

Saana Seppälä

SOLUJEN HYÖDYNTÄMINEN ANTUREINA

Kandidaatintyö
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Tarkastaja: Tomi Ryyänen
Toukokuu 2020

TIIVISTELMÄ

Saana Seppälä: Solujen hyödyntäminen antureina (Utilizing cells as sensors)
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan tutkinto-ohjelma
Toukokuu 2020

Solut kykenevät reagoimaan nopeasti ympäristöönsä ja sen muutoksiin. Tässä työssä tutustutaan siihen, miten soluja voidaan hyödyntää antureissa. Soluantureiden toimintaperiaate on sama, kuin täysin elektronisten antureidenkin, mutta niissä primaarisen aistinelementin muodostaa solut. Solujen integroiminen antureihin mahdollistaa niiden fysiologisen tilan reaaliaikaisen ja toiminnallisen tutkimisen. Biologiset komponentit tuovat myös omat haasteensa. Haasteita aiheuttavat muun muassa solujen elinvaatimukset sekä niiden yhteensopivuus toisten komponenttien kanssa.

Luotettavien tulosten saamiseksi solujen biologisen toiminnan tulisi säilyä normaalina anturisyteemiin liittämisen jälkeen. Tästä syystä tapa, jolla solut ankkuroidaan systeemiin, tulee valita tapauskohtaisesti. Yleisimmät tekniikat ovat yhtenäinen kemiallinen pinnoitus sekä valikoiva kemiallinen pinnoitus. Yhtenäisessä kemiallisessa pinnoituksessa anturikomponentin pinnalle valmistetaan yhtenäinen, soluja puoleensa vetävä pinnoite. Koska koko pinta käsitellään samalla tavalla, solut voivat kiinnittyä mihin tahansa kohtaan pinnalla. Valikoivassa kemiallisessa pinnoituksessa pinnoite valmistetaan esimerkiksi mikrokontaktitulostuksella, jolloin saadaan valmistettua tiettyjä sijainteja, joissa soluja puoleensa vetävät materiaalit ohjaavat soluja kiinnittymään niihin. Muut alueet jätetään pinnoittamatta, jolloin ne hylkivät soluja.

Työssä keskitytään kahteen tapaan hyödyntää solujen sähköisiä ominaisuuksia. Ensimmäisenä esitellään solujen aktiopotentiaaleja hyödyntäviä anturityyppejä. Tällaisia anturikokonaisuuksia ovat muun muassa soluanturit, jotka hyödyntävät kanavatransistoreja (FET), mikroelektrodimatriiseja (MEA) tai valoa hyödyntäviä potentiometrisia antureita (LAPS) sekundaarisena komponenttina. FET-soluanturissa solujen muodostamat aktiopotentiaalit kytkeytyvät systeemin pinnalla, ja aiheuttavat vaihtelua eristekerroksen pintapotentialissa. Tämä taas vaikuttaa varauksenkuljettajien tiheyteen, jolloin myös mitattujen jännitteiden suuruus muuttuu. MEA:a hyödyntäessä solujen aktiopotentiaalit kytkeytyvät elektrodien pinnalla, jolloin mittaustulokset saadaan rekisteröityä. LAPS-soluanturi määrittelee tutkittavan alueen kohdistamalla siihen valoa. LAPS-systeemissä muodostuu valosähkövirta, joka reagoi systeemin pinnalla kytkeytyviin solujen aiheuttamiin potentiaaleihin. Anturikokonaisuutta valittaessa tulee arvioida sovelluskohteen vaatimukset, jotta voidaan löytää paras mahdollinen sekundaarinen komponentti. FET ja MEA sopivat sovelluskohteisiin, joissa rajattu määrä elektrodeja sekä mittaussijainteja riittää. LAPS on hyvä valinta kohteisiin, joissa halutaan tutkia mitä tahansa solua tai solurykelmää anturin pinnalla.

Toinen esiteltävä keino on sähköinen impedanssimittaus, jonka yleisin tekniikka on sähköinen solu-substraattimittaus (ECIS). Impedanssimenetelmät perustuvat solujen kykyyn levittäytyä alustalleen. Tällöin ne rajoittavat systeemissä kulkevaa virtaa, jonka seurauksena aiheutuu muutoksia systeemin resistanssiin sekä impedanssiin. Tällä tekniikalla voidaan tutkia erilaisten ärsykkeiden vaikutuksia solujen biologiseen käyttäytymiseen ja elävyyteen niiden levittäytymisen ja kasvun perusteella. Sähköiset impedanssimittaukset hyödyntävät sekundaarisena komponenttina muun muassa jo aiemmin mainittua mikroelektrodimatriisia.

Soluantureiden sovelluskohteissa tutkitaan solujen vasteita ärsykeille, joille ne altistetaan. Työssä esitellään kolme tutkimusta, jossa soluja on hyödynnetty aistinelementteinä. Ensimmäisessä tutkimuksessa tutkittiin raskasmetallien vaikutuksia solujen fysiologiaan. Toinen tutkimus käsittelee mahdollisuutta hyödyntää sähkökenttiä syöpähoidoissa ja viimeinen esiteltävä tutkimus käsittelee tutkimusta, jossa hyödynnettiin ensimmäistä kertaa rotan sydänsoluja keinotekoisena, biosähköisen kielen toteuttamisessa. Sovellukset havainnollistavat, kuinka soluanturit voivat luoda uusia mahdollisuuksia muun muassa biolääketieteen kehitykselle.

Avainsanat: bioanturi, soluanturi, solumittaukset

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. ANTURIN PERUSPERIAATE	3
3. SOLUT ANTURIKOMPONENTTEINA.....	4
3.1 Soluja hyödyntävän anturikomponentin perusominaisuudet	4
3.2 Solujen liittäminen mittausjärjestelmään.....	6
4. SOLUJA HYÖDYNTÄVIÄ ANTURITYYPPEJÄ JA NIIDEN TOIMINTA.....	8
4.1 Solujen sähköpotentiaalien mittaamiseen perustuvat soluanturit.....	8
4.1.1 Kanavatransistorit	9
4.1.2 Mikroelektrodimatriisit	10
4.1.3 Valoa hyödyntävä potentiometrinen anturi	12
4.2 Impedanssimuutoksiin perustuvat soluanturit.....	13
5. SOVELLUSESIMERKIT	16
5.1 Sydänsolujen hyödyntäminen raskasmetallien havaitsemisessa	16
5.2 Ulkoisten sähkökenttien vaikutus syöpäsoluihin	19
5.3 Sydänsoluja hyödyntävä biosähköinen kieli.....	22
6. YHTEENVETO.....	25
LÄHTEET	27

LYHENTEET JA MERKINNÄT

ECIS	engl. electric cell–substrate impedance sensing, sähköinen solu– substraatti impedanssimittaus
EIS	engl. electric impedance sensing, sähköinen impedanssimittaus
FET	engl. field effect transistor, kanavatransistori
HUVEC	engl. human umbilical vascular endothelial cells, ihmisen napalaskimon endoteelisolut
LAPS	engl. light-addressable potentiometric sensor, valoa hyödyntävä potentiometrinen anturi
MOS-FET	engl. metal oxide semiconductor field effect transistor, metallioksi- puolijohdekanvatransistori
MEA	engl. microelectrode array, mikroelektrodimatriisi
SKOV3	eräs munasarjasyöpäsoluminja

1. JOHDANTO

Soluja hyödyntäviä bioantureita voidaan kutsua soluantureiksi. Soluantureita voidaan hyödyntää monialaisesti, muun muassa biolääketieteen sovelluksissa. Solujen käyttö aistinelementteinä mahdollistaa sen, että anturit voivat havaita toiminnallista informaatiota solujen fysiologisesta tilasta sekä kerätä kvantitatiivista eli määrällistä tietoa. Solu on kokonaisuus, joka reagoi kaikkiin muutoksiin ympäristössään. Soluantureita ei siis tarvitse valmistella reagoimaan johonkin tiettyyn kohteeseen, joten niiden avulla voidaan havaita myös ennalta määräämättömiä kohteita. (Kovacs 2003; Wang et al. 2005) Solut muodostavat siis vasteen myös tuntemattomille aineille altistuessaan, jolloin voidaan esimerkiksi havaita joidenkin haitallisten aineiden olemassaolo. Samasta syystä voidaan myös tutkia erilaisten yhdisteiden muodostamien yhdistelmien aiheuttamia seurauksia solutasolla (Kovacs 2003). Soluanturit antavat kokonaisvaltaista tietoa solutason tilasta ja toiminnasta, arvioiden samalla solujen analyttistä toimintaa. Solujen hyödyntäminen tuo kuitenkin myös omat ongelmansa. Haasteita ovat muun muassa elävien solujen ylläpito sekä niiden oikeaoppinen liittäminen sekundaarisiin anturikomponentteihin kunnollisten signaalien saavuttamiseksi. (Wang et al. 2005)

Anturikokonaisuudessa elävät solut toimivat primaarisina anturikomponentteina, tai muuntajina, jotka muuntavat solutason signaalit sellaisiksi signaaleiksi, jotka sekundaariset anturi- tai muuntajakomponentit voivat mitata (Kovacs 2003). Käytännössä tämä tarkoittaa biologisten vasteiden muuntamista sähköisiksi signaaleiksi. Sekundaarinen komponentti voi olla esimerkiksi solunulkoinen elektrodi, kanavatransistori tai optinen anturi (Kovacs 2003). Solujen käyttö primaarisina tuntoeliminä mahdollistaa reaaliaikaisen ja tarkan informaation keräämisen solunulkoisten ärsykkeiden aiheuttamista fysiologisista muutoksista. Tämä taas mahdollistaa paremman ymmärryksen solutason mekanismeista. (Kiellerich-Pederson & Rozlosnik 2012)

Tämä työ käsittelee kehon ulkopuolisia mittauksia, eli *in vitro* mittauksia. Tällaisissa mittauksissa käytetään soluantureita, joissa hyödynnetään kehon ulkopuolisissa olosuhteissa viljeltyjä eläinsoluja. Työn tavoitteena on koostaa yleiskuva solujen sähköisiin ominaisuuksiin perustuvista soluantureista ja siitä, kuinka ne toimivat, keskittyen muutamaa yleisimmin käytettyyn soluanturikokonaisuuteen. Kyseisten

anturien toimintaa ja hyödyntämismahdollisuuksia tuodaan esille myös jo toteutettujen sovellusten avulla.

Työn toisessa luvussa taustoitetaan yleisesti antureiden toimintaperiaatetta, minkä jälkeen kolmannessa luvussa keskitytään eläviä soluja hyödyntävien bioantureiden ominaisuuksiin sekä niiden liittämiseen sekundaarisiin komponentteihin. Neljännessä luvussa tutustutaan erilaisiin soluanturityyppeihin, joiden toiminta hyödyntää aktiopotentiaaleja ja impedanssimuutoksia. Luvussa viisi käsitellään esimerkkejä soluantureiden sovelluskohteista ja tutustutaan myös niissä saatuihin tuloksiin. Viimeisenä luvussa kuusi on yhteenveto työstä.

2. ANTURIN PERUSPERIAATE

Anturi on mittausjärjestelmään kuuluva laite, joka pystyy reagoimaan mitattavaan kohteeseen ja sen tilan muutokseen. Reagoituaan kohteeseen, anturi muuttaa vasteensa sellaiseksi signaaliksi, joka voidaan myös käytössä olevan muun mittausjärjestelmän avulla havaita ja tulkita. Usein anturi koostuu useammasta komponentista, jotka osallistuvat anturin toimintaan. (Wang & Liu 2011)

Tuntoelin, johon viitataan usein myös primaarisena anturikomponenttina, huolehtii mitattavan suureen havaitsemisesta sekä vasteen muodostamisesta. Bioantureiden tapauksessa primaarisena komponenttina on jokin biologinen komponentti. Primaarisen komponentin muodostaman signaalivasteen muuntamisesta mittauslaitteiston vaatimaan muotoon, yleensä sähköiseen muotoon, huolehtii sekundaarisena komponenttina toimiva muunninkomponentti. Työssä käsiteltävien soluantureiden kohdalla fysiologiset signaalit muunnetaan sähköisiksi signaaleiksi. (Liu & Schutzer 2009)

Anturit voivat antaa tietoa muun muassa systeemin fysikaalisesta, kemiallisesta tai biologisesta tilasta, riippuen siitä mitä halutaan mitata (Wang & Liu 2011). Anturikomponentit ja niiden materiaalit valitaan aina sovelluskohteen ja sen vaatimusten mukaan. Anturin suunnittelussa täytyy huomioida myös tekijät, jotka voivat vaikuttaa anturin toimintakykyyn. Tällaisia ovat muun muassa ympäristöstä aiheutuvat häiriöt, kuten lämpötila ja sen vaihtelu sekä kosteus. (Randy 2013)

Tässä työssä käsiteltävät bioanturit antavat tietoa biologisten systeemien, tässä tapauksessa solujen, tilan muutoksista. Tällaisten anturikokonaisuuksien täytyy olla bioyhteensopivia, eli niiden täytyy olla turvallisia eläville organismeille. Soluantureiden tapauksessa materiaali- ja pinnoitevalinnoilla on normaalia suurempi merkitys.

3. SOLUT ANTURIKOMPONENTTEINA

Soluja hyödyntävissä bioantureissa biologinen komponentti koostuu kokonaisista, elävistä soluista. Näiden avulla voidaan saada toiminnallista informaatiota solujen toiminnasta niiden ympäristössä. Tässä toiminnallisella informaatiolla tarkoitetaan tietoa jonkin ärsykkeen vaikutuksista elävään systeemiin. Usein toiminnallista informaatiota tarvitaan analyttisten tulosten ohella, ja tällöin solujen hyödyntäminen anturikomponentteina on toimiva ratkaisu. (Bousse 1996)

Eläviä soluja hyödyntämällä saadaan muihin bioantureihin verrattuna enemmän informaatiota solujen fysiologisista tiloista, kuten ionikonsentraatioista, sähkövirroista ja jännitevaihteluista (Liu et al. 2014; Gui et al. 2017). Onnistuneita mittauksia varten täytyy kuitenkin huomioida soluantureiden perusominaisuudet sekä haasteet. Lisäksi solut täytyy liittää sopivin keinoin sekundaarisen komponentin pinnalle.

3.1 Soluja hyödyntävän anturikomponentin perusominaisuudet

Solujen hyödyntäminen tuntoelimenä mahdollistaa anturin korkean herkkyuden ja parhaimmillaan hyvän selektiivisyyden (Kiilerich-Pedersen & Rozlosnik 2012). Vaadittavasta selektiivisyydestä pitää kuitenkin huolehtia tarkasti, sillä solut sisältävät muun muassa useita entsyymejä, jotka voivat reagoida eri kohteisiin samanaikaisesti (Liu & Schutzer 2009). Yleisesti antureiden kohdalla mahdollisimman lyhyt vasteaika on tärkeä ominaisuus. Bioantureiden vasteajalla kuvataan sitä aikaa, minkä anturisyteemi reagoidessaan vaatii saavuttaakseen tasapainon ja voidakseen tuottaa luotettavan tuloksen. Reagoimisen jälkeen anturin täytyy palata takaisin niin sanottuun perustyöskentelytilaansa, ennen kuin se voi reagoida uudelleen. Tätä kutsutaan palautumisajaksi. (Asal et al. 2019) Lyhyt vaste- ja palautumisaika tarjoavat mahdollisuuden reaaliaikaisiin sekä luotettaviin mittauksiin.

Soluantureita voidaan käyttää niin yksittäisen solun, solukerroksen kuin soluverkostonkin tutkimiseen. Eri ärsykkeiden vaikutuksia soluihin voidaan mitata yksittäisenkin solun avulla, mutta esimerkiksi solujen levittäytymistä ja kasvua tutkivissa sovelluksissa useampien solujen käyttö on perusteltua. Koska soluja hyödyntämällä on mahdollista saada toiminnallista tietoa solujen fysiologisesta tilasta, voidaan tätä kautta

mahdollisesti myös selvittää solutason eri mekanismit joidenkin sairauksien taustalla. (Kiillerich-Pedersen & Rozlosnik 2012)

Solujen käyttö antureissa tuo hyötyjen lisäksi myös omat vaatimuksensa ja ongelmansa. Solulähtöiset sähköiset signaalit ovat heikkoja verrattuna esimerkiksi elektronisista järjestelmistä syntyviin sähköisiin signaaleihin. Tämän vuoksi solujen muodostamat signaalit ovat alttiita häiritsevälle kohinalle. (Svendsen et al. 2011) Solut vaativat selviytyäkseen niiden luonnollista elintilaa vastaavan kasvu- ja elinympäristön, minkä vuoksi keinotekoinen anturiympäristö vaatii jatkuvaa ja tarkkaa fysikaalisten ja kemiallisten parametrien kontrolloimista. Solut ovat herkkiä ympäristönsä muutoksille ja voivat vaurioitua helposti, mikäli olosuhteet muuttuvat epäideaalisiksi. Usein solut kuitenkin kestävät normaalirajoissa tapahtuvaa ympäristön ja sen tekijöiden, kuten pH:n, tilan vaihtelua. (Banerjee & Bhunia 2009; Liu & Schutzer 2009)

Sopivan elinympäristön lisäksi solujen metabolian tulee toimia normaalisti, ja solut tarvitsevatkin ravinteita jatkuvasti. Toimiakseen anturikomponentteina, solut täytyy kiinnittää sekundaarisen komponentin pinnalle. Kiinnittäminen tulee kuitenkin toteuttaa siten, että se ei häiritse tai rajoita solujen biologisia toimintoja. Jos solujen toiminnot rajoittuvat, ne voivat kuolla tai tuottaa epäluotettavia tutkimustuloksia. Solut myös muodostavat yleensä anturikokonaisuuden lyhytikäisimmän komponentin, joten ne määräävät anturin eliniän. Soluanturin elinikä on tästä syystä usein kokonaan elektronisista komponenteista muodostuvaa anturia lyhyempi. Verrattuna muihin bioantureiden, soluantureiden elinikä on kuitenkin usein pidempi. (Banerjee & Bhunia 2009; Liu & Schutzer 2009) Esimerkiksi entsyymejä hyödyntävien bioantureiden elinikä riippuu siitä, kuinka kauan entsyymi on aktiivinen. Koska entsyymi on proteiini, se saattaa melko herkästi denaturoitua ja deaktivoitua käytännön anturisolvelluksissa (Gouda et al. 2002) Lisäksi solut muodostavat monipuolisen kokonaisuuden, joten ne pystyvät myös mahdollistamaan kattavampien tuloksien saamisen.

Soluantureiden yhteydessä puhutaan usein lyhyestä vasteajasta. Johannessen et al. (2002) onnistuivat kehittämään nanokalorimetrinen bioanturin, joka hyödynsi jäniksen sydänsoluja. Tämän soluanturin vasteaika oli 12 ms. Kuitenkin kokonaisaika, joka soluanturilta kuluu kahden reaktion välillä, riippuu vasteajan lisäksi myös palautumisajasta. Myös palautumisajan taustalla vaikuttaa biologiset ominaisuudet: reagoimisen ja vasteen muodostamisen jälkeen solujen täytyy palata takaisin normaalitilaansa ennen kuin ne voivat esimerkiksi tuottaa uuden aktiopotentialin. Tämä johtaa siihen, että myös koko anturi tarvitsee vähintään saman verran aikaa palatakseen tilanteeseen, josta se voi luotettavasti muodostaa uuden vasteen ja signaalin. (Liu &

Schutzer 2009) Tämän vuoksi soluanturin reagointinopeus voi jäädä hitaammaksi kuin täysin elektronisen anturin, joka ei sisällä biologisia komponentteja.

3.2 Solujen liittäminen mittausjärjestelmään

Solut täytyy ankkuroida sekundaarisen komponentin pinnalle, jotta soluanturit voidaan toteuttaa suunnitelmien mukaan toimivaksi kokonaisuudeksi. On myös tärkeää toteuttaa solujen kiinnittäminen siten, että niiden biologinen toiminta säilyisi mahdollisimman normaalina. Näin pystytään varmistamaan, että solujen reaktiot sekä tutkimustulokset ovat luotettavia. (Liu et al. 2014) Ajan mittaan tutkimuksissa on huomattu, että solujen täsmällinen kiinnittäminen parantaa koko soluanturin toimintaa. Sen on todettu parantavan muun muassa soluanturin vasteaikaa sekä mahdollistavan paremman korrelaation kohdeanalyyttien konsentraatioihin. (Wasilewski et al. 2019)

Koska lasi- ja piirakenteiden mikrovalmistustekniikat ovat kehittyneet nopeasti, niitä suositetaan myös soluantureissa solujen kiinnittymispintamateriaaleina (Liu et al. 2014). Yleensä lasi- ja piirakenteiden pinnalle on muodostettu vielä ohut elektrolyyttikerros, jonka pinnalla solujen muodostamat vasteet kytkeytyvät. Signaalien kytkeytyessä systeemin pinnalle, voivat myös sekundaariset komponentit havaita ne. (Liu & Schutzer 2009) Yleisimmin solujen ankkuroiminen komponentin pinnalle tapahtuu solunulkoisten ankkurointimetodien avulla. Nämä jakautuvat tyypillisesti kahteen kategoriaan: yhtenäinen kemiallinen pinnoitus sekä valikoiva kemiallinen pinnoitus. (Liu et al. 2014)

Yhtenäisessä kemiallisessa pinnoituksessa pinta käsitellään kauttaaltaan samoja materiaaleja ja komponentteja käyttäen, jolloin muodostuu koko pinnan peittävä yhtenäinen pinnoite. Pinnoitemateriaalit ovat soluja puoleensa vetäviä, jolloin solut voivat kiinnittyä pinnalla mihin tahansa kohtaan. Tällöin kiinnittymissijainteja ei myöskään pysty kontrolloimaan kovin tarkasti. Metodi hyödyntää tavallisesti peptidejä tai muita biologisen soluväliaineen komponentteja. Nämä komponentit voi parantaa pinnan yhteensopivuutta solujen kanssa, ja sitä kautta auttaa soluja kasvamaan ja kytkeytymään anturin toimintaan paremmin. Toisaalta soluväliaineen komponenttien hyödyntäminen voi myös heikentää pinnan stabiiliutta, sillä biologisina komponentteina ne voivat reagoida ei-halutulla tavalla altistuessaan muun muassa vaihtelevalle lämpötilalle tai mekaaniselle leikkausjännitykselle. Tämä metodi voi myös johtaa vuotovirran syntymiseen, joka voi häiritä solujen sähköistä toimintaa sekä heikentää halutun signaalin ja kohinan suhdetta. (Liu et al. 2014)

Valikoivassa kemiallisessa pinnoituksessa pinta käsitellään eri mikrovalmistustekniikan keinoilla. Keinoina voidaan hyödyntää esimerkiksi mikrokontaktitulostusta tai mustesuihkutulostusta. Näin anturikomponentin pinnalle saadaan muodostettua kohtia, joiden pinnoitemateriaali vetää soluja puoleensa ja ikään kuin ohjaa ne kiinnittymään tiettyihin sijainteihin. Muut alueet jätetään pinnoittamatta, jolloin ne hylkivät soluja ja solut eivät kiinnity näihin kohtiin. (Liu & Schutzer 2009) Käytetyt materiaalit ovat usein sellaisia, joiden kanssa solut kykenevät muodostamaan kovalenttisia sidoksia. Kovalenttiset sidokset mahdollistavat tiukan kiinnittymisen. Solujen kiinnittämisen ohjaaminen pinnoituksen avulla parantaa kiinnittymisen tarkkuutta, jolloin soluvasteiden vastaanottaminen ja mittaaminen helpottuu. Tapa, millä solut ankkuroidaan sekundaarisen anturikomponentin pinnalle, täytyy kuitenkin valita aina tapauskohtaisesti, sillä samat keinot eivät sovi kaikkiin sovelluskohteisiin. (Liu et al. 2014)

4. SOLUJA HYÖDYNTÄVIÄ ANTURITYYPPEJÄ JA NIIDEN TOIMINTA

Tuntoelimenä toimiessaan solut reagoivat ulkoiseen stimuluseseen eli ärsykkeeseen. Stimulus voi olla muun muassa sähköinen tai kemiallinen ärsyke, lääkeaine tai reseptoriin sitoutuva ligandi. Reagoituaan ärsykkeeseen solut muodostavat vasteen, joka voidaan havaita muun muassa muutoksena solunulkoisissa molekyyli- tai ioneissa, aktiopotentiaalina tai impedanssimuutoksena. (Liu & Schutzer 2009)

Solujen muodostamia vasteita hyödyntäviä antureita on erilaisia, ja ne luokitellaan usein niiden toimintaperiaatteiden mukaan (Banerjee et al. 2010). Seuraavissa alaluvuissa kuvaillaan pääpiirteittäin yleisesti käytössä olevien sähkökemiallisten soluantureiden peruseriaatteet. Tällaisia soluantureita ovat muun muassa aktiopotentiaaleihin ja solujen aiheuttamiin impedanssimuutoksiin perustuvat anturityypit.

4.1 Solujen sähköpotentiaalien mittaamiseen perustuvat soluanturit

Bioanturit voivat hyödyntää soluja, jotka kykenevät tuottamaan aktiopotentiaaleja. Solujen aktiopotentiaalit toimivat tällöin vasteina ärsykeille ja fysiologisen tilan muutoksille, ja ne antavat funktionaalista informaatiota solujen tilasta (Pancrazio et al. 1999). Aktiopotentiaaleja muodostavia soluja ovat esimerkiksi neuronit eli hermosolut sekä kardiomyosyytit eli sydänsolut. Vaikka sydänsolujen ja hermosolujen aktiopotentiaalimekanismit eroavat hieman toisistaan, niiden peruskonsepti on silti sama: aktiopotentiaali aiheutuu ohjattujen ionivirtojen kulkiessa solukalvon läpi (Kovacs 2003). Muutos solukalvon potentiaalissa muuttaa ionien kulkua kalvon läpi, ja päinvastoin (Hondroulis et al. 2013).

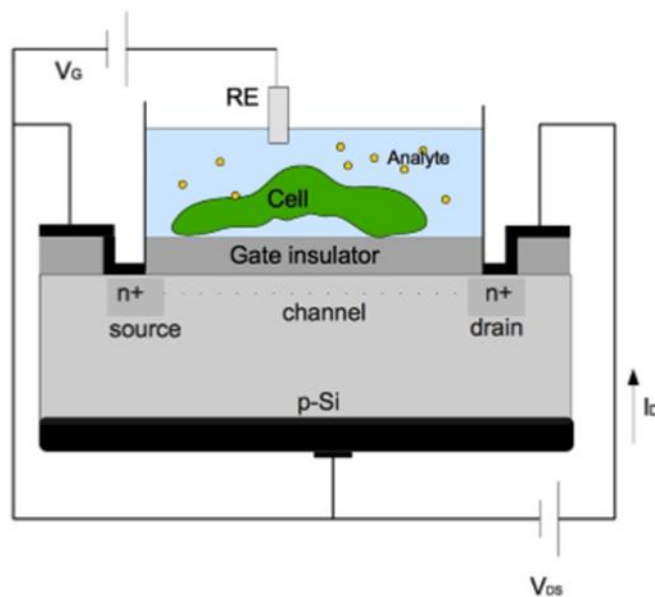
Viljellyt solut altistetaan halutulle ärsykkeelle, kuten valolle tai elektroniselle signaalille (Banerjee et al. 2010). Ärsykkeeseen reagoiminen saa aikaan aktiopotentiaalinn, ja nämä solupotentiaalinn muutokset kytkeytyvät anturin pinnalla. Kytkeytyneet potentiaalimuutokset pystytään näin havaitsemaan ja muuntamaan jatkokäsittelyä varten sopiviksi signaaleiksi. Kuten aiemmin mainittiin, anturin pinnalle valmistetaan usein ohut elektrolyyttikerros, jolla voidaan parantaa solujen kiinnittymistä sekä signaalinn kytkeytymistä sekundaarisen anturikomponentinn pinnalla. Tutkimuksissa on huomattu, että jos elektrodit liitettäisiin suoraan lasi- tai silikonisubstraatin päälle,

solu- ja elektrodivuorovaikutusten tarkka kontrolloiminen ei välttämättä onnistu. (Ding et al. 2008) Tähän vaikuttaa osaltaan se, että pii ja lasi eivät ole ideaalisia alustoja solujen kiinnittymiseen (Liu & Schutzer 2009). Parempi kiinnittyminen auttaa myös paremman signaali-kohina-suhteen saavuttamisessa, jolloin tulokset ovat parempilaatuisia. (Wang et al. 2005) Aktiopotentiaaleja hyödyntävissä soluantureissa voidaan käyttää sekundaarisena anturikomponenttina esimerkiksi kanavatransistoria (FET), mikroelektrodimatriiseja (MEA) tai valoa hyödyntävää potentiometrissa anturia (LAPS) (Ding et al. 2008).

4.1.1 Kanavatransistorit

FET-soluanturit voidaan jakaa yleisesti kahteen ryhmään: solujen metaboliaa mittaavat anturit ja solunulkoisia potentiaaleja mittaavat anturit (Liu & Schutzer 2009). Tässä osiossa perehdytään solunulkoisia potentiaaleja mittaaviin anturityyppeihin, joiden avulla voidaan havainnoida aktiopotentiaaleja pitkäaikaisesti ja soluja tuhoamatta. FET-soluantureiden toiminta perustuu kenttäefektiin (engl. field effect). Käytännössä tämä tarkoittaa, että kanavatransistorin sisällä kulkevia varauksenkuljettajia saadaan ohjattua sähkökentän avulla. (Kiilerich-Pedersen & Rozlosnik 2012)

FET koostuu usein kolmesta liitosjohdosta, jotka ovat hila, nielu ja lähde. Kuvassa 1 on havainnekuva soluanturista, jossa sekundaarinen komponentti on kanavatransistori. "RE" tarkoittaa referenssielektrodiä, " V_G " hilaan kulkevaa jännitettä, " V_{DS} " nielulta lähteeseen kulkevaa jännitettä ja " I_D " nieluvirtaa. (Kiilerich-Pedersen & Rozlosnik 2012).



Kuva 1. Solu-FET -anturi (Kiilerich-Pedersen & Rozlosnik 2012).

Tällä hetkellä FET-soluantureissa käytetään yleisesti n-kanavaista avaustyyppin metallioksidipuolijohdekanavatransistoria (MOS-FET). Muista kanavatransistoreista poiketen MOS-FET:issä on myös neljäs liitosjohto, joka on substraatti. Kun MOS-FET:in hilaan syötetään positiivinen esijännite, alkavat hilan positiiviset varaukset vetämään puoleensa vähemmistövarauksenkuljettajia. Tällöin muodostuu johtava kanava, joka liittää transistorin lähteen ja nielun yhteen. Tätä kanavaa kutsutaan inversiokerrokseksi, ja siinä solujen ja piin väliset vuorovaikutukset vaikuttavat virran muutoksiin. Jos esijännite syötetään lähteen ja nielun välille, hilajännitteen muutos määrää nielu-lähde -virran muutokset. (Liu & Schutzer 2009)

MOS-FET:iin liitetyt solut ovat viljelty komponentin pinnalle hilaeristemateriaalin, kuten piidioksidin tai piinitridin, päälle. Kun solut reagoivat ärsykkeeseen ja muodostavat aktiopotentiaalin, se nostaa eristekerroksen pintapotentiaalia. Tämä aiheuttaa muutoksia varauksenkuljettajaelektronien tiheydessä, mikä taas vaikuttaa saatuihin jännitteisiin. Systemin kalibrointijännite saadaan hilasta, johon on kytketty referenssielektrodi. Tämän oletetaan vastaavan solunulkoista potentiaalia, joka korreloi hyvin solukalvon potentiaalin kasvun kanssa ja toimii siten vertailukohteena tuloksille. FET-soluanturit sopivat sovelluksiin, missä on tarpeellista tutkia vain ennalta määrättyjä sijainteja, sillä mittaussijainnit rajoittuvat komponentin hilaelektrodille. (Liu & Schutzer 2009)

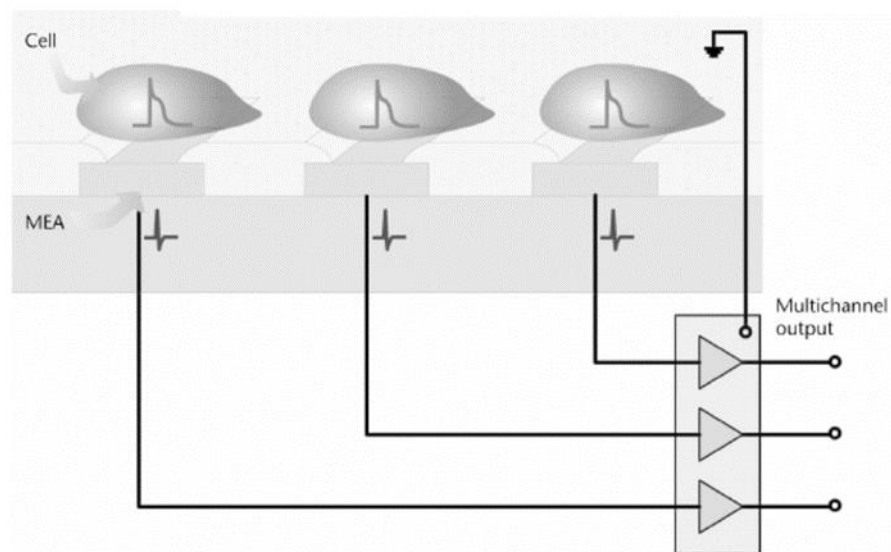
4.1.2 Mikroelektrodimatriisit

Kanavatransistorin tapaan, mikroelektrodimatriisin yhdistäminen soluviljelykammioihin takaa tunkeutumattoman, pitkäaikaisen ja laaja-alaisen mahdollisuuden mitata aktiopotentiaaleja (Xiang et al. 2007). Mikroelektrodimatriisia valmistettaessa, ohut metallinen kalvo valmistetaan eristyskykyisen substraatin päälle. Substraattimateriaaliksi valitaan usein lasi tai pii. Lasi toimii jo itsessään eristemateriaalina, mutta koska pii on puolijohde, se vaatii pinnallensa eristävän kerroksen, jotta se ei reagoisi elektrodien pinnalla kytkeytyviin sähköisiin signaaleihin. Metallikerroksesta työstetään halutun muotoiset ja kokoiset metalliset mikroelektrodit, jotka aistivat solujen aikaansaamia potentiaaleja ja niiden muutoksia. Elektrodikerroksen päälle valmistetaan vielä passivointikerros, joka paljastaa ainoastaan mikroelektrodit solujen muodostamille signaaleille. (Liu & Schutzer 2009; Wang et al. 2012)

MEA-soluantureita voidaan muokata mikrovalmistustekniikan avulla, jolloin muun muassa topografian kontrollointi ja muokkaaminen, sekä mikrofluidististen kanavien tarjoamat kasvutekijät, kuten proteiinit, voivat auttaa solujen kiinnittämisessä haluttuihin sijainteihin (Ding et al. 2008). On tärkeää saada solut kiinnittymään oikeisiin kohtiin, sillä

niihin koskeminen tai niiden siirtäminen haluttuun sijaintiin voi aiheuttaa monimutkaisia reaktioketjuja (Fuhr et al. 1995, Reiningner-Mack et al. 2002 mukaan) Siirtämiseen reagoiminen voi näkyä muun muassa solujen normaalin biologisen toiminnan heikentymisenä, tai jopa solukuolemana.

Kuva 2 havainnollistaa MEA-soluanturin toimintaperiaatetta. Kuvasta nähdään, että solut ovat kytketty mikroelektrodeihin, jolloin niiden aktiopotentiaalien aiheuttamat sähköpotentiaalimuutokset saavat aikaan muutoksia sähkökentässä. (Liu & Schutzer 2009) MEA-rakenne sisältää myös maadoitetut elektrodit, jotka toimivat referenssielektrodeina potentiaalien mittauksessa (Hales et al. 2010).



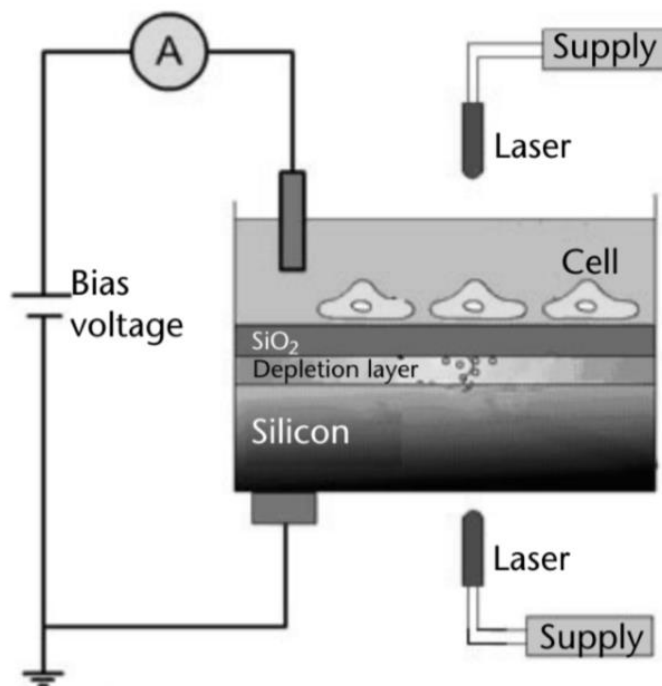
Kuva 2. Havainnekuva MEA-soluanturin toiminnasta (Liu & Schutzer 2009).

Se puoli mikroelektrodista, mikä ei ole peitetty soluilla on yhteydessä väliaineeseen. Saatujen signaalien muoto ja amplitudi eroavat mitattavasta aktiopotentiaalista, sillä muun muassa solukalvon läpäiseminen, solujen ja mikroelektrodien välinen väliaine sekä elektrodielektrolyyttirajapinta vaikuttavat havaittavaan signaaliin. (Liu & Schutzer 2009) Jotta yksittäisten solujen aktiopotentiaalit pystytään mittaamaan, täytyy mikroelektrodien koon vastata tutkittavien solujen kokoa (Kovacs 2003). Paljon soluja suuremmat elektrodit eivät tuota rekisteröitäviä signaaleja johtuen vähenevästä sulkuimpedanssista. Jos taas elektrodit ovat liian pieniä, ulostulo peittyy lämpökohinan alle. (Stenger & McKenna 1994; Kovacs 2003 mukaan) Rajoittavan tekijänä mittauksissa on se, että MEA-soluantureilla pystytään havaitsemaan vain ennalta määrätty määrä diskreettejä aktiivisia sijainteja kerrallaan. Sijaintien määrä riippuu siitä, kuinka monta

elektrodi MEA sisältää. (Ding et al. 2008) Usein mikroelektrodimatriisissa on enintään 64 mittaussijaintia (Liu & Schutzer 2009).

4.1.3 Valoa hyödyntävä potentiometrinen anturi

Myös LAPS on puolijohdepohjainen anturi. Puolijohdemateriaalina anturikomponentissa on usein pii. Yleisimmin LAPS koostuu joko metalli-eriste-puolijohde- tai elektrolyytti-eriste-puolijohderakenteesta. Eläviä soluja hyödyntävissä antureissa tarvitaan elektrolyyttejä, ja siksi näissä sovelluksissa käytetään jälkimmäistä rakennetta. Kuvassa 3 on esitettyä kyseinen soluantureissa käytettävä LAPS-rakenne. (Liu & Schutzer 2009)



Kuva 3. LAPS:in elektrolyytti-eriste-puolijohderakenne (Liu & Schutzer 2009).

Mittauksissa systeemiin kytketään tasajännite, jolloin muodostuu tasajännitteen suuruuden mukaan joko akkumulaatiokerros, ehtymiskerros tai inversiokerros eristeen (SiO₂) ja puolijohteen (Si) rajapintaan. LAPS:in toimintaperiaate perustuu siihen, että tasajännitteen kytkemisen jälkeen piin, piidioksidin ja piinitridin muodostama heterorakenne viritetään valon avulla. Kun puolijohdemateriaalit absorboivat energiaa valosta, rakenteeseen muodostuu elektroni–aukko-pareja. Kun systeemiin kytketty jännite on mitoitettu siten, että eristeen ja puolijohteen rajapintaan muodostuu ehtymiskerros, kyseiseen ehtymiskerrokseen muodostuu sisäinen sähkökenttä. Valon vaikutuksesta tämä sähkökenttä aiheuttaa elektronien ja aukkojen erottautumisen, jolloin

ne toimivat varauksenkuljettajina. Tällöin muodostuu valosähkövirta, joka voidaan havaita muun mittasysteemin avulla. (Liu et al. 2007; Liu & Schutzer 2009)

Soluanturisovelluksissa LAPS:in pinnalle ankkuroidaan soluja. Valo kohdistetaan sille alueelle, jota halutaan tutkia, ja se virittää kyseisen alueen sekä saa aikaan valosähkövirran, kuten yllä esitettiin. Kun solut altistetaan ärsykkeelle, se näkyy muutoksina niiden natrium-, kalium- ja kalsiumionivirroissa. Tämä taas aiheuttaa vaihtelua solujen muodostamissa potentiaaleissa. Nämä potentiaalit kytkeytyvät LAPS:in pinnalla, jolloin systeemin kokonaispintajännite koostuu solupotentiaaleita sekä systeemiin syötetystä tasajännitteestä. Koska valosähkövirran amplitudi reagoi herkästi LAPS:in pintapotentiaaleihin, kytkeytyneet potentiaalimuutokset aiheuttavat näitä potentiaalimuutoksia vastaavia vaihteluita valosähkövirran amplitudissa. Valosähkövirta pienenee lähes lineaarisesti jännitteen kasvaessa. Tästä syystä valosähkövirtaa tarkkailemalla voidaan havaita myös solujen muodostamat potentiaalit. (Liu et al. 2007)

Tärkein eroavaisuus LAPS-anturissa verrattuna MEA- ja FET-antureihin on sen kyky osoittaa kohdesolut missä tahansa kohtaa anturia, eikä vain tietyissä sijainneissa olevat. Tarpeeksi tarkka alueellinen resoluutio sekä mahdollisuus tarkentaa valopiste mikrometrien kokoluokkaan mahdollistavat jopa yksittäisten solujen monitoroinnin. (Liu & Schutzer 2009) LAPS-soluanturia voidaan valaista joko systeemin etupuolelta tai takapuolelta (Werner 2014). Etupuolelta valaiseminen muodostaa varauksenkuljettajia suoraan ehtymiskerrokseen, jolloin muodostuvat valosähkövirta on korkeampi ja havaitut signaalit voimakkaampia (Liang et al. 2019). Toisaalta, kun valo kulkee etupuolelta, se läpäisee LAPS:in pinnalla olevat näytteet ja solut, jolloin osa valosta saattaa absorboitua. Valo saattaa myös vaikuttaa muun muassa soluihin, jolloin sen vaikutukset voivat näkyä havaitussa signaalissa. (Werner 2014)

4.2 Impedanssimuutoksiin perustuvat soluanturit

Soluantureita voidaan käyttää myös mittauksissa, joissa hyödynnetään kasvatusalustaan kiinnittyvien solujen aiheuttamia impedanssimuutoksia. Soluja toimintaa voidaan verrata yksinkertaiseen elektroniseen piiriin, jossa solukalvo toimii kondensaattorina ja solunesteet toimivat johtavina sekä resistiivisinä komponentteina. Sähköisissä impedanssimittauksissa sekundaarisena komponenttina voidaan hyödyntää elektrodeja. (Keese & Giaever, 1994; Banerjee et al. 2010)

Systeemiin lisätään pieni sähkövirta, jonka muutoksien avulla impedanssi mitataan. Kun solut kasvavat ja levittäytyvät elektrodin pinnalle, elektrodin efektiivinen impedanssi

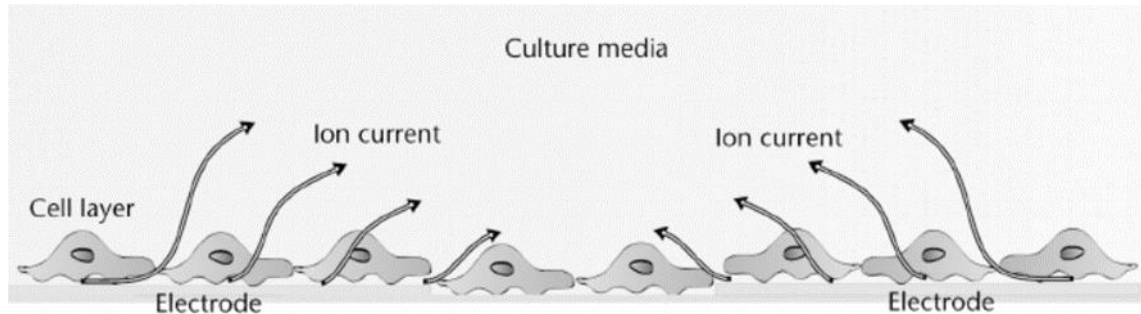
muuttuu, sillä solut alkavat rajoittaa sähkövirran kulkua. Impedanssimittauksia voidaankin käyttää tutkiessa erilaisten analyyttien tai häiriöiden vaikutuksia solujen kiinnittymiseen, leviämiseen sekä liikuntakykyisyyteen. Edellä mainitun kaltaiseen solujen käyttäytymiseen vaikuttavat herkästi monet ulkoiset tekijät, kuten lämpötila ja pH. Mittauksien aikana ympäristötekijöiden muutokset voivat aiheuttaa häiriöitä, jotka heikentävät solujen leviämistä elektrodin pinnalla. Ne voivat myös aiheuttaa jo kiinnittyneiden solujen irtoamista pinnalta. (Keese & Giaever, 1994; Banerjee et al. 2010)

Sähköinen solu–substraatti-impedanssimittaus (ECIS) on eräs suosituimmista sähköisiin impedanssimittauksiin perustuvista keinoista tutkia solujen biologista tilaa (Ding et al. 2008). ECIS-tekniikkaa hyödynnettäessä mittauksia varten valmistettu tasomainen elektrodi upotetaan elatusaineeseen. Elatusaineessa on myös solut, jotka kiinnittyvät elektrodiin ja alkavat levittäytyä sen pinnalle. (Liu & Schutzer 2009) Elatusaine toimii elektrolyytinä (Keese & Giaever 1994). Käytetty elektrodi voi olla valmistettu esimerkiksi kultaisesta kalvosta, joka on kiinnitetty lasista tai piistä valmistetun substraatin pinnalle (Liu & Schutzer 2009).

Kun solut eivät ole vielä päässeet kasvamaan ja levittäytymään elektrodin pinnalle, sähkövirta virtaa elektrodeille vapaasti ionivirran muodossa. Kyseisellä hetkellä vallitseva resistanssi on systeemin perustilan resistanssi, jota käytetään vertailuarvona saaduille tuloksille. Kun solut levittäytyvät ja elektrodin peittoaste kasvaa, solut alkavat rajoittaa virran kulkua ja pakottaen sen myös muuttamaan suuntaansa. Samalla myös systeemin resistanssi kasvaa. Mitä enemmän soluja elektrodin pinnalla on, sitä suurempi on systeemin resistanssi. Jos solujen elinympäristön tila muuttuu, esimerkiksi juuri lämpötilan tai pH:n osalta, solujen leviäminen sekä kiinnittyminen saattaa häiriintyä. Tällöin voidaan havaita laskevia muutoksia systeemin resistanssissa. Myös jotkin hetkelliset häiriöt, kuten muuttuvat sähkökentät tai soluille haitallisten aineiden lisääminen, voivat aiheuttaa muutoksia solujen käyttäytymisessä. Kuten aiemmin todettu, systeemin resistanssi ja tästä aiheutuva virran kulun rajoittuminen näkyy elektrodien efektiivisen impedanssin muutoksina. Näiden systeemissä tapahtuvien muutoksien avulla on mahdollista havaita ärsykkeiden sekä ympäristön tilan vaihteluiden vaikutukset. (Banerjee & Bhunia 2009; Liu & Schutzer 2009)

Kuva 4 (Liu & Schutzer 2009) havainnollistaa sähköistä impedanssimittauksilannetta. Kuvan tilanteessa mittaukset suoritetaan matalilla taajuuksilla. Matalilla taajuuksilla solut toimivat ikään kuin eristeinä ja pakottavat suurimman osan systeemissä kulkevasta virrasta kulkemaan solujen alta ja virtaamaan ulos niiden vierestä. Jos mittaukset

suoritettaisiin korkeammilla taajuuksilla ($f > 10$ kHz), suurin osa kuvassa 4 havainnollistetusta virrasta kulkisi suoraan solukalvon läpi. (Benson et al. 2013)



Kuva 4. Sähköinen impedanssimittaus tasomaisilla elektrodeilla matalilla taajuuksilla (Liu & Schutzer 2009).

Mittauksissa käytettävä sähkövirta on pieni, joten siitä ei ole haittaa soluille, eikä se vaikuta huomattavasti niiden toimintaan. Tämä mahdollistaa sen, että pitkäaikaisetkin kokeet ovat luotettavia ja tulokset verrattavissa toisiinsa. (Liu & Schutzer 2009) ECIS-tekniikan heikkous on siinä, että solut saattavat levittäytyä elektrodin pinnalle epätasaisesti, jolloin ei pystytä saavuttamaan parasta mahdollista peittoastetta. Koska menetelmä perustuu solujen levittäytymisen aiheuttamiin impedanssimuutoksiin, tämä saattaa huonontaa soluanturin herkkyyttä ja tarkkuutta. Tällöin myös tulokset saattavat olla epäluotettavia. (Ding et al. 2008)

5. SOVELLUSESIMERKIT

Soluantureiden antama toiminnallinen informaatio on hyödyksi muun muassa lääkkeiden vaikutusten tutkimisessa, kliinisessä diagnostiikassa sekä toksikologiassa (Liu & Schutzer 2009). Tässä luvussa tutustutaan kolmeen erilaiseen sovellukseen, joissa on hyödynnetty tässä työssä esiteltyjä soluanturikokonaisuuksia.

Ensimmäisessä esitetyssä sovelluskohteessa hyödynnettiin LAPS:a sekä sydänsoluja raskasmetallien vaikutusten tutkimiseen. Toisena esimerkkinä käsitellään tutkimusta, joka selvitti ECIS-tekniikan avulla sähkökenttien vaikutuksia syöpäsoluihin. Viimeisenä esitellään sydänsolujen hyödyntämistä biosähköisen kielen toteuttamisessa. Tässä tutkimuksessa sekundaarisena komponenttina oli MEA.

5.1 Sydänsolujen hyödyntäminen raskasmetallien havaitsemisessa

Ympäristön epäpuhtauksista terveydelle haitallisimpia ovat raskasmetallit. Ne voivat jopa hyvin pieninä pitoisuuksina aiheuttaa terveysongelmia, (Liu et al. 2007) kuten keuhkosairauksia, anemiaa sekä ihosairauksia. On havaittu, että raskasmetallit vaikuttavat negatiivisesti muun muassa solukalvoihin, mitokondrioihin, lysosomeihin sekä solulimakalvostoon. Niistä on haittaa myös esimerkiksi solujen metaboliaan ja soluvaurioiden korjaamiseen liittyvien entsyymien toiminnassa. (Squibb & Fowler 1981)

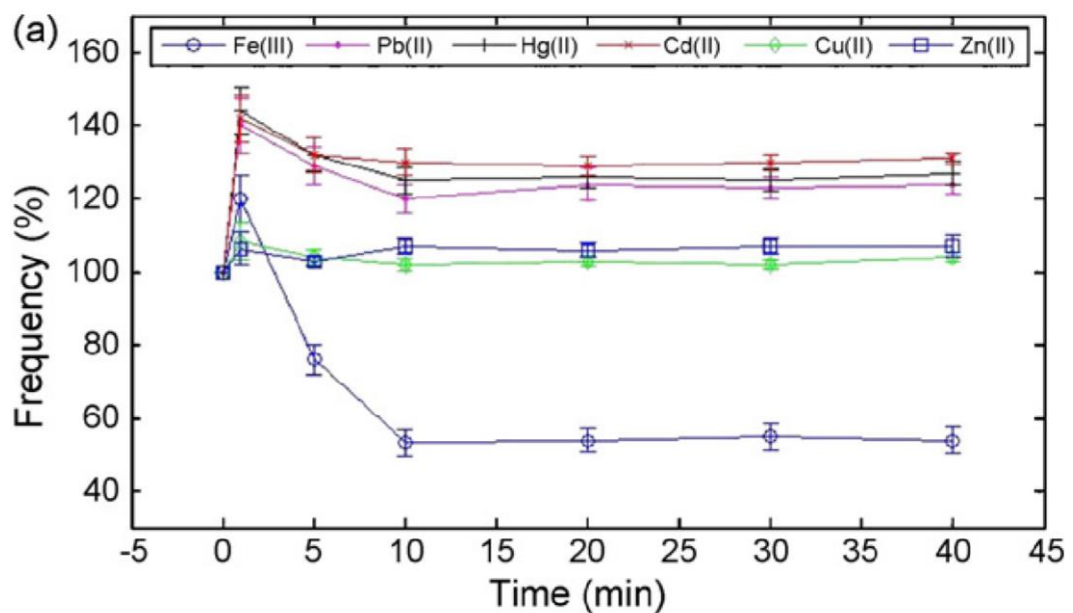
Vain liukoisessa ionimuodossa olevat metallit kykenevät vaikuttamaan soluihin. On siis hyvä ymmärtää, että kokonaisraskasmetallimäärä ei välttämättä kerro suoraan sitä, kuinka suurelle pitoisuudella solut ovat altistuneet. (Rensing & Maier 2003) Tämän biologisesti vaikuttavan metallimäärän (engl. bioavailable metal) havaitseminen, sekä sen aiheuttamien fysiologisten muutoksien arvioiminen, onnistuu hyödyntämällä soluja antureina (Liu et al. 2007)

Liu et al. (2007) selvittivät tutkimuksessaan raskasmetalli-ionien vaikutuksia sydänsolujen spontaania sykkimistä kuvaaviin parametreihin. Tutkimuksessa keskityttiin sydänsolun sykkeen taajuuteen, amplitudiin sekä keston. Taajuus kuvasti sykkimisnopeutta, amplitudi oli signaalin jännite nollassa signaalin huippuun ja kesto oli aika, mihin mennessä signaalin amplitudi saavutti 50 % maksimistaan. Aistinelementteinä käytetyt solut olivat rotan sydänsoluja, ja ne muodostivat anturikokonaisuuden LAPS-komponentin kanssa. LAPS-komponentin valolähteenä oli

helium-neon -laservalo, joka voitiin kohdistaa haluttuihin soluihin. Solujen altistaminen raskasmetalleille aiheutti vaihteluja niiden kalium-, natrium- ja kalsiumionivirroissa, jotka pystyttiin havaitsemaan vastaavina vaihteluina valosähkövirrassa. Kontrolliarvot saatiin tallentamalla sydänsolujen normaalia, spontaania aktiivisuutta. Kun solujen kasvuympäristöön lisättiin raskasmetalli-ionipitoisia liuoksia (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), ne alkoivat vaikuttamaan sydänsolujen muodostamiin potentiaaleihin ja ionivirtoihin.

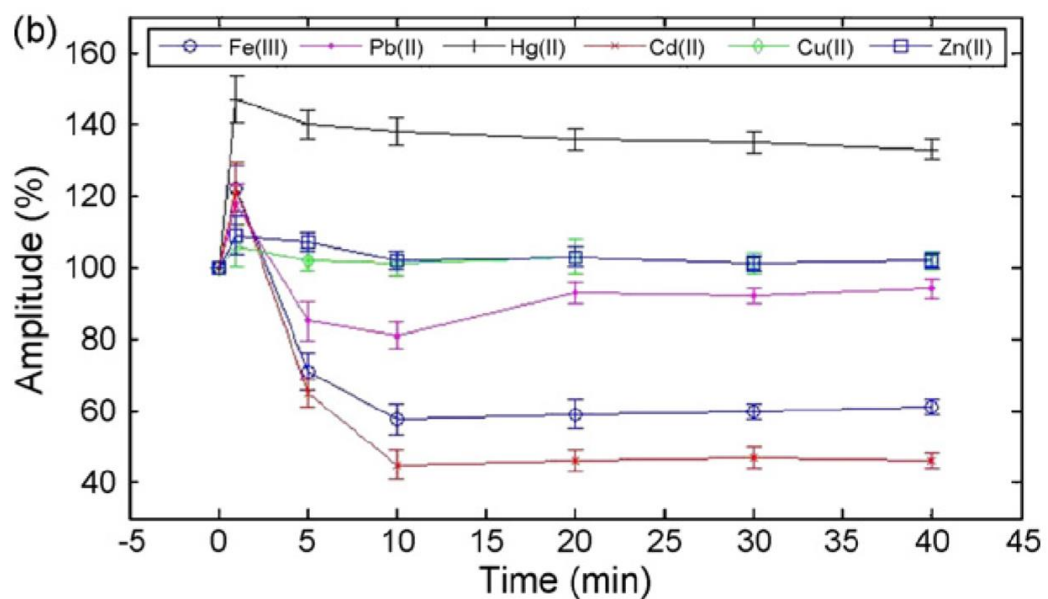
Solut muodostivat LAPS:in pinnalle sykkiviä solurykelmiä. Solurykelmien sykkimistaajuus vaihteli 30–180 sykkyksen välillä minuutissa. Tarkkailun alle valittiin useimmiten selkeimmin sykkivät solurykelmät, jolloin rykelmien väliset sykkimistaajuuserot eivät hankaloittaneet havainnoimista. (Liu et al. 2007)

Tutkimuksessa raskasmetallien vaikutuksia arvioitiin vertailemalla soluanturilla saatuja signaaleja ennen ja jälkeen solujen altistamista raskasmetalleille. Mittaukset aloitettiin perustilassa ajanhetkellä 0 minuuttia. Solut altistettiin kullekin raskasmetalliliuoksille aikavälillä 0–10 minuuttia, jonka jälkeen liuos pestiin pois. Liuoksia oli erivahvuisia, ja ne sisälsivät joko 1 μM , 10 μM tai 100 μM tiettyä raskasmetallia ionimuodossa. Kuvissa 5, 6 ja 7 on eriteltynä eri raskasmetalli-ionien vaikutukset sydänsolujen sykkimisen taajuuteen, amplitudiin sekä keston, kun raskasmetallin pitoisuus liuoksessa oli 10 μM . Muutokset parametrien perustiloihin on ilmoitettu prosentteina y-akselilla, ja kulunut aika minuutteina x-akselilla. (Liu et al. 2007)



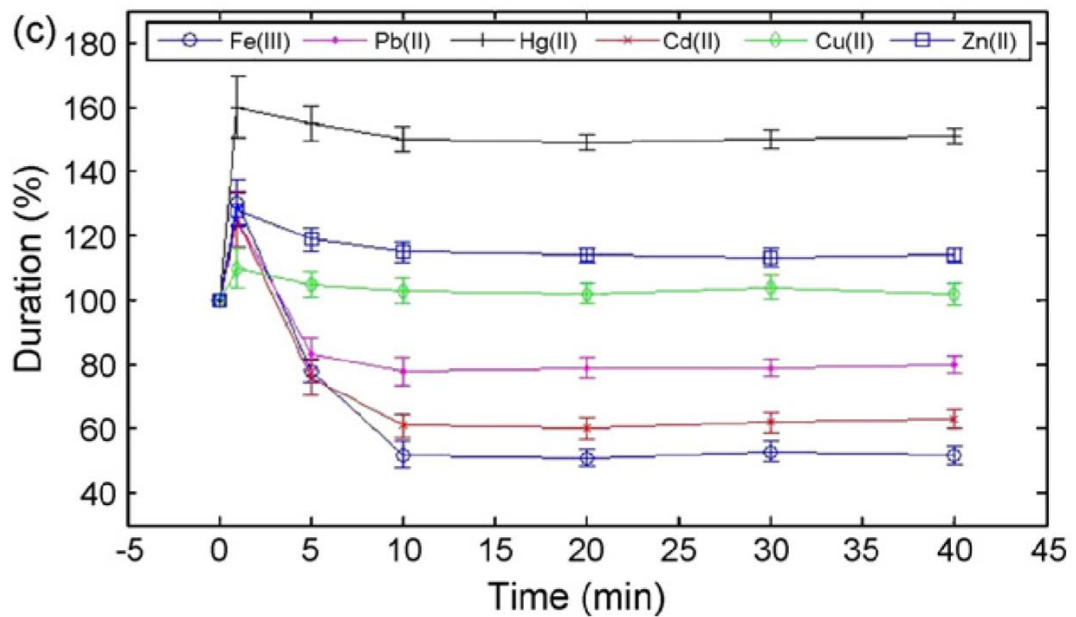
Kuva 5. Raskasmetallien vaikutukset taajuuteen (Liu et al. 2007).

Kuvasta 5 nähdään, että raskasmetalliliuoksen lisäämisen jälkeen jokainen raskasmetalli-ioni aiheutti sykkimistaajuuden, eli sykkimishopeuden muutoksen. Ensin taajuus kasvoi äkkinäisesti, mutta pian lisäyksen jälkeen taajuus alkoi laskemaan. Taajuus ei kuitenkaan palautunut enää perustilaansa. Kuvaajista huomataan, että lyijy-, elohopea- ja kadmiumionien vaikutuksesta taajuus asettui alkuperäistä tilaa korkeammaksi. Rautaionien vaikutus oli selkeästi muista poikkeava, ja taajuus asettui huomattavasti normaalia alemmaksi. Kuparin ja sinkin vaikutukset taajuuteen olivat huomattavasti pienemmät, kuin muiden raskasmetallien: ne vaikuttivat taajuuteen vain hieman nostavasti. (Liu et al. 2007)



Kuva 6. Raskasmetallien vaikutukset amplitudiin (Liu et al. 2007).

Kuvan 6 kuvaajat esittävät raskasmetalli-ionien vaikutuksia amplitudiin. Taajuudessa näkyviin muutoksiin verrattuna amplitudimuutoksissa on huomattavissa enemmän hajontaa eri raskasmetallien aiheuttamien muutosten välillä. Kuvaajista kuitenkin nähdään, että rautaionien vaikutus oli laskeva myös amplitudin kohdalla. Sinkki- ja kupari-ionien vaikutukset olivat pieniä, kuten taajuudenkin kohdalla. Metallien pois pesemisen jälkeen niiden aiheuttamat muutokset asettuivat suhteellisen lähelle alkuperäistä tilaa. Myös elohopeaionien vaikutus noudattaa samaa trendiä kuin taajuuden kohdalla, eli sillä on kasvattava vaikutus amplitudiin. Kadmium- ja lyijyionit aiheuttivat amplitudin pienentymistä, vaikkakin lyijyn vaikutukset pienenevät selkeästi sen jälkeen, kun se pestiin pois. (Liu et al. 2007) Kolmantena tutkittu parametri oli sykkyksen kesto. Sen osalta saatu data on esitetty kuvassa 7.



Kuva 7. Raskasmetallien vaikutukset sydämen sykäyksen keston (Liu et al. 2007).

Kuva 7 vahvistaa, että elohopealla ja raudalla oli jokaiseen tutkittavaan parametriin samaa periaatetta noudattava vaikutus. Rautaionit aiheuttivat kaikkien parametrien kohdalla noin 50 %:in laskun perustilaan verrattuna, kun taas elohopea nosti parametrien arvoja 40–60 % perustilaan verrattuna. Sinkin ja kuparin vaikutukset olivat kaikissa tapauksissa pieniä, vaikkakin sykäyksen keston ne vaikuttivat hieman enemmän, kuin taajuuteen ja amplitudiin. Lyijyn ja kadmiumin kohdalla vaikutukset olivat huomattavia, mutta ne eivät noudattaneet tiettyä kaavaa yhtä selkeästi kuin rauta- ja elohopeaionit. (Liu et al. 2007)

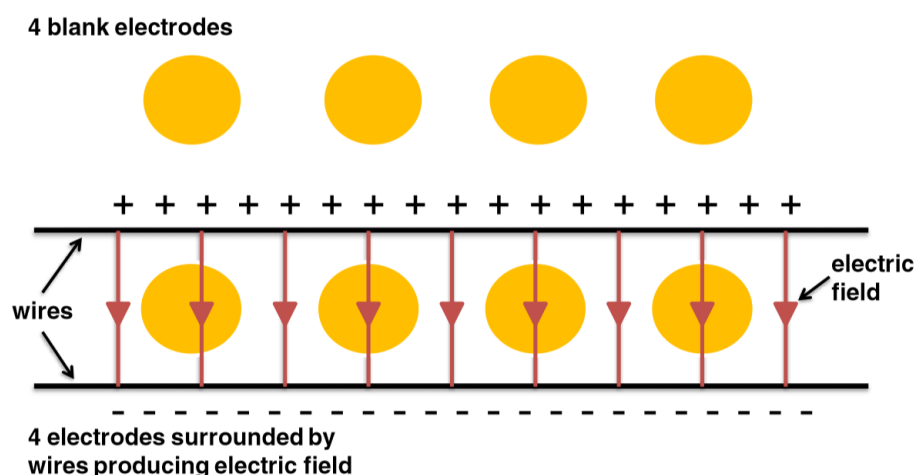
Tutkimuksessa todettiin myös, että 1 μM konsentraatioina ainoastaan rauta- ja kadmiumionit aiheuttivat huomattavia muutoksia taajuuteen, amplitudiin ja keston. Kun liuoksen raskasmetallikonsentraatio oli 100 μM , jokainen raskasmetalli aiheutti spontaanin sykkimisen pysähtymisen. 100 μM :n pitoisuutena kadmiumionit aiheuttivat jopa solukuolemia jo 10 minuutin sisällä. (Liu et al. 2007) Tutkimus vahvisti tietoa siitä, että raskasmetalli-ionit kykenevät vaikuttamaan solujen toimintaan. Koska vaikutukset näkyivät vielä raskasmetalliliuoksen pois pesemisen jälkeen, voidaan päätellä, että jatkuva-aikainen altistuminen voi johtaa solujen normaalin toiminnan häiriintymiseen.

5.2 Ulkoisten sähkökenttien vaikutus syöpäsoluihin

Solujen sähköisten ominaisuuksien vuoksi ne kykenevät muodostamaan omia sähkökenttiään ja reagoivat myös ulkoisiin sähkökenttiin. Vaihtelevien sähkökenttien

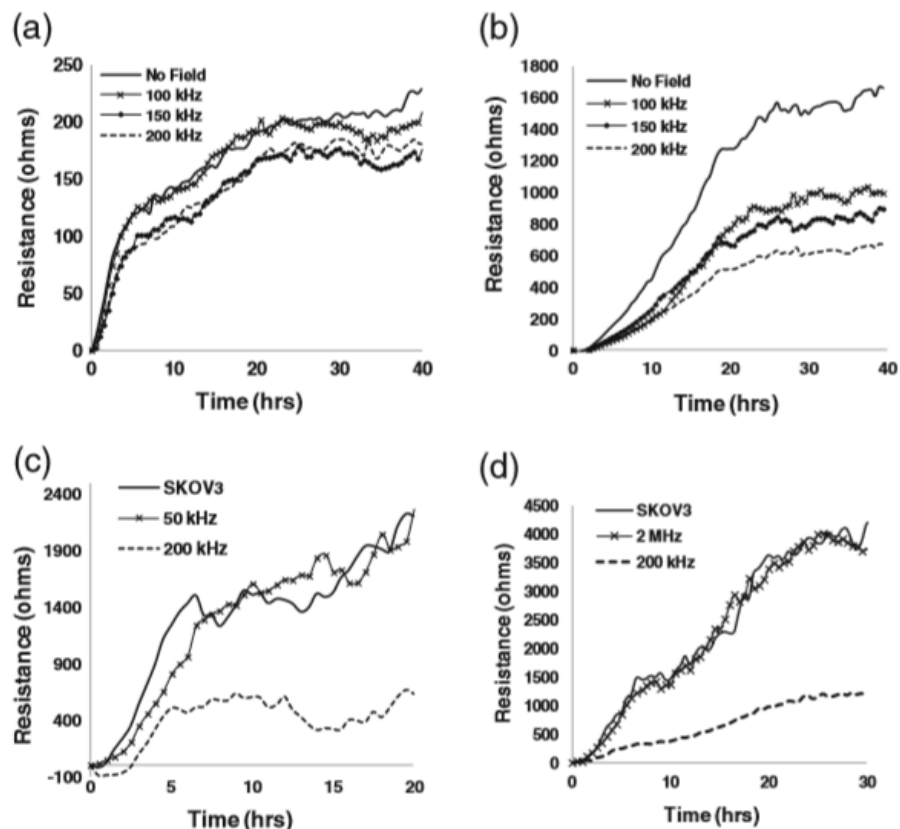
vaikutuksia syöpäsoluihin on alettu tutkimaan siinä toivossa, että niistä olisi tulevaisuudessa hyötyä syöpähoidoissa. Ajatus perustuu siihen, että terveiden solujen ja syöpäsolujen sähköiset sekä fyysiset ominaisuudet eroavat toisistaan. Syöpäsolut eivät muun muassa tuota yhtä suuria kalvopotentiaaleja ja muodostavat vain heikkoja vuorovaikutuksia naapurisoluihinsa. Erojen takia ulkoiset sähkökentät voivat mahdollisesti vaikuttaa syöpäsoluihin eri tavalla, kuin terveisiin soluihin. (Hondroulis et al. 2013)

Hondroulis et al. (2013) tutkivat ulkoisten sähkökenttien vaikutuksia munasarjasyöpäsoluihin (SKOV3). Vertailukohteina tutkimuksessa käytettiin terveitä ihmisen napalaskimon endoteelisoluja (human umbilical vascular endothelial cells, HUVEC). Käytettyjen sähkökenttien taajuudet olivat välillä 100 kHz–200 kHz, ja niiden intensiteetti oli matala, alle 2 V/cm. Matalaintensiteettisten, taajuudeltaan yli 100 kHz:iä olevien sähkökenttien on jo aiemmin tutkittu vaikuttavan muun muassa syöpäsolujen kasvuun ja lisääntymiseen (Kirson et al. 2004; Kirson et al. 2007). Tutkimus toteutettiin myös 50 kHz:in sekä 2 MHz:n sähkökentillä, jotta voitiin varmistaa, että tutkimukseen valittu taajuusalue oli sopiva. Tutkimuksessa käytettiin sähköistä impedanssimittaussirua, jolloin soluanturi mittasi elektrodien impedanssien muutoksia syöpäsolujen levittäytyessä ja kasvaessa ennen ja jälkeen sähkökentälle altistamista. Jotta sähkökenttä saatiin yhdistettyä systeemiin, neljään kuopista asetettiin eristetyt johtimet. Muut neljä kuoppaa toimivat kontrolleina, joihin saatuja tuloksia vertailtiin. (Hondroulis et al. 2013) Kuva 8 havainnollistaa elektrodien järjestäytymistä sirulla.



Kuva 8. Havainnollistava kuva käytetystä 8-kuoppaisesta EIS-sirusta, jossa on neljä referenssielektroodia sekä neljä mittauselektroodia (Hondroulis et al. 2013).

Tutkimuksessa käytettyjen sähkökenttien taajuudet olivat 100, 150 ja 200 kHz:iä. Tarkoituksena oli ensin löytää sähkökenttä, jonka taajuus häiritä eniten SKOV3-syöpäsolujen kasvua vahingoittamatta kuitenkaan terveitä HUVEC-soluja. Testimittauksissa huomattiin, että 100, 150 ja 200 kHz:n sähkökentät eivät huomattavasti vaikuttaneet terveiden HUVEC-solujen leviämiseen. Tämä huomattiin siitä, että systeemin resistanssi ei muuttunut radikaalisti kontrolliarvoihin verrattaessa. Tässä vertailukohteenä oli HUVEC-soluja, joita ei altistettu sähkökentälle. Näiden saman taajuuksien sähkökenttien huomattiin kuitenkin vaikuttavan negatiivisesti syöpäsolujen leviämiseen. Suurimman muutoksen syöpäsoluissa aiheutti 200 kHz:n sähkökenttä, joka aiheutti suurimman laskun systeemin resistanssissa. Kuvassa 9a on testitulokset HUVEC-soluille ja kuvassa 9b tulokset SKOV3-syöpäsoluille. Lisätutkimukset SKOV3-syöpäsoluille 50 kHz:n ja 2 MHz:n sähkökentissä osoittivat, että näillä taajuuksilla sähkökentällä ei ole juuri vaikutusta edes syöpäsoluihin. Nämä tulokset näkyvät kuvissa 9c ja 9d.



Kuva 9. Impedanssimittauksen testitulokset. (a) Tulokset terveille endoteelisoluille, (b)-(d) tulokset syöpäsoluille (Hondroulis et al. 2013).

Hondroulis et al. (2013) päättelivät tuloksista, että 200 kHz:n sähkökentällä oli tehokkain häiritsevä vaikutus syöpäsolujen käyttäytymiseen, mutta ei suurta vaikutusta terveisiin

soluihin. Tutkimusta jatkettiin keskittyen 200 kHz:n sähkökenttään. Jatkotutkimuksissa solujen annettiin levittäytyä EIS-elektrodeille 40 tunnin ajan, ennen kuin ne altistettiin sähkökentälle. Solut olivat tässä kohtaa saavuttaneet suurimman mahdollisimman peittoasteen. Sähkökentän vaikutus näkyi selkeästi laskevana resistanssina, eli jo kiinnittyneet solut alkoivat irtoamaan elektrodien pinnalta. Tämä pysyttiin todistamaan ottamalla lisäksi digitaalisia kuvia elektrodien pinnalta. Niistä nähtiin, kuinka solujen muoto muuttui ja ne vähenivät elektrodien pinnalta.

Lopuksi syöpäsolujen elinkykyisyyttä tutkittiin vielä fluoresoimalla ja värjäämällä ne. Fluoresoivana aineena käytetty propidiumjodidi ei reagoi elävien solujen kanssa eli se fluoresoi vain kuolleet solut. Myöskään väriaineena käytetty Trypan sininen ei pääse tunkeutumaan elävien solujen kalvon läpi, ja näin myös sen avulla voidaan paljastaa kuolleiden solujen määrä. Nämä testit paljastivat, että 200 kHz:n sähkökenttä kykeni myös tappamaan syöpäsoluja. (Hondroulis et al. 2013)

Sähkökenttien vaikutuksista voisi tulevaisuudessa olla hyötyä syöpähoidoissa, mutta aihe vaatii edelleen lisätutkimuksia. Nykyiset syöpähoidot aiheuttavat usein negatiivisia sivuvaikutuksia myös terveisiin soluihin, jolloin hoidot voivat osaltaan myös heikentää potilaan oloa. Sähkökenttiä hyödyntämällä voitaisiin syöpähoitoja toteuttaa ilman haitallisia ja myrkyllisiä sivuvaikutuksia, jotka joskus aiheuttavat potilaalle huonoa oloa hoitokertojen jälkeen, sekä heikentävät vastustuskykyä.

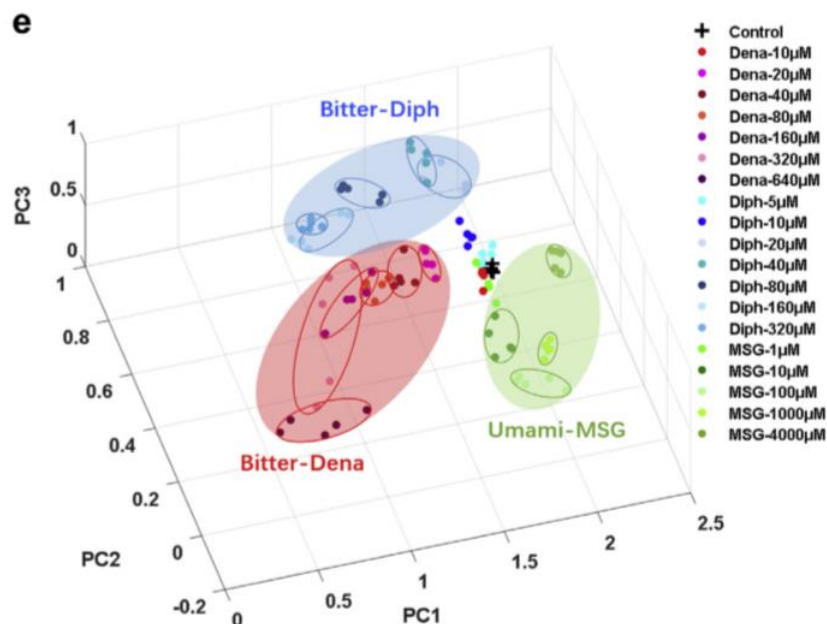
5.3 Sydänsoluja hyödyntävä biosähköinen kieli

Viime vuosina on herännyt kiinnostusta keinotekoisien, sähköisten kielien kehittämistä kohtaan. Kyseisten kielten tarkoituksena on matkia ihmisten biologista makuaistikykyä, ja niitä voitaisiin hyödyntää muun muassa lääketieteessä ja elintarviketeollisuudessa. (Wei et al. 2019) Ensimmäisenä kehityt sähköiset kielet eivät kuitenkaan pärjänneet oikeille biologisille systeemeille. Tästä syystä niihin alettiin integroimaan myös erilaisia biologisia materiaaleja, kuten soluja, kudoksia tai reseptoreita. Tällaiset biosähköiset kielet kykenevät jäljittelemään paremmin ihmisten biologista makuaistisysteemiä. (Wasilewski et al. 2019) Tässä kappaleessa käsitellään biosähköisiä kieliä, jotka hyödyntävät kokonaisia soluja aistinelementteinä.

Käytettävät solut voidaan hankkia eristämällä primaarisia makureseptorisoluja suoraan eläinten tai ihmisten makusilmuista, tai valmistamalla biotekniikan keinojen avulla eläinsolulinjoja. Sekundaarisena komponenttina on tähän mennessä hyödynnetty muun muassa FET-, MEA- ja LAPS-rakenteita. (Wasilewski et al. 2019)

Tutkimuksissa on huomattu, että makureseptoreita löytyy kielen lisäksi myös muun muassa aivoista sekä sydäimestä (Singh et al. 2011; Foster et al. 2013). Wei et al. (2019) kehittivät ensimmäisen rotan sydänsoluja aistinelementteinä hyödyntävän biosähköisen kielen, jonka sekundaarisena anturikomponenttina käytettiin MEA:a. Makuligandien sitoutuessa sydänsolujen reseptoreihin, solujen ionikanavat aukenivat ja solut muodostivat aktiopotentiaaleja. Potentiaaleja tutkimalla makuyhdisteet ja niiden eri konsentraatiot voitiin erottaa toisistaan. Tutkimuksessa hyödynnettiin karvaita ja umamin makuja, sillä on tutkittu, että sydänsolut ilmentävät reseptoreita vain näille yhdisteille.

Tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää uudenlainen toimiva biosähköinen kieli, joka pystyisi reagoimaan ligandeihin, jotka vastaavat karvaita yhdisteitä ja umamiyhdisteitä. Eri maut pystyttiin myös erottamaan toisistaan, ja erilaisten signaalinkäsittelymenetelmien ja ohjelmiston avulla ne voitiin myös erotella konkreettisiksi tuloksiksi. Kvantitatiivisen analysoimisen vuoksi signaaleita tutkittiin parametrien avulla. Parametreinä käytettiin muun muassa solunulkoisten potentiaalien amplitudia ja sitä, kuinka monta aktiopotentiaalia havaittiin sekunnissa. Näitä verrattiin kontrolliarvoon, eli systeemin perustilaan, kun aistinärsykeitä ei ole. (Wei et al. 2019) Alla olevassa kuvassa 10 on kuvattuna tutkimuksen aikana kerätystä datasta koostettu lopputulos, kun testit suoritettiin kahdelle karvasta makua vastaavalle ligandille sekä yhdelle umamiligandille.



Kuva 10. PCA-menetelmällä erotellut tulokset, kun käytettiin kahta karvasta makua sekä yhtä umamin makua (Wei et al. 2019).

Tutkimustuloksista saatu data analysoitiin signaalinkäsittelyohjelmistojen avulla. Datalle suoritettiin tämän jälkeen vielä pääkomponenttianalyysi (PCA), joka auttoi havainnollistamaan tuloksia paremmin. Kuvassa 10 esitetyt tulokset ovat käsitelty pääkomponenttianalyysillä. Tuloksista huomataan, että biosähköinen kieli tunnisti eri aineet ja kykeni myös pääosin erottamaan eri konsentraatiot toisistaan. Ainoastaan kaikista pienimpien konsentraatioiden tulkitseminen jäi heikoksi. Kuvasta voidaan kuitenkin havaita, että tutkimuksesta saatu data asettuu pääkomponenttianalyysin jälkeen aineittain omille alueilleen, mikä viittaa siihen, että kieli on onnistunut havainnoimaan eri komponentit pääosin oikein. (Wei et al. 2019) Tutkimus osoitti, että sydänsolut toimivat makuaistisovelluksissa, vaikka ne eivät kykenekään aistimaan kaikkia perusmakuja. Tämänkaltaiset tutkimukset luovat uusia soveltavia näkökulmia kehitykselle.

6. YHTEENVETO

Solujen hyödyntäminen anturikomponentteina mahdollistaa solujen fysiologian tutkimisen erilaisten menetelmien kautta. Jotta voitaisiin saada reaaliaikaista tietoa erilaisten ärsykkeiden vaikutuksista juuri solujen tilasta ja toiminnasta, toimivin ratkaisu on liittää itse solut systeemiin tuntoelimeksi. Tässä työssä keskityttiin solujen sähköisiä ominaisuuksia hyödyntäviin antureihin, mutta keinoja on myös muita.

Solujen hyödyntäminen anturielementteinä vaatii niiden elinympäristön tarkkaa kontrolloimista. Kehittämisen varaa on edelleen, jotta mittauksista saadaan mahdollisimman tarkkoja. Huolellisella suunnittelulla ja toteuttamisella tuloksista saadaan kuitenkin kattavia ja luotettavia. Lisäksi soluantureiden käytön hyödyt ovat kattavat, mikäli halutaan analyttisen informaation rinnalle myös toiminnallista informaatiota solujen tilasta. Soluantureiden avulla voidaan mahdollisesti myös selvittää, mitä fysiologisia muutoksia eri sairauksien taustalla ilmenee. Sairauksien syntymekanismien ymmärtämisestä voisi mahdollisesti olla apua myös sairauksien hoitojen kehittämisessä.

Soluja voidaan liittää usean erilaisen sekundaarisen komponentin pinnalle oikeanlaisten kiinnitysmetodien ja materiaalien avulla. Solujen biologinen toiminta tulisi säilyä mahdollisimman normaalina myös kiinnittämisen jälkeen, jotta tulokset kuvastaisivat niiden luonnollisia reaktioita. Yleisimmin käytetyt liittämismetodit ovat yhtenäinen kemiallinen pinnoitus sekä valikoiva kemiallinen pinnoitus. Yhtenäinen kemiallinen pinnoitus muodostaa yhtenäisen, soluja puoleensa vetävän pinnoitteen anturikomponentin pinnalle. Valikoivan kemiallisen pinnoituksen avulla solujen kiinnityspintaa voidaan muokata mikrovalmistustekniikan keinoin. Tällöin anturikomponentin pintaan saadaan muodostettua soluja puoleensa vetäviä kohtia haluttuihin sijainteihin. Pinnoittamattomat alueet hylkivät soluja. Materiaalivalinnoilla voidaan auttaa soluja muodostamaan vahvoja kovalenttisia sidoksia pinnan kanssa. Ankkurointimetodi tulee valita aina sovelluskohtaisesti sopivan lopputuloksen saamiseksi.

Solujen sähköisiä ominaisuuksien hyödyntämällä voidaan tutkia esimerkiksi aktiopotentiaaleja sekä solujen levittäytymisestä aiheutuvien sähkövirtojen muutoksien aikaansaamia impedanssimuutoksia. Aktiopotentiaalimittauksissa yleisimmin käytetyt sekundaariset komponentit ovat FET-, MEA- ja LAPS-järjestelmät. Kyseiset kokonaisuudet hyödyntävät elektrodeja, joiden pinnalla potentiaalimuutokset

kytkeytyvät. MEA:a hyödyntäessä mittausalueet riippuvat elektrodikuoppien rajallisesta määrästä, jolloin se mahdollistaa vain ennalta määriteltujen sijaintien tutkimisen. Myös FET-komponentilla voidaan tutkia vain ennalta määritettyä aluetta, sillä signaaleja havaitaan vain hilalle kiinnitetyistä soluista. LAPS-anturilla mittaukset eivät ole rajattuja ennalta määrättyihin sijainteihin, vaan valo voidaan kohdistaa mille tahansa alueelle LAPS:in pinnalla. Valo voidaan kohdistaa tarkasti jopa yhden solun tarkkuuteen. Etupuolelta valaistuna LAPS-soluanturi tuottaa suurempia valosähkövirtoja kuin systeemin takapuolelta valaistuna, mutta samalla valo saattaa absorboitua muun muassa soluihin, ja vaikuttaa niiden käyttäytymiseen.

Impedanssimittauksissa yleisin sähköinen impedanssimittausmenetelmä solusovelluksissa on ECIS. Myös ECIS-menetelmässä hyödynnetään elektrodeja, ja usein sekundaarisena komponenttina onkin esimerkiksi mikroelektrodimatriisi. Menetelmässä mitataan elektrodien pinnalla olevien solujen levittäytymisestä ja kiinnittymisestä aiheutuvia impedanssimuutoksia. ECIS-menetelmän heikkous on se, että solut eivät välttämättä kiinnity tarpeeksi tehokkaasti, jolloin elektrodin peittoaste jää vajaaksi. Tämä heikentää saatuja tuloksia, jolloin ne eivät välttämättä ole täysin luotettavia. Tekniikoiden kehittyessä tämä ongelma pystytään varmasti minimoimaan. ECIS-tekniikka on kuitenkin hyödyllinen sekä soluille turvallinen keino tutkia solujen levittäytymistä ja kiinnittymistä.

Soluja on hyödynnetty paljon anturikomponentteina muun muassa lääkeainetutkimuksissa, mutta mahdolliset sovelluskohteet ovat monipuoliset. Solujen hyödyntäminen avaa monia mahdollisuuksia biolääketieteen saralla. Mitä laajemmin solutason toimintoja opitaan ymmärtämään, sitä tarkempia ja monipuolisempia sovelluksia voidaan kehittää. Soluantureita voidaan hyödyntää niin terveysvaikutusten tutkimiseen, kuin myös erilaisten hoitokeinojen kartoittamiseen. Työssä käsiteltiin kehon ulkopuolisia mittauksia, mutta tekniikoiden kehittyessä myös kehon sisäiset sovellukset voisivat varmasti kehittyä. On ilmeistä, että tällöin tekniikoiden ja laitteiden tulee olla ehdottoman turvallisia, joten tätä kehitysaskelta varten tarvitaan varmastikin paljon lisätutkimuksia.

LÄHTEET

ASAL, M., ÖZEN, Ö, SAHINLER, M., BAYSAL, H.T. and POLATOGLU, I. (2019). An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors. *Sensor Review*, **39**(3), pp. 377–386. <https://doi.org/10.1108/SR-04-2018-0084>

BANERJEE, P. and BHUNIA, A.K. (2009). Mammalian cell-based biosensors for pathogens and toxins. *Trends in biotechnology*, **27**(3), pp. 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.006>

BANERJEE, P., FRANZ, B., BHUNIA, A.K., BELKIN, S. and GU, M.B. (2010). Mammalian Cell-Based Sensor System. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. **117**, pp. 21–55

BENSON, K., CRAMER, S. and GALLA, H-J. (2013). Impedance-based cell monitoring: Barrier properties and beyond. *Fluids and Barriers of the CNS*. **10**(1). <http://doi.org/10.1186/2045-8118-10-5>

BOUSSE, L. (1996). Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*. **34**(1–3), pp. 270–275. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(96\)01906-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(96)01906-5)

DING, L., DU, D., ZHANG, X. and JU, H. (2008). Trends in Cell-Based Electrochemical Biosensors. *Current medicinal chemistry*, **15**(30), pp. 3160–3170. <http://dx.doi.org.libproxy.tuni.fi/10.2174/092986708786848514>

GOUDA, M.D., KUMAR, M.A., THAKUR, M.S. and KARANTH, N.G. (2002). Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents. *Biosensors and Bioelectronics*, **17**(6-7), pp. 503–507. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00021-0)

GUI, Q., LAWSON, T., SHAN, S., YAN, L. and LIU, Y. (2017). *The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics*. Basel, Switzerland: MDPI Publishing. <https://doi.org/10.3390/s17071623>

HALES, C.M., ROLSTON, J.D. and POTTER, S.M. (2010). How to culture, record and stimulate neuronal networks on micro-electrode arrays (MEAs). *Journal of visualized experiments: JoVE*, (39). <https://doi.org/10.3791/2056>

- HONDROULIS, E., MELNICK, S., ZHANG, X., WU, Z. and LI, C. (2013). Electrical field manipulation of cancer cell behavior monitored by whole cell biosensing device. *Biomedical Microdevices; BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*, **15**(4), pp. 657–663. <https://doi-org.libproxy.tuni.fi/10.1007/s10544-013-9788-2>
- JOHANNESSEN, E., WEAVER, J., BOUROVA and L., SVOBODA, P. (2002). Micromachined Nanocalorimetric Sensor for Ultra-low-volume Cell-based assays. *Analytical Chemistry*. **74**(9), pp. 2190–2197. <https://doi-org.libproxy.tuni.fi/10.1021/ac011028b>
- KEESE, C.R. and GIAEVER, I. (1994). A biosensor that monitors cell morphology with electrical fields. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, **13**(3), pp. 402–408. <https://doi.org/10.1109/51.294012>
- KIILERICH-PEDERSEN and K., ROZLOSNIK, N. (2012). Cell-Based Biosensors: Electrical Sensing in Microfluidic Devices. *Diagnostics*, **2**(4), pp. 83–96. <https://doi.org/10.3390/diagnostics2040083>
- KIRSON, E.D., DBALÝ, V., TOVARYŠ, F., VYMAZAL, J., SOUSTIEL, J.F., ITZHAKI, A., MORDECHOVICH, D., STEINBERG-SHAPIRA, S., GURVICH, Z., SCHNEIDERMAN, R., WASSERMAN, Y., SALZBERG, M., RYFFEL, B., GOLDSHER, D., DEKEL, E. and PALTÍ, Y. (2007). Alternating Electric Fields Arrest Cell Proliferation in Animal Tumor Models and Human Brain Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(24), pp. 10152–10157. <https://doi.org/0.1073/pnas.0702916104>
- KIRSON, E.D., GURVICH, Z., SCHNEIDERMAN, R., DEKEL, E., ITZHAKI, A., WASSERMAN, Y., SCHATZBERGER, R. and PALTÍ, Y. (2004). Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer research*, **64**(9), pp. 3288–3295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0083>
- KOVACS, G.T.A. (2003). Electronic sensors with living cellular components. *Proceedings of the IEEE*, **91**(6), pp. 915–929. <https://doi.org/10.1109/JPROC.2003.813580>
- LIANG, T., QIU, Y., GAN, Y., SUN, J., ZHOU, S., WAN, H. and WANG, P. (2019). Recent developments of high-resolution chemical imaging systems based on light-addressable potentiometric sensors (LAPSSs). *Sensors (Switzerland)*, **19**(19). <https://doi.org/10.3390/s19194294>

- LIU, Q., CAI, H., XU, Y., XIAO, L., YANG, M. and WANG, P. (2007). Detection of heavy metal toxicity using cardiac cell-based biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*. **22**(12), pp. 3224–3229. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.03.005>
- LIU, Q. and SCHUTZER, D. (2009). *Cell-Based Biosensors: Principles and Applications*, Edited by Ping Wang, Norwood: Artech House.
- LIU, Q., WU, C., CAI, H., HU, N., ZHOU, J. and WANG, P. (2014). Cell-Based Biosensors and Their Application in Biomedicine. *Chemical Reviews*, **114**(12), pp. 6423–6461. <https://doi.org/10.1021/cr2003129>
- PANCRAZIO, J.J., WHELAN, J.P., BORKHOLDER, D.A., MA, W. and STENGER, D.A. (1999). Development and Application of Cell-Based Biosensors. *Annals of Biomaterial Engineering*, **27**, pp. 697–711. <https://doi-org.libproxy.tuni.fi/10.1114/1.225>
- RANDY, F. (2013). *Smart Sensor Basics*. 3 edn. Artech House.
- REININGER-MACK, A., THIELECKE, H. and ROBITZKI, A.A. (2002). 3D-biohybrid systems: applications in drug screening. *Trends in biotechnology*, **20**(2), pp. 56-61. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01880-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01880-7)
- RENSING, C. and MAIER, R.M. (2003). Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **56**(1), pp. 140–147. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00057-5)
- FOSTER, S.R., PORELLO, E.R., PURDUE, B., CHAN, H-W., VOIGT, A., FRENZEL, S., HANNAN, R.D., MORITZ, K.M., SIMMONS, D.G., MOLENAAR, P., ROURA, E., BOEHM, U., MEYERHOF, W. and THOMAS, W.G. (2013). Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS ONE*, **8**(5), pp. e64579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064579>
- SINGH, N., VRONTAKIS, M., PARKINSON, F. and CHELIKANI, P. (2011). Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biophysical Research Communications*. **406**(1), pp. 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.016>
- SQUIBB, K.S. and FOWLER, B.A. (1981). Relationship between metal toxicity to subcellular systems and the carcinogenic response. *Environmental health perspectives*, Elsevier B.V. **40**, pp. 181-188.
- SVENDSEN, W.E., CASTILLO-LEÓN, J., LANGE, J.M., SASSO, L., OLSEN, M.H., ABADDI, M., ANDRESEN, L., LEVINSEN, S., SHAH, P., VEDARETHINAM, I. and

WANG, J., WU, C., HU, N., ZHOU, J. and DU, L. (2012). Microfabricated Electrochemical Cell-Based Biosensors for Analysis of Living Cells In Vitro. *Biosensors*, **2**(2), pp. 127–170. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bios2020127>

WANG, P. and LIU, Q. (2011). *Biomedical sensors and measurement*. 1st ed. Springer Science & Business Media. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

WANG, P., XU, G., QIN, L., XU, Y., LI, Y. and LI, R. (2005). Cell-based biosensors and its application in biomedicine. *Sensors & Actuators: B. Chemical*. Elsevier. **108**(1–2), pp. 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.11.056>

WASILEWSKI, T., KAMYSZ, W. and GĘBICKI, J. (2019). Bioelectronic tongue: Current status and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, **150**. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111923>

WEI, X., QIN, C., GU, C., HE, C., YUAN, Q., LIU, M., ZHUANG, L., WAN, H. and WANG, P. (2019). A novel bionic in vitro bioelectronic tongue based on cardiomyocytes and microelectrode array for bitter and umami detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **145**. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111673>

WERNER, C.F. (2014). *Entwicklung von lichtadressierbaren potentiometrischen Sensor-Systemen und deren Anwendung in biotechnologischen Umgebungen; Development of light-addressable potentiometric sensor systems and their applications in biotechnological environments*. Philipps-Universität Marburg. <https://doi.org/10.17192/z2014.0337>

XIANG, G., PAN, L., HUANG, L., YU, Z., SONG, X., CHENG, J., XING, W. and ZHOU, Y. (2007). Microelectrode array-based system for neuropharmacological applications with cortical neurons cultured in vitro. *Biosensors and Bioelectronics*. **22**(11), pp. 2478–2484. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.026>