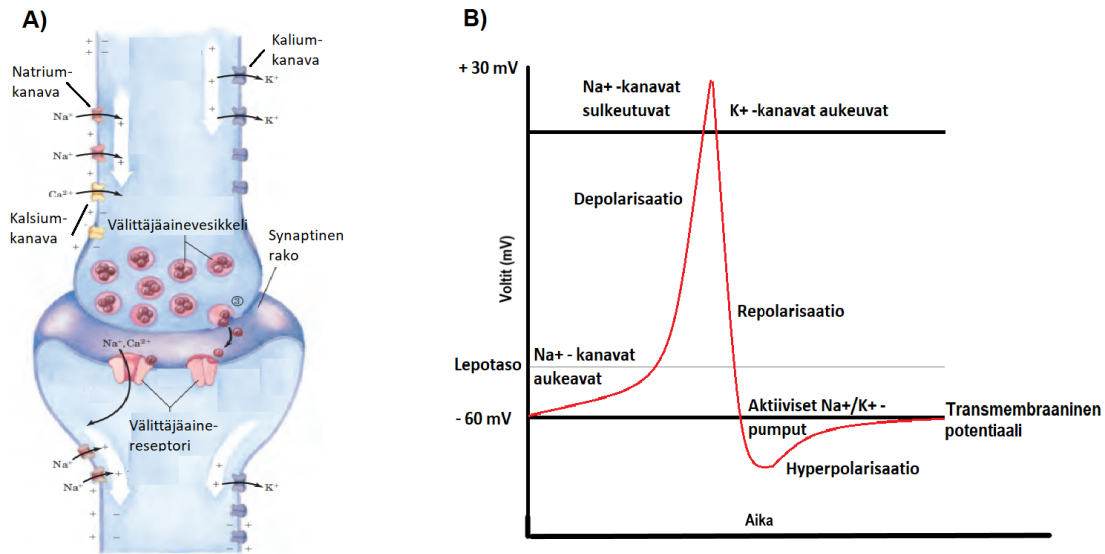
Neuronien sähköinen aktiivisuus perustuu niiden solukalvon eri puolten väliseen ionikonsentraation eroon ja sen muuttumiseen ionien virratessa joko neuronin sisälle tai ekstrasellulaariseen tilaan. Levossa ionikonsentraatioero synnyttää jännite-eron, transmembraanisen potentiaalin, missä neuronin sytosoli on negatiivisesti ja ulkopuoli positiivisesti varautunut, jolloin transmembraaninen potentiaali on noin -60 millivolttia (mV) (Kuva 2B). Transmembraanisen potentiaalin saa pääosin aikaan Na^+K^+ -pumppu, joka pumppaa K^+ -ioneja sisään ja Na^+ -ioneja ulos neuronista (Nelson, Cox, & Lehninger, 2008).

Neuronin stimulointi saa aikaan solukalvoa pitkin kulkevan toimintajännitteen eli aksonipotentiaalin. Toimintajännite syntyy, kun ärsykkeen aikaansaama solukalvon eri puolten välinen jännite-ero muuttuu paikallisesti tarpeeksi ylittämään lepotason (engl. threshold) (Bucher & Goillard, 2011). Tällainen solukalvon paikallinen depolarisaatio saa jänniteherkät Na^+ kanavaproteiinit aukeamaan, jolloin natriumia virtaa solukalvon läpi neuroniin vahvistaen depolarisaatiota (Kuva 2A, B). Tämän myötä sytosolin varaus muuttuu positiivisemmaksi ($+30$ mV) (Kuva 2B) (Nelson et al., 2008). Na^+ ionien sisään virtaus saa aikaan viereisten jänniteherkkien Na^+ kanavaproteiinien aukeamisen, jolloin toimintajännite kulkee yhdensuuntaisesti kohti aksonin päätä, jossa se siirtyy kohdoneuroniin kemiallisesti synapsien välityksellä. Yhdensuuntaisuus on seurausta jänniteherkkien Na^+ kanavaproteiinien refraktaalista periodista, jolloin kanava on hetkellisesti kiinni (Nelson et al., 2008).

Solukalvon paikallinen depolarisaatio saa myös aikaan jänniteherkkien K^+ kanavaproteiinien aukeamisen, jolloin K^+ -ioneja virtaa neuronista ulos (Kuva 2A, B) (Nelson et al., 2008). Tämä saa

aikaan solukalvon paikallisen repolarisoitumisen ja hetkellisen hyperpolarisaation, jolloin jännite-ero on transmembraanista potentiaalia negatiivisempi (Kuva 2B) (Bucher & Goillard, 2011).

Tämän jälkeen solukalvo palaa paikallisesti lepotilaan Na^+K^+ -pumppujen ansiosta (Kuva 2B) ja on valmis uuteen toimintajännitteeseen (Nelson et al., 2008). Keskushermoston neuronin sähköinen aktiivisuus perustuu siis solukalvon eri puolten ionikonsentraatioiden asymmetriaan, näiden ionikonsentraatioiden paikallisiin muutoksiin ja toimintajännitteen kemialliseen välittymiseen toiseen neuroniiin.



Kuva 2 A) Synapsi ja sen esi- ja jälkisynaptiset neuronit. Kuva muokattu lähteestä (Nelson, Cox & Lehninger, 2008). B) Diagrammi toimintajännitteen eri vaiheista.

2.3 Neuroverkostot

Yksittäisen neuronin rakenteen ja sähköfysiologian ymmärtäminen on tärkeää, mutta neuroverkostojen tutkiminen *in vitro* auttaa paremmin ymmärtämään aivojen kompleksisia toimintoja *in vivo*. Neuroverkostot perustuvat toisiinsa rakenteellisesti ja toiminnallisesti yhteydessä oleviin neuroneihin. Näiden avulla voidaan tutkia aivojen rakennetta, toimintoja ja kehitystä, niihin vaikuttavia sairauksia, sekä suorittaa lääkeainetestausta (Ylä-Outinen et al., 2019). Neuroverkostojen toiminta *in vivo* ei onnistuisi pelkkien neuroneiden toimesta, vaan ne tarvitsevat gliasoluja, eli hermotukisoluja, jotka tukevat neuronien toimintaa (Jacobson & Marcus, 2011). *In vivo* neuroverkostojen tutkimisen ja ymmärtämisen ollessa haastavaa, on niitä alettu tutkia erilaisin menetelmin *in vitro*.

Kypsyneiden keskushermoston neuronien ja neuroverkostojen toiminta *in vivo* ja *in vitro* on perusominaisuuksiltaan samanlaista, toimintajännitteeseen ja synapseihin perustuvaa informaation välitystä. Kyseisten neuroneiden esisynaptinen osuus sisältää aksonin pään ja sen sytosolissa

sijaitsevat synaptiset vesikkelit, joista vapautuvat välittäjäaineet siirtävät kemiallisesti toimintajännitteen eteenpäin jälkisyntaptiseen neuroniin (Jacobson & Marcus, 2011). Jälkisyntaptisen neuronin dendriiteissä ja soomassa toimintajännite saa aikaan hermoimpulssin, joka siirtyessään aksoniin muuttuu toimintajännitteeksi.

Välittäjäaineiden vapautuminen perustuu toimintajännitteen aikaansaamaan sytosoliseen Ca^{2+} - ionikonsentraation kasvuun. Toimintajännitteen kulkeutuessa aksonin kärkeen, aukeavat jänniteherkät Ca^{2+} -kanavaproteiinit, jolloin Ca^{2+} -ioneja virtaa neuronin synapsiin. Synapsin sytosolisen Ca^{2+} - ionikonsentraation kasvu aiheuttaa vesikkeleiden fuusioitumisen esisyntaptiseen solukalvoon ja välittäjäaineiden vapautumisen synaptiseen rakkoon, josta ne diffundoituvat synaptisen raon läpi jälkisyntaptisen neuronin välittäjäainereseptoreihin, jolloin dendriitti depolarisoituu ja uusi hermoimpulssi syntyy (Kuva 2). Synapsit voivat kuitenkin olla myös inhiboivia eli estäviä (vrt. eksitoivaan eli aktivoivaan) (Jacobson & Marcus, 2011). Yksittäiset neuronit siis muodostavat yhteyksiä toisiinsa synapsien välityksellä ja näistä yhteyksistä muodostuu neuroverkostoja.

In vivo neuroverkostot sisältävät neuroneiden lisäksi gliasoluja. On kuitenkin mahdollista luoda toiminnallisia neuroverkostoja *in vitro* ilman gliasoluja, tarkkaan säätelällä kasvuympäristön kemiallista ja molekulaarista koostumusta (Amin et al., 2016). Tärkeimpiä gliasoluja keskushermostossa ovat astrocytit, mikroglia-solut ja oligodendrosyytit (Kuva 1), joista jälkimmäisillä on tärkeä rooli toimintajännitteen kulkeutumisen edistämässä. Keskushermoston neuronien aksonit ovat yleensä ympäröityjä myeliinitupilla, joita oligodendrosyytit muodostavat. Myeliini on oligodendrosyytin solukalvoa, joka muodostaa eristeen aksonin ympärille kuitenkin jättäen myelinisoimattomia rakoja, Ranvierin kuroumia. Myelinisaatio nopeuttaa toimintajännitteen kulkeutumista, kun toimintajännite siirtyy aksonissa eteenpäin kuroumasta kuroumaan, koko aksonin pituudelta tapahtuvan tasaisen kulkeutumisen sijaan (Kuva 1) (Nicole Baumann & Danielle Pham-Dinh, 2001).

Astrocytit puolestaan osallistuvat erilaisten kalvojen, kuten veriaivoesteen muodostumiseen aivojen ympärille. Astrocytit myös eristävät synapseja ympäröiviä alueita ja säätelevät välittäjäaineiden konsentraatioita synaptisessa raossa, näin vaikuttaen hermoverkoston toimintaan. Mikroglia-solut sen sijaan ovat vastuussa keskushermoston immuunijärjestelmästä toimimalla makrofageina. Mikroglia-solut voivat erilaistua erityyppisiksi makrofageiksi eri biomolekyylien, kuten antigeenien, tunnistuksen perusteella (Jacobson & Marcus, 2011).

2.4 Neuronien lähteet

Kypsät neuronit ja gliasolut *post natal*, eli syntymän jälkeen, ovat terminaalaisesti erilaistuneet, eli kyseiset solut eivät itse voi uusiutua vaurioituessaan, eikä erilaistua enää muiksi soluiksi. Eläinten alkioista tai *post natal* eristetystä hermokudoksesta saadut neuronit, eli primääriviljelmät ovat

kuitenkin eniten käytettyjä neurotieteellisessä tutkimuksessa *in vitro* (Ylä-Outinen et al., 2019). Myös ihmisten primaariviljelmiä, kuten leikkauksista saatua aivokudosta on käytetty (Wickham et al., 2020). Eristetyn hermokudoksen solut ovat siis pääasiallisesti täysin erilaistuneita neuroneita ja gliasoluja ja vain pieni osa on hermokantasoluja, eli progenitorisoluja (Taulukko 1). Eläinperäisten primääriviljelmien etuna on ensisijaisesti helppo saatavuus ja hermokudoksen sähköfysiologian ainakin osittainen säilyminen eristyspaikan mukaisena (Millet & Gillette, 2012). Lisäksi samankaltaisuudet *in vivo* ja *in vitro* ihmis- ja eläinmallien välillä on todettu olevan riittäviä (Taulukko 1), jonka myötä ihmisten aivojen ominaisuuksia, sairauksia ja lääkeainestausta voidaan tutkia eläinmallien avulla *in vitro* (Liu, Sternberg, Ghiasvand, & Berdichevsky, 2019).

Eläinmalleilla ja primääriviljelmillä on kuitenkin myös haittapuolia. Näihin lukeutuu esimerkiksi eettiset ongelmat, kuten eläinten terveyteen ja elämän arvoon liittyvät asiat (https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/alternatives_information_en.htm, European Commission, Directive 2010/63/EU, 10.8.2020). Lääketieteellisestä näkökulmasta suurempi ongelma kuitenkin on erot ihmis- ja eläinneuroneiden ja neuroverkostojen välillä. Vaikka *in vivo* ja *in vitro* eläinmalleilla pystytään mallintamaan joitain ihmisaivojen ominaisuuksia, on kuitenkin näiden kahden välillä huomattavia lajipohjaisia eroavaisuuksia (Napoli & Obeid, 2016). Eroavaisuuksia ilmenee sekä genomi-, että solutasolla, joiden vuoksi alkionkehityksessä ja neuroverkostojen morfologisessa ja sähköfysiologisessa kehittämisessä on sekä ajallisia ja toiminnallisia eroja (Ylä-Outinen et al., 2019).

Eläinmallien haasteet ajavat neurotieteen tutkimusta kohti *in vitro* pohjaisia ihmissolumalleja. Ihmissolumalleissa käytetään monikykyisistä, eli pluripotentista kantasoluista (eng. human pluripotent stem cells, hPSC) erilaistettuja neuroneita ja neuroverkostoja. Erilaistumisprosessi *in vitro* noudattaa samoja vaiheita kuin aivojen kehitys *in vivo*. Prosessin loppuvaiheessa muodostuu myös astrosyyttejä ja oligodendrosyyttejä (Ylä-Outinen et al., 2019). hPS – solut pystyvät uusiutumaan loputtomasti ja erilaistumaan miksi tahansa solutyypiksi. Näistä soluista ihmissolumalleissa eniten käytettyjä solutyyppejä ovat ihmisalkion kantasolut (eng. human embryonic stem cells, hESC), joita saadaan ihmisalkion blastokystin sisäsolumassasta, ja ihmisen indusoidut pluripotentit kantasolut (eng. human induced pluripotent stem cells, hiPSC), joita saadaan ihmisen erilaistuneista soluista uudelleenohjelmoimalla ne iPSC – tilaan *in vitro*. Uudelleenohjelmointi on riippuvainen eri transkriptiotekijöistä (Keller & Frega, 2019).

Käyttämällä ihmisen hPS-soluja pystytään luomaan neuroverkostomalli *in vitro*, joka tarkemmin kuvaa ihmisen aivoja *in vivo*, samalla välttämällä eläinmateriaalin käyttöön liittyvät eettiset ongelmat. Tarkempaan potilaskohtaiseen ihmissolumalliin päästään hiPS - solujen avulla, jossa potilaan omista soluista, esimerkiksi fibroblasteista, erilaistetaan hiPS - soluja, jolloin solujen genomi ja ominaisuudet ovat potilaskohtaisia. hiPS - solujen käytöllä myös vältetään hES - soluihin liittyvät

eettiset haasteet. hPS-soluihin liittyviä haasteita hES-solujen eettisyyden lisäksi ovat esimerkiksi vaikea saatavuus ja korkea hinta eläinsoluihin verrattuna, haasteellinen viljely ja vajaa ymmärrys erilaistumisprosessista (Taulukko 1). Vajaan ymmärtämisen myötä joidenkin hermoston ominaisuuksien, kuten eri solu -ja kudostyyppien interaktioiden mallintaminen *in vitro* on haastavaa ja aikaa vievää (Taulukko 1), eikä laajalle vakiintuneita erilaistamisprotokollia juurikaan ole (Ylä-Outinen et al., 2019). Erilaistamisprotokollien optimointia ja niiden kehittämistä onkin painotettava, jotta kantasoluja voitaisiin hyödyntää niiden täydessä potentiaalissa.

hPS-soluja on käytetty *in vitro* tutkimuksessa jo vuodesta 1998 lähtien, jolloin hES-soluja ensi kertaa eristettiin ja viljeltiin (Keller & Frega, 2019). Kuitenkin nykyisin hiPS -ja hES – soluja käytetään vähän aivojen kehittymisen ja sairauksien tutkimisessa ja lääkeainetestauksessa *in vitro*, suhteutettuna kyseisten solujen saatavuuteen. Tämä ei täysin selity eläinsolujen hyötyjen, kuten saatavuuden ja alhaisen hinnan myötä, mikä herättää kysymyksiä. Vaikka kehityksen suunta on tutkimus tutkimukselta kauemmas eläinmalleista ja lähemmäs ihmissolumalleja, aiheuttaa toistaiseksi vähäinen ihmissolujen käyttö lukuisia hintavia ja yhteiskunnallisia ongelmia.

Taulukko 1. Neurotutkimuksessa käytettyjä solutyyppejä-, lähteitä ja niiden hyötyjä ja haittoja.

| Solutyyppi | Laji | Lähde | Hyödyt | Haasteet | Referenssi |
|-------------------------------------|--------------------|---|--|--|---|
| Primääri (eläin) | Rotta, Kana, Hiiri | Kortikaali-neuroni, hippokampusneuroni, kortikaali-astroosyytti, mikroglia, oligodendrosyytti DRG-neuroni | Saatavuus, mahdollinen in vivo sähköfysiologian säilyminen, osittainen samankaltaisuus ihmisen solumallien ja aivojen toiminnan kanssa | Eettisyys, erot ihmisen solumalleihin ja ihmisaivojen toimintaan | (Montaux, Charlot, Genoux, Saudou, & Gazorla, 2018) (van de Wijdeven et al., 2019) (Ristola et al., 2019) (Ruiz et al., 2014) |
| Primääri | Ihminen | Kortikaali-neuroni, Hippokampus-neuroni | Ihmismallin, mahdollinen in vivo sähköfysiologian säilyminen, potilaskohtainen | Saatavuus | (Wickham et al., 2020) |
| hESC | Ihminen | Alkiot | Ihmismallin, erilaistaminen hermo - ja gliasoluiksi | Eettisyys, saatavuus, erilaistuminen aikaa vievää ja vajaasti ymmärretty | (Ylä-Outinen et al., 2010) (Kärnä et al., 2012) |
| hiPSC | Ihminen | Erilaistuneet solut | Potilaskohtainen ihmismallin, erilaistaminen hermo - ja gliasoluiksi | Erilaistuminen aikaa vievää ja vajaasti ymmärretty | (Amin et al., 2016) (Takayama & Kida, 2016) |
| Progenitori (lasketaan primääriksi) | Rotta | Kortikaalinen neuroni | Saatavuus, osittainen samankaltaisuus ihmisen solumallien ja aivojen toiminnan kanssa, erilaistaminen hermo -ja gliasoluiksi | Eettisyys, erot ihmisen solumalleihin ja aivotuomintaan | (Montaux et al., 2018) |

DRG = Dorsal root ganglion

Neuroneita on viljelty *in vitro* jo vuodesta 1910 asti. Ensimmäinen *in vitro* neuroniviljelmä suoritettiin ns. ” hanging drop” - tekniikalla, jossa sammakon alkion neuraaliputkesta eristettyä hermokudosta viljeltiin pisaralla mediumia, eli elatusliuosta. Tätä pisaraa mikroskoopilla tarkkailemalla todettiin ensimmäistä kertaa hermosäikeiden koostuvan soluista (Keller & Frega, 2019). Tästä eteenpäin neuroneiden viljely *in vitro* on kehittynyt suunnattomasti. Varsinkin viimeisen 10 vuoden aikana tapahtunut biologisen ymmärryksen syventyminen ja erilaisten teknologioiden kehittyminen ja integrointi neuroneiden viljelyalustoihin on vienyt alaa harppauksin eteenpäin (Ylä-Outinen et al., 2019).

Neuroneita viljellään yleisesti erilaisilla 2D-alustoilla, joilla ne kasvavat sattumanvaraisesti tai ohjatusti ympäristöstä riippuen. Tutkimuksessa kuitenkin pyritään luomaan mahdollisimman *in vivo* – kaltainen kasvu-ympäristö *in vitro*, joka voidaan saavuttaa 3D-alustoilla, joilla solut kasvavat biomateriaaliskaffoldissa tai organoidissa, eli kantasoluista itsenäisesti muodostuneessa solurykelmässä (Ylä-Outinen et al., 2019). 3D - ja ohjatut 2D - alustat voivat sisältää mikrofluidistisia rakenteita, joiden avulla pyritään tarkempaan *in vivo* – kaltaiseen ympäristöön (Neto et al., 2016).

3. Mikrofluidistinen siruteknologia

Neuroneiden ja neuroverkostojen muodostuminen ja toiminta ovat monimutkaisia prosesseja, jotka edellyttävät ympäristöltään tiettyjä ominaisuuksia. Näiden ominaisuuksien luominen *in vitro* on huomattavasti tarkempaa mikrofysiologisten sirujen avulla verrattuna perinteisiin 2D-viljelyalustoihin (Neto et al., 2016). Mikrofysiologisia siruja eli mikrotason ominaisuuksia omaavia viljelyalustoja on lukuisia erilaisia. Tässä osuudessa keskitytään pääasiassa mikrofluidistisiin siruihin.

Mikrofluidistisilla siruilla voidaan manipuloida pieniä nestemääriä ja niiden virtausta, mikä mahdollistaa sirun mekaanisten ominaisuuksien ja biomolekyylien, kuten lääkeaineiden ja ravinteiden saatavuuden säätelyn (Haring et al., 2017). Mikrofluidistiikan ja sirujen muiden ominaisuuksien avulla voidaan tutkia ja manipuloida neuronien ja neuroverkostojen sellulaarisia mekanismeja, kuten aksonien ohjautumista (Takayama & Kida, 2016) tai niiden vaurioita (Yang, Siddique, Hosmane, Thakor, & Höke, 2009) . Siru voidaan esimerkiksi jakaa lokeroihin, mikä lisää sen toiminnallisuutta ja mahdollistaa eri neuronipopulaatioiden ominaisuuksien tutkimisen *in vitro* (Ristola et al., 2019) tai sirun pinnoittamisella eri materiaalein ja kuvioin (Neto et al., 2016). Mikrofluidistisen siruteknologian ollessa urauurtavaa, on siru – solu -interaktiossa vielä paljon tutkittavaa ja kehitettävää.

3.1 Mikrofluidististen sirujen rakenne ja toiminta

Mikrofluidististen sirujen avulla pyritään luomaan neuronien *in vivo* – kaltainen mikroympäristö *in vitro*. Neuronien eri ominaisuuksien tutkimista varten on suunniteltava mikrofluidistisia siruja, joilla on erilaisia toiminnallisia rakenteita. Yleisesti mikrofluidistiset sirut valmistetaan polydimetyylisiloksaanista (eng. Polydimethylsiloxane, PDMS), esimerkiksi sen läpinäkyvyyden, vahvan kaasujen ja heikon veden läpäisevyyden ja bioyhteensopivuuden vuoksi (Millet & Gillette, 2012). Läpinäkyvyyden ansiosta neuroverkostojen kuvantaminen, kuten kalsiumkuvantaminen on mahdollista (Gribaudo et al., 2019). PDMS:n elastisuuden vuoksi se voidaan suhteellisen helposti valaa haluttuun muotoon, joka sisältää esimerkiksi lokeroita ja mikrotunneleita. Mikrotunnelit ovat viljelyalustan substraattiin, kuten PDMS:ään, valettuja tunneleita, joita pitkin esimerkiksi aksonit voivat kasvaa (Haring et al., 2017). Usein sirut päällystetään soluväliaineen biomolekyyleillä, näin

tehostaen bioyhteensopivuutta ja sirun pinnan toiminnallisuutta (Haring et al., 2017). Lisäksi sirujen pintoja voidaan kuvioida, joka päällystyksen kanssa potentiaalisesti vaikuttaa neuronien alustaan kiinnittymiseen, migraatioon, muotoon (Neto et al., 2016) ja aksonien ja dendriittien ohjautumiseen (Haring et al., 2017).

Eryteisesti neurotieteellisessä tutkimuksessa lokeroinnin ja mikrotunneleiden avulla voidaan tutkia ja manipuloida hermoston fysiologiaa *in vitro*, kuten neuroverkostojen muodostumista, ja tarkemmin aksonien kasvua eri neuronipopulaatioiden välillä (Taulukko 2) (Gribaudo et al., 2019). Mikrofluidistisen sirun lokerointi mahdollistaa myös eri solutyypin tutkimisen, kuten neuronien ja oligodendrosyytien kontrolloidun yhteisviljelyn samalla sirulla erillisissä lokeroissa (Taulukko 2) (Ristola et al., 2019). Näissä tapauksissa eri lokeroihin eristetyt solupopulaatiot voivat olla yhteydessä toisiinsa mikrotunneleiden kautta kasvavien aksonien välityksellä, kuten neuronit aivojen eri alueiden välillä *in vivo*. Neuroverkoston kehittymisen ja fysiologian lisäksi suuren huomion kohteena on neurologisten sairauksien, kuten neuroverkostolle haitallisten, väärinlaskostuneiden ja agrekoituneiden proteiinien leviämisen tutkiminen, jollaisia esiintyy esimerkiksi Alzheimerin ja Parkinsonin taudissa. Lokeroidut mikrofluidistiset sirut mahdollistavat tällaisen tutkimuksen suurella tarkkuudella kontrolloidussa ympäristössä (Taulukko 2) (Gribaudo et al., 2019).

Taulukko 2. Mikrofluidististen sirujen ominaisuuksia ja käyttötarkoituksia

| Sirun rakenne | Viljelmätyyppi | Solutyypit ja lähde | Sellulaarinen lokerointi | Lokero lkm. | Malli | Referenssi |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|--|---|------------------|-------------------------|
| Lokerot + yhdistävät mikrotunnelit | Yhteisviljely | Neuroni ja oligodendrosyytti (rotta, primääri) | Neuronin sooma – aksoni - oligodendrosyytti | Yksi oligodendrosyytti -ja kaksi neuronilokeroa | Kehitysmalli | (Ristola et al., 2019) |
| Lokerot + yhdistävät mikrotunnelit | Yhteisviljely | Neuroni ja astroosyytti (hiPSC) | Neuronin sooma – aksoni – neuroni / astroosyytti | Kolme neuronin-astroosyytilokeroa | Sairausmalli | (Gribaudo et al., 2019) |
| Lokerot + mikrotunnelit | Yksisoluviljelmä | Neuroni (rotta, primääri) | Neuronin sooma – aksoni | Kaksi neuronilokeroa | Neuronivaurio | (Yang et al., 2009) |
| Lokerot | Yksisoluviljelmä / yhteisviljelmä | Hippokampusneuroni -, mikroglia -ja astroosyytti (rotta, primääri) | Neuroni / neuroni – mikroglia / neuroni - astroosyytti | Yksi neuronin-, yksi neuronin-mikroglia -ja yksi neuronin-astroosyytilokero | Lääkeainetestaus | (Ruiz et al., 2014) |

hiPSC = human induced pluripotent stem cell

Mikrofluidistiset sirut laajentavat myös lääkeainetestauksen mahdollisuuksia *in vitro*. Mikrofluidistiikka ja lokerointi mahdollistavat kontrolloitujen molekyyligradienttien luomisen sirun eri lokeroiden solupopulaatioille (Neto et al., 2016). Tällaisen sirun avulla on mahdollista tutkia tarkasti neuronien ja hermotukisolujen vastetta lääkeainesiin *in vitro* (Taulukko 2) (Ruiz et al., 2014). Molekyylien konsentraation ja mediumin virtauksen manipuloinnin avulla voidaan tutkia myös kemiallisia neuronivaurioita, kuten aksoneiden degeneraatiota toksiinien vaikutuksesta (Taulukko 2) (Yang et al., 2009). Mikrofluidististen sirujen avulla tutkijat pääsevät lähemmäs aitoja suuren kapasiteetin ja näytämäärän lääkeainetestauksia ja analyyseja, joissa neuronien vastetta lukuisiin eri molekyyliin voidaan testata samalla sirulla, näin vähentäen lääkekehitykseen kuluva aikaa ja rahaa (Neto et al., 2016).

3.2 Mikrofluidististen sirujen haasteet

Mikrofluidististen sirujen käytössä on kuitenkin joitain haasteita. Ensisijaisesti solujen ja kudosten *in vivo* – kaltaisia ominaisuuksia, kuten neuronin ja soluväliaine interaktioita on vaikea luoda *in vitro*, koska mikrofluidistiset sirut ovat yleisesti 2D viljelyalustoja 3D sijaan. Myös neuroneiden interaktio muiden solujen, kuten neuronien tai gliasolujen kanssa on rajoittunut mikrotunneleiden kautta ulottuvien aksonien välittämäksi (Haring et al., 2017). Edellä mainittujen lisäksi sirun pinnan käsittelyn ja kuvioinnin ollessa riittämättömän tarkkoja kopioimaan neuronien kasvuympäristön topografiaa *in vivo* neuronien muodot voivat olla epäluonnollisia. Näiden myötä pitkäaikaiset viljelyt voivat olla haastavia (Ylä-Outinen et al., 2019). Pitkäaikaisia viljelyitä hankaloittaa myös pienet mediumtilavuudet, joihin voi muodostua erilaisia hallitsemattomia virtoja. Samoin tiedetään, että erityyppiset neuronit voivat tarvita erikokoisia mikrotunneleja esimerkiksi aksonikasvun aikaansaamiseksi. Täten yksi sirumalli ei välttämättä toimi ns. yleissiruna, joten useampia sirumalleja tarvitaan eri tutkimuskysymyksiin (henkilökohtainen keskustelu, S. Narkilahti).

Vakituaisesti käytetyistä perinteisistä 2D – viljelyalustoista siirryttäessä mikrofluidistisiin siruihin ja integroituihin alustoihin, on neuroverkoista saatavilla huomattavasti enemmän myös täysin uudenlaista informaatiota. Viljelymetodien standardisoinnilla saatava informaatio ja tulokset ovat toistettavampia. Uudet materiaali- ja viljelytekniikat myös lisäävät saatavan informaation määrää. Lisääntyneen informaation tulkitseminen vaatii uusien matemaattisten ja tietokoneellisten analyysien kehittämistä, jotka urauurtavien viljely- ja materiaalitekniikoiden kanssa vievät neurotiedettä kohti poikkitieteellisempää lähestymistapaa (Neto et al., 2016).

4. Mikroelektrodihilalevy (MEA - levy)

Neuroverkostojen ja aivojen sähköisen aktiivisuuden tutkimuksesta on mahdollista saada runsaasti informaatiota, jonka avulla voidaan ymmärtää aivojen ja neuroverkostojen monipuolista toimintaa *in vivo*. Neuronien sähköinen aktiivisuus ilmenee esimerkiksi toimintajännitteinä, jotka johtavat ekstra

-ja intrasellulaarisiin jännitteiden muutoksiin. Näitä jännitteitä ja niiden muutoksia on mahdollista mitata erilaisin menetelmin, solunsisäisesti ja ulkoisesti, *in vivo* ja *in vitro*.

Aivojen sähköisen mittauksen tekniikat ovat kehittyneet makrotason elektroencefalografia (eng. electroencephalography, EEG) – mittauksista *in vivo*, joissa elektrodit havaitsevat aivojen sähköistä aktiivisuutta päänahan ja kallon läpi. *In vivo* mittauksia on suoritettu myös neulan kaltaisilla mikroelektrodihila (eng. Micro Electrode Array, MEA) - antureilla, jotka asetetaan aivoihin. Nämä mittaustekniikat ovat kuitenkin epätarkkoja paljastamaan joitain aivojen ja neuroverkostojen tarkkoja solutason toimintoja esimerkiksi, EEG:n mitatessa aktiivisuutta laajalta alueelta epäsuorasti ja neulamaisilla antureilla suoritettujen mittausten toistettavuuden ollessa haastavaa (Obien, Deligkaris, Bullmann, Bakkum, & Frey, 2015).

Neuroneita voidaan tutkia esimerkiksi yksittäisten neuroneiden tai kokonaisten neuroverkostojen tasolla *in vitro*. Yksittäisten neuroneiden toimintaa voidaan tutkia esimerkiksi patch-clamp – tekniikalla, joka mahdollistaa, jopa yksittäisen ionikanavan toiminnan tutkimisen *in vitro* (Obien et al., 2015). Tämä menetelmä kuitenkin keskittyy pääasiassa vain yksittäisten neuroneiden tutkimiseen, jolloin neuroverkostotason aktiivisuus jää huomiotta.

Neuronien verkostotason, ja jopa yksittäisten neuronien aktiivisuutta voidaan mitata MEA – levyllä *in vitro*, joka on levy, jolla on neuroneiden sähköistä aktiivisuutta solunsisäisesti tai ulkoisesti mittaavia mikrometriluokan kokoisia mikroelektrodeja (Obien et al., 2015). Neulankaltaisten MEA – antureiden ja MEA – levyjen yleinen toimintaperiaate on sama, erona kuitenkin MEA – levyjen käyttö *in vitro* ja anturien käyttö *in vivo*. Toimintajännitettä MEA – mittauksissa kutsutaan usein piikiksi (eng. spike), joka on signaali sitä vastaavasta toimintajännitteestä (Johnstone et al., 2010). MEA – levyt mittaavat myös lokaalisia kenttä potentiaaleja (eng. local field potential, LFP), jotka koostuvat mikroelektrodin läheisyydessä olevien solujen yhdistyneestä sähköisestä aktiivisuudesta, kuten toimintajännitteiden lisäksi synkronoidusta synaptisesta aktiivisuudesta (Obien et al., 2015).

MEA – mittaukset mahdollistavat tarkan neuroverkostojen tutkimisen *in vitro* (Obien et al., 2015). Tämä on esimerkiksi nähtävissä lääkeainevasteiden samankaltaisuuksissa *in vitro* MEA – tutkimusten ja aivojen fysiologisten vasteiden *in vivo* välillä. Lääkeainetestauksen lisäksi MEA – mittausteknologiaa voidaan hyödyntää neuroverkostojen kehittymisen tutkimisessa *in vitro*, sekä toksisissa altistuksissa (Ylä-Outinen et al., 2010), että fysiologisissa normaalin kehityksen edellyttävissä olosuhteissa (Amin et al., 2016). Myös neuroverkostojen plastisuutta, eli neuroneiden välisten synapsien ja tämän myötä koko verkoston rakenteen ja toiminnan muutosta, on mahdollista tutkia MEA – levyillä *in vitro* (Johnstone et al., 2010). Tässä osiossa keskitytään solunulkoisen sähköisen aktiivisuuden mittaamiseen erilaisilla MEA – levyillä *in vitro* ja MEA – mittauksista saatavan datan analysointiin.

4.1 MEA – levyjen rakenne

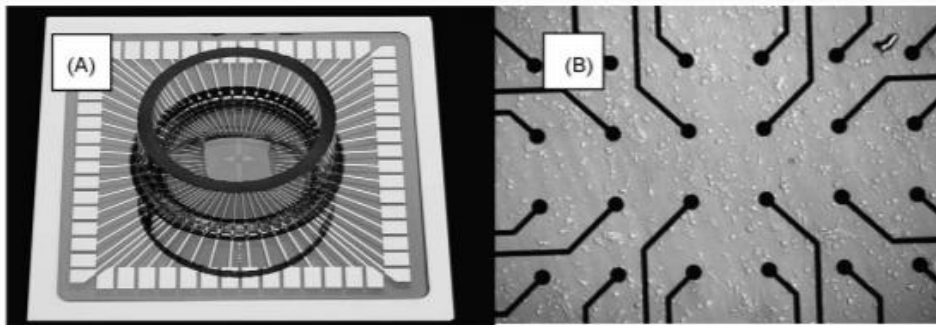
MEA-levy koostuu substraatista, jonka viljelyalueelle on upotettu mikroelektrodeja (Kuva 3A, B), joiden toinen pää sijaitsee sirulla ja mittaa sähköistä aktiivisuutta. Signaali sähköisestä aktiivisuudesta välittyy levyn ulkoiseen vahvistimeen, levyn reunalle ulottuvia mikroelektrodien mikrokanavia pitkin. Ulkoinen vahvistin välittää sähköisen signaalin tietokoneeseen informaation käsittelyä ja analyysiä varten (Johnstone et al., 2010). Mikroelektrodeja voidaan käyttää myös sähköiseen stimulaatioon (Amin et al., 2016; Napoli & Obeid, 2016) (Taulukko 3). MEA – sirun substraatti ja mikroelektrodit voivat olla valmistettuja eri materiaaleista, joiden valitsemisessa täytyy ottaa huomioon bioyhteensopivuus, kaikkien sirun materiaalien ollessa kosketuksessa tai läheisyydessä neuronien kanssa. On myös huomioitava tutkimuksen tarkoitus materiaalien valinnassa (Obien et al., 2015).

Elektrodin materiaalin valinnassa on tärkeää huomioida, bioyhteensopivuuden lisäksi, sähköjohtavuus. Sähköjohtavia materiaaleja mikroelektrodien valmistuksessa voivat olla esimerkiksi kulta, alumiini (Obien et al., 2015) tai titaaninitridi (Ylä-Outinen et al., 2010) (Taulukko 3). On myös valmistettu ei – metallisia mikroelektrodeja (Obien et al., 2015), joihin tässä tutkielmassa ei perehdytä. Materiaalin valitsemisessa tärkeää on erityisesti matalan impedanssin, eli elektrodeissa kulkeutuvalla vaihtovirralla aiheutuneen vastuksen minimoiminen. Matala impedanssin vaikuttaa positiivisesti signaalin laatuun, nostamalla signaalin suhdetta häiriöön (eng. signal-to-noise ratio, SNR). Yleisesti pyritään 5:1 tai korkeampaan SNR:ään (Obien et al., 2015).

Mikroelektrodien koot vaihtelevat levystä riippuen halkaisijaltaan 5 ja 50 μm välillä (Obien et al., 2015) (Taulukko 3). Esimerkkikuvassa (Kuva 3B) mikroelektrodien halkaisija on 30 μm . Suuremmilla mikroelektrodeilla on mahdollisuus olla ”oikeassa kohdassa”, jolloin mitattava signaali on vahvempi. Suuremmat, kuin 50 μm mikroelektronit voivat kuitenkin mitata myös läheisten neuroneiden aktiivisuutta, jolloin signaalista muodostuu keskiarvo, jossa tarkoista korkeista piikeistä tulee epäselvempiä, jolloin SNR pienenee. Mikroelektrodin koko vaikuttaa impedanssiin, joka on tärkeä huomioida signaalin analyysissä (Obien et al., 2015).

MEA – levyt voidaan jakaa elektronilukumääränsä ja tiheydensä mukaan kahteen luokkaan: standardi – MEA ja HDMEA (eng. high density MEA, HD-MEA). Tutkielmassa käytettyjen tieteellisten artikkeleiden kaupallisten MEA – levyjen mikroelektrodien lukumäärä vaihteli 60 – 4225 välillä ja niiden etäisyys toisistaan, välillä 32 – 200 μm (Amin et al., 2016; Kärnä et al., 2012) (Taulukko 3), riippuen käytetystä teknologiasta. Standardi – MEA:n mikroelektrodien lukumäärä on huomattavasti pienempi ja elektrodien etäisyys suurempi HDMEA:an verrattuna. Esimerkiksi kuvan 3B standardi – MEA:n mikroelektrodien lukumäärä on 60 ja etäisyys 200 μm . Yleensä mikroelektrodit sijoitetaan MEA – levyille ruudukoksi 0.2–2 mm^2 alueelle, mikä määrää mittausalueen laajuuden (Johnstone et al., 2010).

Mikroelektrodien lukumäärän ja tiheyden kasvaessa tarpeeksi suureksi, kuten 4225 mikroelektrodin (Amin et al., 2016), on kyse HD-MEA:sta. HD-MEA:t pohjautuvat komplementaariseen metalli - oksidi – puolijohde -tekniikkaan (eng. complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS). CMOS – tekniikkaan pohjautuvan HDMEA:n etuna on korkea mikroelektroditiheys, jolloin on myös suuri todennäköisyys, että mikroelektrodi on juuri ”oikeassa kohdassa”, joka mahdollistaa tarkemmat, sub-sellulaariset aktiivisuusmittaukset (Obien et al., 2015).



Kuva 3 A: Esimerkkikuva standardi - MEA - levystä ja B: mikroskooppikuva soluista kasvamassa mikroelektrodien päällä. Mikroelektrodien lukumäärä on 60 ja niiden etäisyys toisistaan on 200 μm . Kuva muokattu lähteestä (Johnstone et al., 2010).

MEA – levyn pohjasubstraatti, johon mikroelektrodit upotetaan, on yleisesti valmistettu lasista (Wickham et al., 2020) (Kärnä et al., 2012) (Taulukko 3). Levyn pinnan substraatti on mikrokanavat peittävä eriste, kuten silikoni nitridi (Taulukko 3) (Kärnä et al., 2012). Substraatin valintaan vaikuttavat bioyhteensopivuuden lisäksi muokattavuus, joustavuus ja läpinäkyvyys. Läpinäkyvyyden ansiosta voidaan neuroneita kuvata monipuolisemmin mittausten välillä valomikroskopiolla. MEA-levyille voidaan tehdä myös immunosytokemiallisia värjäyksiä, joten saadut mittaustulokset on mahdollista yhdistää tarkempaan solutason analyysiin (Obien et al., 2015). Myös ei läpinäkyviä levyjä voidaan kuvata, valitsemalla oikean tyyppinen kuvaustapa.

MEA – levyjen substraattiin integroidaan lokero tai lokeroita, jolloin sirut voivat olla yksilokeroisia (Kuva 3A) tai olla jaettu useampiin lokeroihin. Tämä luodaan esimerkiksi polydimetyylisiloksaanin (eng. polydimethylsiloxane, PDMS) avulla (Kärnä et al., 2012). Lokerot mahdollistavat soluviljelyliuoksen ylläpitämisen levyjen päällä. Yksilokeroisella MEA - sirulla neuronit kasvavat mikroelektrodien päällä yhdessä lokerossa (Wickham et al., 2020) ja useampaan lokeroon jaetulla sirulla neuronit voivat kasvaa, esimerkiksi kuudessa eri lokerossa, jolloin MEA-levyllä olevat elektrodit on jaettu useampaa erilliseen alueeseen mahdollistaen näin useamman rinnakkaisen verkoston mittaamiseen samalla levyllä (Kärnä et al., 2012; Ylä-Outinen et al., 2010) (Taulukko 3). MEA – levyjä valmistetaan useita erilaisia, joilla on eri määrä lokeroita, enimmillään jopa 96 (Johnstone et al., 2010). Monilokeroisella MEA – levyllä voidaan tutkia esimerkiksi eri neuronipopulaatioiden vasteita useisiin eri lääkeaineisiin yhtäaikaaisesti, samalla useampaan lokeroon jaetulla MEA – levyllä *in vitro*. Monilokeroisella MEA – levyllä suoritettavat rinnakkaiset

tutkimukset mahdollisesti vähentävät vaihtelevuutta tuloksien välillä (Johnstone et al., 2010; Kärnä et al., 2012).

Taulukko 3. MEA – levyjen ominaisuuksia

| Elektrodi lkm. | Elektrodi koko (halkaisija, μm) | Elektrodi tiheys/välimatka (μm) | Elektrodi materiaali | Stimuloiva | Loke ro lkm. | Substratin materiaali | solutyppi | referenssi |
|------------------------------|---|--|----------------------|------------|--------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|
| 4096 | 21 | 42, 81 | Ei tiedossa | Kyllä | 1 | Lasi | Ihmisen neuronit | (Amin et al., 2016)* |
| 4225, 256 | 8, 30 | 32, 200 | Au, TiN | Ei | 1 | Lasi | Ihmisen neuronit | (Wickham et al., 2020)** |
| 60 (9 mikroelektrodia/kaivo) | 30 | 200 | TiN | Ei | 6 | Lasi | Ihmisen neuronit | (Ylä-Outinen et al., 2010) |
| 60 (9 mikroelektrodia/kaivo) | 30 | 200 | TiN | Ei | 6 | Lasi | Ihmisen neuronit | (Kärnä et al., 2012)** |
| 60 | 30 | 200 | TiN | Kyllä | 1 | Lasi | Ihmisen ja rotan neuronit | (Napoli & Obeid, 2016)** |

CMOS-MEA:t värjätty harmaaksi. Punaisella merkitty ei ole CMOS-MEA, vaan toinen kyseisessä tutkimuksessa käytetty standardi-MEA. Au = kulta, TiN = Titaaninitridi, PDMS = polydimetyylisiloksaani.

* <https://scitech.com.au/electrophysiology/hd-multielectrode-arrays-in-vitro/>

** https://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/data_sheets/CMOS-MEA-Chip_Datasheet.pdf &

https://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/data_sheets/256MEA%20Layout.pdf

*** <https://www.multichannelsystems.com/products/60-6wellmea20030ir-ti-wo>

**** <https://www.multichannelsystems.com/products/60mea20030ir-ti-gr>

4.2 Mitattava signaali ja analyysi

MEA – sirujen mikroelektrodit mittaavat neuroneiden ulkoisia toimintajännitteitä ja LFPTä, jopa millisekunnin tarkkuudella, monesta kohtaa ja tarvittaessa pitkäkestoisesti. Käytännössä neuroneiden ulkoiset toimintajännitteet ilmenevät negatiivisina piikkeinä mittauksissa. Yleisesti piikit ovat havaittavissa mikroelektrodin ollessa n. 100 μm päässä piikin lähteestä (Obien et al., 2015). Neuronilähteistä havaitun signaalin voimakkuuteen ja muotoon vaikuttavat mittauspaikka neuronissa ja neuroneiden orientaatio ja välimatka mikroelektrodin ja neuronin välillä. Yleisesti kuitenkin mikroelektrodit havaitsevat läheisyydestään keskiarvoisen jännitteen (Obien et al., 2015).

Mitattu signaali koostuu piikkien ja LFP:n lisäksi sähköisestä häiriöstä, joka on lähtöisin useista eri lähteistä. Biologinen häiriö on yksi suurimmista häiriön tuottajista. Tämä on seurausta mikroelektrodin lähistöllä olevien solujen sähköisestä aktiivisuudesta, kuten toimintajännitteistä ja synaptisesta aktiivisuudesta. Piikkien analysoinnissa LFP käsitellään biologisena häiriönä (Obien et al., 2015). Häiriö voi olla myös peräisin MEA – levyn vahvistimesta, viljelymediumin elektrolyyttien ja elektrodien välisestä interaktiosta ja sähköjohtojen tuottamasta häiriöstä. Häiriöihin voi vaikuttaa suodattamisen lisäksi MEA – levyn ja sen lisäosien suunnittelulla, esimerkiksi sähkönkulutuksen ja osien sijoittamisen suunnittelulla (Obien et al., 2015) ja huolehtimalla, että mittaukset suoritetaan asianmukaisissa laboratoriotiloissa.

MEA – signaalin käsittely yleensä koostuu ei – halutun informaation poissuodattamisesta ja piikkien havaitsemisesta ja erottelusta. Ensiksi ei – haluttu signaalin suodatetaan pois, jotta piikit voidaan erotella häiriöstä, esimerkiksi LFP:stä. Suodattamisen jälkeen piikit havaitaan asettamalla jännitekyynnys, jonka ylittäneet jännitteet luetaan piikeiksi. Jännitekyynnys asetetaan yleensä 5 – kertaiseksi lähtötilanteen häiriöstä (Obien et al., 2015). Erilaisia piikkien havaitsemiseen suunniteltuja algoritmeja on kehitelty, kuten MATLAB – tietokoneohjelma pohjainen jännitekyynnukseen perustuva algoritmi (Ylä-Outinen et al., 2010).

Piikkien havaitsemisen jälkeen ne voidaan jaotella jännitteiden aallonmuotojen mukaan (eng. spike sorting). Ideaalisessa tilanteessa eri neuroneiden piikit muodostavat omat ryhmänsä. Tämä vaihe kuitenkin vaatii tarkkailua mahdollisten virheiden korjaamisen varalta (Obien et al., 2015), yleensä standardi – MEA:lla enemmän. HD-MEA:lla on mahdollista lisätä piikkien erottelun tehokkuutta ja tarkkuutta, jolloin monimutkaisempia neuroverkostoja on mahdollista tutkia (Obien et al., 2015).

Tietokoneanalyysillä saadaan mittauksista huomattavasti enemmän informaatiota, kuin yksittäiset piikit ja LFP. Näihin lukeutuu esimerkiksi piikkien ajallisen jakautuminen (eng. spike trains), piikkien muodot, piikkien rykelmät (eng. bursts) ja piikkien ajallinen jakautuminen näissä rykelmissä. Lisäksi voidaan tutkia piikkien synkronoitumista, piikkirykelmien kestoa ja ajallista jakautumista (Johnstone et al., 2010). Näitä analyysejä on käytetty esimerkiksi havaitsemaan eroja ihmis -ja eläinuronien välillä (Napoli & Obeid, 2016), neuroverkostojen kehittymisen ja aktiivisuuden (Amin et al., 2016) ja neurotoksisuuden tutkimisessa (Ylä-Outinen et al., 2010). Toksiinien vaikutusta neuroverkostoihin voidaan tutkia, analysoimalla piikkien ajallisen jakautumisen muutosta (Johnstone et al., 2010; Ylä-Outinen et al., 2010). Lääkeaineet ja toksiinit mahdollisesti vaikuttavat melkein kaikkiin MEA:lla mitattaviin signaalin ominaisuuksiin (Johnstone et al., 2010), jonka myötä on pääteltävissä MEA – mittauksien keskeinen rooli neurotoksisuuden ja lääkeainevasteiden tutkimuksessa.

4.3 MEA – mittauksien haasteet

MEA – mittauksien haasteet koostuvat pääosin saadun informaation käsittelyn ja analysoinnin vaikeudesta ja itse MEA – levyn ja siihen liittyvien laitteiden suunnittelusta ja näiden osien

aiheuttamasta häiriöstä. MEA -signaalin käsittelyssä piikkien lajittelun toimivuutta on alettu epäillä piikkien erottelualgoritmien vaikean toimivuuden varmistamisen vuoksi (Obien et al., 2015). Lisäksi signaalin suodattamisessa valitun jännitekyynnysen ollessa liian korkea, menetetään mahdollisesti tärkeää informaatiota sisältäviä matalamman amplitudin neuronaaalisia signaaleja. Toisaalta liian matala jännitekyynnys tuottaa suuren määrän vääriä positiivisia piikkejä (Mayer et al., 2018).

Haastavaksi MEA – mittauksissa ja datan käsittelyssä osoittautuu myös piikkien amplitudin vaihtelevuus, joka voi johtaa informaation vääristymiseen. On myös havaittu haasteita piikkirykelmien havaitsemisessa, kuten vain isoimpien piikkiryhmien havaitseminen, jolloin joitain pienempiä jää huomaamatta ja ennenaikainen, piikkiryhmien päättymisen havaitseminen (Obien et al., 2015; Ylä-Outinen et al., 2019). On siis tärkeää tiedostaa, ettei täydellistä, universaalista metodologiaa jokaiseen tutkimukseen kuitenkaan ole, jonka myötä mittaus- ja analyysitekniikat on valittava tutkimuskohtaisesti.

Aiemmin keskusteltujen mikroelektrodien ominaisuuksien vaikutukset impedanssiin ja SNR:ään tuottavat haasteita materiaalien, niiden ominaisuuksien ja koko MEA – levyn suunnittelun optimoinnin suhteen. Koko laitteen suunnittelussa haasteena on myös lämpö, joka on peräisin mikroelektrodien ja muiden sähköisten komponenttien muodostamista piireistä ja signaalin vahvistimesta. Näiden rakenteiden sähkökulutus vaikuttaa lämpöön, joka liian korkeana voi vahingoittaa soluja tai MEA – levyn rakenteita (Obien et al., 2015). Lisäksi monilokeroisella levyllä mikroelektrodien määrä lokeroa kohden pienenee lokerojen lisääntyessä, mikä vähentää mittaustarkkuutta.

MEA – mittaukseen liittyvät haasteet ovat kuitenkin ratkaistavissa. Jatkuva signaalianalyysien kehittäminen ja kehitykset materiaalitekniikassa ja mikroelektronikassa johtavat uudenlaiseen ja tarkempaan informaatioon. SNR:ää voidaan kontrolloida materiaalien ja mikroelektronikan avulla. Luotettavia ja toistettavia tuloksia saadaan suorittamalla useampia rinnakkaisia tutkimuksia monilokeroisilla levyillä. Lisäksi materiaalitekniikan kehittyessä on mahdollista siirtyä kohti joustavampaa ja bioyhteensopivampaa MEA – sirua, mikä on tärkeää pitkän aikavälin mittauksissa *in vitro* (Obien et al., 2015). MEA – mittausta voidaan parantaa myös integroimalla MEA – levy mikrofluidistisille sirulle, jolloin neuroniviljelmien manipulointi ja sähköfysiologian tutkiminen saa uusia ulottuvuuksia.

5. MEA – integroidut mikrofluidistiset alustat

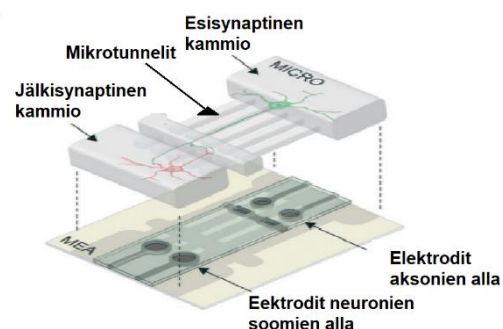
MEA – levyjä voidaan pinnoittaa erilaisilla, solujen toiminnallisuutta lisäävillä biomolekyyleillä, kuten poly – dl – ornitiinilla, polyetyleenillä ja laminiinilla (Amin et al., 2016). Tästä huolimatta niiltä puuttuu tärkeitä ominaisuuksia *in vivo* – kaltaisen viljely-ympäristön luomiseen. Yksistään mikrofluidistisilla

siruilla voidaan tarkemmin luoda *in vivo* – kaltainen ympäristö. Siru voidaan jakaa lokeroihin, sen pinta voidaan kuvioda ja päällystää biomolekyyleillä ja nesteiden määrää ja virtausta voidaan manipuloida. Näiden sirun ominaisuuksien avulla voidaan tarkemmin manipuloida neuroverkostojen kasvuympäristöä *in vitro*, mutta keskeisen tärkeä sähköfysiologian tutkiminen jää rajoittuneeksi, kuten kalsiumkuvantamismenetelmin tutkittavaksi (Gribaudo et al., 2019). Edistykselliset materiaalitieteissä, mikroelektronikassa ja soluviljelytekniikoissa mahdollistavat MEA – integroidut mikrofluidistiset alustat, joilla on mahdollista tarkemmin manipuloida ja kontrolloida neuroverkostojen kasvua ja tutkia niiden sähköfysiologiaa.

5.1 MEA – integroitujen mikrofluidististen alustojen rakenne

Integroitu alusta koostuu, jo aiemmin kuvatussa MEA – levystä, jolle on integroitu mikrofluidistisia rakenteita (Kuva 4). Tämän teknologian ollessa suhteellisen uutta, on suurin osa integroiduista alustoista prototyyppejä. Alustojen suunnittelussa on tärkeää huomioida MEA – levyn ja mikrofluidistisen sirun koon yhteensopivuus (Montaux et al., 2018).

Integroidun alustan mikrofluidistiikan edellyttämät rakenteet koostuvat yleisesti PDMS:stä, jonka avulla alusta voidaan jakaa esimerkiksi kolmeen kaivoon, joiden neuronipopulaatiot ovat yhteydessä toisiinsa mikrotunneleiden kautta kasvavien aksonien välityksellä (Kuva 4) (Taulukko 4). Tällainen rakenne matkii aivojen eri alueiden yhteyksiä *in vivo* (Montaux et al., 2018; van de Wijdeven et al., 2019). Tunneleiden koon suunnittelulla voidaan vaikuttaa myös niiden läpi kulkeutuvien aksonien kasvuun ja ominaisuuksiin, kuten aksonien per. tunneli lukumäärään ja aksonien haarautumiseen (Montaux et al., 2018). Integroidun laitteen mikrofluidistiset rakenteet voidaan luoda myös polystyreenistä valmistetun lokeron avulla (Taulukko 4). Kyseisellä alustalla mikrofluidistiikkaa käytettiin viljelymediumin vaihtoon perfuusiolla (Enright et al., 2016). Mikrofluidistiikalla ei siis aina lokeroita sirua ja yhdistetä lokeroita tunneleihin.



Kuva 4 Esimerkkikuva kolmilokeroisesta MEA - integroidusta mikrofluidistisesta alustasta. Kuva muokattu lähteestä (Montaux et al., 2018)

Integroidun alustan MEA – levyn pohjasubstraatti koostuu yleisesti lasista ja mikroelektrodeista, jotka ovat esimerkiksi titaania ja platinaa (Montaux et al., 2018) tai hopeaa ja hopeakloriittia (Enright et al., 2016) (Taulukko 4). Mikroelektrodien lukumäärä on samaa luokkaa, kuin standardi MEA –

levyillä, ehkä jopa pienempimikkinä. Mikroelektrodien lukumäärä käytetyissä tutkimuksissa vaihteli 8 – 60 välillä (Enright et al., 2016; van de Wijdeven et al., 2019) (Taulukko 4). Mikroelektrodeja voidaan sijoittaa lokeroiden tai mikrotunneleiden alle neuroneiden eri osien tutkimista varten (van de Wijdeven et al., 2019), jolloin mikroelektrodien ja niiden mikrokanavien koko on huomioitava.

Kuten mikrofluidistisia siruja ja MEA – levyjä on päällystetty biomolekyyleillä, voidaan integroiduille alustoille tehdä sama. Alusta pinnoitetaan yleensä bioyhteensopivuutta lisäävillä poly – d – lysiinillä ja lamiiniinilla, jotka auttavat neuroneita kiinnittymään viljelyalustaan ja ohjaamaan kasvua (Enright et al., 2016; Montaux et al., 2018; van de Wijdeven et al., 2019) (Taulukko 4). Ennen pinnoituksia on alusta kuitenkin käsiteltävä plasmalla ja mahdollisesti steriloitava UV – valolla (Montaux et al., 2018; van de Wijdeven et al., 2019). Näin voidaan tehostaa pinnoitusmolekyylien kiinnittymistä ja parantaa mediumin virtausta mikrotunneleissa.

Taulukko 4. Integroitujen alustojen ominaisuuksia ja käyttötarkoituksia.

| Lokeroiden lkm. | 3 | 3 | 1 |
|--------------------------------------|--|---|---|
| Arkkitehtuuri | Lokerot + mikrotunnelit | Lokerot + mikrotunnelit | Lokero |
| MEA – substraatti | Lasi | Lasi | Lasi |
| Mikrofluidistinen substraatti | PDMS | PDMS | Polystyreeni |
| Elektrodien lkm. | 60 | 60 | 16 |
| Elektrodien materiaali | Ti/Pt | Ti/Pt | Pt ja Ag/AgCl |
| Alustan päällystys | Poly-d-lysiini, lamiini | Poly-d-lysiini, lamiini | Poly-d-lysiini, lamiini |
| Solutyyppi | Rotan primaari kortikaali neuronit | Rotan primaari, kortikaali astrocytit ja neuronit | Ihmisen DRG – neuronit |
| Tutkimuksen tarkoitus | Neuroverkoston aksoneiden kalsiumdynamiikka ja sähköinen aktiivisuus | Neuroverkostoaktiivisuuden kehittyminen, verkoston stimulointi välittäjäaineilla ja aksonivauriot | DRG – neuronien toiminta kemiallisesti stimuloituna |
| Referenssi | (Montaux et al., 2018) | (van de Wijdeven et al., 2019) | (Enright et al., 2016) |

PDMS = polydimetyylisiloksaani, Ti = titaani, Pt = platina, Ag = hopea, AgCl = hopeakloriitti, DRG = Dorsal root ganglion.

5.2 Integroitujen alustojen toiminta ja käyttö

Integroidut alustat mahdollistavat ominaisuuksiensa myötä tarkempien *in vivo* – kaltaisten neuroverkostojen luomisen. Verkostoja on mahdollista stimuloida kemikaaleilla tai sähköisesti ja samanaikaisesti tutkia niiden sähköfysiologiaa. Alustan PDMS:n ja lasipohjasubstraatin ansiosta sitä

voidaan myös kuvata erilaisin tekniikoin ja näin laajentaa käytettyjä neuroniviljelmien tutkimismenetelmiä.

Neuroverkosto voidaan luoda mikrotunneleiden ja integroidun alustan päällystämisen avulla. Mikrotunneleiden koon ja laitteen pinnan poly-d-lysiini -ja lamiinigradienttien manipulointi mahdollistivat aksonien hallitun ohjautumisen laitteen mikrotunneleissa ja lokeroissa. Näiden ominaisuuksien avulla on mahdollista luoda samanlaisia kahden neuropopulaation välisiä rakenteita ja yhteyksiä, kuin aivojen kortikaalisissa kerroksissa *in vivo* (Montaux et al., 2018). Mikroelektrodien sijoittaminen mikrotunneleiden ja lokeroitten alle, mahdollistaa tarkan ajallisen ja paikallisen tutkimisen sub-sellulaarisella ja neuroverkostotasolla (Montaux et al., 2018; van de Wijdeven et al., 2019). Neuropopulaatioiden tutkimiseen lisäulottuvuuden luo kuvantamismenetelmät, kuten kalsiumkuvantaminen (Enright et al., 2016; Montaux et al., 2018) ja fluoresenssimikroskopia (van de Wijdeven et al., 2019). Aksonien ollessa keskeisen tärkeitä neuroverkostojen toiminnan kannalta, paljastaa niiden tutkiminen *in vitro*, keskeisiä piirteitä neuronipopulaatioiden välisestä yhteydestä. Tutkimuksessaan van de Wijdeven ym. eristivät aksonien kasvun mikrotunneleihin, joiden alle oli sijoitettu mikroelektrodeja, mikä mahdollisti aksonien sähköisen aktiivisuuden mittaamisen neuroverkoston kehityksen aikana ja aksotomian, eli aksonivaurion jälkeen. MEA – mittauksilla Van de Wijdeven ym. havaitsivat aksotomian täysin poistavan piikkiaktiivisuuden vaurioituneista aksoneista ja aksotomian myötä eristetyn jälkisynaptisen neuronipopulaation esittävän vain populaation sisäistä aktiivisuutta. Tutkimuksessa mikrofluidistiikalla luotiin dynaaminen rakenteellinen ja toiminnallinen neuroverkosto, jonka vastetta aksotomiaan voitiin mitata välittömästi MEA:lla. Kyseinen alusta on siis soveltuva esimerkiksi neurodegeneratiivisten sairauksien mallintamiseen ja tutkimiseen (van de Wijdeven et al., 2019).

Neuroverkostojen ollessa alttiita erilaiselle sähköiselle ja kemikaaliselle stimulaatiolle *in vivo*, on olennaista pyrkiä luomaan samanlainen viljely-ympäristö neuroverkostoille *in vitro*. Tällainen neuroverkostojen viljely-ympäristö voidaan luoda integroidulla alustalla sähköisesti stimuloivilla mikroelektrodeilla tai altistamalla erilaisille kemikaaleille ja molekyyille. Sähköinen stimulaatio voidaan saada aikaan neuroverkoston tai jopa yksittäisen neuronin eri osiin. Mikrofluidistisen sirun avulla mikrotunneleihin eristettyjä aksoneja ja lokeroihin eristettyjä neuronien soomia, voidaan sähköisesti stimuloida erikseen. Verkoston vastetta aksonien sähköiseen stimulaatioon on tutkittu, soomien ja aksonien alle asetetuilla mittaavilla mikroelektrodeilla ja kalsiumkuvantamisella (Montaux et al., 2018). Kalsiumkuvantamisella havaittiin aksonien sähköisen stimulaation taajuuden kasvun, johtavan merkittävään kasvuun aksonien ja jälkisynaptisten neuronien kalsiumpulsseissa, mikä vastaa MEA – mittauksilla selvitettyä neuroniverkostojen spontaania aktiivisuutta.

Integroiduilla alustoilla ihmisen neuroneita on toistaiseksi tutkittu vain vähän ja raportoituja ihmisneuroneilla suoritettuja neuroverkostotutkimuksia ei juurikaan ole. Ihmisen selkäytimen

takajuuren hermosolmun (eng. Dorsal root ganglion, DRG) neuroniviljelmän vastetta kemikaaliseen stimulaatioon on kuitenkin tutkittu *in vitro*. Tutkimuksessa DRG – neuronien vastetta kolmeen eri kemikaaliin tutkittiin MEA – mittauksilla ja automatisoidulla mikrofluidistiikalla. Stimulaatiosta seurannut muutos piikkirykelmien ajallisessa jakautumisessa pystyttiin MEA - mittauksilla yhdistämään tiettyyn kemikaaliin. Käytetyistä kemikaalista esimerkiksi *Capsaicin* aiheutti pitkäkestoisia piikkirykelmiä ja *KCl* (kaliumkloridi) aiheutti jopa sähköisen aktiivisuuden loppumisen (Enright et al., 2016).

Integroitujen alustojen suurena etuna ovat yhtäaikainen neuroniviljelmien manipulointi ja sähköisen aktiivisuuden mittaaminen MEA:lla. Manipulointiin sisältyy esimerkiksi laitteen lokerointi, lokeroitten väliset mikrotunnelit, mediumin käsittely ja stimulointi, joista mediumin käsittely voi olla automatisoitua. Lisäksi yhdellä alustalla voidaan suorittaa useita rinnakkaisia mittauksia ja tutkimuksia, minkä seurauksena on luotettavampaa informaatiota.

Haasteita integroiduilla alustoilla, niin kuin mikrofluidistisilla siruilla ja MEA – levyillä, on havaittu. Esimerkiksi mikroelektrodien levittäminen laajalle alueelle vaikuttaa sähköisen signaalin mittaamisherkkyteen. Tämä on seurausta vähäisen mikroelektrodimäärän käytöstä suhteellisen laajalla alueella. MEA – levyn integrointi mikrofluidistiselle sirulle voi tuottaa myös haasteita, koska suurin osa käytetyistä MEA – levyistä on kaupallisia. Tästä seuraa haasteita mikrofluidistisen sirun suunnittelussa, mikä voi rajoittaa sirun ominaisuuksia (van de Wijdeven et al., 2019). Integroitujen alustojen ollessa suhteellisen uutta teknologiaa, ei ihmisen keskushermoston neuroneilla tehtyjä tutkimuksia vielä ole, mikä jättää tulevaisuuteen runsaasti kehitettävää.

6. Yhteenveto

Aivojen ollessa elimistön monimutkaisin elin, liittyy sen tutkimukseen lukuisia haastavia piirteitä. Aivot koostuvat neuroverkoista, jotka välittävät informaatiota sähköisessä muodossa. Näiden verkostojen luomiseen ja tutkimiseen *in vitro*, eri lähteistä saatavilla neuroneilla, on ajan myötä kehittyneet lukuisia erilaisia tekniikoita. Eri lähteitä neuroneille ovat, esimerkiksi rottien aivoista eristetty kudos ja hiPS – solut. Neuroverkostojen tutkimiseen soveltuvat tekniikat, kuten MEA – mittaukset ja kuvantaminen ovat molemmat olleet suhteellisen kauan käytössä. Neuroniviljelmien ympäristön manipulointi *in vitro*, mikrofluidistiikan avulla on sen sijaan suhteellisen uutta. Kaikilla menetelmillä on puolensa, kuin myös haasteensakin.

Niin mikrofluidistisilla siruilla, kuin MEA – levyillä ja mikroMEA – laitteilla on tulevaisuudessa siirryttävä ihmissolumalliin, jotta aivojen toiminnan, sairauksien ja vaurioiden tutkiminen *in vitro*, olisi mahdollisimman lähellä *in vivo* – olosuhteita. Ihmissolumalleihin siirtyminen ehkäisisi myös eläinten

tutkimuskäyttöön liittyviä eettisiä ongelmia. Eläinkokeista ei kuitenkaan nykyisen tiedon mukaan voida luopua.

Ihmisen neuroneita on mahdollista saada kantasoluista ja tulevaisuudessa hiPS – solujen käytön vakiinnuttua ja yleistettyä, on neuroverkoston ihmissolumallin luomiselle *in vitro* entistä matalampi kynnys. Lisäksi ihmiselimistön eri kudoksia voidaan viljellä ja tutkia niiden yhteyttä toisiinsa samalla laitteella (Enright et al., 2016), näin päästen lähemmäs kokonaisen ihmiselimistön mallintamista *in vitro*, joka mahdollistaa entistä tarkemman *in vivo* – kaltaisen fysiologian ja sairauksien tutkimisen ja lääkeainetestauksen.

MEA – levyjen ja integroitujen alustojen käyttämien elektrodien joustava sijoittaminen ja lukumäärän kasvu ovat toivottuja näiden lisätessä MEA – mittauksien ja stimuloinnin tarkkuutta ja monipuolisuutta, jollaista on jo tänä päivänä nähtävissä HD-MEA – levyillä. Integroitaville alustoille on tulevaisuudessa myös yhdistettävissä 3D – viljelyalusta, mikä mahdollisesti koostuisi hydrogeelistä, sen ollessa lupaava 3D – kasvuympäristö *in vitro*. Tämä ajaa MEA – levyjen kehitystä kohti 3D – MEA:a. Uudet viljely- ja mittaustekniikat mahdollistavat uudenlaisen informaation ja sen käsittely vaatii analyysien kehittämistä. Tällainen materiaali -ja soluviljelytekniikan, mikroelektroniikan ja neuroniviljelmistä saatavan informaation tietokoneellisen ja matemaattisen käsittelyn ja analyysin kehittyminen laajentaa neurobiologian ymmärrystä entistäkin syvällisemmäksi.

Lähteet

- Amin, H., Maccione, A., Marinaro, F., Zordan, S., Nieuw, T., & Berdondini, L. (2016). Electrical responses and spontaneous activity of human iPS-derived neuronal networks characterized for 3-month culture with 4096-electrode arrays. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 121. doi:10.3389/fnins.2016.00121
- Bucher, D., & Goillard, J. (2011). Beyond faithful conduction: Short-term dynamics, neuromodulation, and long-term regulation of spike propagation in the axon. *Progress in Neurobiology*, *94*(4), 307-346. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.06.001
- Enright, H. A., Felix, S. H., Fischer, N. O., Mukerjee, E. V., Soscia, D., Mcnerney, M., et al. (2016). Long-term non-invasive interrogation of human dorsal root ganglion neuronal cultures on an integrated microfluidic multielectrode array platform. *Analyst (London); Analyst*, *141*(18), 5346-5357. doi:10.1039/C5AN01728A
- Gribaudo, S., Tixador, P., Bousset, L., Fenyi, A., Lino, P., Melki, R., et al. (2019). Propagation of α -synuclein strains within human reconstructed neuronal network. *Stem Cell Reports*, *12*(2), 230-244. doi:10.1016/j.stemcr.2018.12.007
- Haring, A. P., Sontheimer, H., & Johnson, B. N. (2017). Microphysiological human brain and neural systems-on-a-chip: Potential alternatives to small animal models and emerging platforms for drug discovery and personalized medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, *13*(3), 381-406. doi:10.1007/s12015-017-9738-0
- Jacobson, S., & Marcus, E. M. (2011). *Neuroanatomy for the neuroscientist* (2nd ed.). US: Springer. doi:10.1007/978-1-4419-9653-4
- Johnstone, A. F. M., Gross, G. W., Weiss, D. G., Schroeder, O. H. -, Gramowski, A., & Shafer, T. J. (2010). Microelectrode arrays: A physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. *Neurotoxicology*, *31*(4), 331-350. doi:10.1016/j.neuro.2010.04.001

Kärnä, P., Mikkonen, J., Kreutzer, J., Narkilahti, S., Skottman, H., Kallio, P., et al. (2012).

Structured PDMS chambers for enhanced human neuronal cell activity on MEA platforms.

Journal of Bionic Engineering, 9(1), 1-10. doi:10.1016/S1672-6529(11)60091-7

Keller, J. M., & Frega, M. (2019). Past, present, and future of neuronal models in vitro. *Advances in Neurobiology; Adv Neurobiol*, 22, 3.

Liu, J., Sternberg, A. R., Ghiasvand, S., & Berdichevsky, Y. (2019). Epilepsy-on-a-chip system for antiepileptic drug discovery. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering; IEEE Trans Biomed Eng*, 66(5), 1231-1241. doi:10.1109/tbme.2018.2871415

Mayer, M., Arrizabalaga, O., Lieb, F., Ciba, M., Ritter, S., & Thielemann, C. (2018).

Electrophysiological investigation of human embryonic stem cell derived neurospheres using a novel spike detection algorithm. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 462-468.

doi:10.1016/j.bios.2017.09.034

Millet, L. J., & Gillette, M. U. (2012). Over a century of neuron culture: From the hanging drop to microfluidic devices. *The Yale Journal of Biology & Medicine*, 85(4), 501-521. Retrieved from MEDLINE database. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239951>

Montaux, E., Charlot, B., Genoux, A., Saudou, F., & Gazorla, M. (2018). An integrated microfluidic/microelectrode array

for the study of activity-dependent intracellular

dynamics in neuronal networks. *LAB on a Chip*, 18(22), 3425–3435.

doi:<https://doi.org/10.1039/C8LC00694F>

Napoli, A., & Obeid, I. (2016). Comparative analysis of human and rodent brain primary neuronal culture spontaneous activity using Micro-Electrode array technology. *Journal of Cellular Biochemistry; J Cell Biochem*, 117(3), 559-565. doi:10.1002/jcb.25312

- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (5th ed.). New York: Freeman.
- Neto, E., Leitão, L., Sousa, D. M., Alves, C. J., Alencastre, I. S., Aguiar, P., et al. (2016). Compartmentalized microfluidic platforms: The unrivaled breakthrough of in vitro tools for neurobiological research. *The Journal of Neuroscience*, *36*(46), 11573-11584.
doi:10.1523/jneurosci.1748-16.2016
- Nicole Baumann, & Danielle Pham-Dinh. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, *81*(2), 871-927.
doi:10.1152/physrev.2001.81.2.871
- Obien, M. E. J., Deligkaris, K., Bullmann, T., Bakkum, D. J., & Frey, U. (2015). Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in Neuroscience; Front Neurosci*, *8*, 423. doi:10.3389/fnins.2014.00423
- Ristola, M., Sukki, L., Azevedo, M. M., Seixas, A. I., Relvas, J. B., Narkilahti, S., et al. (2019). A compartmentalized neuron-oligodendrocyte co-culture device for myelin research: Design, fabrication and functionality testing. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, *29*(6), 065009. doi:10.1088/1361-6439/ab16a7
- Ruiz, A., Joshi, P., Mastrangelo, R., Francolini, M., Verderio, C., & Matteoli, M. (2014). Testing $\alpha\beta$ toxicity on primary CNS cultures using drug-screening microfluidic chips. *Lab on a Chip*, *14*(15), 2860. doi:10.1039/c4lc00174e
- Takayama, Y., & Kida, Y. S. (2016). In vitro reconstruction of neuronal networks derived from human iPS cells using microfabricated devices. *PLoS One*, *11*(2), e0148559.
doi:10.1371/journal.pone.0148559
- van de Wijdeven, R., Ramstad, O. H., Valderhaug, V. D., Köllensperger, P., Sandvig, A., Sandvig, I., et al. (2019). A novel lab-on-chip platform enabling axotomy and neuromodulation in a

multi-nodal network. *Biosensors & Bioelectronics*, 140, 111329.

doi:10.1016/j.bios.2019.111329

Wickham, J., Corna, A., Schwarz, N., Uysal, B., Layer, N., Honegger, J. B., et al. (2020). Human cerebrospinal fluid induces neuronal excitability changes in resected human neocortical and hippocampal brain slices. *Frontiers in Neuroscience; Front Neurosci*, 14, 283.

doi:10.3389/fnins.2020.00283

Yang, I. H., Siddique, R., Hosmane, S., Thakor, N., & Höke, A. (2009). Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration. *Experimental Neurology; Exp Neurol*, 218(1), 124-128. doi:10.1016/j.expneurol.2009.04.017

Ylä-Outinen, L., Heikkilä, J., Skottman, H., Suuronen, R., Aänismaa, R., & Narkilahti, S. (2010). Human cell-based micro electrode array platform for studying neurotoxicity. *Frontiers in Neuroengineering*, 3 doi:10.3389/fneng.2010.00111

Ylä-Outinen, L., Tanskanen, J., Kapucu, F., Hyysalo, A., Hyttinen, J., & Narkilahti, S. (2019). *Advances in human stem cell-derived neuronal cell culturing and analysis* Springer International Publishing.