

Jenna Suoranta

# **SÄHKÖISESTI AKTIIVISTEN SOLUJEN ELEKTROFYSIOLOGISEN TOIMINNAN MITTAUS 3D-HYDROGEEELISSÄ**

Lääketiede ja terveysteknologia  
Kandidaatintyö  
10/2019

# TIIVISTELMÄ

Jenna Suoranta: Sähköisesti aktiivisten solujen elektrofysiologisen toiminnan mittaus 3D-hydrogeelissä  
Kandidaatintyö  
Tampereen yliopisto  
Biotekniikka  
10/2019

---

Tässä kandidaatintyössä perehdyttiin erilaisiin elektrofysiologisiin menetelmiin, joita on käytössä solujen 2D- sekä 3D-viljelmien mittaamiseen sekä pohdittiin näiden menetelmien soveltuvuutta hydrogeelistä mittaamiseen. 3D-viljelmät yhdistettynä hydrogeelissä kasvatukseen mallintavat huomattavasti 2D-viljelmiä paremmin in vivo -olosuhteita, jonka vuoksi soveltuvien mittaamenetelmien löytäminen on erittäin tärkeää. Mittausmenetelmät voidaan karkeasti jakaa solun sisältä mitattaviin eli intrasellulaarisiin sekä solun ulkopuolelta mitattaviin eli ekstrasellulaarisiin menetelmiin. Lisäksi on menetelmiä, kuten esimerkiksi mikroelektrodimatriisit, joilla voidaan suorittaa mittaaminen sekä ekstrasellulaarisesti, että intrasellulaarisesti.

Mittaustuloksia 3D-hydrogeeleistä ei juurikaan löytynyt eli menetelmien soveltuvuus 3D-hydrogeelistä mittaamiseen perustuu lähinnä mittaamenetelmien toimintaan sekä opiskelijan omaan pohdintaan. Tällä hetkellä menetelmistä ainakin patch-clamp-menetelmää, useita mikroelektrodimatriiseja, nanoteknologiaan perustuvia menetelmiä sekä useita värjäykseen perustuvia kuvantamismenetelmiä on onnistuneesti käytetty 3D-viljelmistä mittaamiseen ja niitä voidaan pitää osittain soveltuvina myös hydrogeelistä mittaamiseen. Itse mittaamenetelmän lisäksi hydrogeelin ominaisuuksilla kuten sähkönjohtavuudella sekä läpinäkyvyydellä on vaikutusta mittauksen onnistumiseen.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

## SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO .....	1
2.	SOLUJEN 3D-VILJELY .....	2
2.1	3D-viljely osana lääkinällistä biologiaa .....	2
2.2	Hydrogeelit viljelyalustana .....	3
2.3	Sähköisesti aktiiviset solut .....	4
3.	ELEKTROFYRIOLOGISET MITTAUSMENETELMÄT .....	9
3.1	Patch-clamp elektrodit.....	9
3.2	Mikroelektrodimatriisit .....	10
3.3	Nanoluokan kenttävaikutuksen ilmaisimeen perustuvat menetelmät .....	14
3.4	Optinen kuvantaminen ja väriaineiden käyttö kuvantamisessa.....	16
3.4.1	Ca <sup>2+</sup> -kuvantaminen .....	16
3.4.2	Jänniteherkkien väriaineiden käyttö kuvantamisessa .....	17
3.4.3	Elektroninen impedanssi spektroskopia.....	18
3.4.4	Liikkeen analysointiin perustuvat menetelmät .....	18
4.	POHDINTA .....	20
	YHTEENVETO .....	24
	LÄHTEET.....	25

## LYHENTEET JA MERKINNÄT

AFM	Atomivoimamikroskooppi
ANTT	Aktiivinen pii-nanoputki-transistori
AP	Toimintapotentiaali
CC	Virta clamp, Patch-clamp-tekniikan toinen mittaustapa
CM	Kardiomyosyytti
CV	Jännite clamp, Patch-clamp-tekniikan toinen mittaustapa
DIC	digitaalisen kuvan korrelaatio
ECM	Soluväliaine
EIS	Elektroninen impedanssi spektroskopia
EKG	Elektrokardiogrammi
ES	Alkion kantasolu
EM	elektro – mekaaninen
FLOT	Fluoresenssinen laminaarinen optinen tomografia
FP	Kenttäpotentiaali
FPD	Kenttäpotentiaalin kesto
FPI	Fluorisoiva proteiiniperäinen indikaattori
GFP	Vihreä fluorisoiva proteiini
GEVI	Geneettisesti koodaava jänniteindikaattori
gM $\mu$ E	kultainen sienenmuotoinen mikroelektrodi
HPF	Ylipäästösuodatin
hiPS	Ihmisen indusoitu pluripotentti kantasolu
in vitro	Tutkimus suoritetaan elävän organismin ulkopuolella, esimerkiksi koeputkessa tai kasvatusalustalla
in vivo	Tutkimus suoritetaan elävässä organismissa
iPS	Indusoitu pluripotentti kantasolu
IrOx	Iiridiumoksidi
LTCC	Alhaisen lämpötilan omaavat keraamiset monikerros teknologiat
MEA	Mikroelektrodimatriisi
MQD	Pienin neliöero
nanoFET	Vapaasti seisova puolijohteista valmistettu nanolanka anturi
VSD	Jänniteherkkä väriaine

# 1. JOHDANTO

Soluviljelyllä tarkoitetaan useimmiten eukaryoottisten solujen viljelyä laboratorioolosuhteissa. Perinteinen solujen 2D-viljely on ollut käytössä jo useita vuosikymmeniä. Tässä menetelmässä solut viljellään yhdessä kerroksessa kaksiulotteisessa ympäristössä. 3D-viljely on suuressa osaa laboratorioita alkanut korvata perinteisen 2D-viljelyn sen paremmin solujen luonnollista kasvuympäristöä jäljittelevien ominaisuuksien vuoksi. Etenkin yhdistämällä 3D-viljely ja hydrogeelit kasvualustana on saatu aikaan erityisen hyvin in vivo -olosuhteita mallintava kasvuympäristö. Käyttökohteita 3D-hydrogeeliviljelmille sekä niihin soveltuville mittaustekniikoille löytyy useilta kudosteknologian eri aloilta taudinmallinnuksesta lääkeaineiden testaamiseen. Aikaisemmin 2D-viljelmien analysointiin käytetyt mittausten menetelmät eivät aina ole suoraan sovellettavissa 3D-viljelmiin ja uusia mittausten menetelmiä kehitetään jatkuvasti paremman signaalin saamiseksi. (Ravi et al. 2014)

Tässä kandidaatintyössä tehdään kirjallisuuskatsaus tällä hetkellä käytettyihin mittausten menetelmiin ja niiden soveltuvuuteen 3D-viljelmien analysoinnissa keskittyen erityisesti 3D-hydrogeeleissä tapahtuviin viljelmiin ja niiden analysointiin. Yleisimmin käytettyjä menetelmiä ovat solunsisäiset patch-clamp-elektrodit, mikroelektrodimatriisit sekä erilaiset kuvantamismenetelmät ja jänniteherkkien väriaineiden käyttö kuvantamisessa. (Spira & Hai 2013) Lisäksi työssä esitellään perusteet hydrogeeleistä ja niiden käytöstä kasvualustana sekä sähköisesti aktiivisten solujen yleispiirteet. Työ ei sisällä laboratorio-osuutta tai muita mittauksia.

## 2. SOLUJEN 3D-VILJELY

3D-viljelmät tarjoavat biologisesti parempia rakenteita, joita voidaan käyttää sellaisten monimutkaisten vuorovaikutusten tutkimiseen, joiden tutkiminen ei ollut mahdollista 2D-viljelmillä. Kolmiulotteisia kasvatuksia voidaan tehokkaasti käyttää sekä perustutkimuksiin että soveltavaan tutkimukseen. Instrumentaatioteknologian ja materiaalitieteiden dynaamiset edistysaskeleet ovat lisänneet monimuotoisuutta soluviljelmäteknikoissa. 3D-soluviljelmillä on lukemattomia sovelluksia. Niitä voidaan hyödyntää uusien lääkeaineiden löytämiseen, farmakologisiin tutkimuksiin, solujen fysiologian ymmärtämiseen, geenien ja proteiinien tutkimiseen, syöpätutkimukseen, kudosteknologiaan ja myös bioteollisuuden tuottavuuden lisäämiseen. (Ravi et al. 2014)

### 2.1 3D-viljely osana lääkinnällistä biologiaa

Solujen 3D-kasvatus on jo suuressa osassa tutkimuslaboratorioita syrjäyttänyt perinteisen kasvatusmaljan pohjalla tapahtuvan solulinjojen 2D-viljelyn. 3D-tekniikalla pystytään luomaan solujen luonnollista in vivo -kasvuympäristöä jäljittelevät olosuhteet ja juuri tämän vuoksi se soveltuu 2D-kasvatusta paremmin lääketieteellisen teknologian tutkimuksiin. (Ravi et al. 2014)

Regeneratiivisessa lääketieteessä soluviljelyiden lähteenä käytetään nykyään useimmiten pluripotentteja eli erittäin monikykyisiä kantasoluja. Pluripotentteilla kantasoluilla on kyky erilaistua miksi tahansa kehittyvän alkion kudoksen soluksi. Tällaisia kantasoluja on löydettävissä varhaisista alkioista. Nykyisin alkion pluripotentteja kantasoluja (embryonic stem cell, ES) käytetympiä ovat indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS). Indusoidut pluripotentit kantasolut ovat aikuiselta esimerkiksi ihosta tai verestä otettuja soluja, jotka on uudelleen ohjelmoitu pluripotentiksi kantasoluiksi monivaiheisessa prosessissa tiettyjä transkriptiotekijöitä käyttäen. Nämä iPS solut voidaan ohjata erilaistumaan halutuksi solutyypiksi muokkaamalla viljelyolosuhteita. (Weltner et al. 2014)

Muita käytettyjä solukko lähteitä ovat solulinjat sekä primaarisolut. 2D-viljelyssä käytettävät solulinjat ovat pitkään kasvatettuja ja useita kertoja jaettuja soluja, joiden elinikä on rajaton. Tämän seurauksena niiden genomi saattaa olla muuntunut ja muun muassa niiden vanheneminen ei pysy luonnollisena. Pidemmässä kasvatuksissa tätä pyritään ehkäisemään ja valvotaan erilaisten kokeiden avulla. Primaarisolut, toisin kuin solulinjat, on eristetty suoraan kudoksesta eikä niiden genomi ole muuttunut antaen näin solulinjoja rehellisemmän kuvan kudoksesta. Vaikka solulinjat tarjoavat meille erinomaisen homogeenisen tutkimusmateriaalin, viljelemällä soluja 3D-malleina,

saadaan solut käyttäytymään tavalla, joka on askel lähemmäs kohti luonnollisia kehon sisäisiä olosuhteita. (Ravi et al. 2014) Kolmiulotteisessa ympäristössä kasvavat solut ovat hyviä malleja mukailleen in vivo -järjestelmiä ja antavat meille hyödyllisiä näkemyksiä monin eri tavoin. Ne voivat toimia kustannustehokkaina seulonta-alustoina lääkkeiden kehittämiseksi ja testaukselle ja tarjoavat meille paremman ja realistisemmän ennustearvon turvallisuuden ja riskinarvioinnin kannalta. (Ravi et al. 2014)

Eräs syy käyttää kehittyneempiä in vitro -malleja on pyrkimys vähentää eläinkokeita. Eläinmallit ovat kalliita, aikaa vieviä ja eettisesti ongelmallisia eivätkä aina vastaa ihmisen sairauden patofysiologiaa. Paremmin potilaskohtaisten vaatimusten käsittelemiseksi potilaan omista soluista koostuva solumalli tuottaa loogisesti relevantteja tietoja. Indusoitujen pluripotenttien kantasolujen avulla on mahdollista tuottaa malli juuri kyseisellä potilaalla esiintyvään sairauteen, sillä iPS solujen genomi vastaa solujen luovuttajan genomia. (Zuppinger 2015)

3D-soluviljelyjärjestelmissä käytetään usein apuna scaffoldveja. Scaffoldit ovat huokoisia kolmiulotteisia tukirankoja, jotka jäljittelevät solujen luonnollisen kasvuympäristön soluväliainetta. Scaffoldissa käytetyt materiaalit riippuvat halutusta scaffoldin rakenteesta ja kasvatettavista soluista. (Ravi et al. 2014) Tämän hetken käytetyimmät 3D-soluviljelyjärjestelmät voidaan karkeasti ryhmitellä kolmeen osaan: 1) mallit, jotka käyttävät hydrogeelejä, näissä solut sijaitsevat matriisissa matrigelistä, kollageenistä, fibriinistä tai muista ECM proteiineista valettujen scaffoldien avulla; 2) mallit, jotka käyttävät suhteellisen jäykkiä esivalmistettuja scaffoldveja, joissa solut kasvavat näiden pintoihin tai onkaloihin; 3) mallit, jotka käyttävät solun itsensä organisointia ilman scaffoldveja (esim. mikrokudokset). (Zuppinger 2015) Näistä hydrogeeleihin paneudutaan seuraavassa osiossa tarkemmin.

3D-viljelyjärjestelmiä on käytetty monissa tutkimuksissa kantasolututkimuksen ja erilaistumistutkimuksen aloilla. Kantasoluja käytetään laajalti kolmiulotteisten mallien solukkolähteenä mallinnettaessa kudokset rakenteita. Tämä on mahdollista erilaisiin käyttötarkoituksiin soveltuvien matriisien ja scaffoldien joustavan ja monimutkaisen rakenteiden avulla. Solujen erilaistumista ohjataan mm. muokkaamalla matriisien ja scaffoldien rakennetta, kasvutekijöitä sekä muita viljelyolosuhteita. (Ravi et al. 2014)

## 2.2 Hydrogeelit viljelyalustana

Hydrogeelit ovat hydrofiilisiä, ristosilloittuneita polymeeriverkkoja, jotka voivat absorboida vettä jopa tuhansia kertoja niiden kuivapainosta (Brandl et al. 2006). Veden imeytymiskyky hydrogeeleihin perustuu hydrogeelejä muodostavien polymeerien hydrofiilisyyteen. Joustavan ja pehmeän rakenteen sekä korkean nestepitoisuuden vuoksi hydrogeeleillä voidaan mallintaa todella hyvin oikeaa soluväliainetta (ECM) ja saada

näin tuotettua mahdollisimman bioyhteensopiva kasvatusalusta solujen viljelyyn. Hydrogeelien elastinen olemus myös minimoi tulehdusriskiä, sillä se ei joustavuutensa ansiosta ärsytä soluja. (Buwalda et al. 2014)

Hydrogeelit voivat olla kemiallisesti stabiileja tai lopulta hajoavia (Hoffman 2002). Hydrogeelit voidaan luokitella reversiibeiksi tai fysikaaliseksi geeleiksi ja irreversiibeiksi tai kemiallisiksi geeleiksi. Fysikaalisissa geeleissä verkot pidetään yhdessä molekyylien tai toissijaisten voimien kuten ionisten ristsidoksien ja vetysidoksien avulla. Kemialliset geelit koostuvat puolestaan kovalenttisesti silloitetuista verkoista. (Brandl et al. 2006) Hydrogeeleistä on olemassa myös monia erilaisia fysikaalisia muotoja. Hydrogeelien kemialliset, fysikaaliset sekä mekaaniset ominaisuudet riippuvat niiden valmistuksessa käytetyistä polymeereistä, jotka voivat olla luonnollisia, synteettisiä tai näiden yhdistelmiä. (Hoffman 2002)

Jotta hydrogeelit toimivat solujen kasvua ja erilaistumista ohjaavina alustoina, on niiden biokemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet oltava räätälöity tarjoamaan sopiva ympäristö solujen tarttumiselle, siirtymiselle, kasvulle sekä erilaistumiselle. Optimaalisten parametrien määrittämiseksi kudosten mekaaniset ominaisuudet voivat toimia vertailukohteina. Tämä edellyttää tarkkoja menetelmiä kudosten, valmistettujen hydrogeelien ja kudosteknisten rakenteiden mekaanisten ominaisuuksien mittaamiseksi. Materiaalien, kuten kudosten ja hydrogeelien mekaanisia ominaisuuksia analysoidaan mm. vetolujuuskokeella, puristustestillä ja dynaamisella mekaanisella analyysillä. (Hoffman 2002)

Biomateriaalien alkuperäiset mekaaniset ominaisuudet eivät ole ainoat solujen kohtalon kannalta ratkaisevat tekijät: ajan kuluessa substraattimekaniikka voi muuttua merkittävästi matriisin hajoamisen ja / tai ECM-makromolekyylien absorption vuoksi (Brandl et al. 2006). Hydrogeeleillä on monia eri käyttökohteita biolääketieteen alalla, erityisesti regeneratiivisessa lääketieteessä. Kasvatusalustoiden lisäksi niitä voidaan käyttää muun muassa scaffoldeina tarjoamaan rakenteellista tukea, lääkeaineiden kuljetuksessa, biosensoreina sekä infektioiden estämisessä. (Kaklamani et al. 2018)

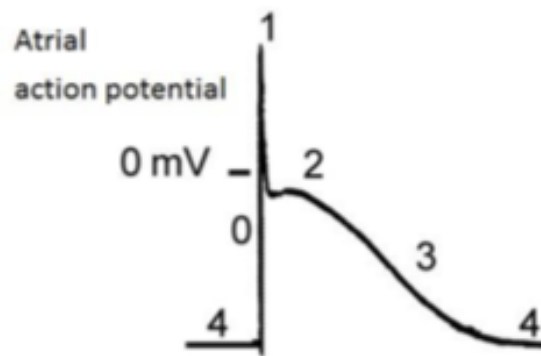
### **2.3 Sähköisesti aktiiviset solut**

Hermosolut sekä sydänlihassolut ovat sähköisesti aktiivisia soluja, eli soluja joissa esiintyy aktiopotentiaaleja. Aktiopotentiaalilla tarkoitetaan solukalvoa pitkin etenevää sähköisen impulssin aaltoa, jonka välityksellä signaali siirtyy solulta toiselle. Aktiopotentiaali perustuu ionikanavien kautta tapahtuviin ioni- eli elektrolyyttivirtoihin ja täten syntyvään hetkelliseen muutokseen kalvojännitteessä. Kalvojännitteellä tarkoitetaan potentiaaliero solukalvon sisäpuolen ja ulkopuolen välillä. Lepotilassa solukalvon sisäpuoli on negatiivisesti varautunut verrattuna ulkopuoleen. (Boron & Boulpaep 2013)



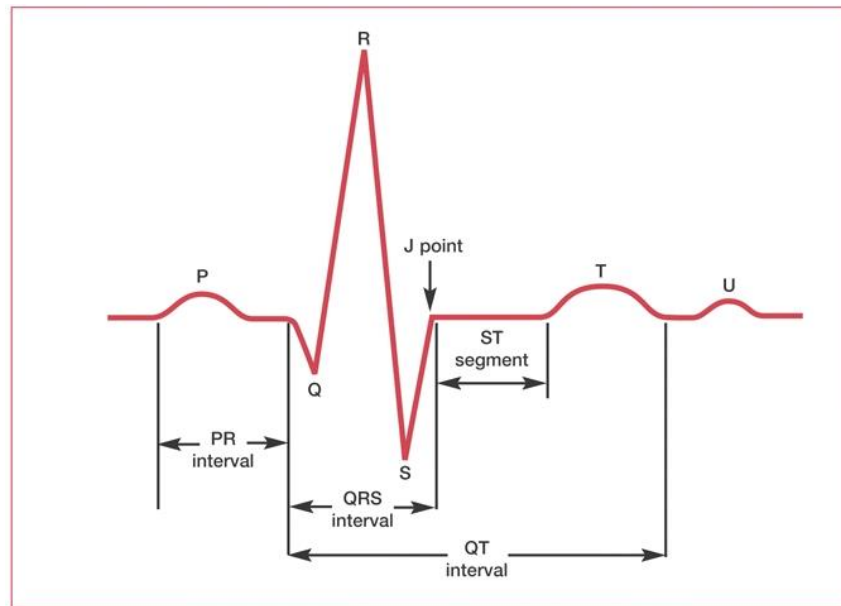
Aktiopotentialin muodostumiseen osallistuvia ioneja ovat natrium-, kalium- ja kalsiumionit. Ionikanavat joiden läpi nämä ionit liikkuvat voivat avautua tai sulkeutua jännitteen muutoksen, ligandin sitoutumisen tai mekaanisen muodonmuutoksen vaikutuksesta. Hermosoluissa aktiopotentialin saa aikaan ulkoinen ärsyke, kun taas sydämen toistuvista aktiopotentiaaleista vastaa sisäinen tahdistin, sinussolmuke. (Prajapati 2018)

Sydänsolun aktiopotentiali koostuu viidestä vaiheesta: 0) nopean depolarisaation vaihe 1) nopean aikaisen repolarisaation vaihe, 2) plateuvaihe, 3) nopean myöhäisen repolarisaation vaihe sekä 4) lepotentiali. Alla kuvassa 1. näkyy yllä mainitut vaiheet ja potentialin muutokset. Nopeassa aikaisessa depolarisaatiossa (Vaihe 0) kalvopotentiali kohoaa noin 30mV ja jänniteriippuvaiset natriumkanavat aukeavat. Vaiheessa 1 nopeat natriumkanavat sulkeutuvat ja jänniteriippuvaiset kaliumkanavat aukeavat, jonka seurauksena kaliumia virtaa ulos solusta ja kalvopotentiali pienenee. Vaiheessa 2 jänniteriippuvaiset kalsiumkanavat aukeavat ja kalsiumia alkaa virrata solun sisälle. Samanaikainen kalsiumin virtaus solun sisälle ja kaliumin virtaus solusta ulos hidastaa potentialin muutosta. Vaiheessa 3 kalsiumkanavat sulkeutuvat hitaiden kaliumkanavien pysyessä edelleen auki. Lopulta solu repolarisoituu ja palaa lepotilaan vaiheessa 4. (Prajapati 2018)



***Kuva 1. Cardiomyosyyttien aktiopotentialin profiili (Prajapati 2018).***

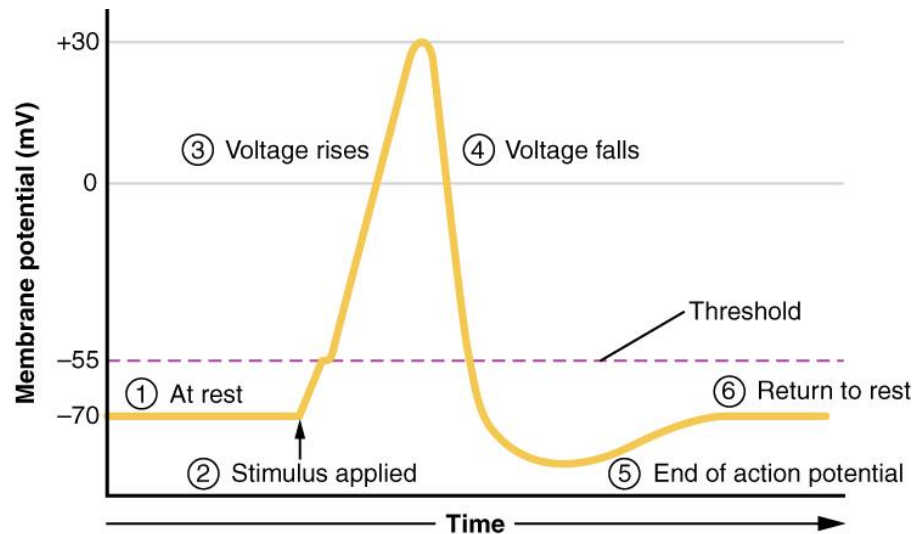
EKG eli elektrokardiogrammi kuvaa sähköisen impulssin kulkua sydämessä. Kuvassa 2 on esitetty EKG käyrän vaiheet. P-aalto kuvaa eteisten läpi kulkevaa impulssia, QRS-kompleksi kammioiden depolarisaatiota ja T-aalto puolestaan kammioiden repolarisaatiota. Ajanjakso QT kertoo kammioiden aktiopotentialin keston ja tämä aika on ihmisillä tyypillisesti 200-300 millisekuntia. (Asakura et al. 2015)



**Kuva 2. EKG käyrän vaiheet (Ashley & Niebauer 2014) .**

Neuroni koostuu neljästä osasta: dendriitit, sooma eli solukeskus, aksoni ja presynaptiset päätteet. Neuronien aktiopotentiaalista on erotettavissa vaiheet depolarisaatio, repolarisaatio sekä hyperpolarisaatio. Tyypillinen neuronin aktiopotentiaali on esitetty kuvassa 3. Impulssi saapuu neuroniin pääasiassa muista neuroneista dendriittien välityksellä. Hermoväliaineet sitoutuvat synapsiraosta vastaanottavan neuronin dendriiteissä (ja soomassa) sijaitseviin reseptoreihin ja voivat olla joko impulssin etenemistä estäviä tai vahvistavia. Jotta aktiopotentiaali saa alkunsa on hermovälittäjäaineiden (tai muun ulkoisen ärsykkeen kuten paineen) saatava aikaan kynnysarvon ylittävä kalvojännite, joka on neuroneilla yleisimmin noin  $-55$  mV. Tämä tapahtuu ligandiriippuvaisten tai mekaanisesta ärsykkeestä riippuvaisten natriumkanavien auetessa. Kynnysarvon ylittymisen jälkeen tapahtuu depolarisaatio ja impulssin eteneminen, jolloin jänniteherkät natriumkanavat aukeavat ja kalvopotentiaali kohoaa noin  $30$  mV:iin. Potentiaalin kohoaminen saa aikaan jänniteherkkien kaliumkanavien aukeamisen jonka seurauksena kaliumia virtaa ulos solusta ja kalvojännite laskee ja palautuu lepojännitteen tasolle eli tapahtuu repolarisaatio. Jänniteherkät kaliumkanavat ovat herkkiä  $-50$  mV jännitteelle eli ne aukeavat depolarisaation aikana ja sulkeutuvat repolarisaation aikana, kun jännite on  $-50$  mV. Jänniteherkät kaliumkanavat aukeavat ja sulkeutuvat huomattavasti hitaammin kuin esimerkiksi jänniteherkät natriumkanavat ja tämän seurauksena depolarisaation aikana jänniteherkät natriumkanavat ehtivät inaktivoitua juuri kuin kaliumkanavat aukeavat. Myös repolarisaation aikana kaliumia virtaa soluun vielä  $-50$  mV jälkeen hitaan sulkeutumisen vuoksi aiheuttaen hyperpolarisaation eli hetkellisen potentiaalin laskun alle normaalin lepojännitteen. Natrium-kalium pumppu palauttaa ionit oikeille puolille

solukalvoa aktiopotentiaalin jälkeen palauttaen neuronille normaalin lepopotentiaalin. (Grider & Glaubensklee 2019)



**Kuva 3. Tyypilliset neuronin aktiopotentiaalin vaiheet. (OpenStax, Anatomy & Physiology 2016).**

Neuronin aktiopotentiaalin kulku vastaa hyvin pitkälti sydänsolujen aktiopotentiaalin kulkua, mutta tapahtuu huomattavasti nopeammin, noin kahdessa millisekunnissa. Signaali etenee dendriiteistä soomaan, jossa tapahtuu signaalien summaaminen ja mahdollisesti varsinainen aktiopotentiaalin eteneminen. Jotta aktiopotentiaali etenee, on vahvistavien signaalien määrän oltava estäviä signaaleja suurempi. Aktiopotentiaali etenee soomasta aksonia pitkin presynaptisiin päätteisiin. Potentiaali etenee eri tavoin myeliinisoituneissa aksoneissa ja myeliisoitumattomissa aksoneissa. Myeliinisoituneissa aksoneissa oleva niin kutsuttu myeliinituppi toimii sähköä eristävänä kalvona ja nopeuttaa siten huomattavasti potentiaalin kulkua. Myeliinituppi ei ole jatkuva vaan siinä on aukkoja, joita kutsutaan Ranvier'n kuroumiksi. Ranvier'n kuroumat ovat aksonin kohtia, joissa on erityisen paljon jänniteherkkiä natriumkanavia. Kussakin kuroumassa membraani depolarisoituu ja aktiopotentiaali jatkaa kulkua eteenpäin kohti seuraavaa kuroumaa ikään kuin hyppien kuroumasta toiseen. Myeliinisoitumattomissa neuroneissa depolarisaation tulee siirtyä viereiseen alueeseen ja potentiaali nostetaan passiivisesti, kunnes kynnysjännite saavutetaan. (Grider & Glaubensklee 2019)

Impulssin välittyminen neuronilta toiselle presynaptisista päätteistä tapahtuu pääsääntöisesti kemiallisesti hermovälittäjäaineiden välityksellä. Presynaptisista päätteistä välittyy impulssin seurauksena hermovälittäjäaineita synapsirakoon, josta ne sitoutuvat edelleen vastaanottavan neuronin reseptoreihin. Yksi neuronin voi olla yhteydessä jopa tuhansiin muihin neuroneihin. Impulssi voi siirtyä neuronilta myös muille kohdekudoksille kuten lihaksille. Aktiopotentiaalin muoto vaihtelee merkittävästi

eri neuronityyppien välillä ja jopa saman neuronityypin välillä eri puolilla kehoa. (Grider & Glaubenskle 2019)

Kenttäpotentiaalin kesto (FPD) määritellään aikaväliksi ensimmäisestä terävästä poikkeamasta toisen positiivisen poikkeaman huippuun. Ensimmäinen poikkeama kuvastaa natriumkanavien aktivoitumista (depolarisaatio) ja toinen poikkeama K<sup>+</sup>-kanavan aktivoitumista (repolarisaatio). Kenttäpotentiaalin vaiheissa on yhteys aktiopotentiaalin vaiheisiin ja kenttäpotentiaalin kesto vastaakin aktiopotentiaalin kestoa sekä QT-aikaa elektrokardiogrammissa (EKG). (Asakura et al. 2015)

Solunsisäisten bioelektristen signaalien tallentaminen on keskeistä solujen ja soluverkkojen perusominaisuuksien ymmärtämiseksi, esimerkiksi hermo- ja sydänjärjestelmissä (Qing et al 2013). FPD:tä on käytetty arvioimaan repolarisointiaikaa ihmisessä alkion kantasoluista tai iPS-soluista peräisin olevissa kardiomyosyyteissä. Sen avulla voidaan arvioida muun muassa lääkeaineiden mahdollista vaikutusta QT-aikaan. (Asakura et al. 2015) Aktiopotentiaalin muoto on myös tärkeä indikaattori kantasoluista peräisin olevien kardiomyosyyttien solutyypistä ja kypsyemisvaiheesta (Boron & Boulpaep 2013).

### 3. ELEKTROFYSIOLOGISET MITTAUSMENETELMÄT

Aktiopotentialin ja ionivirtojen mittaaminen antaa välttämätöntä tietoa sähköisesti aktiivisten solujen toiminnasta. Useimmat nykyiset teknologiat neuronin- ja sydänsoluviljelmien tarkkailemiseksi *in vitro* -olosuhteissa perustuvat kaksikulotteisiin (2D) mikroelektrodirakenteisiin ja soluviljelmiin. Korkean tason biologisten järjestelmien monimutkaisuus vaatii kuitenkin kolmiulotteisia viljelmiä. (Bartsch et al. 2015) Kun solut hautautuvat paksuun solumassaan tai scaffoldiin, on 2D-menetelmistä tuttuja mittaus ja kuvantamismenetelmiä mukautettava tai vaihdettava. Tämän vuoksi tutkimus- ja kehitystyötä on tehty teollisuudessa ja akateemisissa korkeakouluissa, jonka tavoitteena on tehdä 3D-viljelystä suotuisaa sekä perinteisten 3D-menetelmien päivittäminen. (Zuppinger 2015)

Solu- ja biomateriaalikomponenttien jatkuvan kehityksen lisäksi anturitekniikassa ja videokuvien hankinnassa ja käsittelyssä tapahtunut kehitys auttaa mittaamaan fysiologisia parametreja 3D-viljelmästä. Mittaamisen haasteena on, että jotkin keskeisimmistä ominaisuuksista kuten liike sekä sähkö- ja kalsiumsignaalien muutokset tapahtuvat millisekunnin vaihteluvälillä ja vaativat näin hyvin tarkkaa analysointia. (Zuppinger 2015)

Käytetyimpiä teknologioita solujen sähköisen aktiivisuuden tallentamiseen 3D:ssä ovat intrasellulaariset mittaukset, joissa käytetään teräviä tai patch-elektrodeja, solunulkoiset tallenteet, joissa käytetään mikroelektrodimatriiseja (MEA), optinen kuvantaminen käyttäen apuna indikaattoreita (Spira & Hai 2013), (Asakura et al. 2015) sekä muut kuvantamismenetelmät kuten funktionaalinen magneettikuvaus ja elektroencefalografia. (Spira & Hai 2013) Seuraavaksi perehdymme näihin menetelmiin ja niiden etuihin ja heikkouksiin.

#### 3.1 Patch-clamp-menetelmä

Aktiopotentialien solunsisäinen tallentaminen hyödyntäen Patch-clamp-menetelmää on tällä hetkellä niin kutsuttu kulta-standardi-menetelmä solujen elektrofysiologian mittaamiseen (Asakura et al. 2015). Patch-clamp-tekniikan avulla voidaan mitata joko kalvojännitettä ja sen muutosta tai ionivirtaa. Lasielektrodi, jonka terävä kärki on täynnä elektrolyyttisuhteetliuosta mahdollistaa signaalin kulkemisen kahteen suuntaan solun ja monimutkaisen elektronisen järjestelmän välillä. Patch-clamp-tekniikassa on kaksi eri mittaustapaa: virta clamp (CC) sekä jännite clamp (VC). CC:ssä mitataan muutos

kalvojännitteessä virran pysyessä vakiona ja VC-tilassa mitataan ionivirran muutosta kalvojännitteen pysyessä vakiona. (Prajapati 2018)

Koko solun mittauksessa lasielektrodin ja solukalvon välille muodostetaan vahva sidos ja solukalvoon aiheutetaan miedolla imulla mikroskooppisen pieni, alhaisen resistanssin omaava reikä, jonka kautta solunsisäiset mittaukset voidaan suorittaa. Rei'itys-tekniikassa (perforated patch) hyödynnetään usein antibioottista vaikuttavaa ainetta ioneja läpäisevien huokoisten muodostamiseksi ja siten sähköisen yhteyden saamiseksi solukalvon sisäpuolelle. Nämä huokoiset läpäisevät vain pieniä yksiarvoisia molekyyliä kuten natriumia, kaliumia sekä klooria. (Prajapati 2018)

Koko solun patch-clamp on herkin tapa tallentaa toimintapotentiaaleja, mutta myös erittäin invasiivinen ja monimutkainen, mikä estää pitkän aikavälin tai laajamittaisen tallennuksen (Lin et al. 2014). Käyttö rajoittuu pieneen määrään soluja ja jatkuvan endogeenisen mekaanisen supistumisen vuoksi elektrodien ja solujen välinen kitka johtaa usein kalvon repeämiseen ja solukuolemaan (Fendyur & Spira 2012). Lisäksi käyttöä rajoittaa edelleen hinta, kärjen koko, pipetin uudelleenkäyttämättömyys sekä ioninvaihto sytoplasman kanssa (Qing et al 2013). Toisaalta erinomaiset signaalin ja kohinan väliset suhteet mahdollistavat välttämättömien biofysikaalisten parametrien poimimisen (Fendyur & Spira 2012). Patch-clamp-tekniikkaa käytetään laajalti sydän- ja verisuonitutkimuksissa, joissa hyödynnetään hiPS-soluista erilaistettuja kardiomyosyyttejä rytmihäiriöiden ja ionikanavien tutkimiseen sekä lääkeaineiden testaamiseen. (Prajapati 2018)

Koska patch-clamp-menetelmässä käytettävä lasielektrodi on liikuteltavissa, soveltuu menetelmä hyvin myös 3D- mallien mittaamiseen. Syvemmälle 3D- viljelmään tunkeutuminen on hankalampaa kuin 3D-viljelmän pinnalta mittaaminen.

### **3.2 Mikroelektrodimatriisit**

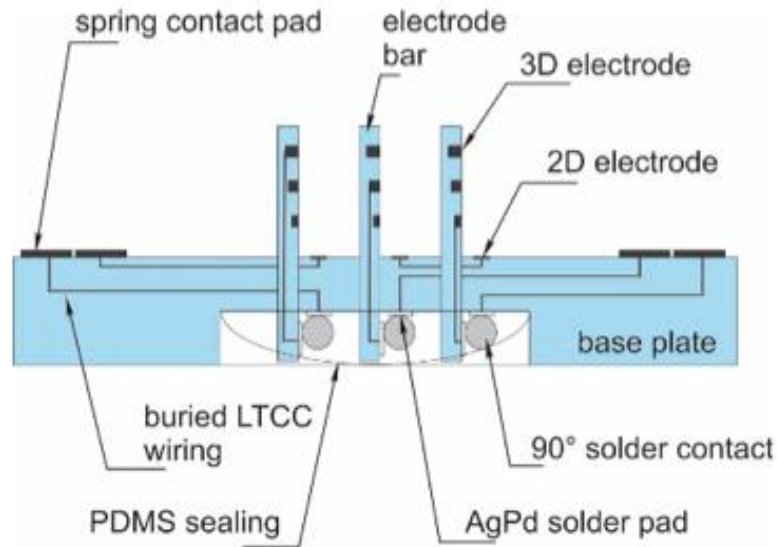
Mikroelektrodimatriisit (MEA) ovat laitteita sähköisen aktiivisuuden havaitsemiseksi sekä kudoksenäytteissä, että in vitro -soluviljelmissä (Bartsch et al. 2018). MEA:t in vitro -mittaukselle mahdollistavat solujen sisäisen eli intrasellulaarisen sekä ulkoisen eli ekstrasellulaarisen elektrofysiologisen aktiivisuuden talteenoton suurille solupopulaatioille solun ulkoisilla elektrodeilla (Bartsch et al. 2015), joita matriisissa saattaa olla yli 10 000 (Spira & Hai 2013). Elektrodien koko vaihtelee useimmiten 5-100 µm. Solun sisäisen aktiivisuuden mittaamisessa käytetään apuna paikallista elektroporaatiota (Lin et al. 2014). MEA-järjestelmiä ja ihmisen indusoimia pluripotentista kantasoluista peräisin olevia kardiomyosyyttejä käytetään usein karakterisoimaan lääkeaine-ehdokkaiden elektrofysiologisia vaikutuksia (Asakura et al.

2015). MEA:n avulla voidaan mitata kenttäpotentiaalien lisäksi johtavuusnopeutta sekä alkuperää (Prajapati 2018).

MEA:t pohjautuvat tasomaiselle alustalle ankkuroituihin elektrodeihin, joiden päälle solut viljellään ja kontakti elektrodien ja solujen välille muodostuu automaattisesti. Solut voidaan myös viljellä erillisellä alustalla, joka siirretään kosketuksiin matriisin kanssa. Perinteiset planaariset matriisit, jossa elektrodit sijaitsevat tasomaisessa levyssä, soveltuvat hyvin 2D-viljelmien analysointiin. Näiden lisäksi on kehitetty erilaisia myös 3D-viljelmiin soveltuvia matriiseja, joissa elektrodit ovat pylväsmäisiä ja mittaavat signaalia korkeammalta alalta. (Qing et al 2013) MEA:n käyttäminen on huomattavasti helpompaa ja omaa suhteellisen suuren suoritustehon verrattuna patch-clamp-menetelmään, mutta ei sovellu yksittäisten solujen ominaisuuksien mittaamiseen (Prajapati 2018).

Useampien tutkimusten, kuten Bartsch et al. (2015), mukaan alhaisen lämpötilan omaavat keraamiset monikerros (LTCC) teknologiat tarjoavat sopivan alustan nopeille biologisille reaktioille voivat tarjota integroituja bio-laitteisto-rajapintoja sähköisesti aktiivisissa soluviljelmissä (Bartsch et al. 2018). Järjestelmän perustana on monikerroksinen LTCC-levy, jossa on kultaelektrodit. LTCC-teknologioiden 3D-MEA:n olennaisia etuja ovat 3D-hybridilaitteiden helppokäyttöinen toteutus; erinomainen liuotinkestävyys ja kemiallinen stabiilisuus sekä stabiilisuus biologisten sovellusten edellyttämien sterilointiprotokollien suhteen, niiden lämmönsietokyvyn ansiosta. (Bartsch et al. 2015)

Näissä LTCC mikroelektrodimatriiseissa signaali kulkee solukalvosta soluviljelyaineella täytetyn kuopan läpi solun ulkoiseen kultaiseen elektrodiin. Itse elektrodi on usein päällystetty ekstrasellulaariseen matriisiin (esim. laminiini tai gelatiini) liittyvillä promootoriproteiineilla solujen tarttumisen parantamiseksi. Poikkileikkauskuvat LTCC MEA:sta on esitetty alla kuvassa 4. (Bartsch et al. 2015) Mitattujen signaalien laatu riippuu sähköisesti aktiivisten solujen ja elektronisen järjestelmän välisestä rajapinnasta ja vaatii toimiakseen luotettavia matalan impedanssin elektrodeja, sillä signaalin ja kohinan välinen suhde heikkenee impedanssin kasvaessa. Bartsch et al. (2018) selvitti tutkimuksessaan impedanssin kasvavan elektrodien halkaisijan pienentyessä ja lisäävän näin mittausepävarmuutta ja laminiini pinnoitteen puolestaan vähentävän tätä vaikutusta. (Bartsch et al. 2018) Myös suuremman solutiheyden on havaittu tuottavan selkeämpiä aaltomuotoja (Asakura et al. 2015).

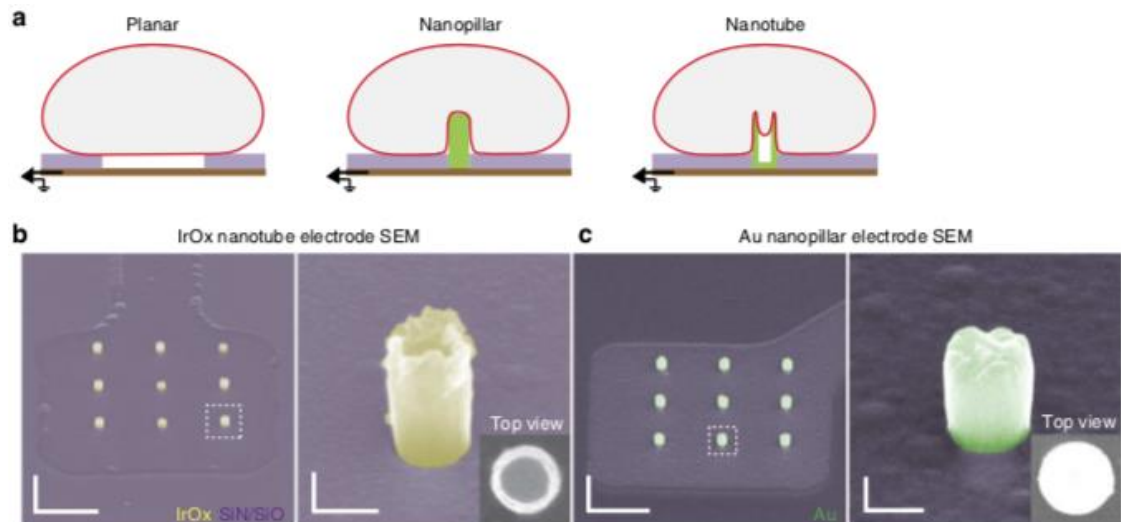


**Kuva 4. Poikkileikkauskuva Bartch et Al. käyttämästä LTCC MEA:sta (Bartch et al. 2015).**

MEA:t kärsivät usein alhaisesta signaalin ja kohinan suhteesta ja rajallisesta lähteiden erottelusta sekä alhaisesta signaalin voimakkuudesta (Boron & Boulpaep 2013). Yksittäiset anturit poimivat solun ulkoisia kenttäpotentiaaleja, jotka muodostavat useat solut ja jotka vaativat monimutkaista käsittelyä ja lajittelua. Näiden rajoitusten voittamiseksi useat laboratoriot ovat alkaneet kehittää uusia lähestymistapoja, jotka mahdollistavat monien yksittäisten solujen samanaikaisen sähköisen tallennuksen laadulla, joka on verrattavissa solunsisäisiin tallenteisiin terävillä tai patch-elektrodeilla. (Ojovan et al. 2015) Seuraavissa tutkimuksissa on käytetty erimuotoisia elektrodeja ja pinnoitteita paremman signaalin aikaansaamiseksi.

Lin et al. (2014) käyttivät tutkimuksessaan iridiumoksidi- (IrOx) nanoputkielektrodeja, joiden sisältä ontossa muotoilussa on hyödynnetty solukalvon luontaista ominaisuutta tutkia ympäristöään. Solut kiertyivät tiukasti elektrodien ympärille sekä sen onttoon sisustaan. Tämä solujen voimakas kiinnittyminen IrOx-nanoputkielektrodeihin ja solujen ja elektrodien välisen etäisyyden väheneminen johti tallennetun solunsisäisen signaalin amplitudin sekä mittauksen keston kasvuun verrattuna kultaisiin nanoputkielektrodeihin, joilla on sama pinta-ala. IrOx-elektrodeilla oli myös pienempi impedanssi sekä korkeampi varaustilavuus. Mittaus suoritettiin kasvatetuista rotan kardiomyosyyteistä, joita elektroporatoitiin paikallisesti sisäisen AP:n mittaamiseksi. Alla olevassa kuvassa 5 a on esitetty poikkileikkauskuvan avulla eroja eri elektrodityyppien välillä, kuvassa 5 b on IrOx-nanoputkielektrodi ja kuvassa c kultainen nanopilarielektrodi. (Lin et al. 2014)

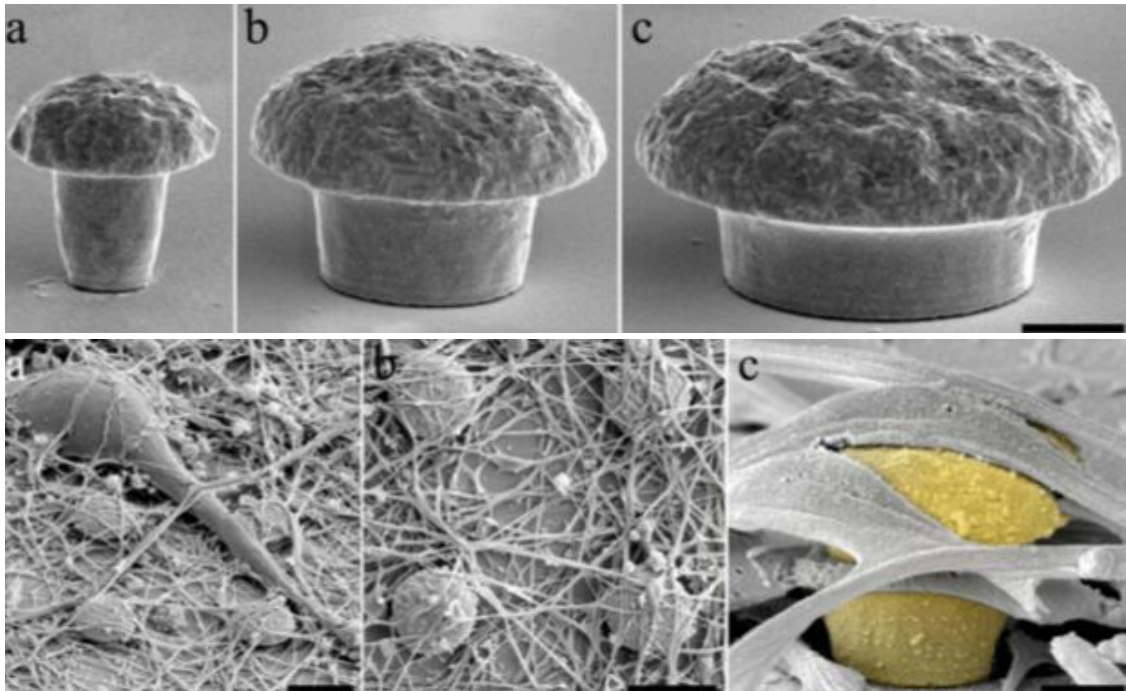




**Kuva 5. Nanoputki- ja nanopilarelektrodeja. (Lin et al. 2014).**

Fendyr et al. (2012) sekä Ojovan et al. (2015) tutkivat kultaisten sienen muotoisten mikroelektrodi pohjaisten (gM $\mu$ E) solun ulkopuolisten matriisien käyttöä solunsisäisten potentiaalien tallentamiseksi. Fendyr et al. käytti tutkimuksessaan viljeltyjä rottien kardiomyosyyttejä (CM) ja Ojovan et al. tutkimuksessaan viljeltyjä *Aplysia*-neuroneita. (Fendyr et al. 2012 ; Ojovan et al. 2015).

Tutkimusten perusteella viljellyn rotan CM:n ja laminiinilla päällystetyn, mikrometrin kokoisen gM $\mu$ E: n välillä muodostunut fyysinen liitos on riittävä, jotta yksittäisten myosyyttien tuottamia kenttäpotentiaaleja voidaan tallentaa viikkojen ajan ja muuntaa CM-gM $\mu$ E-konfiguraatio solunulkoisesta tallennuskonfiguraatiosta solunsisäisiin vaimennettuihin toimintapotentiaaleihin elektroporaatio pulssin avulla. Näin tallennettujen aktiopotentiaalien muoto ja kesto olivat samanlaisia kuin rotan CM:stä solunsisäisesti tallennettujen. (Fendyr & Spira 2012) Myös viljellyt *Aplysia*-neuronit sulkeutuvat tiiviisti gM $\mu$ E:ihin muodostaen korkean tiivistysresistanssin. Tämä yhdessä elektrodiin kohdistuvan neuronaalisen kalvon lisääntyneen johtokyvyn kanssa tekee mahdolliseksi tallentaa toimintapotentiaalit sekä synaptiset potentiaalit ominaisuuksilla ja biofysiikalla, jotka ovat samanlaisia kuin patch-tekniikalla mitatut. Tätä kutsutaan niin sanotuksi IN-CELL -tallennukseksi. (Ojovan et al. 2015) Alla olevassa kuvassa 6 näkyy elektrodeiden päällä kasvavia neuroneja.



*Kuva 6. Pyyhkäisyelektronimikroskooppikuvia gMuE-elektrodeista ja gMuE-matriisin päällä kasvavista neuroneista (Ojovan et al. 2015).*

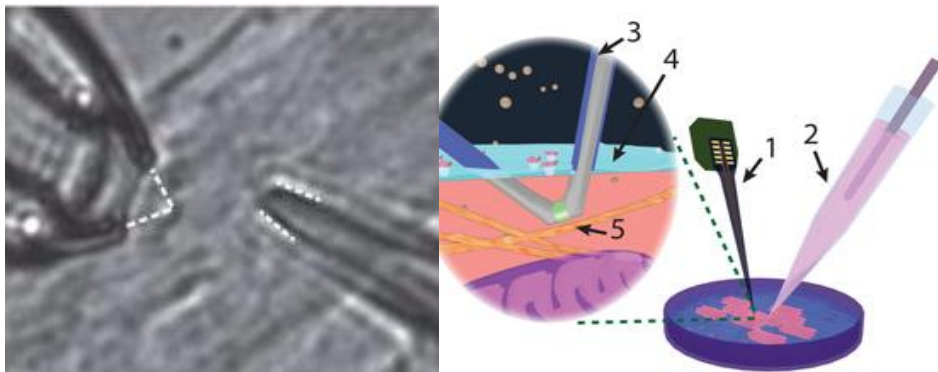
Näiden tutkimusten perusteella kultaisen sienen muotoisella MEA:lla on kyky toimia käteväenä työkaluna toistuville, samanaikaisille solunsisäisille tallenteille ja saada vastaavaa informaatiota, kuin patch-clamp-tekniikalla minimaalisella invasiolla.

### 3.3 Nanoluokan kenttävaikutuksen ilmaisimeen perustuvat menetelmät

Edellä esitetyt teknologiat, lukuun ottamatta patch-clamp-teknologiaa, pohjautuivat kaikki tasomaiselle alustelle ankkuroituihin elektrodihin, joiden päälle solut viljellään ja kontakti elektrodien ja solujen välille muodostuu sen perusteella, mitkä solut sattuvat osumaan elektrodien kohdalle (Qing et al 2013). Vapaasti seisovat, puolijohteista valmistetut nanolanka anturit, joiden taitettuun kärkeen on integroitu kanavatransistori (nanolankaFET), ovat uusi innovaatio solun aktiopotentiaalien mittaamiseksi. Vapaasti liikuteltavien nanolankaFET:ien avulla on mahdollista mitata tarkasti sekä ekstrasellulaarisista että intrasellulaarisista potentiaalia spesifeistä soluista tai solualueista. Intrasellulaarisissa mittauksissa anturin kärki tuodaan solukalvon sisäpuolelle. Ekstrasellulaarisissa mittauksissa signaalin ja kohinan välistä suhdetta on mahdollista säätää nanolankaFET:n ja solukalvon välisen kontaktin voimakkuuden avulla. Piistä valmistetut nanolankaFET:it (SinWFET) on käytetyin nanolankaFET-tyyppi. (De Vittorio et al. 2014)

NanolankaFET:ssä solun tuottama potentiaali saa hilan aktivoitumaan ja siten transistorin puolijohteen johtavaksi, jolloin transistorin lähteeltä kollektorille kulkeva sähkövirta on mitattavissa. Tämä mahdollistaa mittaamisen itsenäisesti ilman laitteen rajapinnan impedanssia ja mahdollistaa siten nanoluokan koon. Toisin kuin perinteisissä metallielektrodeissa, joissa impedanssin on oltava riittävän matala ja koon riittävän suuri hyvien mittaustulosten aikaansaamiseksi. (De Vittorio et al. 2014)

Qing et al. (2013) kehittivät vapaasti seisovan nanolankaFET:n, joka on liitetty sähköisesti ja mekaanisesti makroskooppiseen kahvaan. Mittauksessa kärki tuodaan mikroskoopin avulla hellään kosketukseen solukalvon kanssa. Tutkimusten perusteella samasta solusta tehdyt samanaikaiset mittaukset, jotka on tehty nanolankaFET- ja patch-clamp-koettimilla, osoittivat, että samat AP-amplitudi- ja ajalliset ominaisuudet tallennettiin ilman signaalin korjauksia. Kuvassa 7 on esitetty samanaikainen mittaustilanne nanolankaFET:iä (1) sekä patch-clamp-pipettiä (2) käyttäen. Kuvasta nähdään hyvin ero mittausten kärkien välillä. Verrattuna patch-clamp-tekniikkaan nanolankaFET on minimaalisen invasiivinen keino solunsisäisen AP:n tallentamiseen mikroskooppisen pienen kärjen ansiosta. (Qing et al. 2013)



**Kuva 7. Vapaasti seisova nanolankaFET (Qing et al. 2013)**

Taitettujen nanolankaFET:ien lisäksi on kehitetty nanoputkiFET-transistoreita, joissa kontakti solukalvon sisäpuolen kanssa tehdään ohuen nanoputken välityksellä. Näissä elektrodit sijaitsevat nanoputken vastakkaisessa päädyssä kuin solukalvon sisään tunkeutuva pääty. Nanoputki läpäisee solukalvon ja täyttyy solulimalla, josta elektrodeilla mitataan intrasellulaarinen potentiaali. Tätä muotoilua kutsutaan aktiiviseksi pii-nanoputki-transistoriksi (ANTT). Vapaasti liikuteltavien transistorien lisäksi nanoFET-teknologiaa voidaan hyödyntää MEA:ssa käytettävissä elektrodeissa. (De Vittorio et al. 2014)

### 3.4 Optinen kuvantaminen ja väriaineiden käyttö kuvantamisessa

Monet laboratoriot käyttävät optisia menetelmiä välttääkseen solunsisäisten elektrofysiologisten lähestymistapojen mahdollista häiriötä soluille niiden sähköisen aktiivisuuden seuraamisessa. Näissä menetelmissä voidaan käyttää apuna jännite- tai kalsiumherkkiä väriaineita eli indikaattoreita spesifien ionien tai varausten seuraamiseksi. Myös solujen fyysisien liikkeen, kuten kardiomyosyyttien sykkeen, perusteella tehtävällä analyysillä saadaan tärkeää informaatiota solujen sähköisestä toiminnasta. Optisen kuvantamisen menetelmät ovat ei-invasiivisia ja ne mahdollistavat useimmiten myös pidemmän aikavälin tarkkailun. (Fendyur & Spira 2012) Tehokkaat optiset kuvantamismenetelmät kuitenkin kärsivät useista rajoituksista, jotka tällä hetkellä estävät kokonaan korvaamasta elektrofysiologia lähestymistapoja sähköisen aktiivisuuden tutkimiseksi (Spira & Hai 2013). Lisäksi käytettävät indikaattorit voivat vaikuttaa solujen elektrofysiologisiin ominaisuuksiin (Fendyur & Spira 2012).

#### 3.4.1 Ca<sup>2+</sup>-kuvantaminen

Ca<sup>2+</sup>-kuvantamisessa hyödynnetään fluorisoivia kalsiumindikaattorivärejä joiden aktivoitumista tutkitaan fluoresenssimikroskoopin avulla. Ca<sup>2+</sup>-indikaattorivärit sitoutuvat ja vuorovaikuttavat ainoastaan vapaasti diffundoituviin Ca<sup>2+</sup>-ioneihin ja on hyvä muistaa, että suurin osa soluissa olevasta kalsiumista ei ole vapaana vaan tiukasti sidottuna erilaisiin puskureihin. Indikaattorit voidaan jaotella kemiallisiin sekä geneettisesti koodattaviin indikaattoreihin. Kemiallisia indikaattoreita ei tarvitse transfektoida soluihin, mutta niiden sijaintia soluissa on vaikea kontrolloida ja kohdistaa tiettyyn soluelimeen eivätkä ne sovellu pidempiaikaiseen mittaukseen. Synteettisiä kemiallisia indikaattoreita on markkinoilla useilla erilaisilla viritys- ja emissiospektreillä, kalsiumin sitoutumisaffiniteeteilla, fluoresenssilla sekä solujen läpäisevyydellä, joten erilaisiin sovelluksiin on helppo löytää sopiva. Uusimmat kehitysaskleet indikaattoreissa liittyvät geneettisesti koodattaviin fluorisoiviin orgaanisiin proteiiniperäisiin indikaattoreihin (FPI). FPI:t on johdettu vihreästä fluorisoivasta proteiinista (GFP). Näiden indikaattorien käyttö vaatii solujen geneettistä muokkausta esimerkiksi CRISPR-Cas9 tekniikalla. Vaikka teknologia geenien muokkaamiseksi on nykyään varsin kehittynyttä, se on silti aikaa vievää. Toisaalta, kun solulinja on kerran saatettu fluorisoivaksi sitä voidaan hyödyntää jatkossakin. Geneettisesti koodattavat FPI:t ovat helposti kohdistettavissa ja mahdollistavat pitkäaikaisen mittaamisen, mutta niitä on saatavilla vasta hyvin suppea valikoima ja niiden vasteaika on hidas verrattuna kemiallisiin indikaattoreihin. (Russell 2011)

Ca<sup>2+</sup>-kuvantamisessa mitattava fluoresenssin muutos vastaa muutosta kalsiumkonsentraatiossa. Fluorisenssin mittausta voidaan suorittaa käytettävästä indikaattorista riippuen ratiometrisesti tai ei-ratiometrisesti. Ratiometrisessä

menetelmässä indikaattorit osoittavat muutoksen emissio- tai virityspektrissä sitoutuessaan  $\text{Ca}^{2+}$ -ioniin ja kahden fluorisenssi intensiteetin välinen ero lasketaan. Eiratiometrisessä menetelmässä indikaattorit osoittavat lisääntyntä fluorisenssi intensiteettiä  $\text{Ca}^{2+}$ -ionin sitoutumisen vaikutuksesta. Intensiteettiä kokeen alussa verrataan intensiteettiin kokeen lopussa. Ratiometrinen menetelmä mahdollistaa haalistumisen, laserin voimakkuuden vaihtelun sekä tarkennuksen muutoksen aiheuttamien artefaktien oikaisun, mutta tekee datan analysoinnista työläämpää. (Prajapati 2018)

$\text{Ca}^{2+}$ -kuvantaminen on in vitro -kasvatusten lisäksi käytössä in vivo -testauksissa. Bidocci et al. (2016) tutkivat  $\text{Ca}^{2+}$ -kuvantamista in vitro hiiren astrozyttien 3D-viljelmissä, hiiren aivo viipaleissa sekä in vivo aikuisilla hiirillä. Heidän tutkimuksensa perusteella  $\text{Ca}^{2+}$ -kuvantaminen 3D-olosuhteissa antaa huomattavasti enemmän tietoa astrozyttien toiminnasta verrattuna 2D-olosuhteissa kuvantamiseen. In vivo -olosuhteissa mittauksissa saatu aktiivisuus oli hieman nopeampaa ja toistuvampaa verrattuna 3D viljelmiin. Tutkimus kuitenkin osoittaa 3D-viljeltyjen astrozyttien  $\text{Ca}^{2+}$ -kuvantamisen antavan välttämätöntä tietoa astrozyttien toiminnasta ja tulosten olevan verrattavissa in vivo -olosuhteissa saatuihin tuloksiin. (Bindocci et al. 2016)

### 3.4.2 Jänniteherkkien väriaineiden käyttö kuvantamisessa

Jänniteherkkien väriaineiden (VSD) käyttö kuvantamisessa on tehokas tapa potentiaalien mittaamiseen samanaikaisesti suurista solupopulaatioista millisekunnin ajallisella tarkkuudella. VSD-kuvantaminen perustuu fluorofori-molekyyleihin, jotka sitoutuvat soluihin ja muuntavat muutokset solun membraanijännitteessä valon fluoresenssiksi, mikä havaitaan fluoresenssimikroskoopin avulla. Kuten kalsiumkuvantamisessa myös VSD-kuvantamisessa käytettävät väriaineet eli indikaattorit voivat olla kemiallisia tai geneettisesti koodaavia. Nykyisin geneettisesti koodaavat väriaineet ovat käytetympiä ja myös suurin osa uusista tutkimuksista käsittelee geneettisesti koodaavia jänniteindikaattoreita (GEVI). GEVI:t mahdollistavat mittauksen toistettavuuden ja spesifien solujen ja soluelinten tarkkailun. Joissain tapauksissa GEVI:t kuitenkin aiheuttavat fototoksisuutta. (Inagaki et al. 2017)

VSD-kuvantaminen on mahdollista myös in vivo -olosuhteissa ja komiulotteisen kuvan saaminen onnistuu yhdistämällä fluoresenssin laminaarinen optinen tomografia- (FLOT) ja VSD-tekniikat. FLOT-kuvantamisessa käytetään erilaista erottelua valonlähteestä, joka mahdollistaa hajotetun valon samanaikaisen tunnistamisen eri syvyyksistä, jolloin saadaan 3D-kuva sähköimpulssien etenemisestä. Tutkimuksessaan Tang et al. (2016) käyttivät FLOT- ja VSD-tekniikoiden kombinaatiota nauhoittaakseen hiiren hermoston aktiivisuuksia aivokuoressa in vivo. (Tang et al. 2016)

### 3.4.3 Elektroninen impedanssi spektroskopia

Elektronisen impedanssi spektroskopian (EIS) on osoitettu olevan herkkä, merkkiaineeton ja minimaalisen invasiivinen reaaliaikainen tapa biologisten järjestelmien passiivisten sähköisten ominaisuuksien mittaamiseksi sekä *in vitro* että *in vivo*. EIS-menetelmässä mitataan näytteen sähköinen impedanssi käytetyn sähkövirran tai jännitteen funktiona. Impedanssi on sähkövirran tai jännitteen virtauksen muutosta vastustavan voiman mitta. Kudoksilla on monimutkainen sähköinen impedanssi, joka on riippuvainen kudoksen ominaisuuksista. EIS-mittaukset tuottavat kyseiselle kudokselle ominaisen spektrin ja muutokset spektrissä tarkoittavat muutosta kudoksen toiminnassa. Menetelmää voidaan käyttää soluviljelyiden mittausten lisäksi materiaalien ominaisuuksien tutkimiseen. Menetelmä perustuu käytettäviin biosensoreihin. Tyypillisesti kahden sensorin välille asetetaan potentiaaliero ja mitataan sähkövirta. (Kaklamani et al. 2018)

### 3.4.4 Liikkeen analysointiin perustuvat menetelmät

Kardiomyosyyttien liikkeen analysointi supistumisen ja rentoutumisen aikana antaa tärkeää tietoa sydämen mekaanisista ominaisuuksista. Yksi käytetty menetelmä on videomikroskoopilla kuvatun videokuvan analysointi ja sen pohjalta tehtävät laskelmat. Normaaleissa olosuhteissa supistumisen keston ja kenttäpotentiaalin välillä vallitsee lineaarinen suhde, jota kutsutaan elektro-mekaaniseksi (EM) -kytkennäksi. Sydän- ja verisuonitaudit muuttavat EM-suhdetta ja siten muutokset EM-suhteessa viittaavatkin usein sairauteen, vaikka EM-suhteen muutos saattaa johtua myös rytmihäiriöistä. (Prajapati 2018)

Videokuvien analysoinnissa voidaan käyttää apuna digitaalisen kuvan korrelaatiota (DIC) ja sen alatyyppejä pienintä neliöeroa (MQD) yksityiskohtaisemman informaation saamiseksi supistusten dynamiikasta ja ajoituksesta. Menetelmässä kuva jaetaan pienempiin osa-alueisiin ja vierekkäisten alueiden harmaasävyt on ristikorreloitu keskenään liikkeitä osoittavan siirtymäkartan saamiseksi. Ahola et al. (2014) tutkivat näiden menetelmien käyttöä yksittäisille hiPS-CM:lle. Heidän tutkimuksensa perusteella menetelmä soveltuu hyvin erityisesti yksittäisten CM:n toimintojen analysointiin, vaikka tulokset eivät vastanneet tarkkuudeltaan patch-clamp-tekniikalla saatuja. MQD-menetelmä on kuitenkin patch-clamp-menetelmään verrattuna huomattavasti helpompi toteuttaa, ei-invasiivinen ja mahdollistaa mittauksen pidemmältä aikaväliltä. Se ei myöskään vaadi väri- tai merkkiaineiden käyttöä. Lisäksi liikkeen analysoinnin avulla voidaan saada tärkeää informaatiota supistumisen ja lepotilan ajoituksista, joita ei saada muilla sähköistä aktiivisuutta analysoivilla menetelmillä. (Ahola et al. 2014)

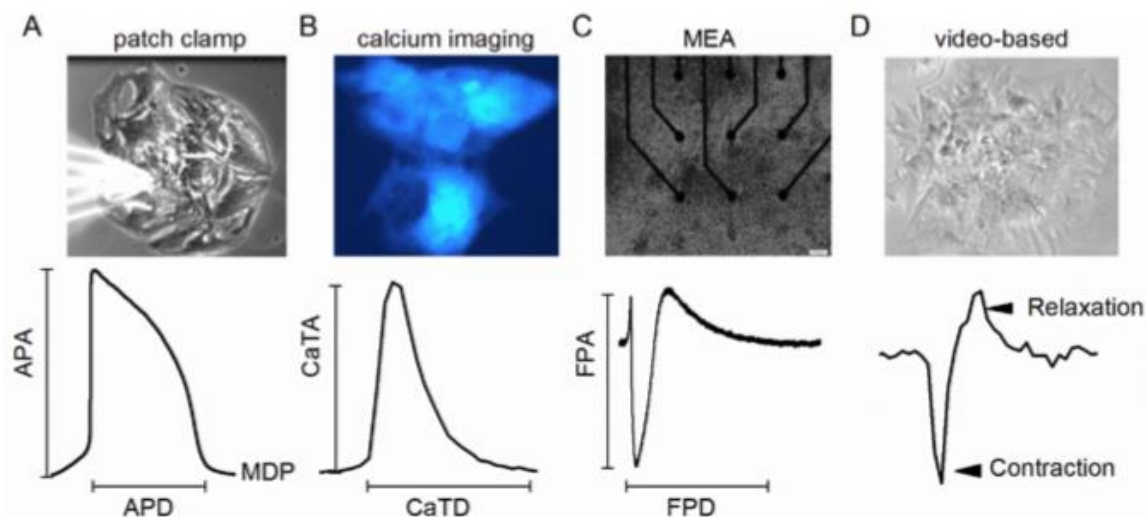
Sydämen sykettä voidaan analysoida myös atomivoimamikroskoopin (AFM) avulla ja siten saada tietoa sydämen supistumisvoimasta, syketaajuudesta sekä -kestosta ja solujen elastisuudesta (Prajapati 2018). Mekaaniset liikkeet siirtyvät AFM:n nanometri-

kokoisen sensorikärjen kautta AFM:n biosensorialustana toimivaan taipuisaan tukivarteen. Pinnan ja kärjen väliset vuorovaikutukset havaitaan siis tukivarren taipumisena. Taipuman mittauksessa käytetään apuna lasersäteiden poikkeama - järjestelmää, jossa mitataan valodetektoriin heijastuneen lasersäteiden poikkeamaa. (Nanoscience Instruments 2019) AFM ei sovellu pitkän aikavälin tarkkailuun, sillä se häiritsee solujen toimintaa jatkuvan fyysisen kosketuksen takia (Ahola et al. 2014).

## 4. POHDINTA

Eri mittaustekniikat voidaan karkeasti jaotella intrasellulaarisiin ja ekstrasellulaarisiin menetelmiin. Näiden lisäksi on käytössä optiseen kuvantamiseen ja solujen liikkeen analysointiin perustuvia menetelmiä. Intrasellulaariset menetelmät mittaavat solukalvon todellisen potentiaalin muutoksen, kun taas ekstrasellulaariset menetelmät mittaavat todellisen potentiaalimuutoksen johdannaista, joka heijastuu ulkoiseksi potentiaalimuutokseksi. Tämän seurauksena ekstrasellulaarisilla tekniikoilla saatu signaali on heikompi ja aktiopotentiaalin muoto/aika-skaalaus erilainen verrattuna todelliseen aktiopotentiaaliin. Ekstrasellulaarisilla mittauksilla saadaan kyllä tietoa aktiopotentiaalista ja sen ajoituksesta, mutta tarkkuus ei riitä ionikanavien tutkimiseen. Intrasellulaarisilla menetelmillä saadaan tietoa myös synapsisesta toiminnasta ja ne mahdollistavat selkeän solu-elektrodi rekisteröinnin. Ekstrasellulaariset mittaukset usein esitetään kaikkien elektrodien mittausten keskiarvona eli mitataan solujen keskiarvoista potentiaalia. Poikkeuksena tästä ekstrasellulaariset nanolankaFET:it, jotka pystyvät pienen kokonsa ansiosta mittaamaan potentiaalia muutaman solun tarkkuudelta. Intrasellulaariset mittaukset pystytään tekemään spesifisesti tietystä solusta. Yleisesti ottaen ekstrasellulaariset menetelmät ovat käytössä suuremmille solupopulaatioille ja intrasellulaariset menetelmät spesifien yksittäisten solujen tarkkailussa. Alla olevassa kuvassa 7 on esitettyinä mittaustuloksia kardiomyosyyteistä muutamalla eri menetelmällä. Kuvassa 7 A on patch-clamp -mittauksella saatu data kalvojännitteen muutoksesta, kuvassa 7 B on kalsium kuvantamisella saatu data  $Ca^{2+}$ -pitoisuuden muutoksesta aktiopotentiaalin aikana, kuvassa 7 C on MEA:lla tehdystä mittauksesta saatu kenttäpotentiaalin muutos ja kuvassa 7 D videokuvaan perustuvan analyysiin perusteella saatu informaatio kardiomyosyyttien mekaanisesta käyttäytymisestä. (Spira & Hai 2013, Qing et al. 2013)





**Kuva 8. Kardiomyosyyteillä tehtyjä mittauksia. (Prajapati 2018)**

Optiseen kuvantamiseen ja liikkeen analysointiin perustuvat menetelmät ovat ei-invasiivisia ja mahdollistavat pidemmänkin aikavälin tarkkailun, mutta niiden perusteella saatava informaatio ei yllä intrasellulaaristen mittausten tasolle (Fendyur & Spira 2012). Intrasellulaariset menetelmät puolestaan vaativat fyysisen kontaktin solun sisäpuolel ja elektrodin välille, mikä tekee menetelmistä invasiivisia verrattuna ekstrasellulaarisiin menetelmiin. Esimerkiksi patch-clamp-menetelmässä lasipipetin kärjen koko vaihtelee 0,2  $\mu\text{m}$ :sta jopa 5  $\mu\text{m}$ :iin saakka. Tällaisen reiän muodostuminen solun solukalvon vaurioittaa solua ja pipetin sisällä olevan elektrolyyttisen nesteen jääminen solukalvon sisäpuolella voi vaikuttaa solun toimintaan. Intrasellulaarisissa menetelmissä, lukuun ottamatta patch-clamp-tekniikkaa, hyödynnetään usein mikromanipulaattoreita, jotka mahdollistavat pääsyn solun sisäpuolelle esimerkiksi elektroporaation avulla. Verrattuna optisiin menetelmiin elektronista aktiivisuutta mittaavilla menetelmillä on parempi signaalin ja melun välinen suhde sekä ajallinen tarkkuus. Elektrodien tarve puolestaan vaikuttaa heikentävästi spatiaaliseen resoluutioon sekä saattaa häiritä solujen kasvua. (De Vittorio et al. 2014)

Viime vuosina on kehitetty tekniikoita, joiden tavoitteena on solunsisäisen tallennuksen saavuttaminen solunulkoisilla nanoelektrodeilla tai transistoreilla. Erityisesti ekstrasellulaaristen vertikaalisten nanoelektrodien on osoitettu kykenevän lähes intrasellulaarisia mittauksia vastaaviin tuloksiin hyvällä signaali-kohinasuhteella. Useimmat MEA:t mahdollistavat sekä ekstrasellulaarisen, että intrasellulaarisen mittaamisen hyödyntäen elektroporaatiota. MEA:t kärsivät kuitenkin usein heikosta spatiaalisesta resoluutiosta sekä alhaisesta signaalin voimakkuudesta. 3D-viljelmistä mitattaessa myös alhainen solutiheys on osoittautunut ongelmaksi. (Boron & Boulpaep 2013) Kultaisilla sienien muotoisilla elektrodeilla tehdyt tutkimukset osoittavat niiden kykenevän patch-clamp-tekniikalla saatuja mittauksia vastaaviin tuloksiin, kun solut viljeltiin suoraan laminiinilla päällystettyjen elektrodien päälle (Ojovan et al. 2015). Vastaavia tutkimuksia ei löytynyt 3D-hydrogeelissä viljellyistä soluista, mutta voisi

olettaa hydrogeelin vaimentavan saatavaa signaalia ja näin ollen hydrogeelin paksuuden vaikuttavan signaalin voimakkuuteen, joten signaalia tarvitsee hydrogeelistä mitattaessa mahdollisesti vahvistaa.

Myös hydrogeelin sähkönjohtavuus vaikuttaa mittauksen onnistumiseen. Mikäli hydrogeeli on sähköä johtava, ei edellä mainittu signaalin vaimentuminen hydrogeelin paksuuden vuoksi ole yhtä voimakasta. Sähkönjohtavuus voidaan saada aikaan muun muassa metallisilla nanopartikkeleilla, johtavilla polymeereillä, hiilillä tai hybridimateriaaleilla. Käytettyjä metallisia nanopartikkeleja ovat muun muassa kulta, hopea, muut jalometallit sekä metallioksidit. Jalometallit ovat passiivisia ja korroosion kestäviä ja soveltuvat siksi hyvin käytettäväksi lääketieteellisissä sovelluksissa. Partikkelit tuovat hydrogeeliin haluttua sähkönjohtavuutta sekä magneettisia ja antibakteerisia ominaisuuksia, mutta kärsivät usein pitkän ajan sytotoksisuudesta. (Min et al. 2018) Partikkelin materiaalin lisäksi muoto vaikuttaa sen hydrogeeliin tuomiin ominaisuuksiin. Yleisimmin käytetty muoto on pallomainen, mutta myös esimerkiksi kuutioita ja tähdenmuotoisia partikkeleja on testattu. Sähkönjohtavuuden lisäksi kulta- ja hopeapartikkeleilla on todettu olevan muitakin hyviä ominaisuuksia. Kultapartikkelit ovat potentiaalisia osteogeneettisiä agentteja luun muodostumisessa ja sekä kulta, että hopeapartikkelien on todettu edesauttavan kantasolujen erilaistumista mesenkymaaliseksi kantasoluiksi. Lisäksi ne lisäävät hydrogeelin mekaanista lujuutta. (Tan et al. 2019)

Johtavissa polymeereissä sähkönjohtavuuden aikaansaamiseksi useimmiten käytettäviä materiaaleja ovat polypyrroli (PPy), polyaniliini (PANi), polythiofeeni (PT), polyfenyleenivinyleeni (PPV) ja poly (3,4-etyleenidiokditiofeeni) (PEDOT). Eri materiaalit tuovat polymeeriin erilaisia ominaisuuksia ja soveltuvat eri käyttötarkoituksiin. Näistä ainakin PPy:tä, PANi:a sekä PT:tä on käytetty kudosteknologian tarkoituksiin. Hiilistä yleisimmin käytettäviä ovat grafeeni-, grafeenioksidi- sekä hiilinanoputket. Grafeeni on nimitys mineraalisen grafiitin yhdelle kerrokselle. Se on suprajohde ja omaa erinomaisen lämmönsietokyvyn sekä korkean mekaanisen lujuuden. Näiden ominaisuuksien vuoksi se sopiikin erinomaisesti käytettäväksi hydrogeeleissä tuomaan sähkönjohtavuuden lisäksi mekaanista tukea, vaikkakin saattaa aiheuttaa pidemmän aikavälin sytotoksisuutta. Sytotoksisia vaikutuksia voidaan kuitenkin ehkäistä erilaisten pinnoitusten avulla. Grafeenioksidi on bioyhteesopivaa sekä solujen lisääntymisen ja kiinnittymisen kannalta ominaisuuksiltaan erinomainen materiaali, mutta sen johtavuus sekä fysikaaliset ominaisuudet ovat rajalliset. Grafeenioksidin pelkistetyllä muodolla on kuitenkin havaittu olevan paremmat fysikaaliset sekä johtavat ominaisuudet johtavuuden jäädessä silti verrattain alhaiseksi. Hiilinanoputkia käytetään niiden sähköisten sekä fysikaalisten ominaisuuksien kuten alhaisen tiheyden vuoksi tuomaan hydrogeeleihin lujuutta sekä johtavuutta. Ne voivat kuitenkin aiheuttaa soluille oksidatiivista stressiä ja kärsivät siten sytotoksisista vaikutuksista. Hiilinanoputket ovat lupaava materiaali johtavien

hydrogeelien valmistukseen, mutta vielä tällä hetkellä sen haitat voittavat saavutettavat hyödyt. (Min et al. 2018)

Myös hydrogeelien valmistusprosessilla on vaikutusta sähkönjohtavuuteen. On tärkeää, että johtavaa materiaalia sekoittuu tasaisesti joka puolelle hydrogeeliä johtavuuden takaamiseksi, kuitenkin vaikuttamatta negatiivisesti hydrogeelin muihin ominaisuuksiin. Johtava materiaali voidaan lisätä osaksi hydrogeeliä ennen sen valmistusta tai lisätä valmiiseen hydrogeeliin jälkikäteen esimerkiksi pinnoituksen avulla. Signaalin kulun edistämisen lisäksi sähköä johtavilla hydrogeeleillä voidaan stimuloida kasvatettavia soluja. (Min et al. 2018)

NanolankaFET:n pieni koko sekä joustavuus mahdollistaa paikallisemman ja paremman spatiaalisen resoluution ekstrasellulaarisissa mittauksissa verrattuna perinteisiin MEA:ssa käytettäviin elektrodeihin. Liikuteltavuutensa vuoksi nanolankaFET soveltuu patch-clamp-tekniikan tavoin myös 3D-viljelmistä mittaamiseen ja mittauksen kohdistamiseen tiettyihin soluihin. (De Vittorio et al. 2014) Hydrogeelistä mitattaessa näillä menetelmillä ongelmaksi saattaa tulla hydrogeelin paksuus. Päästäkseen käsiksi soluihin on ensin tunkeuduttava läpi hydrogeelistä. Tämä rikkoo hydrogeelin rakennetta ja saattaa vaikuttaa sen toimivuuteen. Lisäksi hydrogeelin tulee olla läpinäkyvä, jotta mittauksen kohdistaminen haluttuun soluun on mahdollista. Myös väriaineiden käyttöön perustuvat kuvantamismenetelmät edellyttävät hydrogeeliltä läpinäkyvyyttä. Kun hydrogeeli on läpinäkyvä, on väriaineiden sitoutumista ja aktivoitumista mahdollista seurata hydrogeelin läpi fluoresenssimikroskoopin avulla.

Sydänlihassoluissa ja neuroneissa tapahtuva impulssin syntyminen ja kulku vastaavat peruspiirteiltään toisiaan, mutta impulssi etenee neuroneissa huomattavasti nopeampaa vauhtia kuin sydämessä. Impulssin keston on kardiomyosyyteillä noin 200ms ja neuroneilla noin 2ms. (Asakura et al. 2015, Grider & Glaubenskle 2019) Eräs mittausmenetelmiä koskeva soveltuvuuskysymys onkin niiden nopeus ja vaste-aika. Työssä esitetyistä menetelmistä ainakin patch-clamp:ia, nopeaa kalsium kuvantamista sekä joitain MEA-järjestelmiä on onnistuneesti käytetty myös neuroniviljelmistä mittaamiseen.

## YHTEENVETO

3D-viljelmien elektrofysiologiasta tiedetään vielä tällä hetkellä varsin vähän. Solujen toimintaa 3D:ssä on mitattu lähinnä tasomaisten 2D-elektrodimatriisien avulla. 3D-mittaamiselle on selkeä tarve tautien mallinnuksen, lääkeaineiden vaikutuksen ja toksisuuden määrittämiseksi sekä enemmän in vivo -olosuhteita muistuttavien kasvatusympäristöjen kehittämiseksi. Tarpeeksi suuren solutiheyden saavuttaminen, riittävän spatiaalisen resoluution aikaansaaminen sekä signaalin heikkous tekevät 3D:ssä mittaamisesta haastavaa. Hydrogeelistä mitattaessa mittaukseen vaikuttavat myös hydrogeelin ominaisuudet. Läpinäkyvyys mahdollistaa kuvantamisen väriaineiden ja mikroskoopin avulla ja sähkönjohtavuus parantaa signaalin kulkua soluista hydrogeelin läpi antureille. Hydrogeelin paksuus puolestaan vaikuttaa patch-clamp sekä nanoFET-mittauksiin, joissa mittaaminen perustuu vapaasti liikuteltavaan mittauskärkeen. Vapaa liikuteltavuus mahdollistaa mittauksen kohdistamisen, mutta paksun hydrogeelin läpäisy tekee mittauksesta hankalaa ja rikkoo hydrogeelin rakennetta vaikuttaen sen ominaisuuksiin.

Uusia potentiaalisia menetelmiä kehitetään jatkuvasti, mutta vielä tällä hetkellä 3D-hydrogeelistä tehtäviin mittauksiin ei löydy täysin sopivaa mittauskeinoa ja myös mittausdataa 3D-hydrogeeleistä tehdyistä tutkimuksista on lähes mahdoton löytää. Työssä esitellyistä menetelmistä usean tyyppisiä MEA-järjestelmiä, optisen kuvantamiseen perustuvia menetelmiä, patch-clamp-tekniikkaa sekä nanoFET-järjestelmiä on käytetty onnistuneesti 3D-viljelmistä mittaamiseen. Osa näistä menetelmistä soveltuu varmasti jo sellaisenaan mittaustuloksen aikaansaamiseksi myös hydrogeelissä tehdyistä viljelmistä. Seuraava askel onkin näiden menetelmien soveltaminen ja optimointi hydrogeelistä tehtäviin mittauksiin.

## LÄHTEET

Ahola, A., Kiviaho, A.L., Larsson, K., Honkanen, M., Aalto-Setälä, K. & Hyttinen, J. (2014). Video image-based analysis of single human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte beating dynamics using digital image correlation, *Biomedical engineering online*, Vol. 13(1), pp. 39. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-13-39>

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 and Toxicological Methods*, Vol. 75 pp. 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.04.002>

Ashley E.A., Niebauer J. *Cardiology Explained*. London: Remedica. (2004). Chapter 3, Conquering the ECG. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2214/>

Bartsch, H., Baca, M., Fernekorn, U., Müller, J., Schober, A. & Witte, H. (2018). Functionalized Thick Film Impedance Sensors for Use in In Vitro Cell Culture, *Biosensors*, Vol. 8(2), pp. 37. <https://doi.org/10.3390/bios8020037>

Bartsch, H., Himmerlich, M., Fischer, M., Demko, L., Hyttinen, J. & Schober, A. (2015). LTCC-Based Multi-Electrode Arrays for 3D in Vitro Cell Cultures, <https://doi.org/10.4416/JCST2015-00056>

Bindocci E., Savtchouk I., Liaudet N., Becker D., Carriero G. & Volterra A. (2016). Three-dimensional Ca<sup>2+</sup> imaging advances understanding of astrocyte biology. <https://doi.org/10.1126/science.aa8185>

Boron W. F. & Boulpaep E. L. (2009). *Medical Physiology: a Cellular and Molecular Approach*, 2nd edition. Saunders Elsevier.

Brandl, F., Sommer, F., Goepferich, A. (2006). Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior, *Biomaterials*, Vol. 28(2), pp. 134-146. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.017>

Buwalda, S.J., Boere, K.W.M., Dijkstra, P.J., Feijen, J., Vermonden, T. & Hennink, W.E. (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials, *Journal of Controlled Release*, Vol. 190 pp. 254-273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>

De Vittorio, M., Martiradonna, L. & Assad, J. (2014). *Nanotechnology and Neuroscience: Nanoelectronic, Photonic and Mechanical Neuronal Interfacing*, Springer Science +Business Media New York, 13-34 p. DOI: 10.1007/978-1-4899-8038-0.

Fendyur, A. & Spira, M.E. (2012). Toward on-chip, in-cell recordings from cultured cardiomyocytes by arrays of gold mushroom-shaped microelectrodes, *Frontiers in neuroengineering*, Vol. 5 pp. 21. <https://doi.org/10.3389/fneng.2012.00021>

- Grider M.H., Glaubenskleer C.S. (2019) Physiology, Action Potential. Updated 2019 Feb 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538143/>
- Hoffman, A.S. (2002). Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 54(1), pp. 3-12. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00239-3)
- Inagaki, S., Tsutsui, H., Suzuki, K., Agetsuma, M., Arai, Y., Jinno, Y., Bai, G., Daniels, M.J., Okamura, Y., Matsuda, T. & Nagai, T. (2017). Genetically encoded bioluminescent voltage indicator for multi-purpose use in wide range of bioimaging, *Scientific reports*, Vol. 7(1), pp. 42398. <https://doi.org/10.1038/srep42398>
- Kaklamani, G., Kazaryan, D., Bowen, J., Iacovella, F., Anastasiadis, S.H. & Deligeorgis, G. (2018). On the electrical conductivity of alginate hydrogels, *Regenerative biomaterials*, Vol. 5(5), pp. 293. <https://doi.org/10.1093/rb/rby019>
- Lin, Z.C., Xie, C., Osakada, Y., Cui, Y. & Cui, B. (2014). Iridium Oxide Nanotube Electrodes for Highly Sensitive and Prolonged Intracellular Measurement of Action Potentials, *Nature communications*, Vol. 5 pp. 3206. <https://doi.org/10.1038/ncomms420>
- MacDonald, R.A., Voge, C.M., Kariolis, M. & Stegemann, J.P. (2008). Carbon nanotubes increase the electrical conductivity of fibroblast-seeded collagen hydrogels, *Acta Biomaterialia*, Vol. 4(6), pp. 1583-1592. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.005>
- Min, J.H., Patel, M. & Koh, W. (2018). Incorporation of Conductive Materials into Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Polymers*, Vol. 10(10), pp. 1078. <https://doi.org/10.3390/polym10101078>
- Nanoscience Instruments. (2019). Atomic Force Microscopy. Saatavilla: <https://www.nanoscience.com/techniques/atomic-force-microscopy/>
- Ojovan, S.M., Rabieh, N., Shmoel, N., Erez, H., Maydan, E., Cohen, A. & Spira, M.E. (2015). A feasibility study of multi-site, intracellular recordings from mammalian neurons by extracellular gold mushroom-shaped microelectrodes, *Scientific reports*, Vol. 5(1), pp. 14100. <https://doi.org/10.1038/srep14100>
- OpenStax. (2016). Anatomy & Physiology: 12.4. The Action Potential. Saatavilla: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/12-4-the-action-potential>.
- Prajapati, C.K. (2018). Study of Hypertrophic Cardiomyopathy Using Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes, Tampere University Press.
- Qing, Q., Jiang, Z., Xu, L., Gao, R., Mai, L. & Lieber, C.M. (2013). Free-standing kinked nanowire transistor probes for targeted intracellular recording in three dimensions, *Nature nanotechnology*, Vol. 9(2), pp. 142-147. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.273>
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S.R., Anuradha, E. & Solomon, F.D.P. (2014). 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications, *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 230(1), pp. 16-26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
- Russell, J.T. (2011). Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 163(8), pp. 1605-1625. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00988.x>

Spira, M.E. & Hai, A. (2013). Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology, *Nature nanotechnology*, Vol. 8(2), pp. 83-94. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.265>.

Tan, H., Teow, S. & Pushpamalar, J. (2019). Application of Metal Nanoparticle-Hydrogel Composites in Tissue Regeneration, *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, Vol. 6(1), pp. 17. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010017>

Tang, Q., Tsytsarev, V., Frank, A., Wu, Y., Chen, C., Erzurumlu, R.S. & Chen, Y. (2016). In Vivo Mesoscopic Voltage-Sensitive Dye Imaging of Brain Activation, *Scientific reports*, Vol. 6(1), pp. 25269. <https://doi.org/10.1038/srep25269>

Weltner, J., Trokovic, R. & Otonkoski, T. (2014). *Indusoidut pluripotentit kantasolut lääketieteellisessä tutkimuksessa. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*. Viitattu 13.2.2019. Saatavissa: <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2014/8/duo11597>

Zuppinger, C. (2015). 3D culture for cardiac cells, *BBA - Molecular Cell Research*, Vol. 1863(7), pp. 1873-1881. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.036>