

# **MICROELECTRODE ARRAY -MITTAUKSET SYDÄNMALLIN KEHITTÄMISESSÄ**

Joel Simeon Hyypä  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta  
FICAM  
Toukokuu 2018

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta  
Finnish Centre for Alternative Methods (FICAM)

## HYYPÄ JOEL SIMEON: MICROELECTRODE ARRAY -MITTAUKSET SYDÄNMALLIN KEHITTÄMISESSÄ

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 54 sivua

Ohjaajat: FT Tarja Toimela ja FT Sampo Tuukkanen

Huhtikuu 2018

Avainsanat: microelectrode array, kantasoluista erilaistettut kardiomyosyytit, kenttäpotentiaalinen kesto (FPD)

---

Lääketutkimuksia ja toksikologisia testejä varten tarvitaan luotettavia solumalleja. Tässä tutkimuksessa seurattiin ja verrattiin sydänmalliviljelmien ja pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävien soluviljelmien syketaajuuden, kenttäpotentiaalisen kestön (field potential duration, FPD) ja sähkökäyrän muodon kehittymistä 25 päivän ajan microelectrode array (MEA) -järjestelmällä. Viimeistä edellisenä mittauspäivänä suoritettiin haloperidolialtistus, jonka vaikutuksia syketaajuuteen, kenttäpotentiaaliseen kestoan ja sähkökäyrän muotoon tutkittiin. Kahta eri haloperidolipitoisuutta käytettiin: 1  $\mu\text{mol/l}$  ja 10  $\mu\text{mol/l}$ . Tavoitteena oli saada viitteitä haloperidolin QT-aikaa pidentävästä vaikutuksesta. MEA-mittauksista määritettävä FPD vastaa elektrokardiogrammista mitattavaa QT-aikaa. Syketaajuuden, FPD:n ja sähkökäyrän muodon tarkastelua varten kehitettiin Matlab-pohjainen add-on-ohjelma, Vanellus CardioCalculator, jonka toimivuutta ja soveltuvuutta tutkimuksessa myös testattiin.

Kardiomyosyytit erilaistettiin alkioperäisistä kantasoluista. Sydänmallissa on kardiomyosyyttien lisäksi napanuoran laskimon endoteelisoluja sekä rasvakudoksen stroomasoluja. Kardiomyosyyttien erilaistus suoritettiin kuusikuoppalevyillä. Viiden viikon viljelyn jälkeen kardiomyosyytit siirrostettiin kahdelle kuusikuoppaiselle MEA-levylle. Kymmenessä kuopassa oli sydänmallia ja kahdessa pelkästään kardiomyosyyttejä. Kahdessa sydänmallikuopassa käytettiin suurempaa kardiomyosyyttiheyttä.

Sähkökäyrän kehitys oli positiivista toiselle ja kolmannelle viikolle asti MEA-levylle siirrostamisen jälkeen. Kolmannella ja neljännellä viikolla havaittiin sykkeen epäsäännöllistymistä ja sähkökäyrän muodon huonontumista. Sekä sydänmalliviljelmillä että pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävillä viljelmillä saatiin muodoltaan kelvollisia sähkökäyriä. Pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävien viljelmien sähkökäyrän ominaisuudet vaikuttivat säilyvän kelvollisina pitempään kuin sydänmalliviljelmien.

Ainoastaan kahdesta sydänmallia sisältävästä kuopasta saatiin analysointikelppoisia mittaustuloksia haloperidolialtistuksen jälkeen. Näissä havaittiin hidastunutta sykettä ja pidentyneitä FPD-arvoja.

Vanellus CardioCalculator osoittautui toimivaksi ohjelmaksi syketaajuuden ja FPD:n määrittämiseen sekä sähkökäyrän muodon tarkasteluun. Mittaustulosten kelvollisuuden silmäämääräinen arviointi tosin osoittautui aikaa vieväksi.

Tämän opinnäytteen alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla Tampereen yliopiston laatu- ja laatuvarmistuksen mukaisesti.

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO	4
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	5
2.1	Sydämen solukoostumus	5
2.2	Sydänmallin kriittiset piirteet	6
2.2.1	Rakenteelliset piirteet	6
2.2.2	Pluripotentista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien piirteet	7
2.2.3	Kardiomyosyyttien markerit	8
2.2.4	Kardiomyosyyttien aktiopotentiaali ja ionivirrat	9
2.2.5	Kardiomyosyyttien syketaajuus, supistumisvoima ja johtumisnopeus	10
2.2.6	Kardiomyosyyttien elektrokardiogrammi	11
2.2.7	Korjattu kenttäpotentiaalilin kesto aika FPDC	13
2.3	Lääkeaineiden vaikutusmekanismeja	14
2.3.1	Digoksiini	14
2.3.2	Verapamiili	14
2.3.3	Kinidiini	15
2.3.4	Haloperidoli	15
3	MENETELMÄT	16
3.1	Microelectrode array (MEA) -järjestelmä	16
3.2	Soluviljelmät	16
3.3	Mittausten suoritus ja analysointi	18
3.3.1	MEA-mittausten suoritus	18
3.3.2	Vanellus CardioCalculator	18
4	TULOKSET	23
4.1	Sykkeen ja FPD:n kehitys	23
4.2	Sähkökäyrän kehitys	28
4.3	Analysoinnin kannalta ongelmalliset mittaukset	33
4.4	Haloperidolialtistus	36
5	JOHTOPÄÄTÖKSET	43
	LÄHTEET	47

# 1 JOHDANTO

Lääkekehitys ja toksikologinen tutkimus tarvitsevat luotettavia testausmenetelmiä. Koska kokeiden välitön aloittaminen ihmisillä asettaisi koehenkilöt merkittävään vaaraan, tutkittavia yhdisteiden vaikutuksia testataan usein ensin eläimillä. Vaikka koe-eläimet fysiologisilta ominaisuuksiltaan suuresti muistuttavatkin ihmisiä, on niissä myös merkittäviä eroja, jotka voivat ratkaisevasti vaikuttaa tuloksiin (Heinonen 2015). Täydellistä eläinmallia ihmiselle ei ole, joten tarkat tutkimukset edellyttävät useiden eri eläinlajien käyttöä. Tällöinkään ei ole täysin varmaa, päteekö tulos ihmiselle. (Milani-Nejad & Janssen 2014).

Yleinen tutkimuksissa käytetty *in vivo* -malli on hiiri. Sydäntutkimuksessa hiirimallin käytölle on kuitenkin merkittäviä esteitä, sillä pienten jyrsijöiden sydämen fysiologia poikkeaa ratkaisevasti ihmisen vastaavasta. Esimerkiksi aikuisen hiiren leposyketäajuus on 600–700 lyöntiä minuutissa, joten sen sydänlihassolut repolarisoituvat nopeasti eikä niillä ole selkeää latenssivaihetta (Nerbonne 2004). Hiiren sydän eroaakin ihmisen sydäimestä jo kardiomyosyyttien tasolla (Hamilton & Ianuzzo 1991). Repolarisaation mekanismit eroavat niin suuresti ihmisten ja hiirien välillä, että The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) ei pidä hiirten käyttöä sopivana testiaineiden sydänvaikutusten tutkimiseen (Food and Drug Administration 2005).

*In vivo* -mallien kyky ennustaa vasteita ihmisessä on puutteellinen, mutta ne eivät suinkaan ole ainoa mahdollisuus prekliinisiin ja toksikologisiin tutkimuksiin (Knight 2008, Doke & Dhawale 2015). Puutteellisen ennustavuuden, eettisten seikkojen, ajankäytön tehokkuuden ja myös taloudellisten syiden takia on kannattavaa panostaa ihmissolupohjaisten *in vitro* -mallien kehittämiseen (Suter-Dick ym. 2015). *In vitro* -malleilla voidaan jo nyt korvata osa eläinkokeista, mutta mallien jatkokehittelylle on vielä tarvetta (Lilienblum ym. 2008).

Sydän- ja verisuonisairaudet ovat yleisiä kuolinsyitä (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators 2015), ja sydän on varsin herkkä lääkkeiden haittavaikutuksille (Redfern ym. 2003). Haittavaikutusten ehkäisyn kannalta on tärkeää, että uudet lääkkeet testataan kattavasti, ja tehokkaasti tämä tapahtuisi ihmisen sydäntä vastaavalla mallilla. Sydän on kuitenkin monimutkainen elin, jossa on kardiomyosyyttien lisäksi muun muassa sileitä lihassoluja, endoteelisoluja, perisyyttejä ja fibroblasteja (Nag 1980). Näin ollen pelkääntään kardiomyosyytteihin perustuva malli ei riitä, kun selvitetään tutkittavan yhdisteen vaikutuksia sydämeen. Tässä syventävien opintojen kirjallisessa työssä perehdytään sydänmallin kehittämiseen liittyviin *microelectrode array* (MEA) -mittauksiin.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Sydämen solukoostumus

Selkärankaisilla sydän on ensimmäinen kehittyvä elin, ja sillä on elintärkeä rooli ravinnon ja hapen kuljetuksessa (Buckingham ym. 2005). Vaikka sydämen usein ajatellaan olevan vain verta pumpaava lihas, se on kuitenkin useista solutyypeistä rakentuva monimutkainen kokonaisuus. Sydämen pääsolutyypit ovat sydänlihassolut, fibroblastit, sileät lihassolut ja endoteelisolut (Banerjee ym. 2007). Karkeasti sydämen solut voidaan jakaa myosyytteihin ja ei-myosyytteihin. Vaikka sydänlihassolut eli kardiomyosyytit muodostavatkin suurimman osan sydämen massasta ja noin 75 prosenttia tilavuudesta, niiden osuus aikuisen sydämen soluista on 20–35 prosenttia (Brutsaert 2003, Nag 1980, Soonpaa & Field 1998). Fibroblastit voivat muodostaa yli puolet sydämen soluista (Xin ym. 2013). Sydämen solujen prosentuaaliset osuudet kuitenkin muuttuvat elinaikana. Vastasyntyneellä kardiomyosyyttien osuus sydämen vasemman kammion soluista voi olla yli 60 prosenttia. Kardiomyosyyttien määrä pysyy suhteellisen vakaana, kun taas endoteelisolujen ja mesenkymaalisten solujen, kuten fibroblastien, määrä kasvaa. Nuorilla aikuisilla kardiomyosyyttien osuus on keskimäärin noin 18, endoteelisolujen 24 ja mesenkymaalisten solujen 58 prosenttia. (Bergmann ym. 2015.)

Sydämen solukoostumuksen tarkkaa määrittämistä vaikeuttaa muun muassa solujen tunnistamisen vajavaisuus. On mahdollista, että fibroblastien suhteellista osuutta on liioiteltu. Syynä tähän on fibroblastin selvän määritelmän puuttuminen, jolloin koostumustutkimuksissa myös perisytyt ja leukosyytit on saatettu luokitella fibroblasteiksi. (Pinto ym. 2016.) Sydämen fibroblastit ovat kuitenkin hyvin heterogeeninen solupopulaatio, mikä osaltaan aiheutuu fibroblastien vaihtelevista alkuperistä. Ne voivat polveutua sydämen alkuperäisistä fibroblasteista, endoteelisoluista endoteeli-mesenkymyitransition kautta tai luuytimeistä peräisin olevista verenkierron mukana kulkevista progenitorisoluista, monosyyteistä tai fibrosyyteistä. (Krenning ym. 2010).

Vaikka ei-myosyyttien osuus sydämen tilavuudesta on suhteellisen pieni, ne ovat välttämättömiä sydämen normaalille homeostaasille, sillä niiden toiminta tarjoaa soluväliaineen ja verisuonituksen sekä mahdollistaa solujen välistä viestintää. Sekä myosyytit että ei-myosyytit vastaavat fysiologisiin ja patologistiin stressitekijöihin. Maladaptiiviset muutokset ei-myosyyteissa, kuten fibroosi ja alentunut kapillaaritiheys, osallistuvat sydämen vajaatoiminnan patogeneesiin. (Zhou & Pu 2016.)

Endoteelisolujen ja kardiomyosyyttien välinen vuorovaikutus on välttämätöntä sydämen kehitykselle ja toiminnan ylläpidolle. Endoteelisolut ilmentävät, aktivoivat ja vapauttavat useita vasoaktiivisia aineita sekä lukuisia muita bioaktiivisia molekyylejä. Näin endoteelisolut vaikuttavat kardiovaskulaariseen homeostaasiin säätelemällä verisuonten permeabiliteettia ja läpimittaa sekä ylläpitämällä veren juoksevuuutta. (Brutsaert 2003.)

Fibroblastit tuottavat valtaosan soluväliaineesta. Soluväliaine ohjaa kardiomyosyyttejä kasvamaan toimivaan järjestykseen ja jakaa kardiomyosyyttien supistumisen aiheuttaman mekaanisen voiman koko myokardiumille. Se myös helpottaa solujen välistä mekaanista, sähköistä ja kemiallista viestintää. Tällä on merkitystä niin homeostaasin ylläpidossa kuin sydämen kehityksessäkin. (Bowers ym. 2010, van Spreeuwel ym. 2014.) Fibroblastit tuottavat myös monia kasvutekijöitä, jotka vaikuttavat muun muassa kardiomyosyyttien morfologiaan ja kasvuun. (Kakkar & Lee 2010.) Sydämen fibroblasteilla on tärkeä rooli niin normaalin toiminnan ylläpidossa kuin myös erilaisissa patologisissa tiloissa. Soluväliaineen välityksellä tapahtuvan viestinnän lisäksi ne vaikuttavat myös solu-solukommunikaation kautta. (Souders ym. 2009.)

Kardiomyosyytit liittyvät toisiinsa kytkylevyjen välityksellä. Kytkylevyissä on neljää erilaista solujen välistä liitosta: desmosomeja, vyöliitoksia, tiiviitä liitoksia ja aukkoliitoksia. Virheet desmosomeissa, vyöliitoksissa ja aukkoliitoksissa ovat yhteydessä rytmihäiriöihin. (Lisewski ym. 2008.) Aukkoliitoksilla on tärkeä rooli kardiomyosyyttien sähkönjohtavuudessa ja myokardiumin koordinoitussa toiminnassa (Kanno & Saffitz 2001). Desmosomit ja vyöliitokset vaikuttavat sähkönjohtavuuteen osittain epäsuorasti tukemalla aukkoliitosten toimintaa. Myös tiiviillä liitoksilla on merkitystä sähkönjohtavuuden kannalta, sillä tiiviisiin liitoksiin kuuluvan coxsackievirus-adenovirusreseptorin puute johtaa vakavaan AV-solmukkeeseen toiminnan estymiseen. Coxsackievirus-adenovirusreseptorin puute ei kuitenkaan vaikuta eteisten ja kammioiden sähköiseen toimintaan. (Lisewski ym. 2008.)

## **2.2 Sydänmallin kriittiset piirteet**

### **2.2.1 Rakenteelliset piirteet**

Jotta sydämen in vitro -malli voisi luotettavasti kuvata in vivo -olosuhteita, sen tulee sisältää kaikkia sydämen kriittisiä soluja, joihin kuuluvat kardiomyosyytit, endoteelisolut, perisytyt, sileät lihassolut ja fibroblastit. Vain yhdestä solutyypistä koostuvissa malleissa ei ole tarvittavaa mikroympäristöä eikä olennaisia solu-soluliitoksia. (Vuorenperä ym. 2014.)

Kaksiulotteinen soluviljely ei vastaa in vivo -tilannetta, sillä kaksiulotteisella mallilla ei voida täysin jäljitellä solujen kolmiulotteista järjestystä eikä kudosten välistä soluväliainetta (Shamir & Ewald 2014). Viljelytapa vaikuttaa myös solujen morfologiaan, supistumiskykyyn, proliferaationopeuteen, solujen välisiin adheesiorakenteisiin, myofibrillien järjestymiseen, mitokondrioiden muotoon, solulimakalvoston sisältöön, solun tukirakenteisiin ja solujen erilaistumista kuvaavien markkereiden ilmentymiseen. Kaksiulotteisesti viljeltyt kardiomyosyytit ovat litteitä ja levinneitä, kun taas kolmiulotteisella viljelyllä saadaan sauvamaisia ja bipolaarisia, enemmän erilaistuneita sydänsoluja muistuttavia kardiomyosyyttejä. Kolmiulotteinen viljely myös suosii solujen välisten liitosten ja kypsien myofibrillien muodostumista ja säilymistä. Se myös lisää mitokondrioiden määrää kardiomyosyyteissä. (Pontes Soares ym. 2012.) Kolmiulotteisessa viljelyssä adheesiomolekyylit

ja reseptorit ovat jakautuneet tasaisemmin eri puolille solukalvoa kuin kaksiulotteisessa viljelyssä, jossa ne ovat keskittyneet solun viljelyastian puoleiselle pinnalle (Knight & Przyborski 2015).

Kolmiulotteisessa viljelyssä voidaan hyödyntää ulkoista, biologisesti yhteensopivaa kehikkoa. Kehikkojen käytöllä kudosteknologiassa on saavutettu merkittäviä tuloksia monien eri kudosten ja elinten kohdalla, ja osaa tuloksista on voitu hyödyntää myös kliinisesti. Hyvästä biologisesta yhteensopivuudesta huolimatta kehikkojen käyttöön liittyy kuitenkin erilaisia ongelmia, jotka tulee ottaa huomioon sydänmallissa. Sydänlihaskudoksen kardiomyosyyttien yhtäaikainen supistuminen vaatii suurta solutiheyttä, jotta aukkoliitoksia voi muodostua kardiomyosyyttien välille. Kehikkojen käyttö vähentää solu-soluliitoksia ja johtaa soluväliaineen vääränlaiseen järjestykseen, mikä vaikuttaa sydänlihaskudoksen voimantuotto-kykyyn. (Norotte ym. 2009.)

Keinotekoisista kehikkoa parempi menetelmä sydänmallin kannalta on käyttää tukirakenteena soluviljelyllä muodostettua verisuonten kaltaisten rakenteiden muodostamaa verkostoa. Mekaanisen tuen lisäksi suoniverkosto tarjoaa kasvutekijöineen luonnollisen kasvualustan, mikä edistää tärkeiden soluliitosten, kuten aukkoliitosten, muodostumista. Tällaisella kardiovaskulaarisella mallilla on todettu suotuisia vaikutuksia lisäksi kardiomyosyyttien morfologiaan, järjestykseen ja toimintaan. (Vuorenpää ym. 2014.)

Tehokkaan lihassupistuksen aikaansaamiseksi kardiomyosyyttien tulee järjestäytyä yhdensuuntaisesti. Kardiomyosyyttien oikeanlainen asettuminen parantaa supistumisominaisuuksien lisäksi kardiomyosyyttien kaliumin käsittelyä. (van Spreeuwel ym. 2014.) Pelkkien kardiomyosyyttien soluviljely ei johda yhtenäiseen orientaatioon. Kardiomyosyyttien kasvattaminen suoniverkoston läheisyydessä saa kardiomyosyytit asettumaan pitkittäin ja yhdensuuntaisesti suonirakenteiden kanssa. (Vuorenpää ym. 2014.) Hiiren alkion kantasoluista erilaistetuilla kardiomyosyyteillä tehdyissä tutkimuksissa on todettu, että myös kardiomyosyyttien yhteisviljely endoteelisolujen kanssa edistää sydänlihassolujen yhdensuuntaista asettumista kuten myös pitkänomaisen solumuodon kehittymistä (Lee ym. 2015).

### **2.2.2 Pluripotentista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien piirteet**

Aikuiset sydänlihassolut ovat suuria ja lieriömäisiä, ja useimmat niistä ovat monitumaisia (Robertson ym. 2013). Niiden pituus on noin 130 mikrometriä, ja niillä on järjestyneet sarkomeerit ja kattava T-tubulusverkosto (Hartman ym. 2016). Aikuisen kardiomyosyytit eivät ole proliferatiivisia, ja aikuisen kantasoluja on vaikea erilaistaa kardiomyosyyteiksi, joten ainoa uusien kardiomyosyyttien lähde soluviljelyyn ovat pluripotentit kantasolut. Ihmisen alkioiden käyttöön solujen lähteenä liittyy suuria eettisiä ongelmia, mutta nämä ongelmat on mahdollista välttää käyttämällä indusoituja pluripotentteja kantasoluja. (Batalov & Feinberg 2015.)

Pluripotenteista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien rakenteelliset ominaisuudet eroavat aikuisen kardiomyosyyteistä. Ne ovat yksitumaisia ja pienempiä kuin aikuisen kardiomyosyytit, niillä on vähemmän mitokondrioita, ja niiltä puuttuu T-tubulusverkosto. Soluviljelyolosuhteet ja viljelyajan pituus vaikuttavat pluripotenteista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien ominaisuuksiin. Kun kardiomyosyyttejä viljellään pitkään, niiden muodosta tulee pitkänomainen, jolloin ne muistuttavat morfologisesti enemmän aikuisen kardiomyosyyttejä, mutta ne ovat kuitenkin selvästi pienempiä kuin aikuisen kardiomyosyytit. Pitkään viljelysaika ei tee kardiomyosyyteistä monitumaisia eikä saa niitä kehittämään T-tubuluksia. (Robertson ym. 2013.) Lisäksi hiiren soluilla tehdyt tutkimukset osoittavat, että kardiomyosyyttien sarkomeerien pakkaustiheys, jolla tarkoitetaan  $\alpha$ -aktiinin osuutta Z-levyissä, on merkittävästi suurempi neonataalisilla kardiomyosyyteillä kuin pluripotenteista kantasoluista erilaistetuilla kardiomyosyyteillä (Sheehy ym. 2014). Viljelemällä erilaistetuilla kardiomyosyyteillä voidaan kuitenkin värjäyksellä havaita sydänlihassoluille tyypilliset poikkijuovat, jotka viittaavat hyvin järjestyneisiin sarkomeerirakenteisiin (Gupta ym., 2010).

Spontaanisti sykkivien solujen havaitseminen on onnistuneen kardiomyosyytiksi erilaistumisen ensimmäinen merkki. Lisäksi erilaistumisen varmistaminen edellyttää kardiomyosyyteille tyypillisten geenien ilmentämistä. Näihin kuuluvat sydämen rakenneproteiineja, transkriptiofaktoreita, aukkoliitoksiin liittyviä proteiineja, hormoneja sekä pintaproteiineja ja ionikanavia tuottavat geenit. (Xu 2012.)

### 2.2.3 Kardiomyosyyttien markkerit

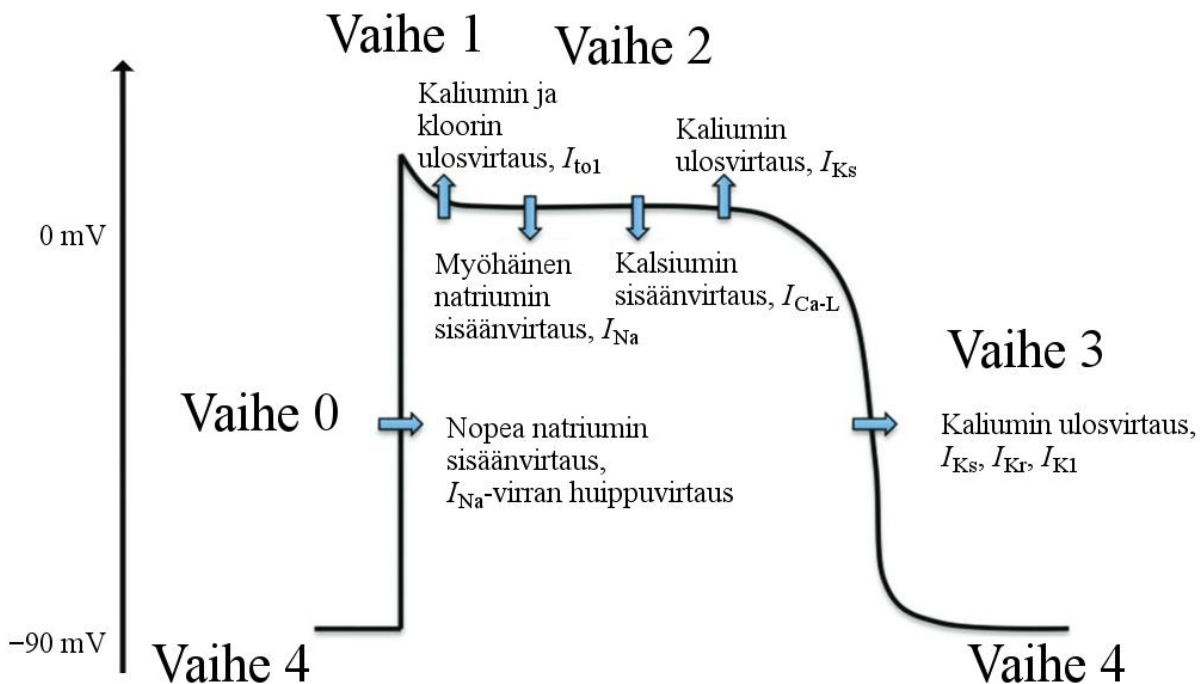
Kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien karakterisoinnilla pyritään varmistamaan se, että erilaistuneilla soluilla on oletetut molekulaariset ja toiminnalliset ominaisuudet. Solujen tunnistaminen kardiomyosyyteiksi edellyttää, että ne ilmentävät sydänlihassoluille tyypillisiä markkereita. Erilaistumisen edetessä kantasoluille tyypillisten geenien ilmentymisen tulee vähentyä. (Xu 2012.)

Sydänlihassoluille tyypillisiä markkereita ovat muun muassa Nkx2.5 (cardiac homeobox protein), MEF2c (myocyte enhancer factor 2c),  $\alpha/\beta$ -MHC (myosin heavy chain), troponiinit cTnI ja cTnT, ANP (atrial natriuretic peptide), GATA4, TBX5, TBX20, N-kadheriini, Cx43 (konneksiini 43), MLC2a ja MLC2v (myosin light chain). Troponiinit ja myosiiniketjut ovat rakenneproteiineja. Nkx2.5, GATA4, TBX5, TBX20 ja MEF2c ovat transkriptiofaktoreita. N-kadheriini ja Cx43 ovat aukkoliitoksiin liittyviä proteiineja, ja ANP on hormoni. (Ng ym. 2010, Xu 2012.) Erilaistumisen edetessä pluripotenteille soluille tyypillisten markkerien, kuten Oct4 ja Sox2, ilmentymisen tulee vähentyä huomattavasti (Yokoo ym. 2009, Huber ym. 2007). Eteisten ja kammioiden kardiomyosyyttien geenien ilmentämisessä on myös eroja (Ng ym. 2010).



## 2.2.4 Kardiomyosyytien aktiopotentiaali ja ionivirrat

Sydämen aktiopotentiaalissa on viisi eri vaihetta. Vaiheessa 4 kardiomyosyytin kalvopotentiaali on noin  $-85$  mV. Vaiheessa 0 solukalvo depolarisoituu nopeasti. Nopeassa depolarisaatiossa kardiomyosyytin kalvopotentiaali muuttuu positiiviseksi ja nousee lopulta noin arvoon  $30$  mV. Nopeassa depolarisaatiossa nopeasti aktivoituvat jänniteriippuvaiset natriumkanavat avautuvat. Näistä suurin osa on  $\text{Nav}1.5$ -kanavia. Vaiheessa 1 nopeat natriumkanavat sulkeutuvat ja jänniteriippuvaiset kaliumkanavat aukeavat. Tällöin kaliumia virtaa ulos solusta ja solun kalvopotentiaali pienenee. Varhaisessa vaiheen 1 repolarisaatiossa keskeisessä osassa on transient outward ( $I_{\text{to1}}$ ) -virta, joka muodostuu hitaiden  $\text{Kv}1.4$ -,  $\text{Kv}1.7$ - ja  $\text{Kv}3.4$ -kanavien sekä nopeiden  $\text{Kv}4.2$ - ja  $\text{Kv}4.3$ -kanavien kautta virtaavasta kaliumista. Myös kloridia virtaa solun sisään vaiheessa 1, mutta aktiopotentiaalin kannalta sen merkitys on vähäisempi kuin kaliumin. Vaiheessa 2 jänniteriippuvaiset L-tyypin kalsiumkanavat aukeavat. Yhtäaikaista kalsiumin virrasta sisään ja kaliumin virrasta ulos seuraa pitkähkö tasainen vaihe. Vaiheessa 2 tapahtuu myös myöhäistä natriumin sisäänvirtausta. Vaiheessa 3 kalsiumkanavat sulkeutuvat mutta hitaat kaliumkanavat pysyvät auki, jolloin solu repolarisoituu nopeasti ja päätyy jälleen vaiheeseen 4. (Ng ym. 2010, Duan 2009, Saad ym. 2016.) Vaiheen 3 tärkein komponentti on rapid delayed rectifier current ( $I_{\text{Kr}}$ ) -virta, joka kulkee human ether-à-go-go-related gene (hERG) -geenin tuottaman kaliumkanavan kautta (Sanguinetti & Tristani-Firouzi 2006). Sinus- ja AV-solmukkeiden solujen aktiopotentiaaleissa ei ole vaiheita 1 ja 2 (Pinnell ym. 2007). Aktiopotentiaali vaiheineen ja olennaisimmat ionivirrat on esitetty kuvassa 1.



**Kuva 1.** Kaavakuva kardiomyosyytin aktiopotentiaalista vaiheineen ja olennaisimpine ionivirtoineen (muokattu Saad ym. 2016).

Pluripotenteista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien aktiopotentiaalit ovat piirteiltään epäkypsiä verrattuna aikuisen kardiomyosyytteihin. Alhaisen  $I_{K1}$ -kanavien määrän takia erilaistettujen kardiomyosyyttien kalvopotentiaali vaiheessa 0 on yleensä noin  $-60$  mV. Depolarisaationopeus eli potentiaalın muutos ajan suhteen depolarisaatiossa ( $\frac{dV}{dt_{max}}$ ) on aikuisen kardiomyosyyteillä  $300$  V/s. Vajaatoimintaisenkin sydämen kardiomyosyyteissä se on noin  $100$  V/s. Erilaistettujen kardiomyosyyttien depolarisaationopeus sen sijaan on huomattavan alhainen, yleensä alle  $40$  V/s. Alhainen depolarisaationopeus johtuu  $Na_v1.5$ -kanavien ja L-tyypin kalsiumkanavien vähäisestä määrästä. Näiden kanavien puute aiheuttaa myös aktiopotentiaalın lepovaiheen lyhyen keston tai puutteen. (Robertson ym. 2013, Yang ym. 2014.)

Aikuisen kardiomyosyyttien tärkeimmät ionivirrat ilmentyvät myös pluripotenteista kantasoluista erilaistetuissa kardiomyosyyteissä, mutta kanavien määrät ovat usein poikkeavia. Kalsiumin indusoima kalsiumin vapautuminen solulimakalvostosta on kantasoluista erilaistetuilla kardiomyosyyteillä hyvin vähäistä, jolloin suurin osa supistumiseen tarvittavasta kalsiumista tulee solukalvon kautta. Tämä vähentää supistusten yhdenaikaaisuutta, joka on välttämätöntä suurelle voiman tuotolle. (Robertson ym. 2013.) Kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien on havaittu ilmentävän ainakin L-tyypin kalsiumkanavia sekä  $I_{F-}$ , natrium-,  $K_{ir2.1}$ - ja  $K_v4.3$ -kanavia tuottavia geenejä (Yokoo ym. 2009). Erilaistetut kardiomyosyytit ilmentävät myös kaliumvirtoja, joiden oletetaan olevan vastuussa rytmihäiriöistä (Robertson ym. 2013).

## 2.2.5 Kardiomyosyyttien syketaajuus, supistumisvoima ja johtumisnopeus

Pluripotenteista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien perussyketaajuudeksi on raportoitu eri arvoja väliltä  $21$ – $52$  lyöntiä minuutissa, ja yleensä taajuus on noin  $40$  lyöntiä minuutissa. Syketaajuuteen voivat vaikuttaa käytetty solulinja, viljelyolosuhteet, erilaistumisaika ja sykkimisen alkamisesta kulunut aika. (Robertson ym. 2013.) Sähköinen stimulaatio vaikuttaa erilaistettujen kardiomyosyyttien syketaajuuteen adaptiivisesti (Eng ym. 2016).

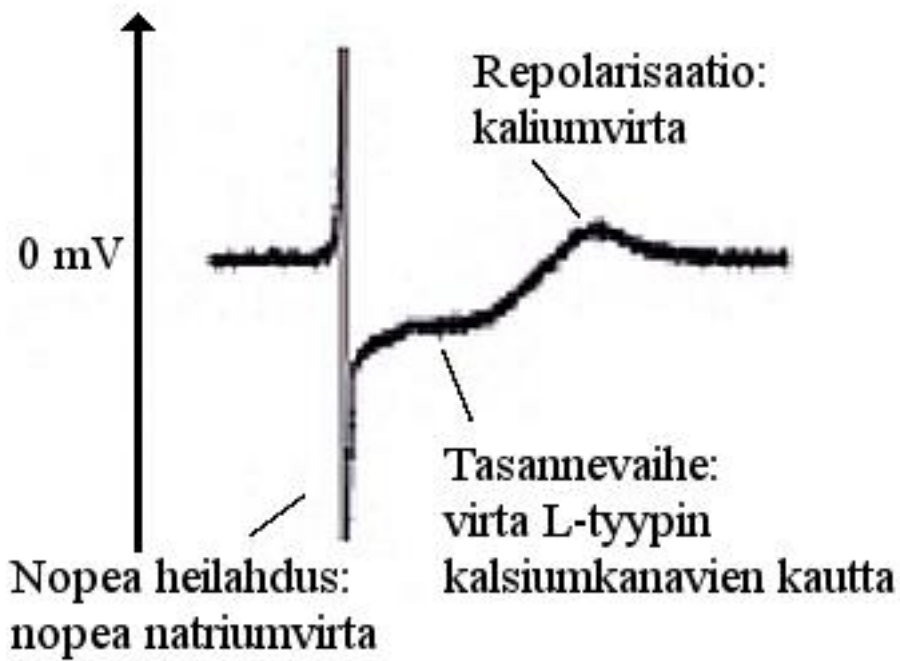
Alkioperäisistä kantasoluista erilaistetuilla kardiomyosyyteillä tehdyissä tutkimuksissa yksittäisen kardiomyosyytin supistumisen kokonaisvoimaksi on mitattu  $144$  nN  $\pm$   $33$  nN. Tämä lukema ei muuttunut  $90$  päivän aikana. Rotan neonataalisilla kammion kardiomyosyyteillä vastaava tulos oli  $222$  nN  $\pm$   $54$  nN. Mittaukset tehtiin dynamic traction force microscopy -menetelmällä. (Kita-Matsuo ym. 2009.) Aikuisilla kardiomyosyyteillä suurempi syketaajuus johtaa suurempaan supistusvoimaan. Pluripotenteista kantasoluista erilaistetuilla kardiomyosyyteillä korkea taajuus taas johtaa pienempää supistusvoimaan. Tämä johtuu T-tubulusten puutteesta. (Robertson ym. 2013.)

Aikuisen ihmisen vasemman kammion myokardiumin johtumisnopeus on 0,3–1,0 m/s (Yang ym. 2014), kun taas hiiren kantasoluista erilaistetuilla kardiomyosyyteillä johtumisnopeudeksi on mitattu 0,24–0,3 m/s (Pfannkuche ym. 2009). Aukkoliitosten määrällä ja sijoittumisella on suuri vaikutus johtumisnopeuteen (Yang ym. 2014).

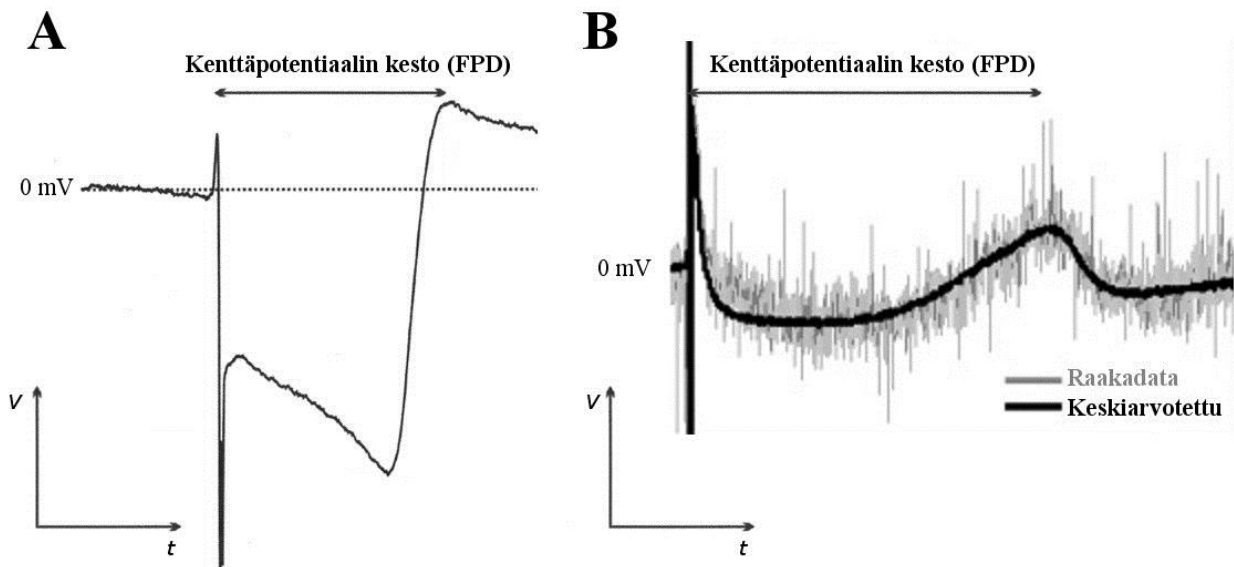
## 2.2.6 Kardiomyosyytien elektrokardiogrammi

Elektrokardiogrammi (EKG) kuvaa sähköisen impulssin syntyä ja johtumista sydämessä. Jokainen sydämen lyönti alkaa sinussolmukkeesta. Sähköinen ärsyke leviää nopeasti eteisten läpi, ja EKG:ssa tätä kuvaa P-aalto. Impulssin kulkeutuminen kammioihin tapahtuu AV-solmukkeen, Hisin kimpun ja Purkinjen säikeiden kautta. EKG:n QRS-kompleksi kuvaa kammioden depolarisaatiota, kun taas kammioden repolarisaatiota kuvaa T-aalto. QT-aika kuvaa kammioden aktiopotentiaalin kestoa ja aikaa, joka kuluu impulssin johtumiseen myokardiumin poikki. Tämän takia kammion kardiomyosyytien aktiopotentiaalin pidentyminen johtaa myös QT-ajan pidentymiseen. Ihmisillä kammion kardiomyosyytien aktiopotentiaalin kesto on tyypillisesti 200–300 millisekuntia. (Finlayson ym. 2004.) Vaikka pluripotentista kantasoluista erilaistetut kardiomyosyytit eivät ilmennäkään täysin kypsää fenotyyppiä, QT-ajan ja rytmihäiriöiden havaitsemisen osalta erilaistetut kardiomyosyytit korreloivat vahvasti aikuisten kardiomyosyytien kanssa (Kolaja 2014). QT-ajan pituudessa on yksilökohtaisia eroja, ja lisäksi se vaihtelee syketaajuuden mukaan, mutta normaalin korjatun QT-ajan on ajateltu osuvan välille 350–440 millisekuntia (Johnson & Ackerman 2009). American Heart Society, American College of Cardiology Foundation ja Heart Rhythm Society kuitenkin suosittelivat lausunnossaan normaaleiksi väleiksi 390–460 millisekuntia naisille ja 390–450 millisekuntia miehille (Rautaharju ym. 2009).

Microelectrode array- eli MEA-menetelmillä voidaan mitata sähköisesti aktiivisista soluista koostuvien alueiden paikallisia potentiaaleja ajan funktiona (Maddah ym. 2015) ja tästä voidaan määrittää ekstrasellulaaristen kenttäpotentiaalien kestoajoja (field potential duration eli FPD). Kenttäpotentiaalin kesto on määritelty aikavälinä, joka alkaa aaltokuvion ensimmäisestä terävästä poikkeamasta ja päättyy toisen positiivisen poikkeaman huippuun. Ensimmäinen terävä poikkeama kuvaa natriumkanavien aktivaatiota depolarisaatiossa, kun taas kenttäpotentiaalin päättävä poikkeama kuvaa kaliumkanavien aktivaatiota repolarisaatiossa. (Asakura ym. 2015.) Kenttäpotentiaalissa voidaan havaita negatiivinen tasannevaihe, joka kuvaa L-tyypin kalsiumkanavien kautta tapahtuvaa virtausta. Tasannevaihe ei kuitenkaan aina näy. (Halbach ym. 2003, Meyer ym. 2004.) Kenttäpotentiaalin vaiheissa ja niihin liittyvissä ionivirroissa on havaittavissa yhtenevyyttä aktiopotentiaalin vaiheisiin ja virtoihin. Kenttäpotentiaalin vaiheet on esitetty kuvassa 2 ja kenttäpotentiaalin keston arviointi kuvassa 3.



**Kuva 2.** Kenttäpotentiaalin vaiheet ja niihin liittyvät ionivirrat (muokattu Meyer ym. 2004).



**Kuva 3.** Kenttäpotentiaalin keston arviointi kahdesta erimuotoisesta kenttäpotentiaalista. Kuviossa A (muokattu Reppel ym. 2004) on kaavamainen esitys ja kuviossa B (muokattu Gilchrist ym. 2015) kohinaisesta mittauksesta määritetty kenttäpotentiaalin kesto.

Kenttäpotentiaalinen kesto vastaa kardiomyosyytin aktipotentiaalinen kesto ja myös QT-ajan pituutta elektrokardiogrammissa (Blazeski ym. 2012, Halbach ym. 2003), joten se on käyttökelpoinen mittauskohde arvioitaessa lääkeaineiden mahdollista vaikutusta QT-aikaan. MEA-menetelmällä voidaan tutkia myös syketaajuutta, lyöntien yhdenaikaisuutta, eksitaation lähtökohtaa ja impulssin kulkeutumista (Reppel ym. 2005). Tällaiset menetelmät yleensä edellyttävät suurta solutiheyttä tarkoitukseen sopivilla alustoilla sekä suoraa kontaktia solujen ja elektrodien välillä (Maddah ym. 2015).

### 2.2.7 Korjattu kenttäpotentiaalinen kesto aika FPDC

QT-aika vaihtelee sydämen syketaajuuden mukaan, mikä vaikeuttaa normaaliin QT-aikamuutosten erottamista patologisista. Tämän takia sekä tutkimuksessa että kliinisessä työssä käytetään korjattua QT-aikaa (QT<sub>c</sub>). Korjatun QT-ajan määrittämiseen on kehitetty useita erilaisia matemaattisia yhtälöitä, joista yleisimmän niin kliinisessä työssä, tutkimuksessa kuin opetuksessakin käytetään Bazettin yhtälöä. (Luo ym. 2004.) Bazettin yhtälössä (Bazett 1920) korjattu QT-aika saadaan jakamalla mitattu QT-aika RR-välin pituuden neliöjuurella:

$$QT_{c_B} = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$$

Myös Friderician yhtälöä (Fridericia 1920) on käytetty laajasti:

$$QT_{c_F} = \frac{QT}{\sqrt[3]{RR}}$$

Luo ym. (2004) pitivät tutkimuksessaan kuitenkin parhaimpana vaihtoehtona Hodgesin ym. (1983) kehittämä yhtälöä

$$QT_{c_H} = QT + 105 \left( \frac{1}{RR} - 1 \right).$$

QT-ajan korjausyhtälöitä on käytetty myös kardiomyosyyteillä tehdyissä tutkimuksissa. Niiden soveltuvuus tähän on kuitenkin kyseenalaista. (Izumi-Nakaseko ym. 2017.) Izumi-Nakaseko ym. (2017) ovat kehittäneet yhtälön korjatulle kenttäpotentiaalinen kestoajalle (FPDC), kun kyseessä ovat indusoiduista pluripotentista kantasoluista erilaistetut kardiomyosyyttilevyt:

$$FPDC = \frac{FPD}{RR^{0,22}}$$

Kun RR-välin pituuden sijaan käytetään syketaajuutta minuuttia kohden (BPM), Izumi-Nakasekon ym. yhtälö saadaan muotoon

$$FPD_c = \frac{FPD}{\left(\frac{60}{BPM}\right)^{0,22}}$$

## 2.3 Lääkeaineiden vaikutusmekanismeja

### 2.3.1 Digoksiini

Digoksiini on steroidiglykosidi, jota on käytetty sydämen vajaatoiminnan ja eteisvärinän hoitoon jo yli 200 vuotta. Viime vuosikymmeninä sen turvallisuus ja tehokkuus on kuitenkin kyseenalaistettu, mutta tästä huolimatta sillä on edelleen tärkeä rooli sydänsairauksien hoidossa. (Stucky & Goldberger 2015.)

Digoksiini inhiboi  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasia, mikä häiritsee natriumin kuljetusta solukalvon läpi. Tällöin solunsisäinen natriumpitoisuus nousee, kun taas kaliumpitoisuus laskee. Tällöin myös solunsisäinen kalsiumpitoisuus kasvaa, koska natrium-kalsiumvaihtajan toiminta vähenee. Kalsium varastoidaan sarkoplasmiseen retikuluumiin. Suurentunut kalsiumpitoisuus laajentaa systolea ja lisää sydämen supistuvuutta. Digoksiini myös lisää vagaalista tonusta ja vaimentaa sympaattista hermostoa, minkä seurauksena sinussolmukkeen toiminta hidastuu ja AV-solmukkeen johtavuus huononee. Digoksiini voi myös aiheuttaa rytmihäiriöitä, sillä kalsiumpitoisuuden nousu lisää kammion kardiomyosyyttien automaatiota ja jälkipolarisaatiota. (Stucky & Goldberger 2015, Chaggar ym. 2015.) Myös pluripotentista kantasoluista erilaistetuilla kardiomyosyyteillä tehdyissä kokeissa digoksiinin on havaittu lyhentävän kenttäpotentiaalien kestoa, mikä vastaa eristetyillä sydämillä havaittua QT-ajan lyhenemistä (Guo ym. 2011).

### 2.3.2 Verapamiili

Verapamiili on L-tyypin kalsiumkanavien estäjä, ja sitä käytetään muun muassa angina pectoriksen, rytmihäiriöiden ja sepelvaltimotaudin hoitoon. Kalsiumkanavien estäminen heikentää kardiomyosyyttien supistumista, kasvattaa johtumisaikaa ja aiheuttaa vasodilataatiota. (Palande ym. 2015, Batalis ym. 2007.) Verapamiili inhiboi myös hERG:n (human ether-à-go-go-related gene) tuottamia  $\text{K}_v11.1$ -kanavia, mutta sen kalsiumkanavia salpaava vaikutus on vahvempi (Johannesen ym. 2014).

Verapamiili pidentää PR- ja QRS-aikaa, muttei juurikaan vaikuta QT-aikaan. QRS-ajan piteneminen on tosin vähäistä verrattuna PR-ajan pitenemiseen. PR-ajan piteneminen johtuu AV-solmukkeen johtumisen hidastumisesta. Verapamiili myös nostaa syketaajuutta. (Johannesen ym. 2014.)

### 2.3.3 Kinidiini

Kinidiiniä käytetään *Plasmodium falciparum* -loisen aiheuttaman malarian hoitoon (Wroblewski ym. 2012). Kinidiini on malarialääkkeenä kenties paremmin tunnetun kiniinin diastereomeeri (Hedman & Meijer 1998). Kinidiiniä on myös käytetty eteisvärinän hoitoon mutta enää kinidiiniä ei tähän suositella, sillä se voi aiheuttaa kääntyvien kärkien kammiotakykardian eli torsade de pointes -oireen. Torsade de pointes on polymorfinen kammiotakykardia, johon liittyy QT-ajan piteneminen. (Wroblewski ym. 2012.)

Kinidiini salpaa ensisijaisesti hERG-kanavia, mutta suurilla annoksilla se inhiboi myös Nav1.5- ja Cav1.2-kanavia (Harris ym. 2013). Kinidiini pidentää QT-aikaa, kun taas PR- ja QRS-aikaan sen pidentävä vaikutus on vähäinen. Kinidiini myös nostaa syketaajuutta. (Johannesen ym. 2014.)

### 2.3.4 Haloperidoli

Haloperidoli on butyrofenoneihin kuuluva antipsykoottinen lääkeaine, jota käytetään skitsofrenian ja vakavan agitaation hoitoon (Nachimuthu ym. 2012). Se voi pidentää QT-aikaa, aiheuttaa torsade de pointes -oireen ja johtaa äkkikuolemaan (Glassman & Bigger 2001).

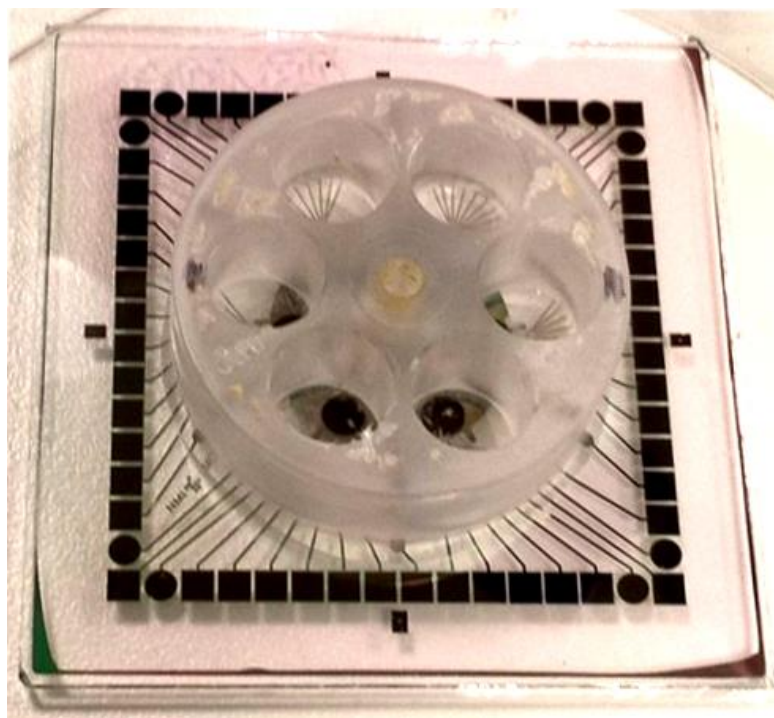
Haloperidoli pidentää QT-aikaa salpaamalla hERG-kanavia (Suessbrich ym. 1997). Lisäksi haloperidoli salpaa natriumkanavia. Natriumin hidastunut virtaus kardiomyosyytteihin aiheuttaa kinidiinin kaltaisen vaikutuksen, mikä johtaa aktiopotentiaalin muuttumiseen ja johtumisajan pitenemiseen. (Ogata & Narahashi 1989, Girardin & Sztajzel 2017.)



### 3 MENETELMÄT

#### 3.1 Microelectrode array (MEA) -järjestelmä

Kardiomyosyyttien sähköisiä ominaisuuksia tutkittiin käyttämällä MEA-järjestelmää (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Saksa). MEA-järjestelmässä solut viljellään spesifille MEA-levylle. Tässä tutkimuksessa käytettiin kuusikuoppaisia MEA-levyjä, joissa on kuusikymmentä titaaninitridielektrodia. Näistä kuusi on maadoituselektrodeja, jolloin kuhunkin kuoppaan jää yhdeksän mittaavaa elektrodiä. Kuusikuoppainen MEA-levy on esitetty kuvassa 4. Levyn lämpötila mittausten aikana pidettiin + 37 °C:ssa laitteiston kuuluvalla lämmittäjällä.



**Kuva 4.** Kuusikuoppainen MEA-levy.

#### 3.2 Soluviljelmät

Mittauksissa käytettiin soluviljelmiä, joissa oli vain kardiomyosyyttejä, sekä FICAMilla kehitettyä sydänmallia (Vuorenpää ym. 2014). Tässä kardiiovaskulaarimallissa pluripotenteista kantasoluista erilaistettua kardiomyosyyttiä viljellään verisuonimalliin, joka koostuu ihmisen rasvakudoksen stroomasoluista (human adipocyte stromal cells, hASC) ja ihmisen napanuoran laskimon endoteelisoluista (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC). Stroomasoluissa on useita erilaisia soluja, kuten muun muassa kypsiä soluja, progenitorisoluja ja kantasoluja. Stroomasolut ovat peräisin ihonalaisesta rasvakudoksesta, jota jää yli leikkauksissa



tai rasvaimussa. Napanuoralaskimon endoteelisolut erotetaan lahjotetuista napanuorista 0,05-prosenttisella kollageenaasi I:llä. Sekä strooma- että endoteelisolut vaativat mekaanisen ja entsyymaattisen käsittelyn, ennen kuin niitä voidaan hyödyntää viljelyssä. (Sarkanen ym. 2010, Sarkanen ym. 2012.)

Soluviljelmät inkuboitiin + 37 °C:n lämpötilassa ja ilman hiilidioksidipitoisuus inkubaattorissa pyrittiin pitämään 5 prosentissa. Elatusaine vaihdettiin kahden tai kolmen päivän välein. Endoteelisolujen elatusaineena käytettiin EGM-2:ta (Lonza Group Ltd, Basel, Sveitsi). Rasvakudoksen stroomasoluja kasvatukseen pohjana oli Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (DMEM/F-12, Gibco, Invitrogen, USA), ja lisäksi siinä oli 1 prosentti L-glutamiinia (L-glut, Gibco), 10 prosenttia ihmisseerumia (HS, Cambrex, USA) ja 1 prosentti antibiootti-antimykoottisekoitusta (AB/AM, Gibco).

Ihmisen embryonaaliset kantasolut viljeltiin ja erilaistettiin vitronektiinillä päällystetyillä levyillä. Solujen herätyksessä käytettiin Essential 8 Flex Mediumia (Gibco), johon lisättiin RevitaCell-supplementtia (Gibco). Viljelyn aluksi kantasolujen elatusaineena käytettiin Essential 8 Flex Mediumia (Gibco), minkä jälkeen erilaistuksessa ja ylläpidossa käytettiin PSC Cardiomyocyte Differentiation Kitiä (Gibco).

Sydänmallissa, joka koostuu verisuonimallin ja kardiomyosyytien yhteisviljelmästä, soluille annettussa elatusaineesta puolet oli kardiomyosyyteille tarkoitettua elatusainetta ja puolet stroomasoluille tarkoitettua stimulaatioliuosta. Kardiomyosyyteille suunnattu liuos koostui Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-liuoksesta (Gibco), jossa oli lisäksi 2 prosenttia B-27-supplementtia (Gibco) ja 0,5 prosenttia penisilliini-streptomysiiniliuosta (Lonza). Stroomasolujen stimulaatioliuos koostui DMEM/F-12-liuoksesta (Gibco), jossa oli lisäksi 3,3 prosenttia 30-prosenttista naudan seerumin albumiinia (Biosera), 2,8 prosenttia natriumpyruvaattia (Gibco) ja 1,3 prosenttia L-glutamiinia (Gibco) sekä supplementteina insuliini-transferriini-seleeniliuosta (Gibco), 10-mikromolaarista tyroniiniliuosta (Sigma-Aldrich), askorbiinihappoa (Lonza), fibroblastikasvutekijä-beetaa (R&D Systems), verisuonen endoteelin kasvutekijää (R&D systems), hydrokortisonia (Lonza) ja hepariinia (Lonza). Yhteisviljelmässä elatusaine vaihdettiin kahden tai kolmen päivän välein aina maanantaisin, keskiviikkoisin ja perjantaisin. Myös yhteisviljelmien kuopissa oli vitronektiinipinnoitus.

Pakastettuja embryonaalisia pluripotentteja kantasoluja viljeltiin aluksi kuusikuoppalevyllä. Erilaistus aloitettiin kolmantena viljelypäivänä. Soluja viljeltiin kuusikuoppalevyllä viisi viikkoa ennen kuin ne siirrostettiin kuusikuoppaisille MEA-levyille.

Mittauksissa käytettiin kahta kuusikuoppaista MEA-levyä. Kummallakin levyllä yhdessä kuopassa oli pelkästään kardiomyosyyttejä. Muissa kuopissa oli sydänmallin muodostavia yhteisviljelmiä. Kussakin sydänmallikuopassa oli 3850 hASC-solua ja 1540 HUVEC-solua. Kardiomyosyytien solutiheys kuoppaa kohden oli 100 000 lukuun ottamatta kahta sydänmallikuoppaa, joissa kardiomyosyyttitiheys oli 500 000 kuoppaa kohden.

### 3.3 Mittausten suoritus ja analysointi

#### 3.3.1 MEA-mittausten suoritus

MEA-mittaukset suoritettiin MEA2100-System-laitteella (Multi Channels Systems MCS GmbH) ja ne tallennettiin MC\_Rack-ohjelmalla (Multi Channels Systems MCS GmbH). MEA-mittaukset suoritettiin viitenä päivänä viikossa maanantaista perjantaihin, ja mittausten pituus oli yksi minuutti. Mittaukset aloitettiin MEA-levylle siirrostamista seuraavana päivänä. Elatusaineen vaihtopäivinä mittaukset suoritettiin ennen elatusaineen vaihtoa. Mittauksia jatkettiin 25 päivää. Haloperidolialtistus suoritettiin 24. päivänä. Levylle MEA1 annetun haloperidolin konsentraatio oli 1  $\mu\text{mol/l}$  ja levyllä MEA2 10  $\mu\text{mol/l}$ . Ennen altistusta suoritettiin tavanomaiset mittaukset. Altistusmittaukset kestivät 17 minuuttia, ja mittaukset jaettiin yhden minuutin mittaisiin jaksoihin käsittelyä varten. Haloperidoli annettiin, kun altistusmittausten alusta oli kulunut noin 260 sekuntia.

Käyttämämme MC\_Rack-ohjelman analysointimahdollisuudet olivat hyvin rajoittuneet ja käyttökelpoisten ohjelmien saatavuus on varsin heikkoa, joten kehitin Samuel Hyypän kanssa ohjelman tarkempaa analysointia varten. Ohjelma nimettiin Vanellus CardioCalculatoriksi. Tätä ohjelmaa varten data muunnettiin tekstimuotoon MC\_DataTool-ohjelmalla (Multi Channels Systems MCS GmbH). Vanellus CardioCalculator -ohjelmalla määritettiin kunkin mittauselektrodin tuloksista kenttäpotentiaalinnan keston ja syketaajuuden mittauskohtaiset keskiarvot. Näistä tuloksista laskettiin kuoppakohtaiset keskiarvot ja keskihajonnat Microsoft Excel 2016 -ohjelmalla. Mittausten hyväksyttävyyttä arvioitiin silmämääräisesti. Hyväksyttävyyttä edellytti, että sähkökäyrän muoto oli kelvollinen ja että lähes kaikki mittauspisteet asettuivat niille paikoille, joihin ne kuuluvat. Sykkeen tapauksessa nämä paikat olivat FPD:n aloittavien suurten positiivisten poikkeamien eli R-piikkien maksimeja ja FPD:n tapauksessa FPD:n määritelmän mukaisia aloitus- ja lopetuskohtia.

#### 3.3.2 Vanellus CardioCalculator

Vanellus CardioCalculator on Matlab-pohjainen (The MathWorks Inc., Natick, USA) add-on-ohjelma, josen käyttö ei vaadi Matlab-ohjelmistoa. Itse vastasin ohjelman kenttäpotentiaalinnan määrittämisen oikeellisuudesta, ja Samuel Hyypä vastasi ohjelman teknisestä toteutuksesta. Vanellus CardioCalculator mahdollistaa signaalinnan muodon tarkastelun sekä syketaajuuden ja kenttäpotentiaalinnan keston määrittämisen.

Ohjelmalla analysoidaan MEA-datan, joka ilmaisee jännitteen ajan funktiona. Ohjelmaan voi tuoda tekstimuotoisia tiedostoja tai Matlabin käyttämiä mat-tiedostoja. Tekstimuotoiset tiedostot voidaan muuntaa ohjelmalla mat-muotoon, jolloin ne vievät vähemmän tilaa.

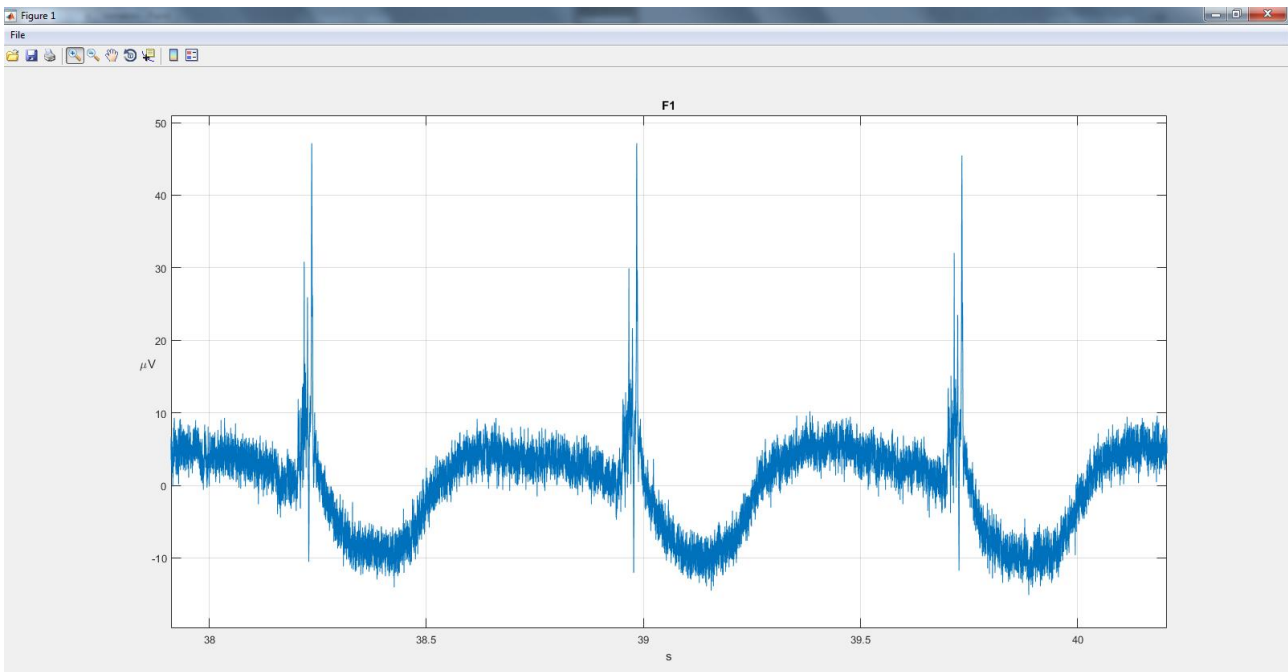
Analysoitaessa data ensin suodatetaan Fourier-muunnoksen avulla. Suodattamaton sähkökäyrä esitetään kuvassa 5. Tämän jälkeen ohjelma jakaa mittauksen oletusarvoja käytettäessä sekunnin kestäviin osiin, joista

etsitään minimi- ja maksimiarvot. Kahden peräkkäisen maksimin välistä aikaa kutsutaan EKG-mittausten nimeämiskäytännön mukaan RR-väliksi. Ohjelma määrittää RR-välin pituuden peräkkäisten maksimien välissä kuluvasta ajasta. R-piikkien etsintä ja siten RR-välin määrittäminen on mahdollista suorittaa myös ilman suodatusta.

Syketaajuuden määrittämisessä käytetään korjattua RR-väliä, jossa jätetään huomiotta keskiarvosta liikaa poikkeavat RR-välit, koska nämä todennäköisesti ovat virheellisiä. Karsinnassa käytetään epäyhtälöä

$$\left| \frac{\text{RR-väli}}{\text{RR-keskiarvo}} - 1 \right| > \text{kynnysarvo}.$$

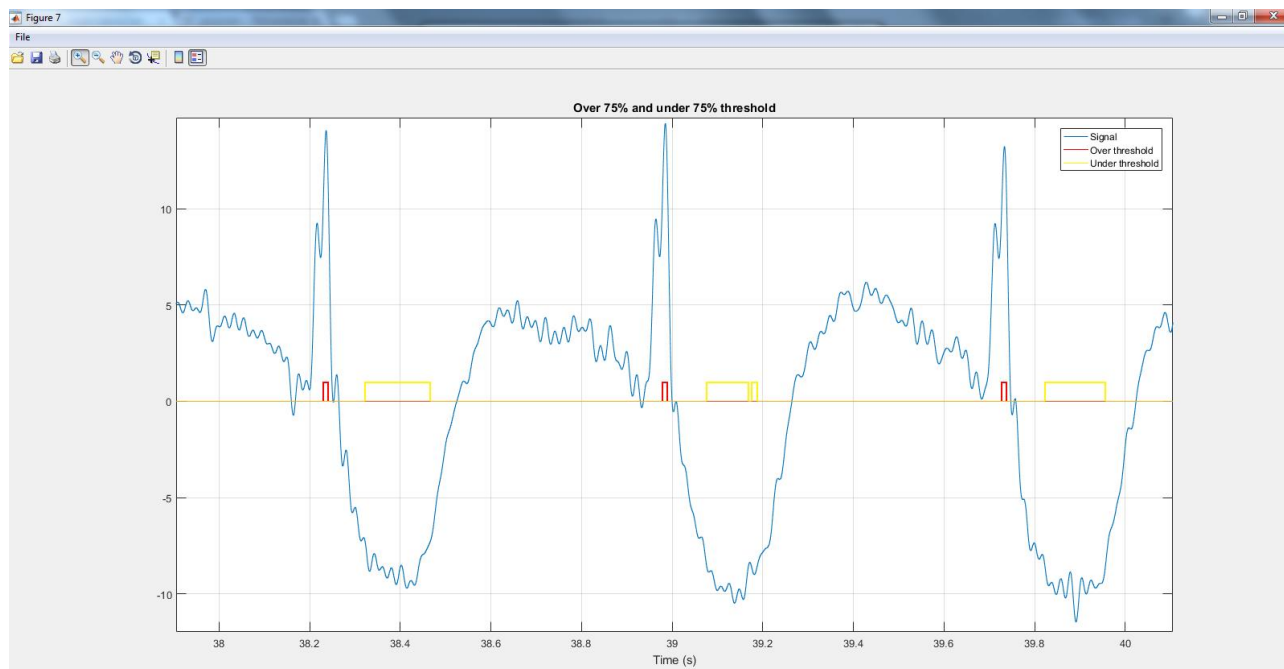
Jos RR-välin pituuden sijoittaminen yhtälöön johtaa kynnysarvon ylitykseen, kyseistä RR-väliä ei oteta keskiarvon määrittämiseen mukaan. Kynnysarvon oletusarvo on 0,2. Syketaajuus minuuttia kohden lasketaan jakamalla 60 sekuntia RR-välin kestolla.



**Kuva 5.** Sähkökäyrä ennen suodatusta Fourier-muunnoksella.

Kenttäpotentiaalinkin keston määrittämisessä pyritään karsimaan ylimääräiset häiriöpiikit pois. Jotta tämä onnistuisi, ohjelma etsii maksimi- ja minimiarvojen perusteella mittauksesta alueet, joilla jännite on yli 75 prosenttia maksimiarvosta tai yli 75 prosenttia minimiarvosta. Graafisesti ilmaistuna maksimin lähetyvillä tarkastellaan 75 prosentin kynnysarvon yläpuolelle jäävää aluetta ja minimin lähetyvillä toisen kynnysarvon alapuolelle jäävää aluetta. Jos ylittäviä alueita on useampia, käytetään vain viimeisintä. Jos taas alittavia alueita on useampia, ne yhdistetään, jolloin tarkasteluun otetaan mukaan myös yhdistettyjen alueiden väliset

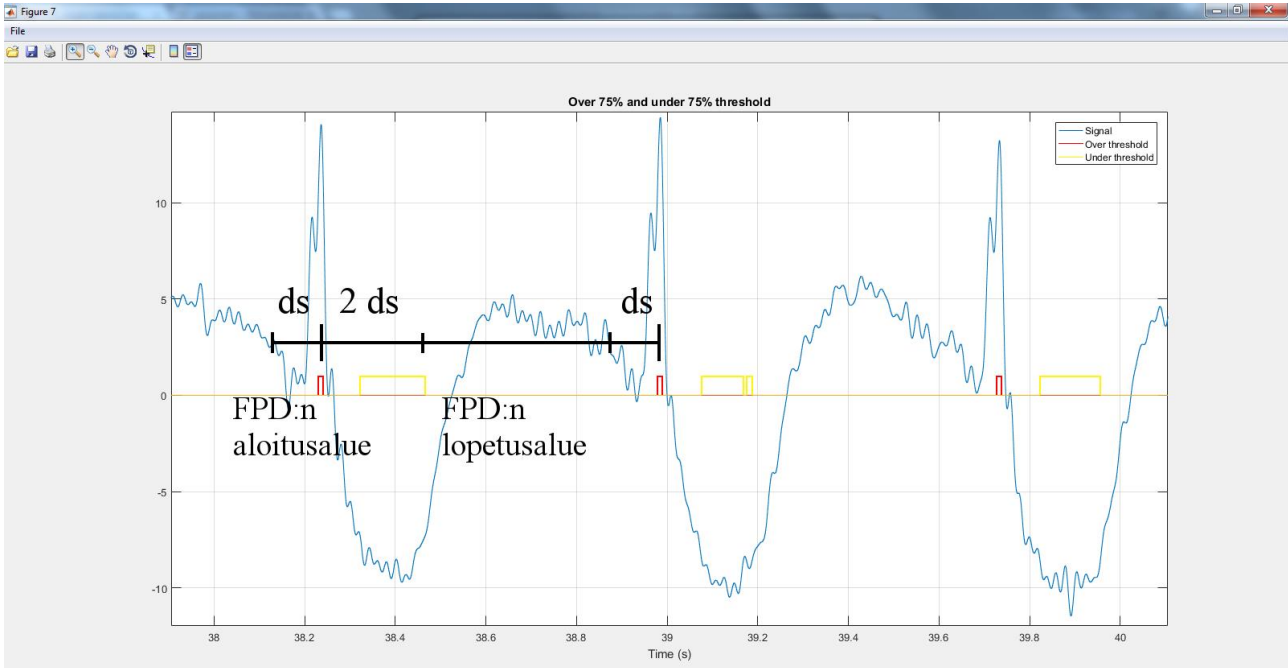
alueet. Yhdistämisessä hyödynnetään tietoa, että kenttäpotentiaalissa maksimia seuraa minimi. Kultakin alueelta etsitään vain yksi maksimi tai minimi, jolloin ylimääräiset häiriöpiikit karsitaan pois. Alueiden rajausta on esitetty kuvassa 6.



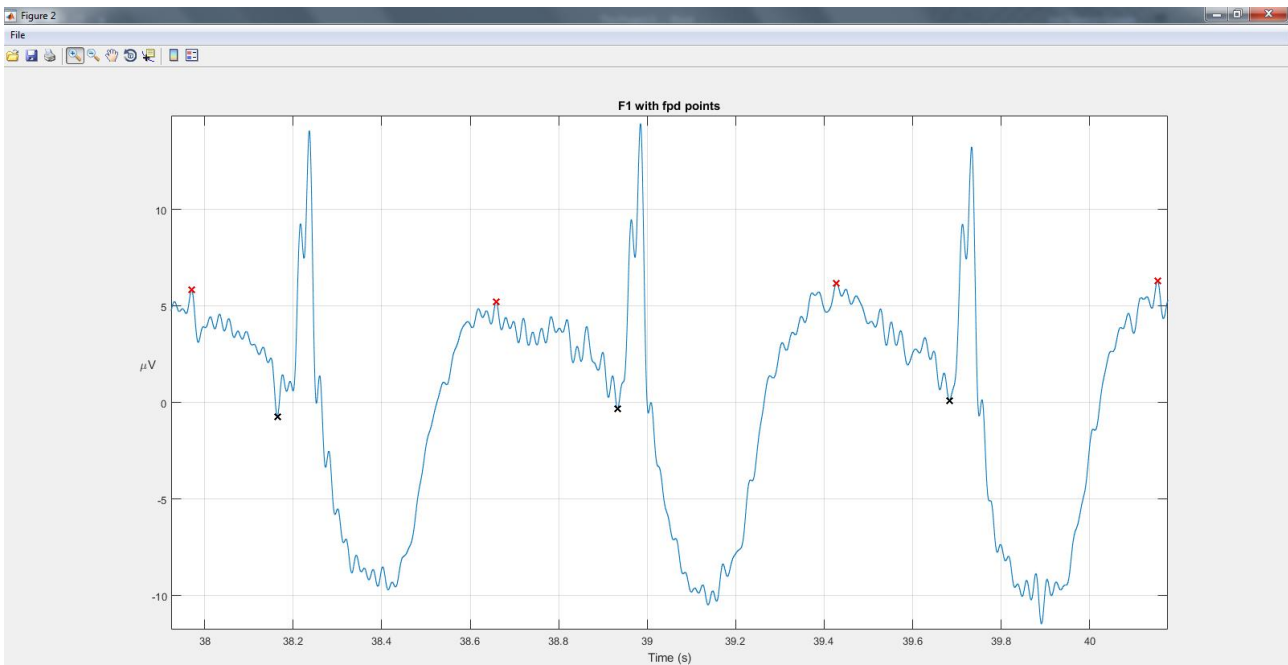
**Kuva 6.** Punainen nelikulmio osoittaa positiivisen kynnyksiarvon yläpuolelle jäävän alueen ja keltainen negatiivisen kynnyksiarvon alapuolelle jäävän alueen. Kuvassa näkyvä kaksiosainen keltainen alue yhdistetään tarkastelussa. Data on suodatettu Fourier-muunnoksella.

Kenttäpotentiaalinkin keston määrittämisessä pyritään etsimään kenttäpotentiaalien aloitus- ja loppupisteet. Tässä käytetään mittauksesta määritettyä RR-välin keston keskiarvoa ja deadspace-parametria. Deadspace on aikaväli, jonka avulla määritetään alueet, joilta joko etsitään ääriarvoa tai jotka jätetään huomiotta ääriarvoa etsittäessä. Sen oletusarvoksi on asetettu 15 prosenttia RR-välin keston keskiarvosta.

Kenttäpotentiaalinkin alkupisteen etsimisessä käytetään edellä määritettyä potentiaalinkin maksimia. Maksimista siirrytään deadspace-ajan verran aika-akselilla taaksepäin ja tältä alueelta etsitään minimi. Tämä minimi asetetaan kenttäpotentiaalinkin alkupisteeksi. Maksimin jälkeen liikutaan aika-akselilla kahden deadspace-ajan verran eteenpäin. Tältä ajanjaksolta ei etsitä ääriarvoja. Kenttäpotentiaalinkin loppupiste etsitään tätä seuraavalta ajanjaksolta, joka päättyy seuraavan kenttäpotentiaalinkin alkupisteen etsintäalueeseen. Tämä ajanjakso vastaa kestoltaan oletusarvoilla 55 prosenttia RR-välin keskiarvosta. Kenttäpotentiaalinkin loppupiste on kyseisen alueen maksimi. Alku- ja loppupisteiden etsintäalueet on esitetty kuvassa 7 ja ohjelman kenttäpotentiaaleille määrittämät alku- ja loppupisteet kuvassa 8.



**Kuva 7.** Kenttäpotentiaalın alkupiste etsitään yhden deadspace-ajan (ds) pituiselta ajanjaksolta maksimin edestä. Loppupisteen etsintäalue alkaa, kun potentiaalın maksimin jälkeen rajataan etsinnän ulkopuolelle kahden deadspace-ajan (2 ds) pituinen ajanjakso. Loppupisteen etsintäalue loppuu seuraavan potentiaalın alkupisteen etsintäalueeseen.



**Kuva 8.** Kenttäpotentiaalın alkupisteet on merkitty mustalla ja loppupisteet punaisella.

RR- ja FPD-pisteiden piirtäminen mahdollistaa niiden mielekkyyden tarkastelun. Datan laatu vaikuttaa suuresti analysoinnin onnistumiseen. Jos data ei ole analysoinnin kannalta suotuisaa, säätöparametreja voidaan muuttaa. Muutettavia parametreja ovat jakovälin pituus, kynnysarvot, Fourier-taajuuksien määrä sekä dead-space-parametri. Heikkolaatuisen datan tapauksessa parametrien säätäminen ei tietenkään auta. Analysoinnin kannalta väärinpäin oleva data on mahdollista invertoida.

Kenttäpotentiaalिन keston arvioinnissa satunnaisvirheet ovat todennäköisiä, sillä sähkökäyrän muoto voi johtaa siihen, että osa FPD-pisteistä sijoittuu väärin. Keskiarvoon yksittäiset virheet eivät kuitenkaan juurikaan vaikuta. Kenttäpotentiaalिन kesto on QT-ajan tapaan vaihteleva suure, joten toksikologisen testauksen kannalta on olennaista havaita siinä tapahtuvat testiaineen aiheuttamat muutokset, ja tähän tarkoitukseen ohjelma soveltuu hyvin. Ohjelma on mahdollista myös piirtää kuvaajat, joissa näkyy RR-välin, syketaajuuden ja kenttäpotentiaalिन keston muutokset mittauksen aikana.

## 4 TULOKSET

### 4.1 Sykkeen ja FPD:n kehitys

Kuusikuoppalevyillä pluripotentista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien havaittiin sykkivän 16 vuorokautta solujen herätyksen ja 13 vuorokautta erilaistamisen aloituksen jälkeen. Havainnot tehtiin mikroskoopilla.

MEA1-levyn mittaustulokset on esitetty taulukossa I ja MEA2-levyn taulukossa II. Taulukoissa on kuoppakohtaiset keskiarvot ja keskihajonnat kenttäpotentiaaloin kestoaajoille (FPD) ja syketaajuuksille kullekin mitauspäivälle. Lisäksi on ilmoitettu, kuinka moni kuopan yhdeksästä mittauselektrodista antoi analysointikelpoiseksi tulkitun tuloksen. FPD- ja FPDC-arvot on ilmoitettu millisekunteina ja syketaajuudet iskuina minuuttia kohden. FPD-arvot on ilmoitettu millisekunnin tarkkuudella ja syketaajuudet yhden desimaalin tarkkuudella. Mittaukset ovat minuutin pituisia lukuun ottamatta MEA1-levyn ensimmäisen ja yhdeksännen päivän mittauksia. Ensimmäisen päivän mittaus kesti noin 96 sekuntia ja yhdeksännen päivän mittaus noin 10 sekuntia.

MEA1-levyllä havaittiin heti siirrostusta seuraavana päivänä sykettä pelkkiä kardiomyosyyttejä sisältävässä kuopassa F. MEA2-levyllä ei havaittu sykettä ensimmäisenä siirrostuksen jälkeisenä päivänä, joten siitä ei suoritettu mittauksia. MEA2-levyn kuopista A ja F, joissa kardiomyosyyttitiheys oli yli 500 000 kuoppaa kohden, ei saatu analysointikelpoisia mittaustuloksia tutkimuksen aikana lukuun ottamatta seitsemättä mitauspäivää, jolloin kuopan F mittaustulos oli analysointikelpoista.

**Taulukko I:** MEA1-levyn soluviljelmien FPD:n ja sykkeen kehitys. FPD-ka tarkoittaa FPD-tuloksien keskiarvoa millisekunteinä, SD tulosten keskihajontaa, el tarkasteluun hyväksytyjen elektrodien lukumäärää ja FPDc Izumi-Nakasekon ym. yhtälöllä laskettua korjattua FPD:tä. Solujen elatusaineen vaihtopäivät on merkattu tähdellä. Päivän 1 mittaus oli muista poiketen noin 96 sekunnin mittainen ja päivän 9 vain 10 sekunnin mittainen.

Kuoppa	A							B							C							
	Päivä	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc
1 (pitkä mittaus)				0			0					0			0				0			0
2*				0			0					0			0				0			0
3		439	40	4	100,7	1,2	9	491	553	31	7	93,0	0,3	9	609	497	27	3	80,1	1,0	9	530
4*				0	121,1	8,9	9		325	0	1	112,0	3,0	9	373			0	80,3	11,0	6	
7					146,9	5,9	9		371	0	1	126,4	16,6	9	437			0			0	
8					106,8	14,7	9		260	5	5	203,1	1,6	9	340	307	0	1	161,4	5,6	9	381
9* (lyhyt mittaus)		458	17	2	85,9	18,3	8	496	359	34	6	128,2	3,6	9	424	449	61	3	109,4	13,9	8	513
10				0	106,6	14,8	9		269	7	2	192,6	6,9	9	348	348	15	5	149,7	5,2	8	425
11*		384	0	1	89,9	3,8	6	420	348	85	5	119,5	2,7	6	405	381	17	7	137,1	1,2	9	457
14*				0	102,2	4,4	4		348	103	7	110,8	2,8	8	399	323	0	1	116,9	7,6	4	374
15				0	119,6	1,7	3		218	0	1	142,1	1,8	9	264	341	10	7	146,5	2,0	9	414
16*				0	75,8	2,1	3		388	60	7	122,6	3,5	8	454	406	30	2	110,9	0,8	9	465
17				0	91,2	0,4	7		330	73	8	124,3	0,2	9	387	458	20	7	102,4	4,4	9	515
18*				0	94,6	6,1	3		556	36	3	86,6	0,1	8	603			0	137,0	14,5	9	
21*				0	73,8	3,0	4					0		0		694	14	8	78,4	4,2	9	736
22		388	0	1	109,2	1,3	3	443	396	41	6	128,2	0,1	8	468	461	7	7	117,7	1,6	7	535
23*				0	73,9	1,2	2		513	41	5	81,9	4,1	9	549	547	20	6	113,9	0,4	6	630
24		597	0	1	64,3	1,4	3	606	461	32	8	90,5	13,0	9	505	752	10	8	71,5	0,2	9	782

Kuoppa	D							E							F (pelkästään kardiomyosyyttejä)								
	Päivä	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	
1 (pitkä mittaus)				0			0					0			0				0	80,5	4,7	4	
2*				0			0					0			0	595	72	9	82,9	0,1	9	639	
3				0	94,0	1,0	4		549	26	8	77,6	1,4	9	581	276	103	9	123,8	0,8	9	324	
4*				0			0					0	72,3	7,1	3		314	87	9	115,4	0,2	9	363
7*				0			0		425	17	2	107,0	1,3	3	482	232	20	9	209,2	0,2	9	306	
8				0			0					0	151,7	12,3	6		554	74	8	84,8	6,2	8	598
9* (lyhyt mittaus)				0	157,9	7,5	2		411	26	2	117,5	23,2	7	476				0			0	
10				0	92,1	8,4	4		348	8	2	119,2	10,2	9	404	270	27	9	175,8	0,1	9	342	
11*				0			0		399	8	2	117,0	13,0	4	463	282	0	1	175,7	3,2	9	357	
14*				0			0		480	30	2	87,1	8,2	3	521				0			0	
15				0	98,5	9,1	6		349	39	2	121,3	5,3	9	407	249	16	9	202,4	0,1	9	325	
16*				0	80,8	2,0	2		431	97	5	95,7	1,0	9	477	417	44	9	81,2	0,6	9	446	
17				0	77,3	3,3	6		394	76	6	104,7	0,2	9	445	282	20	9	180,4	0,1	9	360	
18*				0	85,7	11,2	6		462	133	5	86,0	0,7	9	500				0			0	
21*		652	0	1	86,4	0	1	706	485	30	2	103,1	2,3	3	547				0			0	
22		540	0	1	96,5	2,6	3	560	289	29	2	107,0	2,0	5	328	392	32	5	125,3	16,1	7	461	
23*		684	0	1	57,3	0	1	677	437	93	3	73,9	1,7	7	457				0	71,5	1,7	9	
24				0	72,2	0	1		503	56	6	89,0	0,7	9	548	519	27	9	95,1	0,2	9	575	



**Taulukko II:** MEA2-levyn soluviljelmien FPD:n ja sykkeen kehitys. Lyhenteiden selitykset ovat samat kuin taulukossa I. A- ja F-kuopissa kardiomyosyyttiheys oli 500 000 kardiomyosyyttiä kuoppaa kohden.

Kuoppa	A (suurempi solutiheys)							B							C (pelkästään kardiomyosyyttejä)								
	Päivä	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	
1																							
2*				0			0				0			0		436	45	9	102,3	0,1	9	491	
3				0			0		567	36	4	82,8	1,3	7	609	349	64	9	135,1	1,4	9	417	
4*				0			0		714	6	4	68,0	2,5	7	733	351	102	9	85,4	0,2	9	380	
7*				0			0		370	31	2	132,6	4,9	6	441			0	128,1	4,1	3		
8				0			0		316	0	1	150,6	5,3	4	387			0			0		
9*				0			0		470	83	2	90,1	15,1	5	514	359	66	9	98,0	7,1	9	400	
10				0			0				0	113,4	10,2	2		349	92	8	105,7	2,4	9	395	
11*				0			0				0			0			0				0		
14*				0			0		448	0	1	85,1	0	1	484	297	80	9	113,7	1,0	9	342	
15				0			0				0			0		325	49	9	124,3	1,2	9	381	
16*				0			0				0			0		319	68	9	125,6	0,8	9	376	
17				0			0				0			0		375	51	7	112,8	6,6	9	431	
18*				0			0				0			0		424	42	8	88,0	0,6	9	462	
21*				0			0				0			0		610	26	5	65,0	4,6	5	620	
22				0			0				0			0		283	0	1	114,7	0	1	327	
23*				0			0				0			0				0			0		
24				0			0				0			0				0			0		

Kuoppa	D							E							F (suurempi solutiheys)								
	Päivä	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	
1																							
2*				0	86,5	2,7	7				0			0				0			0		
3	379	44	5	82,7	0,6	7	406	499	17	6	102,0	2,4	8	561				0			0		
4*				0			0	538	39	3	77,8	4,7	6	569				0			0		
7*				0			0				0			0	330	35	5	148,9	0,1	6	403		
8	363	0	1	147,4	1,0	5	443	332	0	1	127,0	6,1	5	391				0			0		
9*	271	0	1	136,7	1,0	5	325	406	3	2	121,4	5,0	8	474				0			0		
10				0	143,2	23,9	9				0	173,2	7,3	6				0			0		
11*	460	76	8	87,8	0,7	8	501	445	15	2	107,0	3,8	6	506				0			0		
14*	368	22	4	126,2	0,5	9	433	522	12	2	90,0	5,9	3	571				0			0		
15	453	50	8	111,5	3,8	8	519				0	107,2	4,4	5				0			0		
16*	652	40	8	66,1	0,6	9	666	554	0	1	80,9	2,2	3	592				0			0		
17	341	23	3	142,7	1,1	5	413				0	93,1	7,3	5				0			0		
18*	497	91	4	96,0	5,3	9	551	600	8	2	73,0	2,6	6	627				0			0		
21*				0			0	526	0	1	87,2	16,4	4	571				0			0		
22	625	24	5	72,9	1,9	9	652				0	101,4	8,8	4				0			0		
23*	575	10	3	70,1	3,4	8	595				0	114,9	5,0	8				0			0		
24	367	13	2	137,3	5,2	8	440				0	91,0	9,4	6				0			0		

Mittaustuloksissa on suurta päiväkohtaista vaihtelua, eikä FPD tai syketaajuus näytä kehittyvän lineaarisesti. Kaikissa MEA1-levyn vertailukelpoisissa kuopissa havaitaan syketaajuuden maksimi toisen mittausviikon alussa. Nämä ajoittuvat joko mittauspäivälle 7 tai 8. Kuopassa D sykemaksimi osuu päivälle yhdeksän, mutta mittauksen lyhyen keston takia tulosta voidaan pitää epäluotettavana. MEA2-levyllä sykemaksimi näyttäisi myös osuvan toiselle mittausviikolle (päivät 7–10) lukuun ottamatta pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävää kuoppaa C, jossa sykemaksimi saavutetaan jo kolme päivää MEA-levylle siirrostamisen jälkeen.

Sekä sydänmallia että pelkkiä kardiomyosyyttejä sisältävissä kuopissa havaitaan syketaajuuden suurta päiväkohtaista vaihtelua. Elatusaineen vaihtopäivillä ei vaikuta olevan systemaattista vaikutusta syketaajuuden suuruuteen vaihtoa seuraavan päivän mittauksissa. Kaikilla kuopilla, joista saatiin analysointikelpoisia tuloksia yhtä mittausta enemmän, päiväkohtaiset sykkeiden keskiarvot vaihtelivat alle 80 iskusta minuuttia kohden yli 130 iskuun minuutissa. Sykkeitä, joiden taajuus oli yli 200 iskua minuuttia kohden, havaittiin sekä sydänmallia että pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävissä kuopissa. Pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävien kuoppien syketaajuuden koko kehittymisen seurantamittausten ajalta laskettujen keskiarvojen vaihteluväli oli 107,6–128,9 ja sydänmallia sisältävillä kuopilla 90,8–124,1 iskua minuutissa, kun MEA2-levyn kuopan F yksittäinen mittaustulos jätetään huomiotta.

FPD:n kannalta analysointikelpoisia mittaustuloksia on huomattavasti vähemmän kuin sykkeen kannalta analysointikelpoisia. Myös FPD:n päiväkohtainen vaihtelu on suurta. MEA1-levyllä ensimmäiset analysointikelpoisista mittauksista saadut FPD-tulokset ovat suuria ja seuraavissa hyväksyttävissä mittauksissa FPD-arvot ovat pienempiä. Tämä näkyy etenkin niissä mittauksissa, joista saadaan FPD-tuloksia heti ensimmäisellä mittausviikolla. Tällaista FPD:n käyttäytymistä ei kuitenkaan havaita MEA2-levyllä. FPD-arvoissa havaitaan myös huomattavan suuria keskihajontoja: osassa mittauksissa on yli sadan millisekunnin keskihajonta.

FPD:n ja FPDc:n keskiarvojen viikko- ja kuoppakohtaiset vaihteluvälit on koottu taulukkoihin III, IV, V ja VI. Viikot on jaettu viikonloppujen mukaan, joten viikkoon 1 kuuluvat mittauspäivät 1–4, viikkoon 2 päivät 7–11, viikkoon 3 päivät 14–18 ja viikkoon 4 päivät 21–24. Tuloksista havaitaan, että sydänmallia sisältävissä kuopissa FPD:n toisen mittausviikon keskiarvon maksimi ei kertaakaan ylitä 500 millisekuntia. Ensimmäisellä mittausviikolla 500 millisekunnin ylittävät FPD-maksimit ovat tavallisia. Kolmannen viikon FPD-maksimit ovat useimmiten korkeampia kuin toisen viikon. Neljännellä viikolla 500 ja myös 600 millisekuntia ylittävät FPD-maksimit ovat tavallisia. Pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävien kuoppien käytös on erilaista: näissä FPD:n vaihteluväli pysyy suhteellisen tasaisena kolmen ensimmäisen mittausviikon aikana, mutta myös näissä neljännen viikon maksimit ylittävät aina 500 millisekuntia.

FPD:n keskiarvon minimi eivät sydänmallikuopissa alita 300 millisekuntia kertaakaan ensimmäisen mittausviikon aikana, vaan alle 300 millisekunnin FPD-minimejä saavutetaan aikaisintaan toisella mittausviikolla.

Sen sijaan pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävissä kuopissa 300 millisekunnin alittava FPD-minimi voidaan saavuttaa jo ensimmäisellä mittausviikolla. Neljännen mittausviikon FPD:n keskiarvojen minimeissä on suurta vaihtelua.

**Taulukko III:** MEA1-levyn viikkokohtaiset FPD:n keskiarvojen vaihteluvälit millisekuntein.

<b>Viikko</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b> (pelkästään kardiomyosyyttejä)
<b>1</b>	439	325–553	497	-	549	276–595
<b>2</b>	384–458	260–371	307–449	-	348–425	232–554
<b>3</b>	-	218–556	323–458	-	349–480	249–417
<b>4</b>	388–597	396–513	461–752	540–684	289–503	392–519

**Taulukko IV:** MEA1-levyn viikkokohtaiset FPDc:n keskiarvojen vaihteluvälit millisekuntein.

<b>Viikko</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b> (pelkästään kardiomyosyyttejä)
<b>1</b>	491	373–609	530	-	581	324–639
<b>2</b>	420–496	340–437	381–513	-	404–482	306–598
<b>3</b>	-	264–603	374–515	-	407–521	325–446
<b>4</b>	443–606	468–549	535–782	560–706	328–548	461–575

**Taulukko V:** MEA2-levyn viikkokohtaiset FPD:n keskiarvojen vaihteluvälit millisekuntein.

<b>Viikko</b>	<b>A</b> (suurempi solutiheys)	<b>B</b>	<b>C</b> (pelkästään kardiomyosyyttejä)	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b> (suurempi solutiheys)
<b>1</b>	-	567–714	349–436	379	499–538	-
<b>2</b>	-	316–470	349–359	271–460	332–445	330
<b>3</b>	-	448	297–424	368–652	522–600	-
<b>4</b>	-	-	283–610	367–625	526	-

**Taulukko VI:** MEA2-levyn viikkokohtaiset FPDc:n keskiarvojen vaihteluvälit millisekunteina.

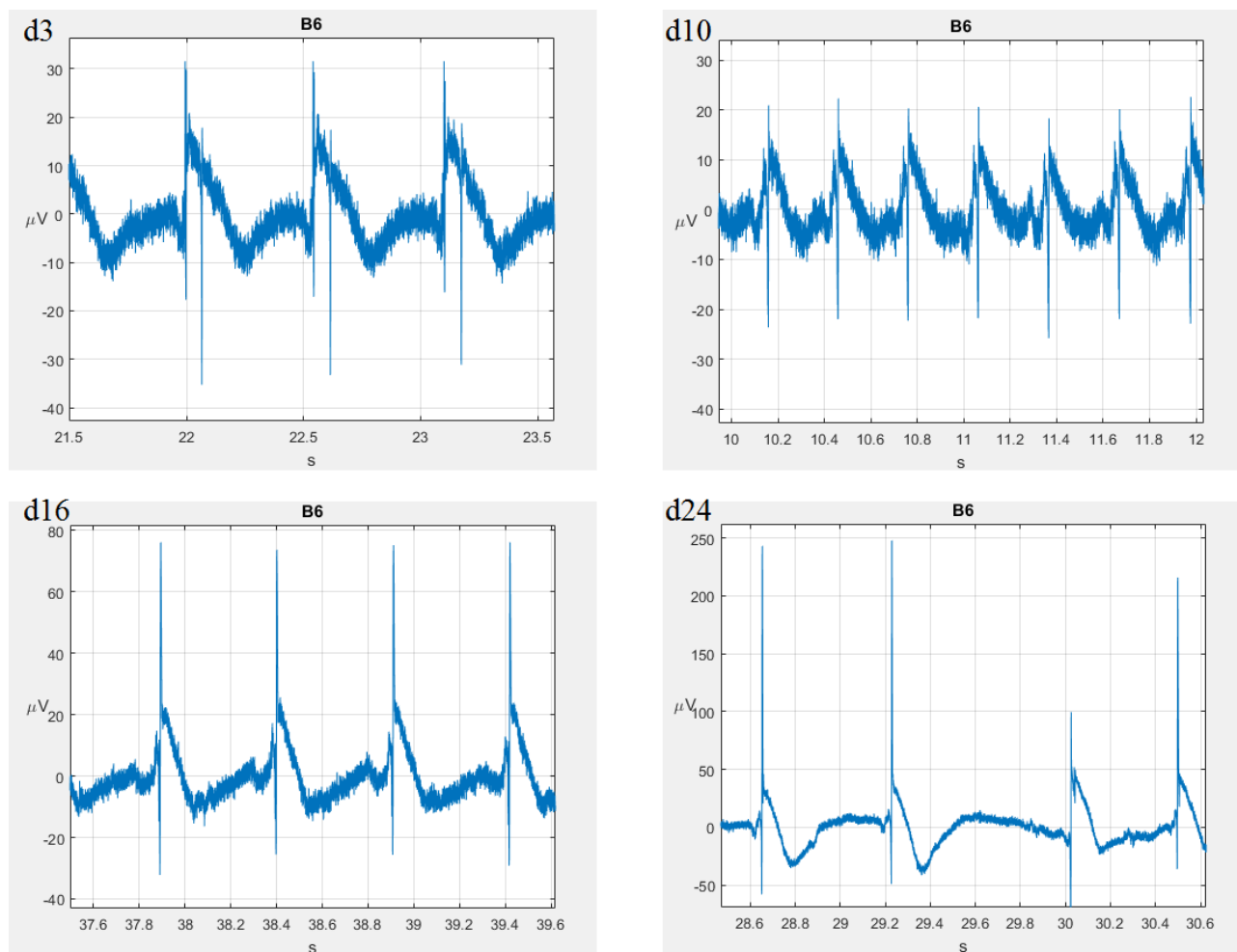
<b>Viikko</b>	<b>A</b> (suurempi solutiheys)	<b>B</b>	<b>C</b> (pelkästään kardiomyosyyttejä)	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b> (suurempi solutiheys)
<b>1</b>	-	609–733	380–491	406	561–569	-
<b>2</b>	-	387–514	395–400	325–501	391–506	403
<b>3</b>	-	484	342–462	413–666	571–627	-
<b>4</b>	-	-	327–620	440–652	571	-

## 4.2 Sähkökäyrän kehitys

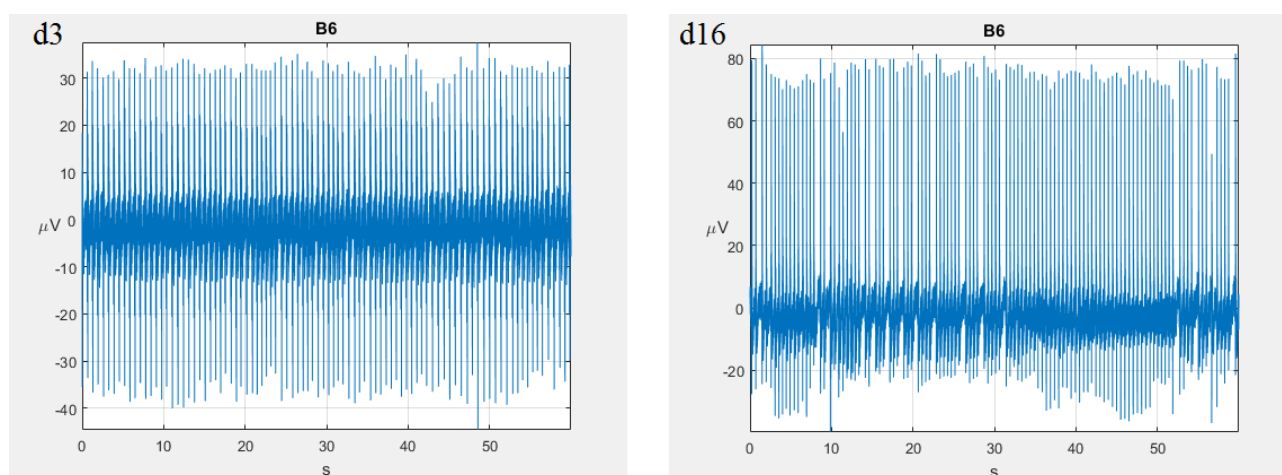
Sähkökäyrän kehitystä on esitetty kuvissa 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ja 16. Kuvissa 9, 11, 13 ja 15 esitetään lähikuvat sähkökäyrän muodosta ja kuvissa 10, 12, 14 ja 16 esitetään koko minuutin kestoinen mittaus, mikä havainnollistaa sykkeen säännöllisyyttä. Usein toistuvina piirteinä käyrillä olivat leveä R-piikin kanta, R-piikkiä seuraavan negatiivisen tasanteen lyhyys ja vaikeasti havaittava FPD:n lopetuspiste.

Pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävissä kuopissa (kuvat 11 ja 15) nähdään, että signaalin muoto on jo kolmantena mittauspäivänä selväpiirteinen. Myöhempien viikkojen sähkökäyrästä poikkeava piirre on matala R-piikkiä seuraava negatiivinen poikkeama. MEA1-levyllä tämä R-piikkiä seuraava negatiivinen poikkeama on vielä kolmantena päivänä matala. MEA2-levyllä havaitaan matala R-piikkiä seuraava negatiivinen poikkeama toisena päivänä, mutta kolmannen päivän mittauksessa poikkeama on jo syventynyt myöhempien viikkojen noin –20 mikrovoltin tasolle. MEA1-levyllä tämä syvyys saavutettiin vasta neljäntenä päivänä ja tällöinkin vain osassa elektrodeista. Selvää FPD:n lopettavaa positiivisen poikkeaman huippua oli useimmissa mittauksissa silmämääräisesti vaikea havaita.

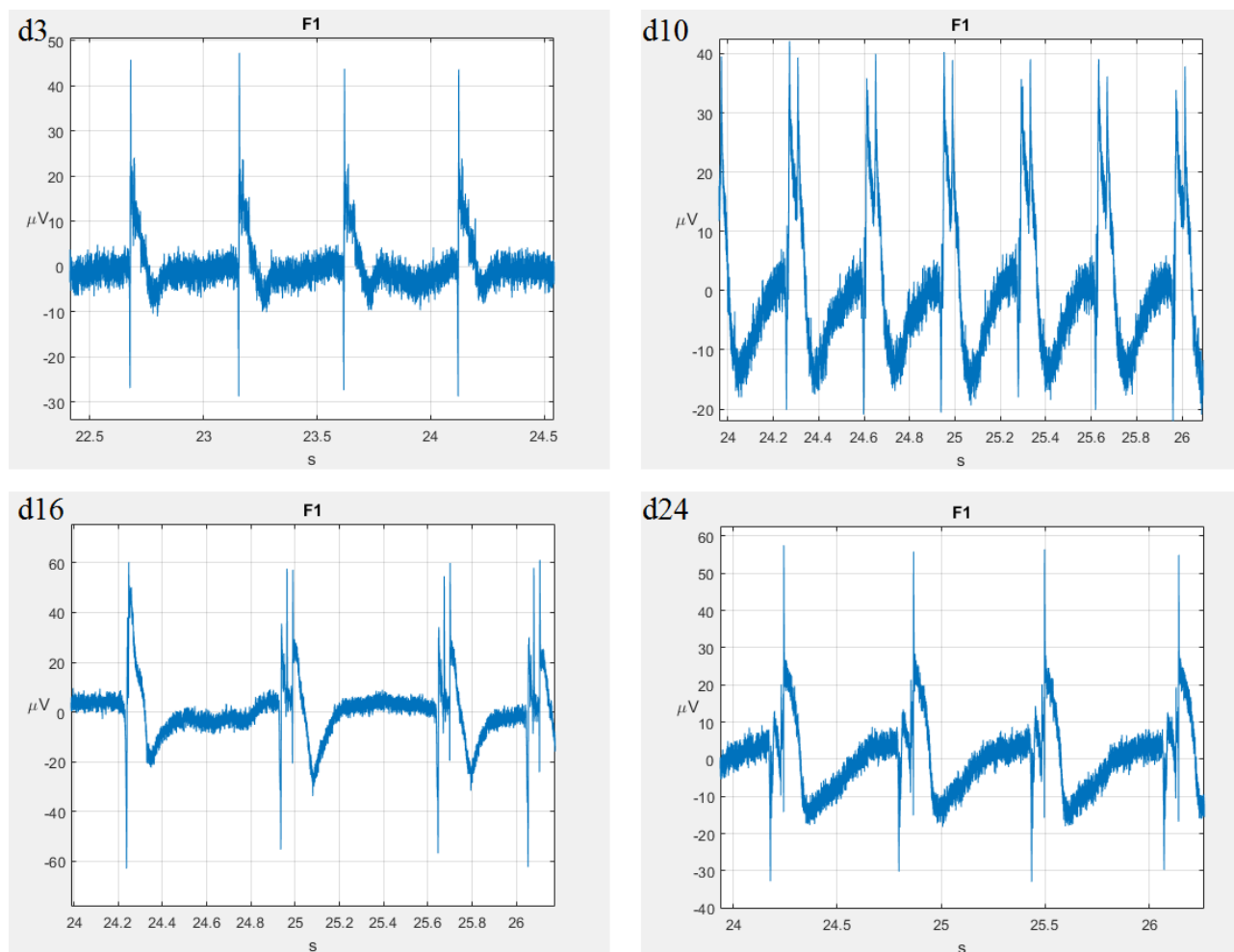
Sydänmallia sisältävien kuoppien sähkökäyrät eivät olleet yhtä selväpiirteisiä kuin pelkästään kardiomyosyyteillä mitatut sähkökäyrät. R-piikkiä seuraava negatiivinen poikkeama oli usein matala ja taustakohina peitti signaalin muotoa. Syketaajuuden ja FPD:n määrittäminen kuitenkin onnistui myös sydänmallin sähkökäyrästä.



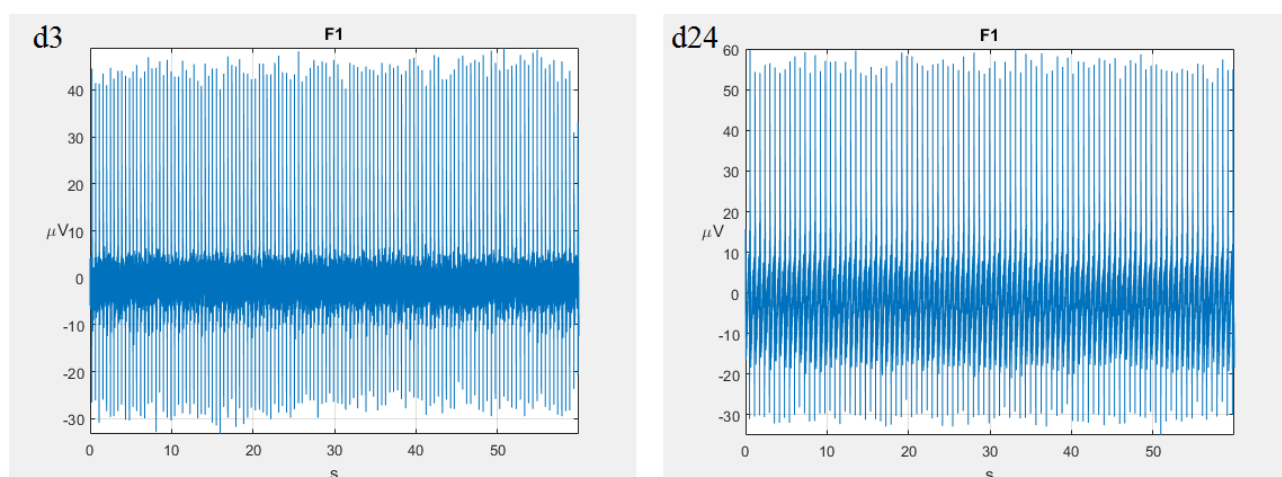
**Kuva 9.** MEA1-levyn sydänmallia sisältävän kuopan B sähkökäyrän kehitys päivinä 3, 10, 16 ja 24 elektrodin B6 mittaamana.



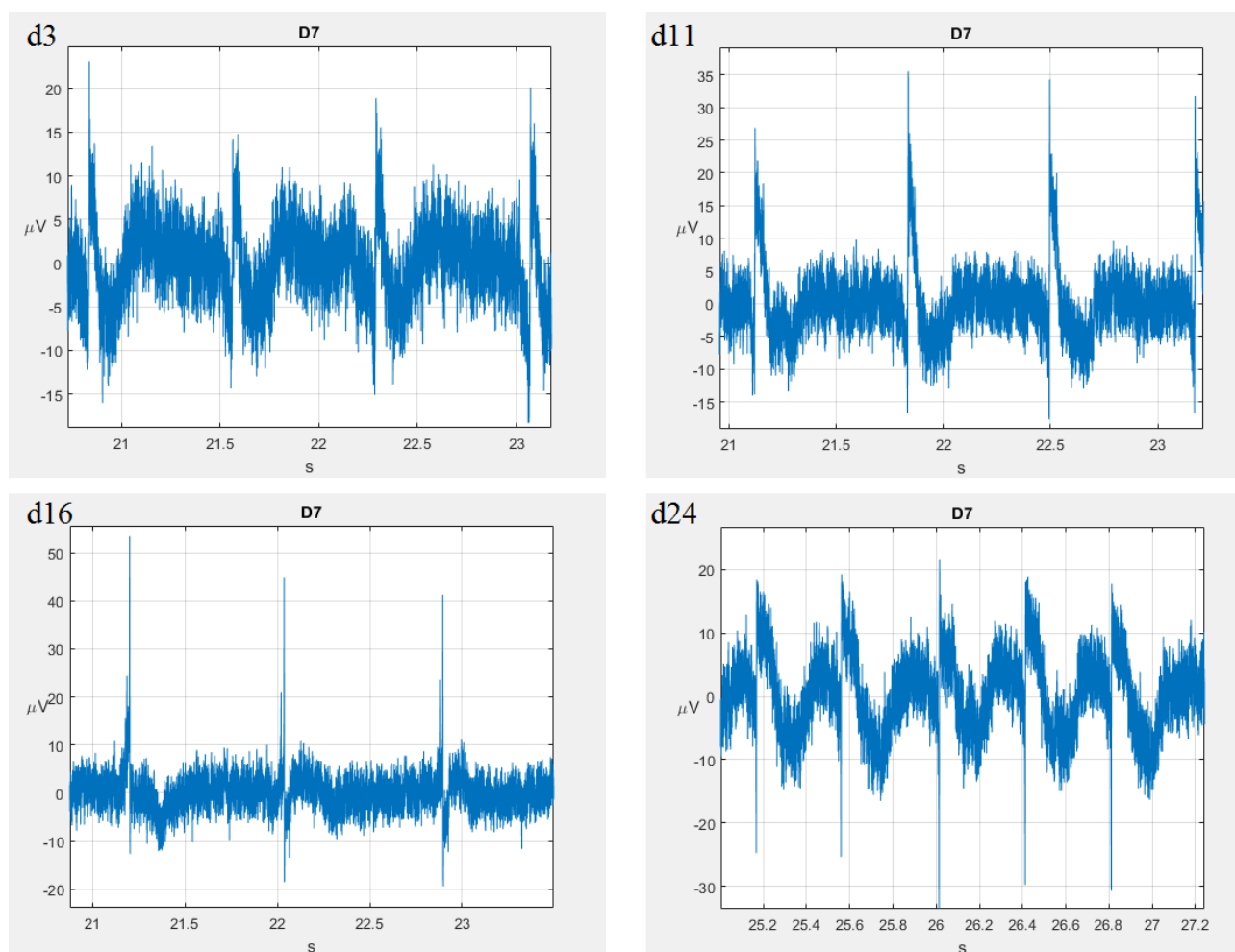
**Kuva 10.** MEA1-levyn sydänmallia sisältävän kuopan B sähkökäyrän kehitys päivinä 3 ja 16 elektrodin B6 mittaamana. Sykevälän vaihtelu lisääntyy viljelyajan kasvaessa.



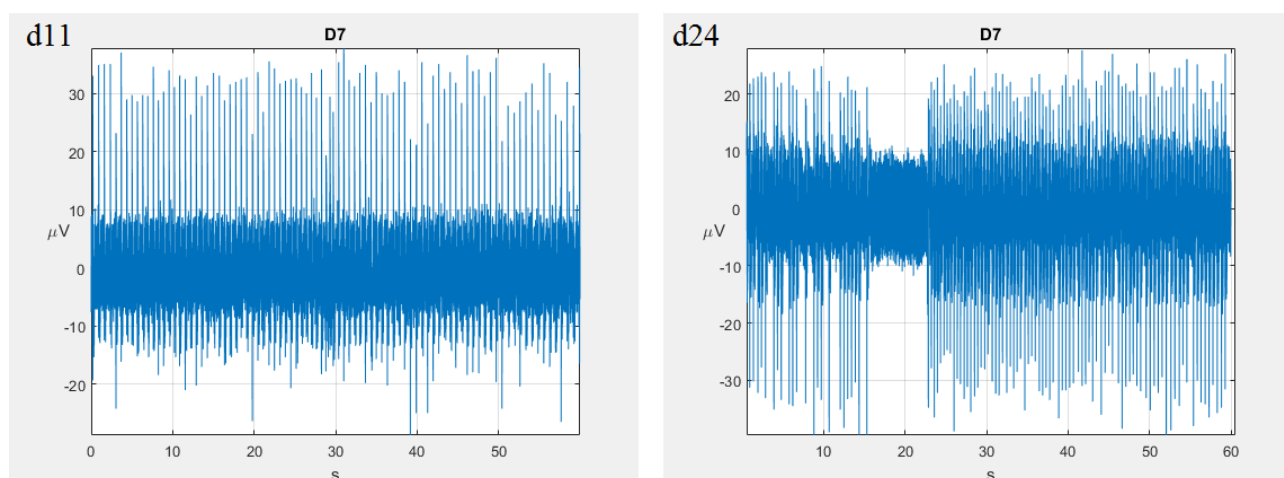
**Kuva 11.** MEA1-levyn pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävän kuopan F sähkökäyrän kehitys päivinä 3, 10, 16 ja 24 elektrodin F1 mittaamana.



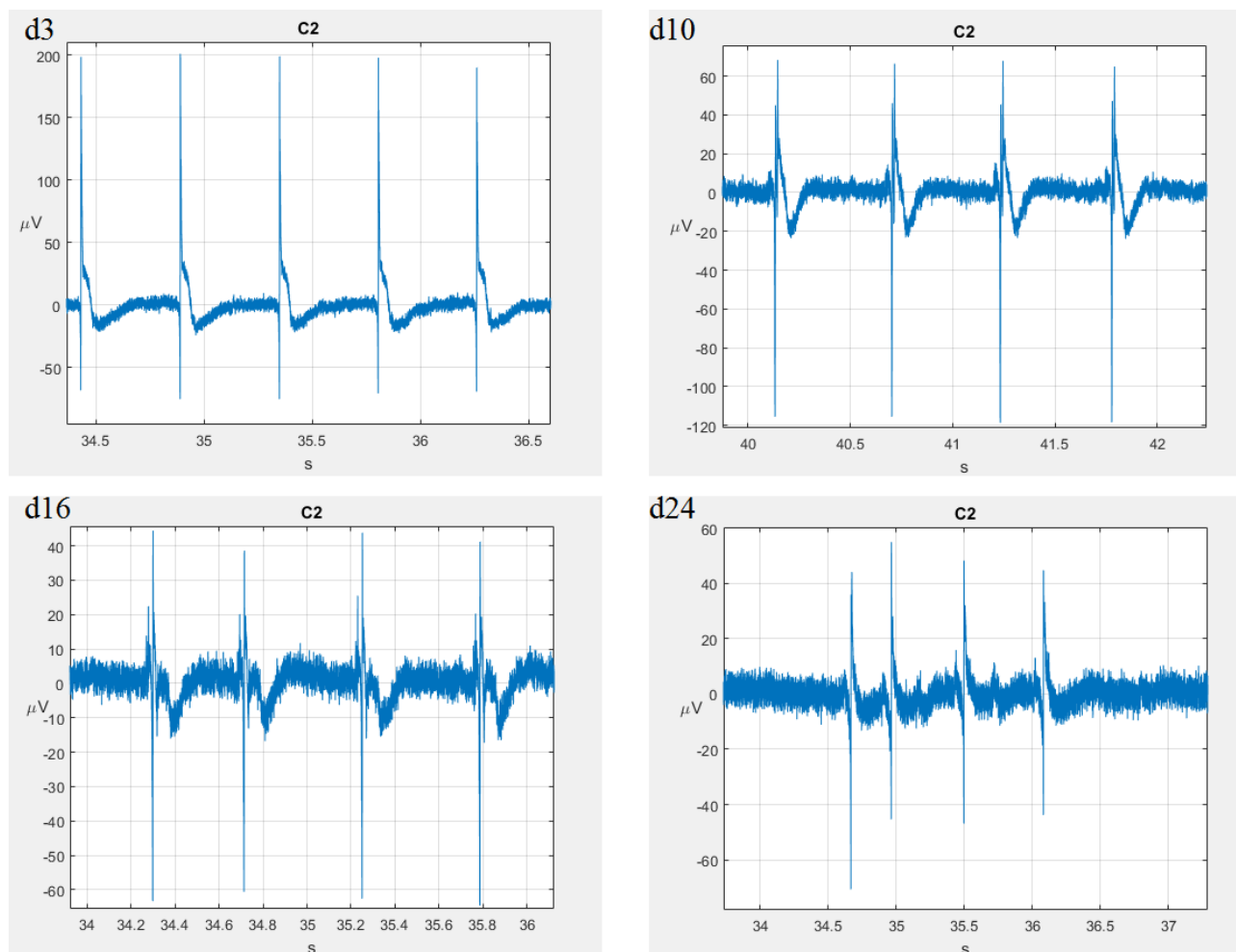
**Kuva 12.** MEA1-levyn pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävän kuopan F sähkökäyrän kehitys päivinä 3 ja 24 elektrodin B6 mittaamana. Sykeväli pysyy hyvin tasaisena.



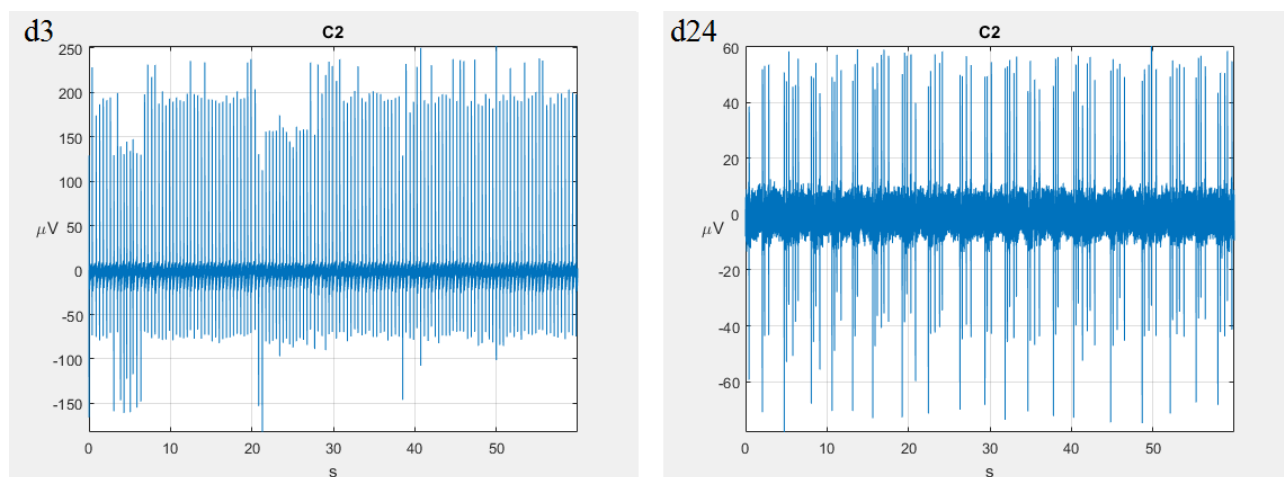
**Kuva 13.** MEA2-levyn sydänmallia sisältävän kuopan D sähkökäyrän kehitys päivinä 3, 11, 16 ja 24 elektrodin D7 mittaamana.



**Kuva 14.** MEA2-levyn sydänmallia sisältävän kuopan D sähkökäyrän kehitys päivinä 11 ja 24 elektrodin D7 mittaamana. Mittauspäivän 24 mittauksessa havaitaan syketauko.



**Kuva 15.** MEA2-levyn pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävän kuopan C sähkökäyrän kehitys päivinä 3, 10, 16 ja 24 elektrodin C2 mittaamana.

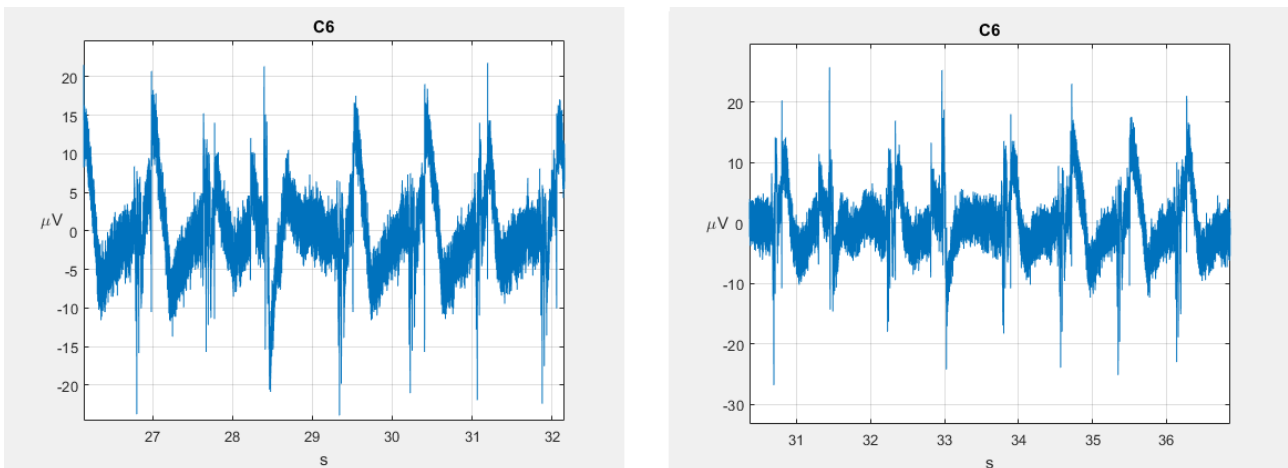


**Kuva 16.** MEA2-levyn pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävän kuopan C sähkökäyrän kehitys päivinä 3 ja 24 elektrodin C2 mittaamana. Sykevälän vaihtelu lisääntyy viljelyajan kasvaessa.



Kolmannella ja neljännellä viikolla sykkeen epätasaisuus yleisty, kuten nähdään kuvista 10, 14 ja 16. MEA1-levyn pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävä kuoppa F kykeni kuitenkin vielä neljännelläkin viikolla ylläpitämään tasaista sykettä (kuva 12). MEA2-levyn pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävän kuopan C syke oli kuitenkin neljännellä viikolla epäsäännöllistä, kuten myös sydänmallia sisältävillä kuopilla.

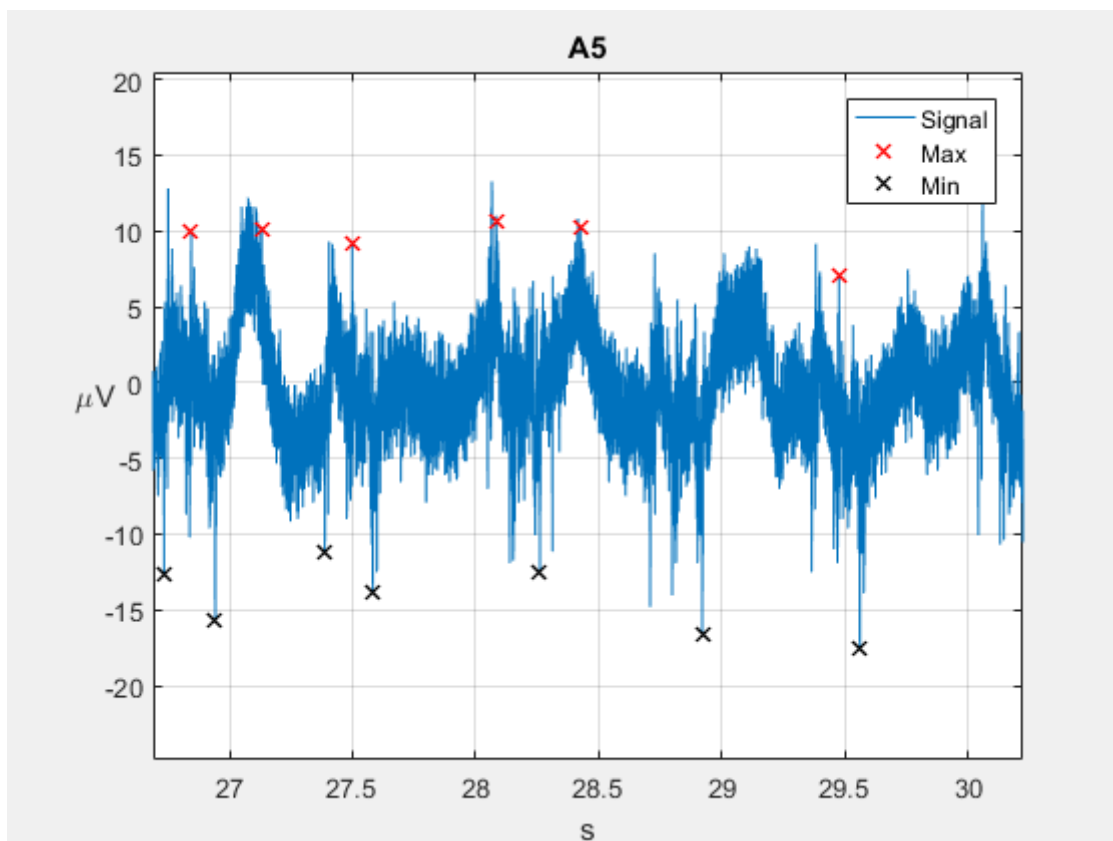
Neljännellä viikolla 24:ntenä mittauspäivänä ennen haloperidolin annostelua havaittiin myös yksittäisiä kenttäpotentiaalien kääntyilyjä MEA1-levyn kuopan C mittauksissa. Näiden merkitys itsessään lienee vähäinen, mutta ne tuskin parantavat sähkökäyrän laatua. Esimerkkejä kääntyilystä on esitetty kuvassa 17.



**Kuva 17.** Kääntyneitä kenttäpotentiaaleja sydänmallin sähkökäyrässä MEA1-levyn kuopasta C elektrodin C6 mittaamana. Vasemmanpuoleinen kuva on sähkökäyrän kehitysmittaus päiväältä 24, ja siinä ennen 28,5 sekuntia alkava kenttäpotentiaali on muihin verrattuna toisinpäin. Oikeanpuoleinen kuva on saman päivän haloperidolialtistusmittauksesta minuutilta 4, jolloin haloperidolia ei ollut vielä annosteltu. Muihin nähden eripäin oleva kenttäpotentiaali alkaa 33 sekunnin kohdalla. Kummassakin kuvassa kääntynyttä kenttäpotentiaali edeltävä potentiaali on epätyypillisen muotoinen. Oikeanpuoleisessa kuvassa myös ennen 31,5 sekuntia alkavaa kenttäpotentiaalia voidaan pitää kääntyneenä.

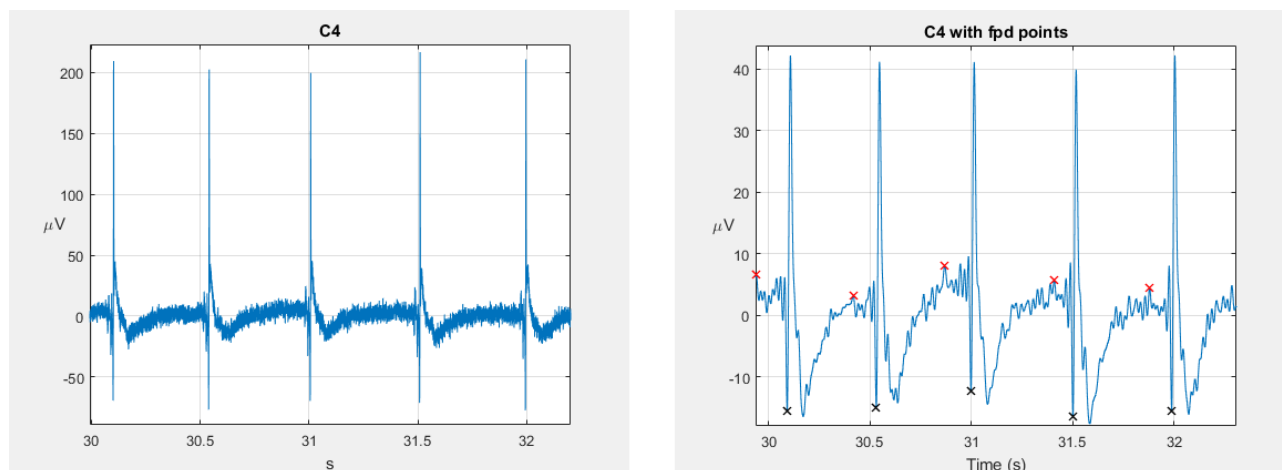
### 4.3 Analysoinnin kannalta ongelmalliset mittaukset

Useissa mittauksissa FPD:n määrittäminen ei onnistunut sähkökäyrän analysoinnin kannalta kelpaamattoman muodon takia. Tällöin syketaajuuden määrittäminen saattoi olla mahdollista, mutta sen hyödyllisyys lienee kyseenalaista, sillä on mahdollista, että R-piikit sekoittuvat kenttäpotentiaalain päättäviin maksimeihin. Mittaustuloksen suodatus voi vaikuttaa suuresti syketaajuuden arvioon. Esimerkki FPD:n analysoinnin kannalta kelpottomasta mittaustuloksesta on esitetty kuvassa 18.



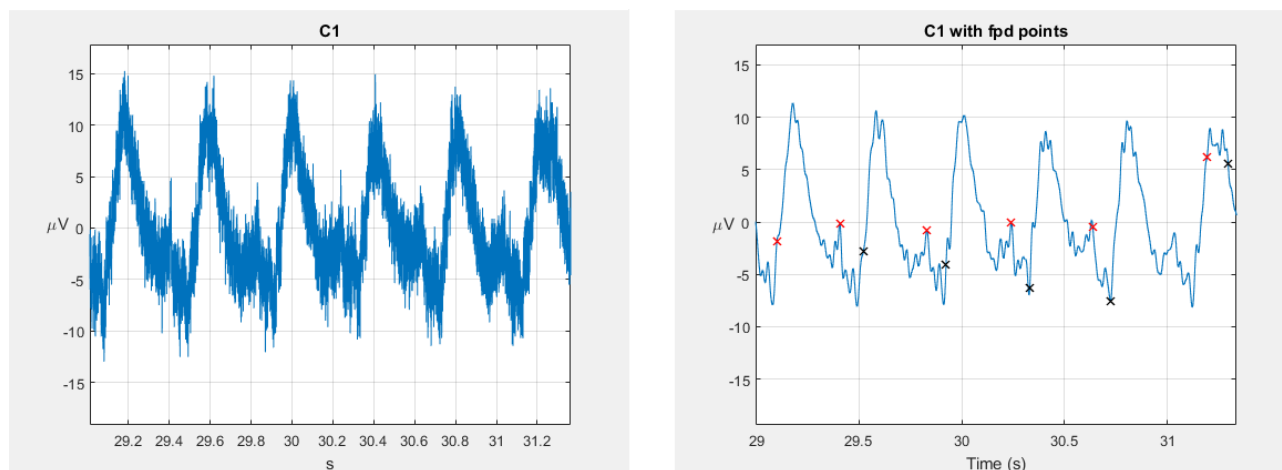
**Kuva 18.** Sähkökäyrä MEA1-levyn sydänmallia sisältävästä kuopasta A elektrodin A5 mittaamana päivältä 17. Mittaus on FPD:n kannalta analysointikelvoton, mutta syketaajuus on arvioitu. Arvion hyödyllisyys on kuitenkin kyseenalainen.

Kenttäpotentiaalın tavanomaista muotoa noudattavista sähkökäyristä syketaajuuden ja FPD:n määrittäminen on yksinkertaista, mutta useissa tämän tutkimuksen mittauksissa FPD:n päätepisteen määrittäminen osoittautui haastavaksi. R-piikkiä ei aina seurannut selvä positiivinen poikkeama, jonka huipulle FPD:n päätepiste olisi asetettu. Tällöin ohjelma asetti päätepisteen perustasolle asettumisen jälkeen osuvalle maksimille. Esimerkki tällaisesta sähkökäyrästä on esitetty kuvassa 19.



**Kuva 19.** Sähkökäyrä MEA2-levyn pelkästään kardiomyosyytejä sisältävästä kuopasta C elektrodin C4 mitattamana päivältä 15. Vasemmalla on suodattamaton mittaustulos ja oikealla Fourier-muunnoksella suodatettu mittaustulos, johon on asetettu FPD:n aloitus- ja lopetuspisteet. Aloituspisteet on merkattu mustalla ja lopetuspisteet punaisella. Lopetuspiste asetuu perustasolle asettumista seuraavalle maksimille.

Usein toistuva, tavanomaisesta kenttäpotentiaalikulusta poikkeava muoto oli sahamainen. Tälle sahamaiselle muodolle tyypillistä oli leveä R-piikki, jota seurasi kapea positiivinen poikkeama. FPD:n lopetuspiste asetettiin tämän kapean positiivisen poikkeaman huipulle. Kuvassa 20 on esitetty esimerkki sahamaisesta signaalista ja sen FPD-pisteistä. Sahamaista signaalia havaittiin sekä sydänmallia että pelkästään kardiomyosyytejä sisältävissä kuopissa, mutta sydänmallia sisältävissä kuopissa se oli yleisempi.



**Kuva 20.** Sähkökäyrä MEA1-levyn sydänmallia sisältävästä kuopasta C elektrodin C1 mitattamana päivältä 15. Vasemmalla on suodattamaton mittaustulos ja oikealla Fourier-muunnoksella suodatettu mittaustulos, johon on asetettu FPD:n aloitus- ja lopetuspisteet. Aloituspisteet on merkattu mustalla ja lopetuspisteet punaisella. Kaikki pisteet eivät osu optimaalisille paikoilleen. Signaali on muodoltaan sahamainen.

#### 4.4 Haloperidolialtistus

MEA1-levyn haloperidolialtistuksen ja altistusta seuraavan päivän mittaustulokset on esitetty taulukossa VII. MEA2-levyn vastaavat mittaustulokset on esitetty taulukossa VIII. MEA1-levylle annetun haloperidolin konsentraatio oli 1  $\mu\text{mol/l}$  ja MEA2-levylle 10  $\mu\text{mol/l}$ . MEA2-levyn kuopista A, B ja C ei saatu analysointikelpoisia mittaustuloksia, joten nämä kuopat on jätetty pois taulukosta VIII. Mittaukset ovat minuutin mittaisia, ja lääkkeen annostelu aloitettiin 260 sekuntia mittausten aloituksen jälkeen. Näin ollen vaikutukset voisivat näkyä aikaisintaan mittauksessa 5. Haloperidolin vaikutus nähdään sähkökäyrän muodossa MEA1-levyllä viidennen mittauksen lopussa ja MEA2-levyllä kuudennen mittauksen alussa. Myös altistusta seuraavan päivän mittaustulokset on esitetty taulukoissa.

**Taulukko VII:** MEA1-levyn haloperidolialtistuksen (1 µmol/l) ja altistuksen jälkeisen päivän mittaustulokset. Lyhenteet ovat samat kuin taulukossa I.

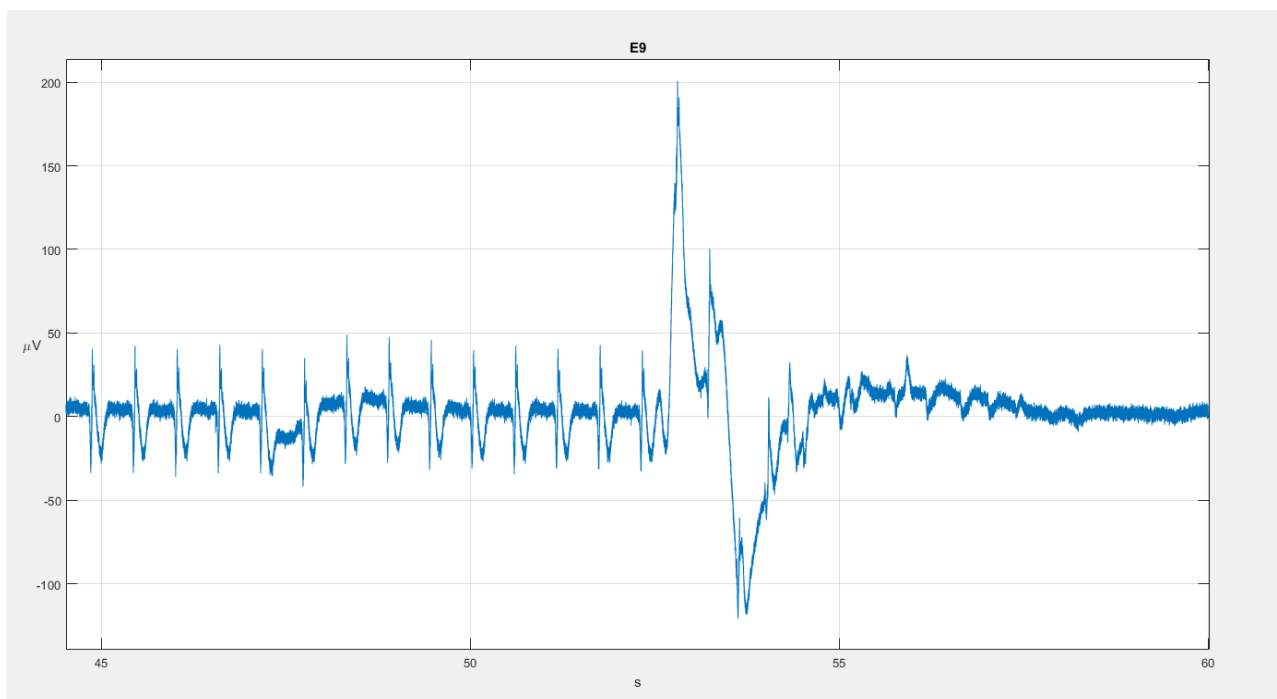
Kuoppa	A							B							C							
	Mittaus	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc
1				0	43,4	2,9	4		636	87	5	71,0	0,6	8	660	852	16	8	61,1	0,1	8	855
2				0	44,0	0,6	3		503	117	7	81,8	0,5	9	539	773	16	8	68,5	0,2	8	796
3				0	42,4	2,2	4		452	121	7	91,1	0,5	9	495	695	30	8	72,1	2,0	9	723
4				0	59,3	2,0	4		406	84	7	94,4	0,3	9	449	707	26	0	68,2	3,0	8	727
5				0	56,0	1,2	3		469	57	6	96,7	0,7	8	521	593	13	0	76,6	2,3	8	626
6				0	24,1	3,4	4		606	38	4	60,0	2,1	8	606			0	66,4	3,3	8	
7				0	21,8	2,1	4		773	21	2	33,9	2,6	9	682			0			0	
8				0	27,4	1,6	3		787	12	2	26,0	1,2	9	655			0			0	
9				0	25,1	1,5	3					0	14,3	0,7	5			0			0	
10				0	32,1	0,8	3					0	16,5	2,1	4			0			0	
11				0	32,0	0,8	5					0	6,5	1,1	3			0			0	
12	904	25	3	34,9	0,8	8	802				0	5,4	1,3	3			0			0		
13	830	20	3	36,5	2,7	8	744				0	4,6	0,3	4			0			0		
14	820	10	3	34,3	1,3	8	725				0	9,3	0,9	4			0			0		
15	814	43	3	35,3	1,1	8	724				0	12,7	0,1	3			0			0		
16	858	30	3	34,7	0,4	8	761	790	0	1	11,3	0,3	3	547			0			0		
17	876	20	3	34,8	0,2	8	777	780	26	2	12,3	0,9	4	550			0			0		
Päivä 25	804	72	3	38,1	4,1	8	727				0	25,9	0	1			0			0		

Kuoppa	D							E							F (pelkästään kardiomyosyyttejä)							
	Mittaus	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc
1	725	4	2	72,1	3,7	7	754	559	64	7	73,6	0,9	9	585	655	20	5	66,0	5,4	8	669	
2	673	3	2	78,0	0,7	6	713	511	64	5	86,0	0,8	9	553	651	39	9	62,9	0,9	9	658	
3				0	87,4	5,7	8		481	67	5	94,4	0,4	9	531	604	30	9	73,4	0,5	9	631
4				0	88,9	2,9	7		476	46	5	99,6	0,2	9	532	576	30	9	79,2	2,8	9	612
5				0	87,9	2,2	7		471	56	4	103,1	0,9	9	530	547	26	8	86,2	0,2	9	593
6				0			0				0			0			0			0		
7				0			0				0			0			0			0		
8				0			0				0			0			0			0		
9				0			0				0			0			0			0		
10				0			0				0			0			0			0		
11				0			0				0			0			0			0		
12				0			0				0			0			0			0		
13				0			0				0			0			0			0		
14				0			0				0			0			0			0		
15				0			0				0			0			0			0		
16				0			0				0			0			0			0		
17				0			0				0			0			0			0		
Päivä 25				0			0				0			0			0			0		

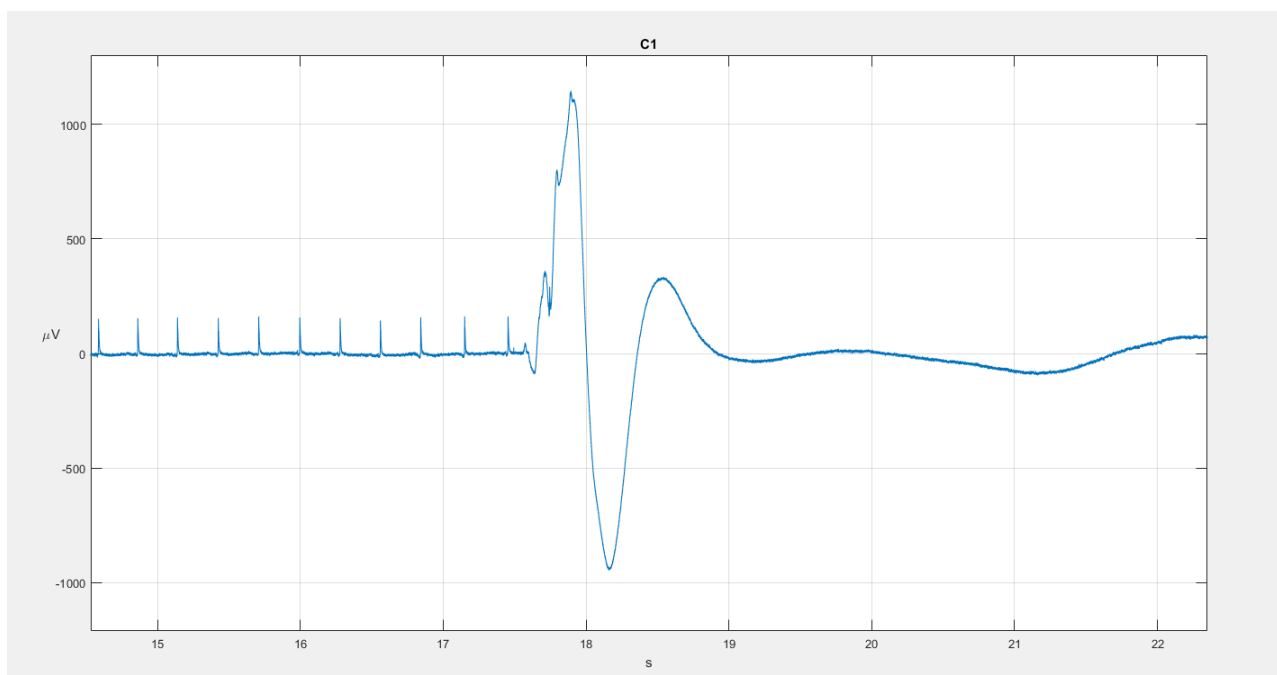
**Taulukko VIII:** MEA2-levyn haloperidolialtistuksen (10 µmol/l) ja altistuksen jälkeisen päivän mittaustulokset. Lyhenteet ovat samat kuin taulukossa I.

Kuoppa	C (pelkästään kardiomyosyyttejä)							D							E						
	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc	FPD-ka	SD	el	Syke	SD	el	FPDc
1	397	0	1	87,6	0,5	2	431	516	80	9	83,9	6,5	9	556	563	34	2	73,1	19,4	7	588
2	365	12	3	105,3	2,4	4	413	561	119	8	77,2	5,3	9	593			0	94,0	10,9	4	
3	353	13	3	105,1	0,9	3	400	464	78	8	110,7	6,1	9	531			0	96,3	6,0	3	
4	370	33	2	106,4	1,3	5	420	434	60	7	120,0	2,1	8	506			0	103,4	2,8	4	
5			0	107,2	1,4	4		405	55	5	126,7	2,9	8	477			0	104,4	2,2	4	
6			0			0				0			0				0			0	
7			0			0				0			0				0			0	
8			0			0				0			0				0			0	
9			0			0				0			0				0			0	
10			0			0				0			0				0			0	
11			0			0				0			0				0			0	
12			0			0				0			0				0			0	
13			0			0				0			0				0			0	
14			0			0				0			0				0			0	
15			0			0				0			0				0			0	
16			0			0				0			0				0			0	
17			0			0				0			0				0			0	
Päivä 25			0			0				0			0				0			0	

MEA2-levyllä käytetty vahva haloperidolipitoisuus (10 µmol/l) lopetti kardiomyosyyttien sykkeen nopeasti: haloperidolin vaikutuksen jälkeen mittauksissa ei havaittu taustakohinasta erottuvaa sähköistä toimintaa, joten analysointikelpoisia mittaustuloksia ei haloperidolin vaikutuksen jälkeen enää saatu. Myös MEA1-levyllä käytetty pitoisuus (1 µmol/l) osoittautui vahvaksi: kuopista D, E ja F ei saatu enää analysointikelpoisia mittaustuloksia haloperidolin vaikutuksen jälkeen. MEA1-levyllä haloperidolin aiheuttamien häiriöpoikkeamien suuruus vaihteli välillä 65–504 mikrovolttia ja MEA2-levyllä välillä 155–1421 mikrovolttia. Korkeimmat poikkeamat saatiin niistä kuopista, joissa oli pelkästään kardiomyosyyttejä, ja matalimmat poikkeamat niistä, joissa oli sydänmallia. Haloperidolin sykkeen lopettavat vaikutukset on esitetty kuvissa 21 ja 22. Kuopista C kuudennessa altistusmittauksesta saatiin vielä määritettyä syketaajuus, vaikka haloperidolin vaikutuksen taikua signaalin muoto oli epätyypillinen. Kuopista A ja B sen sijaan saatiin analysointikelpoisia mittaustuloksia vielä haloperidolin annostelun jälkeenkin.

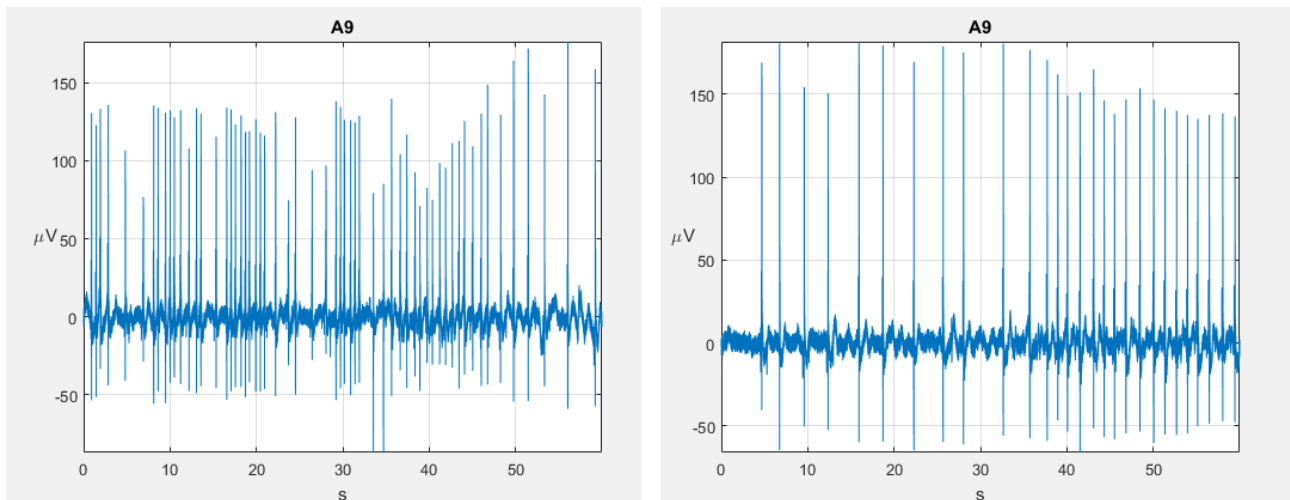


**Kuva 21.** Esimerkki haloperidolin vaikutuksesta sähkökäyrään. Kuva on MEA1-levyn sydänmallia sisältävästä kuopasta E elektrodin E9 mittaama tulos altistusmittauksen viidennen minuutin loppuosasta.



**Kuva 22.** Esimerkki haloperidolin vaikutuksesta sähkökäyrään. Kuva on MEA2-levyn pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävästä kuopasta C elektrodin C1 mittaama tulos altistusmittauksen kuudennen minuutin alkupuolelta. Kuvassa nähdään haloperidolin aiheuttama yli 1400 mikrovoltin suuruinen poikkeama.

MEA1-levyn kuopissa A ja B havaitaan selkeä syketaajuuden lasku haloperidolin vaikutuksen alkamisen jälkeen. Kuopan B mittauksista nähdään myös FPD:n pidentyminen heti haloperidolin vaikutuksen alkamisen jälkeen altistusmittauksen minuuteilla 6 ja 7. Molempien kuoppien kaikki haloperidolin havaitun vaikutuksen alkamisen eli viidennen mittauksen jälkeen mitatut FPD- ja FPDC-keskiarvot ovat pitkiä, mikä sopii haloperidolin QT-aikaa pidentävään vaikutukseen. Kuopissa A ja B haloperidolin vaikutus ei kuitenkaan näy iskun kaltaisena sykkeen muutoksena kuten niissä kuopissa, joissa haloperidoli lopetti analysointikelpoisen sykkeen. Kuoppien A ja B sykkeen hidastumista on silmämääräisesti vaikea havaita. Kuopan A viidennen ja kuudennen minuutin altistusmittaukset elektrodin A9 mittaamina on esitetty kuvassa 23.

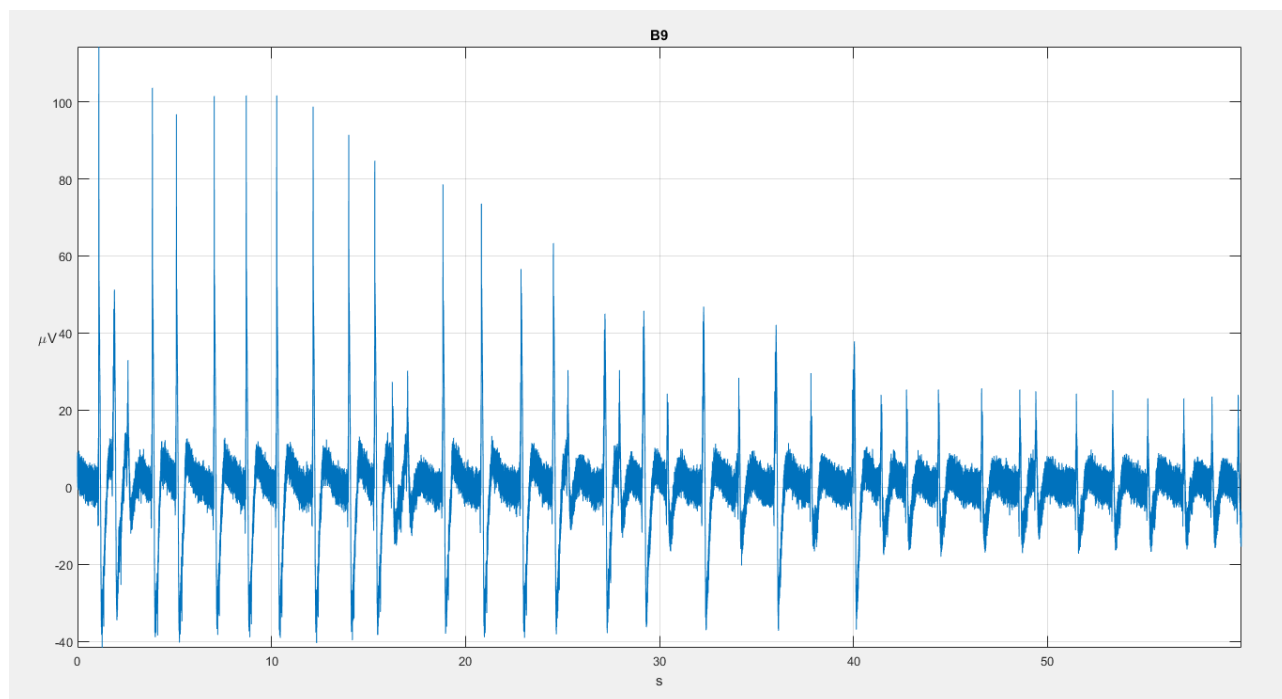


**Kuva 23.** MEA1-levyn sydänmallia sisältävän kuopan A haloperidolialtistuksen elektrodin A9 mittaamat viidennen ja kuudennen minuutin mittaukset esitettynä peräkkäin. Kuudennen mittauksen lopussa havaittavasta sykkeen tihentymisestä huolimatta syketaaso jää alhaisemmaksi kuin ennen haloperidolin annostelua.

Kuopan A sydänmallin sähkökäyrä ei ole FPD:n kannalta analysointikelpoista altistusmittausten alussa, koska yksiselitteistä FPD:n lopetuspistettä ei voida määrittää. Sähkökäyrä kuitenkin muuttuu altistusmittausten aikana FPD:n kannalta analysointikelpoiseksi. Epäselväksi jää, johtuuko tämä haloperidolin vaikutuksesta vai mittausten pitkästä kestosta. Joka tapauksessa mittauksissa saadut FPD:n ja FPDC:n keskiarvot ovat huomattavan pitkiä: vähintään yli 700 millisekuntia.

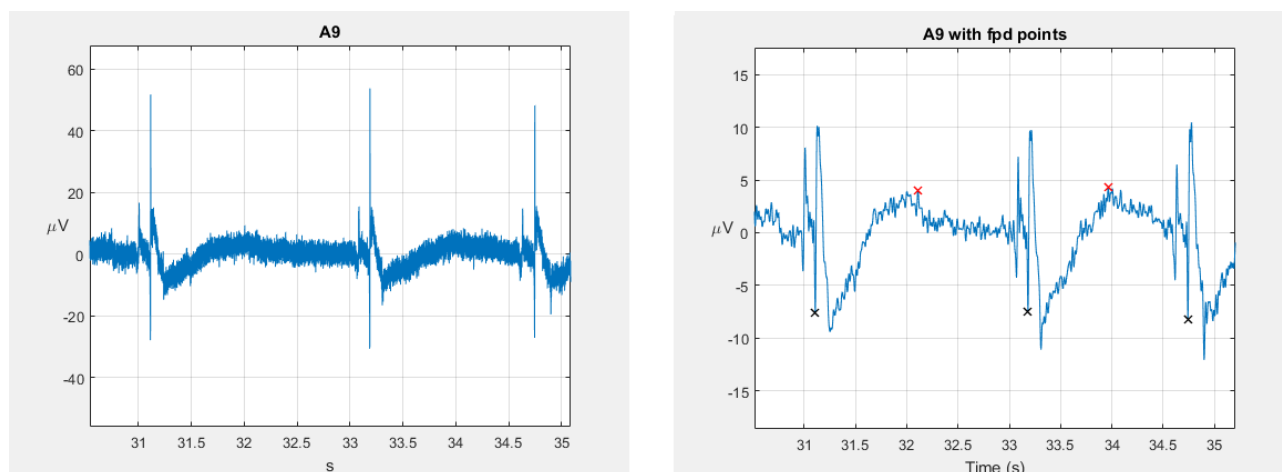
Kuopassa B tapahtuu sykkeen hidas hiipuminen, joka lopulta johtaa harvaan sykkeeseen, josta ei voida määrittää FPD:n päätepistettä yksiselitteisesti. Altistusmittausten loppupuolella saadaan kuitenkin yksittäisiä FPD:n kannalta analysointikelpoisia mittaustuloksia. Näistäkin määritetyt FPD:n ja FPDC:n keskiarvot ovat huomattavan pitkiä: FPD:n keskiarvot lähes 800 millisekuntia ja syketaajuudella korjatutkin FPD:n keskiarvot yli 500 millisekuntia. Sykkeen hiipuminen kuopassa B altistusmittausten seitsemännellä minuutilla nähdään kuvassa 24.



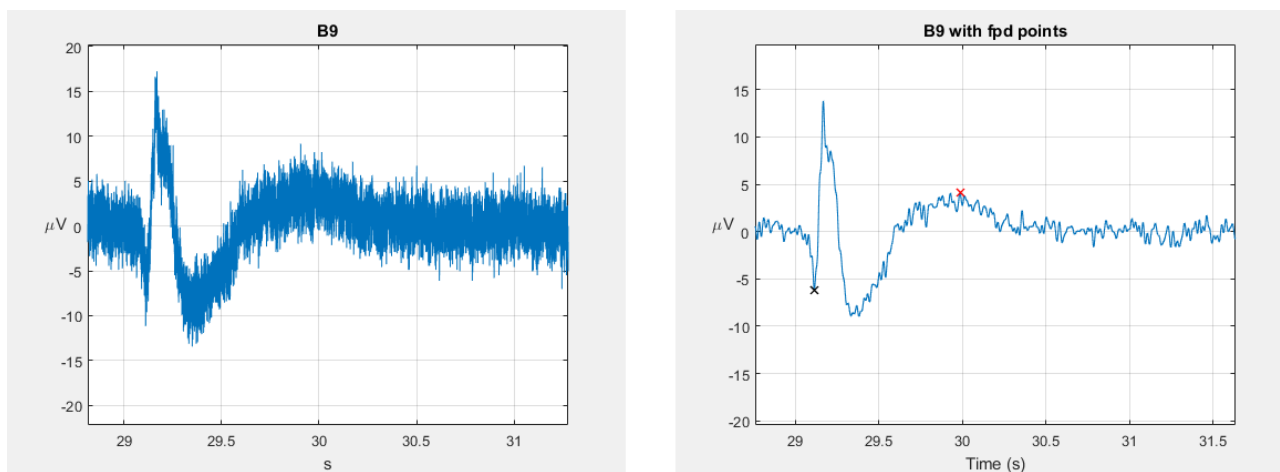


**Kuva 24.** MEA1-levyn sydänmallia sisältävän kuopan B elektrodin B9 altistusmittauksen seitsemännellä minuutilla mitaama sähkökäyrä, jossa nähdään sykkeen hiipuminen.

FPD:n pidentymisestä huolimatta kenttäpotentiaalien muodot olivat molempien kuoppien analysointikelpoisissa mittauksissa selväpiirteisiä ja säännönmukaisia. Kuvissa 25 ja 26 on esimerkit altistusmittausten minuutilta 17.



**Kuva 25.** Pidentyneitä kenttäpotentiaaleja altistusmittausten minuutilta 17 MEA1-levyn sydänmallia sisältävästä kuopasta A elektrodin A9 mitaamana. Vasemmalla on suodattamaton mittaustulos ja oikealla Fouriermuunnoksella suodatettu mittaustulos, johon on merkitty FPD:n aloitus- ja lopetuspisteet. Aloituspisteet on merkitty mustalla ja lopetuspisteet punaisella.



**Kuva 26.** Pidentyneitä kenttäpotentiaaleja altistusmittausten minuutilta 17 MEA1-levyn sydänmallia sisältävästä kuopasta B elektrodin B9 mittaamana. Vasemmalla on suodattamaton mittaustulos ja oikealla Fouriermuunnoksella suodatettu mittaustulos, johon on merkitty FPD:n aloitus- ja lopetuspisteet. Aloituspiste on merkitty mustalla ja lopetuspiste punaisella.

## 5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä tutkittiin syketaajuuden, kenttäpotentiaalिन keston ja sähkökäyrän muodon kehittymistä sydänmallilla ja kardiomyosyyteillä. Tätä tarkoitusta varten kehitettiin Matlab-pohjainen Vanellus CardioCalculator -add-on-ohjelma, jonka käytettävyyttä testattiin tutkimuksen yhteydessä. Ohjelman etuna voidaan pitää sitä, ettei sen käyttö edellytä Matlabin omistamista tai Matlabin käytön osaamista.

Kenttäpotentiaalिन ominaisuuksien tutkimista varten on kehitetty ennenkin erilaisia ohjelmia (esimerkiksi Pradhapan ym. 2013). Ohjelmien heikko saatavuus aiheuttaa kuitenkin ongelmia, minkä takia oman ohjelman kehittämistä pidettiin aiheellisenä. Vanellus CardioCalculator osoittautui toimivaksi, sillä signaalin tarkastelu mahdollistui ja numeeriset arvot syketaajuudesta ja kenttäpotentiaalिन kestosta pystyttiin määrittämään. Sujuvan käytön takia ohjelmaa varten suositellaan kuitenkin tietokonetta, jossa on vähintään 16 gigatavua RAM-muistia. Tämän tutkimuksen analyysit suoritettiin 8 gigatavun tietokoneella, mikä hidasti tulosten käsittelyä ohjelman ajoittaisen kaatumisen takia.

Arvojen määrittäminen Vanellus CardioCalculatorilla tapahtuu nopeasti, mutta sähkökäyrien analysointikelpoisuuden silmämääräinen arviointi vie paljon aikaa. Mittausten kelpoisuuden alustava arviointi varianssin perusteella karsii selvästi häiriöiset mittaukset pois, mutta välillä varianssiin perustuva karsinta ehdottaa erittäin laadukkaidenkin mittaustulosten hylkäämistä. Yksinkertaista varianssiin perustuvaa karsimista ei voi pitää kovin hyödyllisenä. Nopea ohjelman suorittama mittausten analysointikelpoisuuden arviointi vaatisi jatkokokehitystä.

Vanellus CardioCalculatorin toimintaperiaate on suoraviivainen, sillä se perustuu syke- ja kenttäpotentiaaliintervallien mittaamiseen, joista lasketaan keskiarvo. Ainoastaan syketaajuuden määrittämisessä käytetään liian keskiarvosta poikkeavien yksittäisten RR-välien jättämistä pois tarkastelusta. Säännöllisten mittaustulosten kanssa ohjelma toimii kiittävästi. Ongelmallisiksi osoittautuivat kuitenkin sellaiset mittaukset, joissa signaalin muoto tai syketaajuus voimakkaasti vaihtelevat. Näistäkin kuitenkin pystyttiin määrittämään numeerisia arvoja asetuksia säätämällä. Erittäin epäsäännöllisten mittaustulosten tarkan analysoinnin mielekkyys pitää kuitenkin arvioida tapauskohtaisesti, sillä lähtökohtaisesti soluviljelyillä pyrittiin saamaan aikaan säännöllistä sydämen toimintaa ilmentävä sydänmalli. Epäsäännöllisiä ja epätyypillisiä sähkökäyriä analysoitaessa ohjelman asetuksilla voidaan suuresti vaikuttaa saataviin numeerisiin arvoihin, mutta säännöllisiä sähkökäyriä analysoitaessa asetusten optimoinnilla on selvästi vähäisempi merkitys lopputulokseen. Erittäin tarpeelliseksi osoittautui mahdollisuus sähkökäyrien invertointiin, sillä tämä mahdollisti analysoinnin kannalta väärinpäin olevien mittaustulosten numeeristen arvojen määrittäksen. Saman kuopan sähkökäyrä saattoi eri mittauspäivinä olla eripäin, ja saman kuopan elektrodien saman mittauskerran sähkökäyristä osa saattoi olla toisinpäin kuin toiset. Vanellus CardioCalculatorin tuloksia voisi olla hyödyllistä vertailla sellaisiin ohjelmiin, jotka käyttävät monimutkaisempia analysointi menetelmiä syketaajuuden ja FPD:n määrittämiseen, kuten esimerkiksi erilaisia korrelaatiomenetelmiä.

Ohjelman kehittämiseen käytetyn mittauksen sähkökäyrän muoto poikkesi tutkimuksen mittaustuloksista. Ohjelman kehitykseen käytetyssä datassa R-piikki oli kapea ja sitä seuraavat poikkeamat olivat muodoltaan pyöreitä ja kenttäpotentiaalın päättävä maksimi oli helppo määrittää (kuva 5). Tutkimuksessa mitattujen sähkökäyrissä R-piikin kanta oli usein leveä, R-piikkiä seuraava negatiivinen poikkeama oli usein terävä ja selvää kenttäpotentiaalia päättävää maksimia ei aina havaittu (esimerkiksi kuva 15). R-piikin kannan leveys vaikeutti sähkökäyrän oikeinpäin olemisen määrittystä, sillä R-piikin leveän kannan voi sekoittaa R-piikkiä seuraavaan negatiiviseen poikkeamaan. Sähkökäyrien analysoiminen väärinpäin johtaa siihen, että kenttäpotentiaalın kesto arvioidaan liian lyhyeksi. Kehitysdatan ja tutkimusten mittaustulosten eroista huolimatta Vanellus CardioCalculator pystyi määrittämään numeeriset arvot syketaajuudelle ja FPD:lle myös kehitysdatan muodosta poikkeaville tuloksille. Mahdollisena syynä kehitysdatan ja mittaustulosten sähkökäyrien eroille voi olla se, että kehitysdatan solut mitattiin yksikuoppaisella MEA-levyllä ja tässä tutkimuksessa käytettiin kuusikuoppaisia MEA-levyjä, jolloin kuoppien halkaisija oli selvästi pienempi.

Sahamaisen signaalimuodon hyväksyttävyyttä mietitytti (kuva 20), mutta sekin hyväksyttiin mukaan tarkasteluun, koska siitä voidaan erottaa kenttäpotentiaalın eri vaiheet. Sahamaisessa signaalissa on leveä R-piikki, jota seuraa lyhyt negatiivinen poikkeama ja terävä positiivinen poikkeama, jonka huipulle FPD:n lopetus-piste asettuu. Lopetus-pistettä seuraava lyhyt perustasovaihe on negatiivinen. Sahamaisista sähkökäyristä määritetyt numeeriset arvot eivät poikenneet tyypillistä kenttäpotentiaalın kulkua ilmentävistä mittauksista.

MEA-levylle siirrostamisen jälkeen mittauskelpoisia sykkeitä pitäisi tämän tutkimuksen perusteella ilmentyä jo kaksi tai kolme päivää siirrostamisen jälkeen. Jos soluviljelmät eivät kolmantena päivänä ilmentäneet analysointikelpoisia sykkeitä, myöhemmät analysointikelpoiset mittaukset rajoittuivat yksittäisiin tapauksiin. Tällä perusteella voitaisiin ajatella, että jos ensimmäisen mittausviikon aikana ei saada aikaan analysointikelpoisia sykkeitä, sykkeen laadun paraneminen viljelyä jatkamalla ei ole todennäköistä.

Kardiomyosyyttiviljelmien sähkökäyrän laatu oli parempaa kuin sydänmalliviljelmien. Pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävillä viljelmillä saatiin suhteessa enemmän FPD:n kannalta analysointikelpoisia mittaustuloksia kuin sydänmalliviljelmillä. Esimerkiksi kuvasta 9 kuitenkin nähdään, että myös sydänmallin sähkökäyrä ilmentää tyypillistä kenttäpotentiaalın muotoa, joten sähkökäyrän laatu ei rajoita sydänmallin käyttöä.

Pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävillä viljelmillä 300 millisekunnin alittavat FPD-keskiarvot olivat tavallisempia kuin sydänmalliviljelmillä. Vastaavasti 500 millisekuntia ylittävät FPD-keskiarvot olivat yleisempiä sydänmallilla. Syketaajuuksissa ei ole selvää eroa kardiomyosyytti- ja sydänmalliviljelmien välillä. Sekä syketaajuuksissa että FPD-arvoissa on kummallakin viljelytyypillä suurta vaihtelua mittauspäivien välillä, eikä lineaarista kehitystä havaita. Elatusaineen vaihtopäivillä ei vaikuttanut olevan systemaattista vaikutusta syketaajuuteen tai kenttäpotentiaalın kestoon seuraavana päivänä.

Kahdessa sydänmallin kuopassa kardiomyosyyttiheys oli 500 000 kuoppaa kohden. Näistä ei yhtä poikkeusta lukuun ottamatta saatu analysointikelpoisia mittaustuloksia. Mittauspäivän 7 hyvälle tulokselle MEA2-levyn kuopasta F ei saatu selitystä. Tätä poikkeusta lukuun ottamatta suuren kardiomyosyyttiheyden kuoppien mittaustulokset olivat analysointikelvottomia. Näiden kuoppien kardiomyosyytit kasvatettiin eri astialla kuin muiden kuoppien kardiomyosyytit. Näissäkin kuitenkin havaittiin sykkimistä mikroskoopilla ennen siirrostusta MEA-levylle, joten on hyvinkin mahdollista, että liiallinen kardiomyosyyttiheys johti ravinnon riittämättömyyteen, mistä seurasi sykkimisen puute tai heikkous.

Robertsonin ym. (2013) katsausartikkelissa ihmisen pluripotenteista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien spontaanin syketaajuuden todettiin vaihtelevan välillä 21–52 iskua minuutissa. Tässä tutkimuksessa käytettyjen solujen sykkimistaajuus oli selvästi suurempi: sydänmallilla kehitysmittausten keskiarvot vaihtelivat välillä 90,8–124,1 ja pelkästään kardiomyosyyttejä sisältävillä kuopilla välillä 107,6–128,9 iskua minuutissa. Robertson ym. (2013) toteavatkin, että syketaajuuteen voivat vaikuttaa käytetty solulinja, viljelyolosuhteet, erilaistamisesta kulunut aika ja sykkimisen alkamisesta kulunut aika. Viljelyaika saattoi johtaa syketaajuuden kasvuun tai vähenemiseen. Tässä tutkimuksessa havaittiin suurta päiväkohtaista vaihtelua sekä sykkeissä että FPD-arvoissa. Haloperidolialtistusmittausten viidellä ensimmäisellä minuutilla, jolloin haloperidolia ei ollut vielä annosteltu, havaitaan, että syketaajuus voi muuttua parikymmentäkin yksikköä ja FPD jopa yli 200 millisekuntia viiden minuutin aikana. Voi olla, että olosuhteiden muuttuminen, kun MEA-levyt siirretään inkubaattorista mittausalustalle, aiheuttaa kardiomyosyyttien sykkeessä muutoksia.

Haloperidolialtistusmittauksissa ainoastaan kahdesta kuopasta saatiin FPD:n kannalta analysointikelpoisia tuloksia haloperidolin vaikutuksen jälkeen, ja näistä kummassakin oli sydänmallia. Näiden FPD-keskiarvot altistuksen jälkeen olivat huomattavan pitkiä, mikä johtuu haloperidolin QT-aikaa pidentävästä vaikutuksesta. MEA1-levy kuopasta B saatiin altistusmittauksen viimeiseltä kahdelta minuutilta yksittäisiä FPD:n kannalta analysointikelpoisia mittauksia, joissa Izumi-Nakasekon ym. yhtälöllä laskettu syketaajuudella korjattu FPD on lyhyempi kuin altistusmittauksen ensimmäisellä minuutilla määritetty FPDc, jolloin haloperidolia ei ollut vielä annosteltu. Altistusmittausten alussa FPD oli kaikkien analysointikelpoisten kuoppien mittaauksissa tavanomaista korkeampi, ja B-kuopassakin altistusmittauksen minuuteille 2–5 määritetyt FPDc-arvot ovat pienempiä kuin minuuteille 16 ja 17 määritetyt. Voidaan myös miettiä, onko FPDc:n laskeminen näin matalilla syketaajuuksilla (11,3–12,3 iskua minuutissa) mielekäästä. Kuopan B mittaauksissa kuitenkin nähdään selkeä FPD:n ja FPDc:n lasku altistusmittauksen minuuttien 5 ja 6 välillä. Kuopan A sähkökäyrä ennen haloperidolin annostelua ei ollut FPD:n kannalta analysointikelpoinen, mutta huomattavan suuret FPD- ja FPDc-arvot altistusmittauksen loppupuolella viittaavat vahvasti pidentyneeseen kenttäpotentiaalın kestoon.

Normaali QT-aika asettuu välille 390–460 millisekuntia (Rautaharju ym., 2009). Vaikkei kardiomyosyyttien FPD:n kehityksessä selvää lineaarista kehitystä havaittukaan, pitkät FPD-arvot vaikuttaisivat yleistyvän kolmannella ja etenkin neljännellä viikolla. Neljännellä viikolla suoritetuissa haloperidolialtistusmittauksissa

FPD-arvot olivat jo ennen haloperidolin annostelua huomattavan suuret, vaikka haloperidolin havaittiinkin pidentävän FPD-arvoja. Lähimmäksi QT-ajan normaaleja arvoja päästäneen toisella viikolla. Toisen mittausviikon alkuun osui yleensä syketaajuuden maksimi. Tällöin syke on liian korkea, kun sitä verrataan ihmisen normaalitilanteeseen. Optimaalisin altistusmittausten ajankohta ajoittuisi näillä perusteilla joko toisen viikon loppuun tai kolmannen viikon alkuun MEA-levylle siirrostamisen jälkeen. Aikaisempaa altistusmittausten ajoitusta puoltaa myös se, että sykkeen epäsäännöllisyys alkoi yleistyä kolmannella viikolla. Signaalin muodon kehityksessä ei tapahtunut olennaista kehitystä toisen ja kolmannen mittausviikon välillä, ja neljäntenä viikkona signaalin muoto usein huononi. Pelkkiä kardiomyosyyttejä sisältävät viljelmit vaikuttaisivat kestäväen hyvälaatuisina pidempään, vaikka niidenkin sykkeissä havaittiin epäsäännöllisyyksiä neljännellä viikolla. MEA-levylle siirrostamista edeltävän viljelyajan pituuden vaikutusta sähkökäyrän ominaisuuksien kehitykseen ei tässä tutkimuksessa selvitetty. Koska sykkeen säännöllisyydessä ja signaalin muodossa alettiin havaita heikentymistä jo kolmannella viikolla MEA-levylle siirrostamisen jälkeen, voidaan hyvinkin miettiä, oliko viisi viikkoa liian pitkä aika siirrostusta edeltävälle viljelylle.

Korjatun FPD:n laskeminen johti kehityksen seurantamittauksissa yhtä poikkeusta lukuun ottamatta FPD-arvon kasvamiseen, koska yhtä poikkeusta lukuun ottamatta syketaajuuden keskiarvo oli yli 60 iskua minuutissa. Kehityksen seurantamittauksissa vain yhdessä mittauksessa FPD:n keskiarvo oli alle 300 millisekuntia. Liian lyhyt kenttäpotentiaalinen kesto ei vaikuttaisi muodostuvan ongelmaksi solumallien kanssa. Ongelmana vaikuttaisi ennemminkin olevan liian pitkä FPD, mutta vaikka tämän tutkimuksen haloperidolialtistusmittauksen alussa FPD-arvot olivat jo valmiiksi normaalia QT-aikaa pidempiä, haloperidolin QT-aikaa pidentävä vaikutus tuli selvästi mittauksissa esiin. FPD:n pituuteen altistusmittauksen alussa voidaan myös vaikuttaa altistusmittausten sopivalla ajoituksella.

Tämä tutkimus osoitti, että kehitetty Vanellus CardioCalculator -ohjelma soveltuu kardiomyosyyttejä sisältävien soluviljelmien syketaajuuden, kenttäpotentiaalisen keston ja sähkökäyrän muodon sekä näissä tapahtuvien muutosten määrittämiseen ja tarkasteluun. Altistuskokeessa käytetty haloperidoli voi pidentää QT-aikaa tai aiheuttaa äkkikuoleman (Glassman & Bigger 2001). Näin ollen haloperidoli vaikutti tutkittuihin malleihin oletetulla tavalla, koska useassa kuopassa analysointikelpoinen syke loppui haloperidolin annostelun jälkeen ja niissä kuopissa, joissa analysointikelpoista sykettä havaittiin vielä haloperidolin annostelun jälkeen, haloperidolin QT-aikaa pidentävä vaikutus näkyi suurina FPD-arvoina.

## LÄHTEET

- Asakura K, Hayashi S, Ojima A, Taniguchi T, Miyamoto N, Nakamori C, Nagasawa C, Kitamura T, Osada T, Honda Y, Kasai C, Ando H, Kanda Y, Sekino Y & Sawada K. 2015. Improvement of acquisition and analysis methods in multi-electrode array experiments with iPS cell-derived cardiomyocytes. *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods*, 75, 17–26. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2015.04.002>
- Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK & Baudino TA. 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*, 293(3), H1883–91.
- Batalis NI, Harley RA & Schandl CA. 2007. Verapamil toxicity: An unusual case report and review of the literature. *American Journal of Forensic Medicine & Pathology*, 28(2), 137–140. doi:10.1097/01.paf.0000257399.58935.28
- Batalov I & Feinberg AW. 2015. Differentiation of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells using monolayer culture. *Biomark Insights*, 10(Suppl 1), 71–76. doi:<http://dx.doi.org/10.4137/BMI.S20050>
- Bazett HC. 1920. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart*, 7, 353–370.
- Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, Sjostrom SL, Szewczykowska M, Jackowska T, Dos Remedios C, Malm T, Andra M, Jashari R, Nyengaard JR, Possnert G, Jovinge S, Druid H & Frisen J. 2015. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell*, 161(7), 1566–1575. doi:10.1016/j.cell.2015.05.026 [doi]
- Blazeski A, Zhu R, Hunter DW, Weinberg SH, Boheler KR, Zambidis ET & Tung L. 2012. Electrophysiological and contractile function of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 110(2–3), 178–195. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.07.012>
- Bowers SLK, Banerjee I & Baudino TA. 2010. The extracellular matrix: At the center of it all. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 48(3), 474–482. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.024>
- Brutsaert DL. 2003. Cardiac endothelial-myocardial signaling: Its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiological Reviews*, 83(1), 59–115.
- Buckingham M, Meilhac S & Zaffran S. 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 826–835.
- Chaggar PS, Shaw SM & Williams SG. 2015. Is foxglove effective in heart failure? *Cardiovascular Therapeutics*, 33(4), 236–241. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/1755-5922.12130>
- Doke SK & Dhawale SC. 2015. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223–229. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>



- Duan D. 2009. Phenomics of cardiac chloride channels: The systematic study of chloride channel function in the heart. *Journal of Physiology*, 587(Pt 10), 2163–2177. doi:<https://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165860>
- Eng G, Lee BW, Protas L, Gagliardi M, Brown K, Kass RS, Keller G, Robinson RB & Vunjak-Novakovic G. 2016. Autonomous beating rate adaptation in human stem cell-derived cardiomyocytes. *Nature Communications*, 7, 10312. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10312>
- Finlayson K, Witchel HJ, McCulloch J & Sharkey J. 2004. Acquired QT interval prolongation and HERG: Implications for drug discovery and development. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 129–142.
- Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. 2005. International conference on harmonisation; guidance on S7B nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals; availability. notice. *Federal Register*, 70(202), 61133–61134.
- Fridericia LS. 1920. Die Systolendauer im Elektrokardiogramm bei normalen Menschen und bei Herzkranken. *Acta Medica Scandinavica*, 53, 469.
- Global Burden of Disease 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. 2015. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: A systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet (London, England)*, 385(9963), 117–171. doi:10.1016/S0140-6736(14)61682-2 [doi]
- Gilchrist KH, Lewis GF, Gay EA, Sellgren KL & Grego S. 2015. High-throughput cardiac safety evaluation and multi-parameter arrhythmia profiling of cardiomyocytes using microelectrode arrays. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 288(2), 249–257. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.07.024>
- Girardin F & Sztajzel J. 2017. Cardiac adverse reactions associated with psychotropic drugs. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 9(1), 92–95.
- Glassman AH & Bigger JTJ. 2001. Antipsychotic drugs: Prolonged QTc interval, torsade de pointes, and sudden death. *American Journal of Psychiatry*, 158(11), 1774–1782. doi:<https://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.158.11.1774>
- Guo L, Qian J, Abrams R, Tang H, Weiser T, Sanders MJ & Kolaja KL. 2011. The electrophysiological effects of cardiac glycosides in human iPSC-derived cardiomyocytes and in guinea pig isolated hearts. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 27(5), 453–462. doi:<http://dx.doi.org/10.1159/000329966>
- Gupta MK, Illich DJ, Gaarz A, Matzkies M, Nguemo F, Pfannkuche K, Liang H, Classen S, Reppel M, Schultze JL, Hescheler J & Saric T. 2010. Global transcriptional profiles of beating clusters derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are highly similar. *BMC Developmental Biology*, 10, 98. doi:<http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-10-98>
- Halbach M, Egert U, Hescheler J & Banach K. 2003. Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 13(5), 271–284. doi:<https://dx.doi.org/74542>



- Hamilton N & Ianuzzo CD. 1991. Contractile and calcium regulating capacities of myocardia of different sized mammals scale with resting heart rate. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 106(2), 133–141.
- Harris K, Aylott M, Cui Y, Louttit JB, McMahon NC & Sridhar A. 2013. Comparison of electrophysiological data from human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to functional preclinical safety assays. *Toxicological Sciences*, 134(2), 412–426. doi:<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kft113>
- Hartman ME, Dai D & Laflamme MA. 2016. Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 96, 3–17. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.004>
- Hedman A & Meijer DK. 1998. The stereoisomers quinine and quinidine exhibit a marked stereoselectivity in the inhibition of hepatobiliary transport of cardiac glycosides. *Journal of Hepatology*, 28(2), 240–249.
- Heinonen T. 2015. Better science with human cell-based organ and tissue models. *ATLA-Alternatives to Laboratory Animals*, 43(1), 29–38.
- Hodges M, Salerno D & Erlie D. 1983. Bazett's QT correction reviewed: Evidence that a linear QT correction for heart is better. *Journal of the American College of Cardiology*, 1, 694.
- Huber I, Itzhaki I, Caspi O, Arbel G, Tzukerman M, Gepstein A, Habib M, Yankelson L, Kehat I & Gepstein L. 2007. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *FASEB Journal*, 21(10), 2551–2563. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=17435178>; <http://sfx.nelliportaali.fi/nelli06b?sid=OVID&isbn=&issn=0892-6638&volume=21&issue=10&date=2007&title=FASEB+Journal&atitle=Identification+and+selection+of+cardiomyocytes+during+human+embryonic+stem+cell+differentiation.&aulast=Huber+I&spage=2551>
- Izumi-Nakaseko H, Kanda Y, Nakamura Y, Hagiwara-Nagasawa M, Wada T, Ando K, Naito AT, Sekino Y & Sugiyama A. 2017. Development of correction formula for field potential duration of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes sheets. *Journal of Pharmacological Sciences*, 135(1), 44–50. doi:<https://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2017.08.008>
- Johannesen L, Vicente J, Mason JW, Sanabria C, Waite-Labott K, Hong M, Guo P, Lin J, Sorensen JS, Galeotti L, Florian J, Ugander M, Stockbridge N & Strauss DG. 2014. Differentiating drug-induced multichannel block on the electrocardiogram: Randomized study of dofetilide, quinidine, ranolazine, and verapamil. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 96(5), 549–558. doi:10.1038/clpt.2014.155 [doi]
- Johnson JN & Ackerman MJ. 2009. QTc: How long is too long? *British Journal of Sports Medicine*, 43(9), 657–662. doi:<http://dx.doi.org/10.1136/bjism.2008.054734>
- Kakkar R & Lee RT. 2010. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circulation Research*, 106(1), 47–57. doi:<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.207456>

- Kanno S & Saffitz JE. 2001. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovascular Pathology*, 10(4), 169–177.
- Kita-Matsuo H, Barcova M, Prigozhina N, Salomonis N, Wei K, Jacot JG, Nelson B, Spiering S, Haverslag R, Kim C, Talantova M, Bajpai R, Calzolari D, Terskikh A, McCulloch AD, Price JH, Conklin BR, Chen HSV & Mercola M. 2009. Lentiviral vectors and protocols for creation of stable hESC lines for fluorescent tracking and drug resistance selection of cardiomyocytes. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 4(4), e5046. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005046>
- Knight A. 2008. Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor contributions toward human healthcare. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 3(2), 89–96.
- Knight E & Przyborski S. 2015. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*, 227(6), 746–756. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/joa.12257>
- Kolaja K. 2014. Stem cells and stem cell-derived tissues and their use in safety assessment. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 4555–4561. doi:<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R113.481028>
- Krenning G, Zeisberg EM & Kalluri R. 2010. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 225(3), 631–637. doi:10.1002/jcp.22322 [doi]
- Lee DS, Chen J, Lundy DJ, Liu C, Hwang S, Pabon L, Shieh R, Chen C, Wu S, Yan Y, Lee S, Chiang P, Chien S, Murry CE & Hsieh PCH. 2015. Defined MicroRNAs induce aspects of maturation in mouse and human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes. *Cell Reports*, 12(12), 1960–1967. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.042>
- Lilienblum W, Dekant W, Foth H, Gebel T, Hengstler JG, Kahl R, Kramer P, Schweinfurth H & Wollin K. 2008. Alternative methods to safety studies in experimental animals: Role in the risk assessment of chemicals under the new european chemicals legislation (REACH). *Archives of Toxicology*, 82(4), 211–236. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00204-008-0279-9>
- Lisewski U, Shi Y, Wrackmeyer U, Fischer R, Chen C, Schirdewan A, Juttner R, Rathjen F, Poller W, Radke MH & Gotthardt M. 2008. The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *Journal of Experimental Medicine*, 205(10), 2369–2379. doi:<http://dx.doi.org/10.1084/jem.20080897>
- Luo S, Michler K, Johnston P & Macfarlane PW. 2004. A comparison of commonly used QT correction formulae: The effect of heart rate on the QTc of normal ECGs. *Journal of Electrocardiology*, 37(Suppl), 81–90.
- Maddah M, Heidmann JD, Mandegar MA, Walker CD, Bolouki S, Conklin BR & Loewke KE. 2015. A non-invasive platform for functional characterization of stem-cell-derived cardiomyocytes with applications in cardiotoxicity testing. *Stem Cell Reports*, 4(4), 621–631. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.02.007>
- Meyer T, Boven K, Gunther E & Fejtl M. 2004. Micro-electrode arrays in cardiac safety pharmacology: A novel tool to study QT interval prolongation. *Drug Safety*, 27(11), 763–772.

- Milani-Nejad N & Janssen PML. 2014. Small and large animal models in cardiac contraction research: Advantages and disadvantages. *Pharmacology & Therapeutics*, 141(3), 235–249. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.007
- Nachimuthu S, Assar MD & Schussler JM. 2012. Drug-induced QT interval prolongation: Mechanisms and clinical management. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 3(5), 241–253. doi:<https://dx.doi.org/10.1177/2042098612454283>
- Nag AC. 1980. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: A fine structural analysis and distribution. *Cytobios*, 28(109), 41–61.
- Nerbonne JM. 2004. Studying cardiac arrhythmias in the mouse—a reasonable model for probing mechanisms? *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(3), 83–93.
- Ng SY, Wong CK & Tsang SY. 2010. Differential gene expressions in atrial and ventricular myocytes: Insights into the road of applying embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for future therapies. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 299(6), 1234–1249. doi:<http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00402.2009>
- Norotte C, Marga FS, Niklason LE & Forgacs G. 2009. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials*, 30(30), 5910–5917. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.034>
- Ogata N & Narahashi T. 1989. Block of sodium channels by psychotropic drugs in single guinea-pig cardiac myocytes. *British Journal of Pharmacology*, 97(3), 905–913.
- Palande NV, Bhojar RC, Biswas SP & Jadhao AG. 2015. Short-term exposure to L-type calcium channel blocker, verapamil, alters the expression pattern of calcium-binding proteins in the brain of goldfish, *carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 176–177, 31–43. doi:10.1016/j.cbpc.2015.07.006 [doi]
- Pfannkuche K, Liang H, Hannes T, Xi J, Fatima A, Nguemo F, Matzkies M, Wernig M, Jaenisch R, Pillekamp F, Halbach M, Schunkert H, Saric T, Hescheler J & Reppel M. 2009. Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: Intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 24(1–2), 73–86. doi:<http://dx.doi.org/10.1159/000227815>
- Pinnell J, Turner S & Howell S. 2007. Cardiac muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 7(3), 85–88.
- Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA & Tallquist MD. 2016. Revisiting cardiac cellular composition. *Circulation Research*, 118(3), 400–409. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778
- Pontes Soares C, Midlej V, de Oliveira MEW, Benchimol M, Costa ML & Mermelstein C. 2012. 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 7(5), e38147. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038147>

- Pradhapan P, Kuusela J, Viik J, Aalto-Setälä K & Hyttinen J. 2013. Cardiomyocyte MEA data analysis (CardioMDA) – a novel field potential data analysis software for pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 8(9), e73637. doi:<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073637>
- Rautaharju PM, Surawicz B, Gettes LS, Bailey JJ, Childers R, Deal BJ, Gorgels A, Hancock EW, Josephson M, Kligfield P, Kors JA, Macfarlane P, Mason JW, Mirvis DM, Okin P, Pahlm O, van Herpen G, Wagner GS, Wellens H, American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology, American College of Cardiology Foundation & Heart Rhythm Society. 2009. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: Part IV: The ST segment, T and U waves, and the QT interval: A scientific statement from the american heart association electrocardiography and arrhythmias committee, council on clinical cardiology; the american college of cardiology foundation; and the heart rhythm society. endorsed by the international society for computerized electrocardiology. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(11), 982–991. doi:<https://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.014>
- Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PKS, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ & Hammond TG. 2003. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: Evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovascular Research*, 58(1), 32–45.
- Reppel M, Pillekamp F, Brockmeier K, Matzkies M, Bekcioglu A, Lipke T, Nguemo F, Bonne-meier H & Hescheler J. 2005. The electrocardiogram of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Journal of Electrocardiology*, 38(4 Suppl), 166–170.
- Reppel M, Pillekamp F, Lu ZJ, Halbach M, Brockmeier K, Fleischmann BK & Hescheler J. 2004. Microelectrode arrays: A new tool to measure embryonic heart activity. *Journal of Electrocardiology*, 37(Suppl), 104–109.
- Robertson C, Tran DD & George SC. 2013. Concise review: Maturation phases of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells*, 31(5), 829–837. doi:<http://dx.doi.org/10.1002/stem.1331>
- Saad M, Mahmoud A, Elgendy IY & Richard Conti C. 2016. Ranolazine in cardiac arrhythmia. *Clinical Cardiology*, 39(3), 170–178. doi:<https://dx.doi.org/10.1002/clc.22476>
- Sanguinetti MC & Tristani-Firouzi M. 2006. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*, 440(7083), 463–469. doi:<https://dx.doi.org/10.1038/nature04710>
- Sarkanen J-R, Mannerström M, Vuorenperä H, Uotila J, Ylikomi T & Heinonen T. 2010. Intra-laboratory pre-validation of a human cell based in vitro angiogenesis assay for testing angiogenesis modulators. *Frontiers in Pharmacology*, 1, 147. doi:<https://dx.doi.org/10.3389/fphar.2010.00147>
- Sarkanen J-R, Vuorenperä H, Huttala O, Mannerström B, Kuokkanen H, Miettinen S, Heinonen T & Ylikomi T. 2012. Adipose stromal cell tubule network model provides a versatile tool for vascular research and tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 196(5), 385–397. doi:<https://dx.doi.org/10.1159/000336679>

- Shamir ER & Ewald AJ. 2014. Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(10), 647–664. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3873>
- Sheehy SP, Pasqualini F, Grosberg A, Park SJ, Aratyn-Schaus Y & Parker KK. 2014. Quality metrics for stem cell-derived cardiac myocytes. *Stem Cell Reports*, 2(3), 282–294. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.015>
- Soonpaa MH & Field LJ. 1998. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circulation Research*, 83(1), 15–26.
- Souders CA, Bowers SLK & Baudino TA. 2009. Cardiac fibroblast: The renaissance cell. *Circulation Research*, 105(12), 1164–1176. doi:<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209809>
- Stucky MA & Goldberger ZD. 2015. Digoxin: Its role in contemporary medicine. *Postgraduate Medical Journal*, 91(1079), 514–518. doi:<http://dx.doi.org/10.1136/postgradmedj-2014-132937>
- Suessbrich H, Schonherr R, Heinemann SH, Attali B, Lang F & Busch AE. 1997. The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on HERG potassium channels expressed in xenopus oocytes. *British Journal of Pharmacology*, 120(5), 968–974. doi:<https://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0700989>
- Suter-Dick L, Alves PM, Blaauboer BJ, Bremm K, Brito C, Coecke S, Flick B, Fowler P, Hescheler J, Ingelman-Sundberg M, Jennings P, Kelm JM, Manou I, Mistry P, Moretto A, Roth A, Stedman D, van de Water B & Beilmann M. 2015. Stem cell-derived systems in toxicology assessment. *Stem Cells & Development*, 24(11), 1284–1296. doi:<http://dx.doi.org/10.1089/scd.2014.0540>
- van Spreeuwel ACC, Bax NAM, Bastiaens AJ, Foolen J, Loerakker S, Borochoin M, van der Schaft, D W J., Chen CS, Baaijens FPT & Bouten CVC. 2014. The influence of matrix (an)isotropy on cardiomyocyte contraction in engineered cardiac microtissues. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 6(4), 422–429. doi:<http://dx.doi.org/10.1039/c3ib40219c>
- Vuorenpää H, Ikonen L, Kujala K, Huttala O, Sarkanen J-R, Ylikomi T, Aalto-Setälä K & Heinen T. 2014. Novel in vitro cardiovascular constructs composed of vascular-like networks and cardiomyocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 50(4), 275–286. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11626-013-9703-4>
- Wroblewski HA, Kovacs RJ, Kingery JR, Overholser BR & Tisdale JE. 2012. High risk of QT interval prolongation and torsades de pointes associated with intravenous quinidine used for treatment of resistant malaria or babesiosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 56(8), 4495–4499. doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06396-11>
- Xin M, Olson EN & Bassel-Duby R. 2013. Mending broken hearts: Cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 529–541. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3619>

- Xu C. 2012. Differentiation and enrichment of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 52(6), 1203–1212.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.012>
- Yang X, Pabon L & Murry CE. 2014. Engineering adolescence: Maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation Research*, 114(3), 511–523.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300558>
- Yokoo N, Baba S, Kaichi S, Niwa A, Mima T, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T & Heike T. 2009. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 387(3), 482–488.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.052>
- Zhou P & Pu WT. 2016. Recounting cardiac cellular composition. *Circulation Research*, 118(3), 368–370. doi:<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308139>