



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Syöpälääkkeiden sytotoksisuuden määrittäminen reaaliaikaisella soluanalyysillä

Anni Aaku

Detektioteknologian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

16.5.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on
tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Anni Aaku

Otsikko: Syöpälääkkeiden sytotoksisuuden määrittäminen reaaliaikaisella soluanalyysillä

Ohjaaja(t): Kari Kopra

Sivumäärä: 25 sivua

Päivämäärä: 16.5.2026

Kemoterapiahoidoissa käytettäviin lääkeaineisiin liittyy sytotoksisia eli soluille haitallisia vaikutuksia. Sytotoksisuus on keskeinen osa solunsalpaajien eli sytostaattien vaikutusmekanismeja, ja kemoterapiahoidoilla voidaan tehokkaasti pienentää syöpäkasvaimen kokoa ja näin helpottaa potilaan oireita. Sytostaattien tehokasta hoitovastetta rajoittavat elimistön terveisiin kudoksiin kohdistuvat haitalliset sivuvaikutukset, jotka ilmenevät potilailla esimerkiksi hiusten lähtönä ja pahoinvointina.

Solupohjaisia määryksiä tarvitaan syöpätutkimuksen ja lääkekehityksen tueksi etenkin uusien lääkeaineiden seulontaan sekä toksisuusmittauksiin. Reaaliaikainen soluanalyysi (*engl.* real-time cell assay, RTCA) on impedanssipohjainen määrytys, joka mahdollistaa solujen käyttäytymisen ja fysiologisten ominaisuuksien seuraamisen dynaamisesti. RTCA:lla voidaan mitata solujen sitoutumista, proliferaatiota ja morfologiaa. RTCA:n perusjärjestelmä xCELLigence RTCA on osoittautunut lupaavaksi menetelmäksi toksisuusmittauksiin. Perinteiset toksisuusmittaukset voidaan luokitella mitattavan biologisen ominaisuuden perusteella seuraaviin keskeisiin luokkiin: 1. solun metaboliseen aktiivisuuteen perustuvat määrytykset, 2. solun permeabiliteettimäärytykset, 3. apoptoosimäärytykset ja 4. proliferaatiomäärytykset. Merkkiainepohjaisiin menetelmiin, kuten tetrazoliumsuolamäärytyksiin, verrattuna RTCA ei vaadi ylimääräisten kemiallisten reagenssien käyttöä mittauksessa, mikä minimoi soluihin kohdistuvan häiriön. Lisäksi RTCA-menetelmä tukee reaaliaikaista mittaustapaa, ja tietokoneohjelman luoma soluindeksikäyrä antaa kattavammin tietoa esimerkiksi solujen lisääntymisestä kuin päätepistemäärytykset. RTCA:n käyttöä kuitenkin rajoittavat vielä tietokonepohjaisesta järjestelmästä sekä kertakäyttöisistä kuoppalevyistä johtuvat kalliit käyttökustannukset sekä impedanssiprofilien vaikeaselkoisuus.

Avainsanat: sytotoksisuus, reaaliaikainen soluanalyysi, impedanssi, soluindeksi, toksisuusmittaukset

SISÄLLYSLUETTELO

1 Johdanto	1
2 Sytotoksiset syöpälääkkeet	2
2.1 Syöpälääkkeet	2
2.2 Sytotoksiset aineet kemoterapiassa	4
2.3 Sytotoksisuuden sivuvaikutukset elimistössä	5
2.4 Perinteiset analyttiset menetelmät sytotoksisuuden mittauksessa	6
2.4.1 Solun metabolinen aktiivisuus	8
2.4.2 Solukalvon läpäisevyys	10
2.4.3 Apoptoosi	11
2.4.4 Proliferaatio	12
3 Reaaliaikainen soluanalyysi	13
3.1 Solujen adheesioon perustuvat menetelmät	13
3.2 Reaaliaikainen soluanalyysi	15
3.3 RTCA-teknologia ja sen sovellukset	17
4 RTCA:n ja muiden menetelmien vertailua	21
5 Reaaliaikaisen soluanalyysin haasteet ja tulevaisuus	24
6 Yhteenveto	21
Viitteet	21

1 Johdanto

Syöpäsairaudet ovat maailmanlaajuisesti yleisimpiä kuolinsyitä, ja Maailman terveysjärjestö (WHO) on raportoinut, että syöpään kuolee vuosittain yli 8 miljoonaa ihmistä. Sädehoidon ja leikkauksen lisäksi kemoterapia on tavallisimpia syövänhoitomuotoja, mutta sen tehokasta hoitovastetta heikentävät potilaalle haitalliset sivuvaikutukset. Perinteisten hoitojen rinnalle on kehitetty kohdennetumpia hoitomuotoja, esimerkiksi immunoterapeuttisia hoitoja, ja tällaiset hoitomuodot ovat olleet merkittävä kehitysaskel syövänhoidossa. Täsmälääkehoidon lisäksi solupohjaisilla määrityksillä voitaisiin vaikuttaa merkittävästi syöpätutkimukseen ja lääkekehitykseen, sillä tällaiset määritykset mahdollistavat kemoterapiahoitojen sytotoksisten eli soluille haitallisten vaikutusten arvioinnin. Tällä tavoin lääkekehitysprosessia voitaisiin optimoida ja madaltaa sen kustannuksia.

Sytotoksisten syöpälääkkeiden soluvasteita arvioidaan toksisuusmittauksilla. Tyypilliset toksisuusmittaukset perustuvat värin poissulkuun, spektrofotometrisesti luettavien yhdisteiden käyttöön, sekä ATP-pohjaisiin bioluminesenssimäärityksiin. Solujen elinkelpoisuusmääritykset (*engl.* cell viability assays, CVAs) voidaan luokitella neljään kategoriaan seuraavien mitattavien ominaisuuksien perusteella: solujen metabolinen aktiivisuus, solukalvon läpäisevyys, apoptoosi ja proliferaatio. Solujen metabolisen aktiivisuuden mittaamiseen pohjautuvat tetrazoliumsuolamääritykset, Alamar Blue ja CellTiter-Glo ovat herkkiä ja yksinkertaisia menetelmiä, ja selkeiden tulosten ansiosta ne ovat luotettavia toksisuusmäärityksiä. Apoptoosimääritys aneksiini-V ja proliferaatiomääritys RealTime-Glo MT CVA tukevat dynaamista mittaustapaa, mikä tekee menetelmistä herkempiä päätepidemäärityksiin verrattuna. Monet menetelmät vaativat kuitenkin soluihin kajoavan merkkiaineen käyttöä, ja osa määrityksistä antaa vain yksittäisiä mittaustuloksia.

Reaaliaikainen soluanalyysi (*engl.* real-time cell assay, RTCA) on impedanssipohjainen menetelmä, jolla voidaan mitata dynaamisesti ja ei-invasiivisesti solujen käyttäytymistä ja fysiologisia ominaisuuksia aiheuttamatta ylimääräistä stressiä tai häiriötä tutkittaville solulinjoille. Menetelmä mahdollistaa solujen adheesion, proliferaation ja morfologian määrittämisen, ja RTCA:n perusjärjestelmällä xCELLigence RTCA:lla onkin useita sovelluskohteita esimerkiksi lääkeseulonnessa sekä mikro- ja solubiologisissa tutkimuksissa. Muihin toksisuusmittauksiin verrattuna tietokonepohjainen RTCA-järjestelmä muodostaa soluindeksikäyriä, jotka kertovat solun fysiologisista muutoksista. Menetelmä on kuitenkin kallis, ja tulosten tulkinta vaatii kokemusta sekä vahvaa tietämystä solubiologisista muutoksista. Tässä tutkielmassa perehdytään RTCA-menetelmään ja perinteisiin analyttisiin toksisuusmittauksiin, sekä vertaillaan menetelmiä keskenään. Lisäksi tutkielmassa käsitellään lyhyesti erilaisia syövänhoitomuotoja sekä kemoterapialääkkeitä ja niiden sytotoksisia vaikutuksia elimistössä.

2 Sytotoksiset syöpälääkkeet

Yhdysvaltain Kansallisen Syöpäinstituutin (The National Cancer Institute, NCI) mukaan syöpä on yleistermi sairauksille, joissa epänormaalit solut jakautuvat hallitsemattomasti ja voivat tunkeutua viereisiin kudoksiin. Maailman terveysjärjestö (WHO) on raportoinut, että syövällä on verisuoni- ja sydänsairauksien jälkeen maailmanlaajuisesti toiseksi suurimmat kuolleisuusluvut.^{1,2} Solujen kontrolloimattoman jakautumisen ja kajoavuuden vuoksi syöpä on nopeasti etenevä sairaus, jonka hoitaminen vaatii tehokkaita hoitomuotoja, joista yksi yleisimpiä on sytostaattien käyttöön perustuva kemoterapia. Potilaiden hoitotuloksia kuitenkin heikentävät sytostaattien toksiset sivuvaikutukset elimistössä, ja tällaisten vasteiden arvioiminen toksisuusmittauksilla onkin tärkeä osa lääkekehitystä. Sytotoksisten eli soluille haitallisten lääkeaineiden toimintamekanismit perustuvat useisiin eri mekanismeihin, esimerkiksi DNA:n vaurioittamiseen ja solunjakautumisen pysäyttämiseen. Sytotoksisten vasteiden mittaamisen lisäksi syövänhoito on kehittynyt merkittävästi kohdennettujen hoitomuotojen, kuten immunoterapian, kehittämisen myötä. Seuraavaksi tarkastellaan erilaisia syövänhoitomenetelmiä ja perehdytään tarkemmin sytotoksisiin aineisiin sekä niiden sivuvaikutuksiin elimistössä. Lisäksi tarkastellaan syvemmin sytotoksisten vaikutusten mittaamisessa käytettäviä analyyttisiä menetelmiä.

2.1 Syöpälääkkeet

NCI:n määritelmän mukaan syövän toimintaperiaate perustuu epänormaalien solujen hallitsemattomaan jakautumiseen ja viereisiin kudoksiin tunkeutumiseen. Tyypillisimpiä syövän hoitomenetelmiä ovat sädehoito, kirurgia ja kemoterapia. Syöpäsolujen kasvun ja leviämisen kannalta välttämättömiin toimintoihin tai rakenteisiin kohdistuvien lääkkeiden kehitys ja eri lääkeyhdistelmien käyttöönotto ovat kehittäneet syöpähoitoja merkittävästi viime vuosikymmenten aikana. Täsmälääkkeiden myötä syöpäpotilaiden eloonjäämisennusteet ovat parantuneet huomattavasti. Syöpälääkkeet voidaan luokitella niiden vaikutusmekanismin perusteella seuraaviin kategorioihin: sytotoksiset kemoterapeuttiset aineet, immunoterapia, vasta-ainekonjugaatit ja molekyylikohdennetut hoidot (molecular targeted therapeutics, MTT).^{1,3}

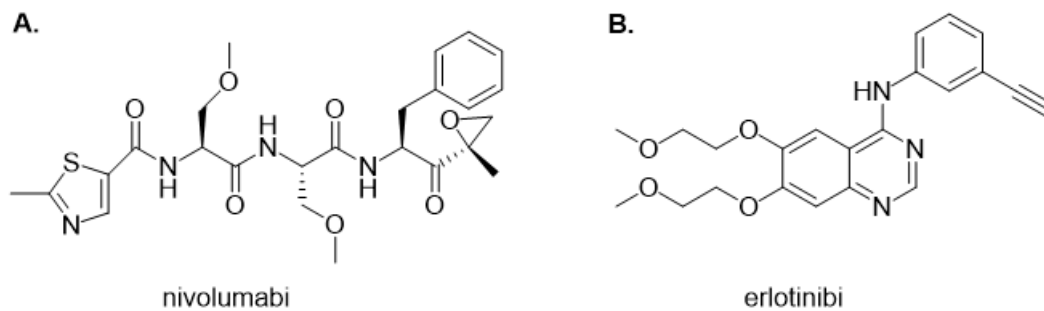
Kemoterapia on yleisin syövänhoitomuoto kirurgian ja sädehoidon ohella, ja nimensä mukaisesti se tarkoittaa kemiallisen yhdisteen käyttöä hoitomuotona. Vaikutusmekanismin perusteella luokiteltavia kemoterapeuttisia aineita eli sytostaatteja on useita erilaisia ja niitä käsitellään tarkemmin luvussa 2.2. Sytostaattien käyttöön liittyy monia ei-toivottuja toksisia sivuvaikutuksia,

jotka johtuvat kasvainsolujen resistenssistä kemoterapialle ja siitä, että syöpäsolut ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan normaalien solujen kaltaisia.¹

Immunoterapia hyödyntää elimistön immuunijärjestelmää syöpäsolujen tunnistamiseen ja tuhoamiseen, ja sädehoitoon ja kemoterapiaan verrattuna se on kohdennettu hoitomuoto. Menetelmä perustuu immuunijärjestelmän vahvistamiseen tai muokkaamiseen niin, että hoito pystyy kohdistumaan erityisesti syöpäsoluihin, mikä suojaa terveitä kudoksia. Immunoterapiassa käytettyjä tunnetuimpia hoitomenetelmiä ovat immuunivasteen vapauttajat (*engl.* immune checkpoint inhibitors, ICI), CAR-T-soluterapia ja vasta-ainehoito. Näiden lisäksi merkittäväksi immunoterapeuttiseksi hoitomuodoksi ovat nousseet syöpärokotteet, jotka aktivoivat immuunijärjestelmän ilmentämällä kasvaimelle spesifisiä antigeenejä. Immuunivasteen vapauttajat, kuten nivolumabi (kuva 1A), inhiboivat proteiineja (esimerkiksi PD-1, PD-L1 ja CTLA-4), joita syöpä- tai immuunisolut käyttävät immuunivasteen heikentämiseen. Estämällä mainittujen proteiinien signalointireittejä immuunivasteen vapauttajat mahdollistavat T-solujen tehokkaamman hyökkäyksen syöpäsoluja vastaan. Solu- ja geeniterapeuttisessa CAR-T-soluterapiassa potilaan T-soluja muokataan geneettisesti siten, että ne ilmentävät kimeerisiä vasta-ainereseptoreita eli CAR:eja (*engl.* chimeric antigen receptor, CAR). Tämä parantaa T-solujen kykyä tunnistaa ja tuhota syöpäsoluja.⁴ Monoklonaaliset vasta-aineet ovat laboratoriossa valmistettuja proteiineja, jotka tunnistavat syöpäsolujen ilmentämiä kohdeantigeenejä ja sitoutuvat niihin. Tällä tavoin vasta-aineet ohjaavat immuunijärjestelmän tuhoamaan kyseiset solut.⁴ Vasta-aineiden luokittelu perustuu niille spesifisiin kohdeantigeeneihin. Esimerkiksi rintasyövän hoidossa käytettävän Herceptin-lääkkeen vaikuttava aine trastutsumabi sitoutuu HER2/neu-reseptoriin.³

Vasta-ainelääkekonjugaatit (*engl.* antibody-conjugates, ADCs) ovat spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita, jotka yhdistyvät kemiallisesti suunnitellun linkkerin avulla sytotoksiseen lääkeaineeseen. ADC:t kuljettavat sytotoksisia lääkeaineita suoraan syöpäsoluihin, jolloin terveet solut eivät vaurioidu.³ Konjugaatti koostuu antigeeniin sitoutuvasta osasta (Fab) ja kiteytyvästä osasta (Fc), joka vastaa vasta-ainevälitteisestä solusytotoksisuudesta, komplementtivilitteisestä sytotoksisuudesta ja vasta-ainevälitteisestä fagosytoosista. Brentuksimabivedotiini on ADC-valmiste, jolla hoidetaan Hodgkinin lymfoomaa.⁵

Nykyaikaisessa syöpähoidossa hyödynnetään paljon immunoterapian ja molekyylikohdennetun hoidon yhdistelmää. Molekyylikohdennetut hoidot perustuvat syövän kasvun ja elinkyvyn kannalta tärkeiden signaalireittien inhiboimiseen. Tällaisilla lääkkeillä on eri molekyylikohteet syöpäsolujen kasvua säätelevillä signaalintireiteillä. Esimerkiksi tyrosiinikinaasin estäjät kohdistuvat epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR) signaalintireittiin. Erlotinibi (kuva 1B) on tyrosiinikinaasin aktiivisuutta estävä aine, joka vaikuttaa useisiin reseptorivälitteisiin kasvusignaalointiin liittyviin solunsisäisiin reitteihin, mikä aiheuttaa solun toimintahäiriön ja sitä seuraavan solukuoleman. Molekyylikohdennetuilla hoidoilla voidaan myös muokata kasvaimen mikroympäristöä niin, että se on suotuisampi immuunivasteelle. EGFR-reitin inhiboinnin lisäksi tyrosiinikinaasin estäjät voivat säädellä immuunisolujen toimintaa tehostaen T-solujen hyökkäystä syöpäkasvaimiin.⁶



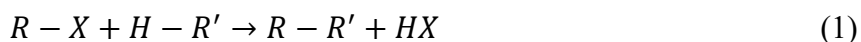
Kuva 1. Syöpälääkemolekyylejä.

2.2 Sytotoksiset aineet kemoterapiassa

Kemiallisen yhdisteen sytotoksisuus tarkoittaa sen herkkyyttä aiheuttaa solukuolemia.⁷ Kemoterapiahoitojen vaikutukset perustuvat sytotoksisiin syöpälääkeaineisiin, jotka estävät solujen kasvua ja jakautumista, sekä pienentävät syöpäkasvainta. Näiden kemoterapeuttisten lääkeaineiden vaikutus syöpäsoluihin perustuu useisiin eri mekanismeihin, joita ovat DNA:n vaurioittaminen, solunjakautumisen pysäyttäminen ja solujen aineenvaihdunnan häiritseminen. Lääkemolekyylit voidaan jakaa alkyloiviin yhdisteisiin, antimetaboliitteihin, topoisomeraasi I ja II:n inhibiittoreihin ja antimitoottisiin aineisiin.^{1,6,8}

Alkyloivat yhdisteet ovat yleisimpiä kemoterapiassa käytettyjä farmakologisia yhdisteitä. Ne ovat elektrofiilejä, jotka reagoivat DNA:n nukleofiilisten rakenteiden kanssa. Tämän reaktion seurauksena tapahtuu alkyyliryhmän kovalenttinen siirtyminen. Kaavassa 1 on kuvattu alkyylireaktiossa tapahtuva nukleofiilinen substituutio: alkylaation nukleofiilisen kohteen (H-R')

vetyatomin H korvaa alkyloivan aineen alkyyliryhmä R (R-X). Tässä alkyyliryhmässä X on negatiivisesti varautunut halogeeniatomi, esimerkiksi kloori Cl.⁹

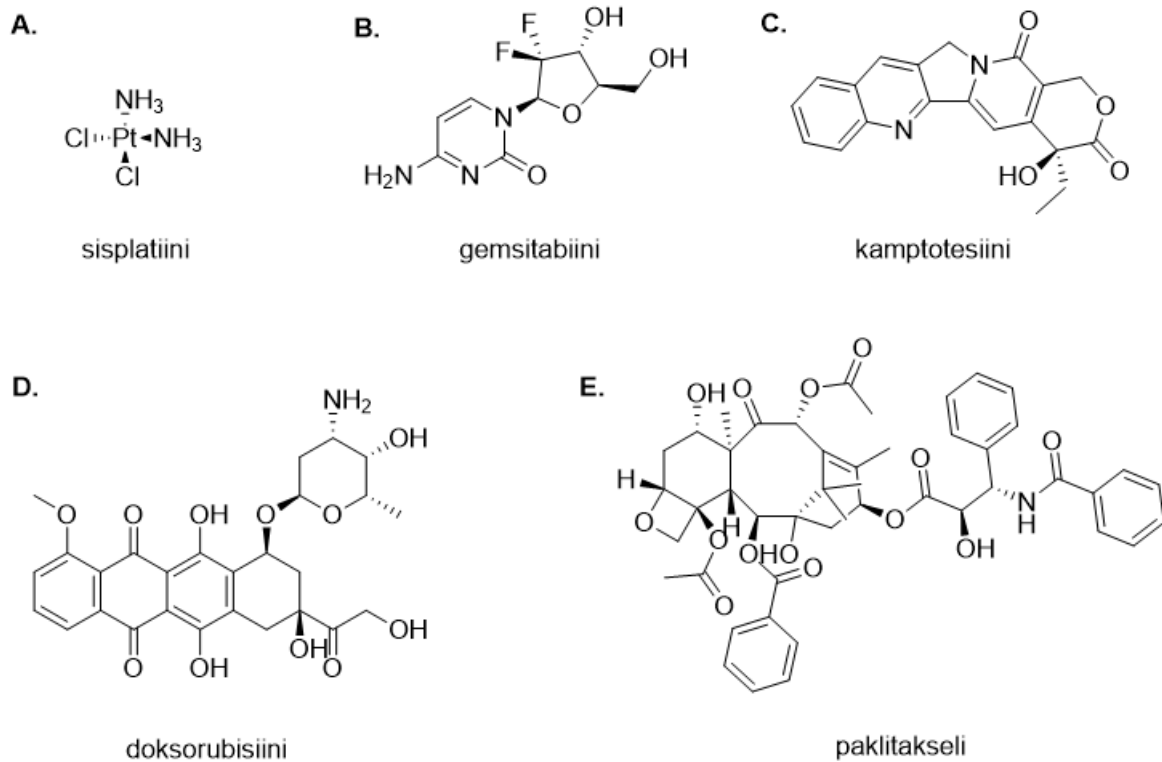


Alkyloivat aineet reagoivat DNA-emästen rengasrakenteen typpiätomien N ja rakenteen ulkopuolisen happiatomin O kanssa muodostaen kovalenttisia addukteja eli kahden molekyylin muodostamia kemiallisia yhdisteitä. Tällaiset adduktit voivat olla yksinkertaisia metyyliiryhmiä tai monimutkaisempia alkyylilisäyksiä, jotka voivat aiheuttaa ristisidosten muodostumista DNA-juosteisiin, normaalista poikkeavien emäsparien muodostumista tai juostekatkoja DNA:ssa. Kemoterapeuttiset alkyloivat yhdisteet voidaan luokitella kuuteen kategoriaan: triaseenit, hydratsiinit, nitrosoureat, typpisiinapit, oksatsafosforiinit, alkyylialkaanisulfonaatit, etyleeni-imiinit ja platinajohdannaiset yhdisteet. Platinajohdannainen sisplatiini (kuva 2A) on yleisimmin käytettyjä lääkeaineita kemoterapiassa ja sitä käytetään useiden eri syöpien, kuten keuhkojen ja kohdunkaulan syöpien, hoidossa.^{6,8,9}

Antimetaboliitit koostuvat useista ryhmistä, joita ovat pyrimidiiniantagonistit, puriiniantagonistit, puriinianalogit, antifolaatit ja ribonukleotidireduktaasin estäjät. Näiden syöpälääkkeiden toiminta perustuu soluille välttämättömien biosynteesireittien sekä DNA- ja RNA-synteesin häiritsemiseen ja DNA-juostekatkojen aiheuttamiseen estämällä tiettyjen entsyymien (dihydrofolaatireduktaasi, ribonukleotidireduktaasi ja DNA-polymeraasi) toimintaa. Antimetaboliitit voivat myös liittyä DNA:han tai RNA:han virheellisinä pyrimidiini- tai puriiniyhdisteiden rakenneanalogeina. Esimerkki tällaisesta antimetaboliitista on pyrimidiiniantagonisti gemitabiini (kuva 2B), jota käytetään rinta- ja munasarjasyöpien hoidossa. Se on sytosiininukleosidianalogi, joka aktiivisessa muodossaan korvaa solun luonnolliset nukleotidit muodostaen puutteellisia DNA-juosteita, jotka eivät voi replikoitua.^{6,8}

Topoisomeraasi I:en ja II:en inhibiittorit estävät DNA:n replikaatiossa tarvittavien topoisomeraasientsyymien toiminnan ja aiheuttavat katkoksia DNA-juosteisiin.⁶ Kamptotesiini (kuva 1C) on topoisomeraasi I:en inhibiittori, joka vaurioittaa DNA:ta aiheuttamalla vääntöjännitystä juosteeseen.¹ Topoisomeraasi II:en inhibiittori doksorubisiini (kuva 2D) on eräs yleisimmistä solunsalpaajista, jolla hoidetaan esimerkiksi leukemiaa ja pienisoluista keuhkosyöpää. Se on antrasykliiniantibioottien ryhmään kuuluva sytostaatti, joka estää solun replikaation ja DNA:n transkriptioon liittyviä keskeisiä prosesseja sitoutumalla topoisomeraasi II:een. Lisäksi se voi vaurioittaa nukleiinihappoja.⁸

Antimitoottiset aineet, kuten taksaanit ja vinka-alkaloidit, estävät tuman jakautumisen vaikuttamalla solun mikrotubulusten toimintaan ja muodostumiseen, mikä keskeyttää mitoosin ja johtaa solukuolemaan.⁶ Taksaaneista yleisimmin käytetty lääke on paklitakseli (kuva 2E), jota käytetään rintasyövän hoidossa. Paklitakseli estää mikrotubulusten toimintakykyä aktivoimalla niiden rakenneyksikön eli tubuliiniproteiinin sitoutumisen mikrotubuluksiin, jolloin solusykli pysähtyy ja mitoosi estyy.¹⁰



Kuva 2. Kemoterapeuttisia lääkemolekyylejä.

2.3 Sytotoksisuuden sivuvaikutukset elimistössä

Kemoterapia vaikuttaa tehokkaasti jakautuviin syöpäsoluihin, mutta hoitomuodon terapeuttisista hyödyistä huolimatta se aiheuttaa systemaattista toksisuutta, joka vaikuttaa negatiivisesti potilaiden hoitotuloksiin ja rajoittaa hoidon onnistumista. Useimpien onkologisten lääkkeiden terapeuttinen alue on hyvin kapea, minkä vuoksi potilaalle on vaikea antaa tehokasta hoitoannosta ilman toksisia vaikutuksia. Kuten aikaisemmassa kappaleessa käsiteltiin, kemoterapiassa käytettävien lääkkeiden vaikutusmekanismit liittyvät DNA:n interkalaatioon, solun mikrotubulusten toiminnan häiritsemiseen sekä nukleiinihapposynteesin estämiseen. Sytotoksiset vaikutukset eivät ole

kohdennettuja, minkä vuoksi kemoterapeuttiset aineet aiheuttavat merkittäviä histomorfologisia muutoksia syöpäkudoksen lisäksi elimistön terveissä kudoksissa. Haitalliset vaikutukset ulottuvat erityisesti sellaisiin kudoksiin, joilla on korkea jakautumisaktiivisuus, kuten luuytimeen, ruoansulatuskanavan epiteeliin ja munuaistubuluksiin. Histopatologinen tutkimus on osoittanut, että hoidon jälkeen pahanlaatuisissa kudoksissa esiintyy yleisiä soluvaurioon liittyviä piirteitä, kuten tuman pientymistä, tumakalvon hajoamista sekä kromatiinin pientymistä ja hajoamista.¹¹ Sytostaattien yleisiä haittavaikutuksia ovat pahoinvointi, hiustenlähtö ja väsymys. Yleisimpien syöpälääkeaineiden sytotoksisia sivuvaikutuksia on esitelty tarkemmin taulukossa 1.

Taulukko 1. Yleisimpien sytostaattien sytotoksiset sivuvaikutukset.

Kemoterapia-aine	Sytostaatti	Sytotoksiset sivuvaikutukset
Alkyloivat aineet	Sisplatiini	Luuytimen toiminnan heikkeneminen, munuaisvauriot
Antimetaboliitit	Gemsitabiini	Maksan ja munuaisten vajaatoiminta
Topoisomeraasi I:en inhibiittori	Kamptotesiini	Ripuli, luuytimen toiminnan heikkeneminen
Topoisomeraasi II:en inhibiittori	Doksorubisiini	Verisuonivauriot
Antimitoottinen aine	Paklitakseli	Ääreishermostovauriot, neutrofiilisten valkosolujen puute

2.4 Perinteiset analyttiset menetelmät sytotoksisuuden mittauksessa

Solujen elinkelpoisuusmäärityksillä (*engl.* cell viability assays, CVAs) voidaan arvioida solujen terveyttä, kasvua, lisääntymistä ja sytotoksisia vasteita. Tällaiset määritykset ovat laajasti käytössä biolääketieteellisessä tutkimuksessa, lääkekehityksessä ja bioteknologian alalla. Sytotoksisuus- ja CVA-määrityksillä voidaan mitata solujen fysiologisia vasteita lääkkeisiin, toksisiin yhdisteisiin ja ulkoisiin stressitekijöihin. CVA-määritykset voidaan luokitella sen perusteella, mitä solun perusominaisuuksia ne mittaavat, ja määritykset voidaan jakaa neljään keskeiseen kategoriaan: 1.

solun metaboliseen aktiivisuuteen perustuvat määritykset, 2. solun permeabiliteettimääritykset, 3. apoptoosimääritykset ja 4. proliferaatiomääritykset. Näiden luokkien puitteissa menetelmät voivat keskittyä yksittäisen solun tai kokonaisen populaation tasolle, ja määritysten tukena voidaan hyödyntää erilaisia detektiotekniikoita, kuten fluoresenssia, luminesenssia, mikroskopiaa, monikuoppalevylukijaa ja virtaussytometriä.¹² Osa CVA-määrityksistä on päätepistemäärityksiä (*engl.* endpoint assays), joissa mittaus optimoidaan yksittäisiin ajankohtiin ja näistä aikapisteistä valitaan paras tuloksia varten.¹³

2.4.1 Solun metabolinen aktiivisuus

Tetrazoliumsuolamääritys on yksi yleisimmistä kvantitatiivisista toksisuusmittauksista, jolla voidaan havaita kolorimetrisesti aineenvaihdunnallisen aktiivisuuden perusteella elinkykyiset solut mikrobeista nisäkässoluihin asti. Määritykset perustuvat biokemiallisiin pelkistysreaktioihin, joissa mitokondriaaliset dehydrogenaasientsyymit pelkistävät tetrazoliumyhdisteen värilliseksi formatsaanikiteiksi. Dehydrogenaasientsyymit osallistuvat solun keskeisiin biokemiallisiin reaktioihin, kuten oksidatiiviseen fosforylaatioon, minkä vuoksi ne ovat tärkeitä solun aineenvaihdunnalle ja näin ollen välttämättömiä solun elinkyvyn ylläpitämisessä.^{12,13}

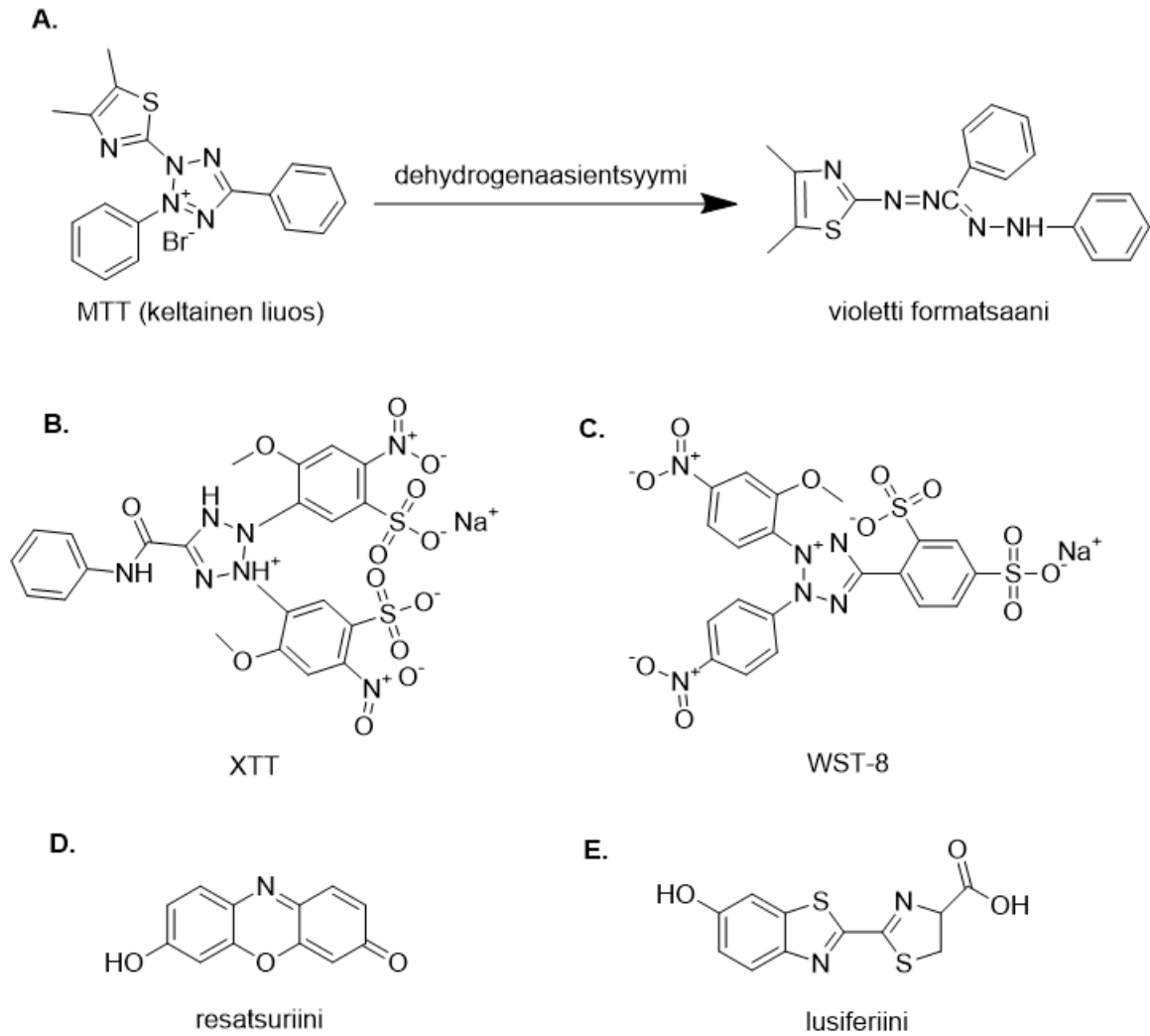
Yleisimpiä tetrazoliumyhdisteitä ovat MTT (3-(4,5-dimetyylitiasol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrazoliumbromidi) (kuva 3A), XTT (natrium 3'-[1-(fenyylamino)-karbonyyli]-3,4-tetrazolium-bis(4-metoksi-6-nitro)bentseenisulfonihappohydraatti) (kuva 3B) ja WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenyyli)-3-(4-nitrofenyyli)-5-(2,4-disulfofenyyli)-2H-tetrazolium, natriumsuola] (kuva 3C). Positiivisen varauksen ansiosta MTT-yhdiste läpäisee vaivattomasti solukalvon, mutta negatiivisesti varautuneet XTT ja WST-8 eivät pääse yhtä helposti solun sisälle kuin MTT. Tästä syystä XTT- ja WST-määrityksissä tarvitaan yleensä elektroninvälittäjä, joka siirtää elektronit sytoplasmasta tai solukalvolta, mikä johtaa tetrazoliumyhdisteen pelkistymiseen.^{12,13}

MTT-määrityksessä dehydrogenaasientsyymi pelkistää MTT-yhdisteen keltaisen liuoksen liukenemattomiksi, violeteiksi formatsaanikiteiksi (kuva 3A). Korkea formatsaanikonsentraatio kertoo korkeasta aineenvaihdunnallisesta aktiivisuudesta ja vastaavasti matala konsentraatio alhaisesta aineenvaihdunnallisesta aktiivisuudesta. MTT- ja XTT-määritykset ovat hyvin samankaltaiset, mutta XTT-yhdiste muodostaa metabolisesti aktiivisessa solussa pelkistyessään liukoisia, oranssin värisiä formatsaanikiteitä.⁷ WST-8-yhdistettä käytetään Dojindon lanseeraamassa CCK-8-mittauksessa (Cell Counting Kit-8). Entsymaattisessa reaktiossa WST-8-yhdiste pelkistyy vesiliukoiseksi, oranssin väriseksi formatsaaniksi. Kaikissa tetrazoliumsuolamäärityksissä

formatsaanin värin absorbanssia mitataan spektrofotometrisesti 450-490 nm aallonpituudella mikrolevylukijalla.^{12,14}

Tetrazoliumsuolamääritysten tavoin resatsuriinimääritys Alamar Blue perustuu useiden dehydrogenaasientsyymien katalysoimaan pelkistysreaktioon, joka heijastaa koko solun pelkistyskykyä. Resatsuriini (kuva 3D) on ei-myrkyllinen, solukalvon läpäisevä sininen väriaine, joka pelkistyy entsyymaattisesti solussa resorufiiniksi. Resorufiini on voimakkaasti fluoresoiva vaaleanpunainen yhdiste, jonka fluoresenssin voimakkuus on yhteydessä solun elinkykyyn. Yhdiste voidaan havaita kolorimetrisesti 570 nm:n aallonpituudella tai fluoresenssin avulla, kun viritys on aallonpituudella 530-560 nm ja emissio 580-620 nm.¹²

Solujen pelkistyspotentiaalia mittaavien kokeiden lisäksi ATP-pohjaiset bioluminesenssimääritykset ovat tärkeitä metabolista aktiivisuutta arvioivia analyysejä, sillä ATP on solun ensisijainen energialähde ja näin ollen tehokas solun elinkyvyn indikaattori. Promegan julkaisema CellTiter-Glo perustuu lusiferaasientsyymien katalysoimaan reaktioon, jossa ATP:ta energialähteenä käyttävä lusiferiini (kuva 3E) hapettuu tuottaen bioluminesenssia, joka voidaan havaita 560 nm:n aallonpituudella luminometrillä. Luminesenssi kertoo suoraan solunsisäisestä ATP-tasosta. Solujen menettäessä solukalvon eheyden ATP-synteesi ei ole enää mahdollinen, ja endogeeniset ATPaasit kuluttavat nopeasti jäljellä olevan ATP:n, mikä tekee ATP-pohjaisista määrityksistä erityisen herkkiä apoptoosin mittaamisessa.¹²



Kuva 3. Tetrazoliumsuoja-, Alamar Blue- ja CellTiter-Glo-määrittämissä käytettäviä molekyylejä. A-kohdassa on kuvattu MTT:n keltaisen liuoksen pelkistyminen dehydrogenaasientsyymin vaikutuksesta violetiksi formatsaaniksi.

2.4.2 Solukalvon läpäisevyys

Värin poissulkuun perustuva menetelmä on yksi laajasti käytetyistä menetelmistä solun permeabiliteettimäärittämissä, kun halutaan arvioida elävien ja kuolleiden solujen määrää tietyssä populaatiossa. Menetelmä perustuu solukalvon läpäisevyyteen: väriaineet eivät voi läpäistä ehjää solukalvoa, mutta ne voivat kulkea vaurioituneen solukalvon läpi. Väriaineiden pääsy solulimamatriisiin johtaa sytoplasman tai tumen värjäytymiseen, jolloin värjäytyneet ja ei-värjäytyneet solut voidaan helposti erottaa toisistaan valomikroskoopin, fluoresenssimikroskoopin tai virtausytometrian avulla. Määrittämissä suositetaan hyvin hydrofiilisiä väriaineita, joiden

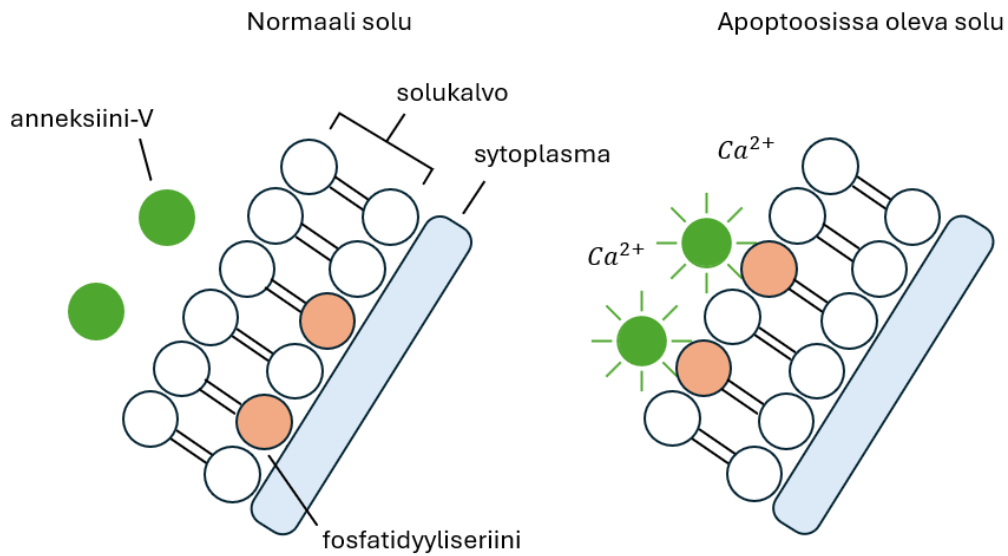
molekyylipaino on yli 500 Da. Tällaiset väriaineet minimoivat passiivisen siirtymisen solukalvon läpi. Trypaanin sininen, propidiumjodidi (PI) ja etidiumhomodimeeri-1 (EthD-1) ovat suuria ja hyvin polaarisia väriaineita, jotka eivät läpäise solukalvoa. Näin ollen ne pääsevät helposti siirtymään vaurioituneiden solukalvojen läpi, ja osoittavat joko värjäytymistä tai fluoresenssia.¹²

Trypaanin sinisen väriaineen käyttöön perustuva menetelmä on yksi vanhimmista ja laajimmin käytetyistä CVA-määrittelyistä, jolla voidaan kvantitatiivisesti analysoida solujen määrää. Menetelmää käytetään edelleen apuna lääkkeiden tai toksiinien aiheuttamien solujen elinkelpoisuuteen liittyvien muutosten varmentamisessa sekä soluviljelyssä. Trypaanin sininen on diatsoväriaine, jonka kemiallinen rakenne on negatiivisesti varautunut ja näin ollen trypaanin sininen ei läpäise terveiden solujen ehjää solukalvoa, mutta pääsee helposti vaurioituneiden solukalvojen läpi. Mikroskoopilla tarkasteltuna elävät solut näkyvät kirkkaina ja kuolleet solut siniseksi värjäytyneinä.¹²

2.4.3 Apoptoosi

Apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema on tarkasti säädelty tapahtuma, joka eliminoi tarpeettomat, vialliset tai mahdollisesti vaaralliset solut, ja estää näin esimerkiksi syövän tai autoimmuunisairauksien kehittymisen. Apoptoosi on välttämätön kudosten homeostaasille, kehitykselle ja immuunijärjestelmän säätelylle. Apoptoosiin vaikuttavat sen eri vaiheissa biokemialliset ja rakenteelliset muutokset solussa, ja apoptoosimääritykset mittaavatkin suoraan solukuolemaa aiheuttavia tekijöitä, kuten muutoksia solukalvopotentialissa, kaspasiaktiivisuutta, mitokondrion epänormaalia toimintaa ja DNA:n vaurioitumista.¹²

Anneksiini-V-määritys (*engl.* Annexin V) perustuu nimensä mukaisesti kalsiumriippuvaisen anneksiini-V-proteiiniin käyttöön. Tämä proteiini sitoutuu suurella herkkyydellä fosfolipidi fosfatidyyliiseriiniin (*engl.* phosphatidylserine, PS), joka on normaalisti sitoutunut terveissä soluissa solukalvon sisäpuolelle. Anneksiini-V ei pysty läpäisemään solukalvoa, joten se ei pysty sitoutumaan PS:ään. Kuitenkin solukuoleman aikana PS siirtyy solukalvon ulkopuolelle, jolloin fluoresenssimerkkiaineella merkitty anneksiini-V voi sitoutua siihen, ja toimia herkkänä koettimena apoptoottisille soluille osoittamalla PS:n siirtymisen solun ulkopuolelle (kuva 5). Anneksiini-V:llä ei voida erottaa apoptoottisia ja nekroottisia eli hallitsemattomasti kuolevia soluja toisistaan, joten menetelmää käytetään yleensä yhdessä väriaineiden, kuten PI:n, kanssa.¹²



Kuva 5. Anneksiini-V:n toimintaperiaate. Kalsiumriippuvainen anneksiini-V sitoutuu fosfatidyyliseriiniin, joka on normaalisti terveessä solussa sitoutunut solukalvon sisäpuolelle. Anneksiini-V ei voi läpäistä solukalvoa, joten se voi sitoutua fosfolipidiin ainoastaan apoptoottisissa soluissa, joissa kyseinen solukomponentti on siirtynyt solukalvon ulkopuolelle. Fluoresenssimerkkiaineella merkitty anneksiini-V osoittaa näin apoptoottiset solut.

2.4.4 Proliferaatio

Proliferaatiomääritysten avulla voidaan arvioida solujen kasvu- ja jakautumiskykyä vasteena erilaisille fysiologisille olosuhteille, lääkeainealtistukselle tai geneettisille muokkauksille. Reaaliaikainen elinkelpoisuusmääritys on uusi, lusiferaasipohjaisiin menetelmiin perustuva mittaustapa ja ainoa solujen elinkykyä mittaava määritys, joka mahdollistaa solutason muutosten dynaamisen seurannan. Menetelmä soveltuu monipuolisesti erilaisiin sovelluksiin, sillä sitä voidaan hyödyntää jatkuvissa mittauksissa sekä päätepestemäärityksissä. Promegan lanseeraama RealTime-Glo MT CVA on reaaliaikainen elinkelpoisuusmääritys, joka perustuu merikatkaravusta peräisin olevan muokatun lusiferaasin (NanoLuc) ja solukalvon läpäisevän pro-substraatin (esimerkiksi pro-furimatsiini) käyttöön. Pro-substraatti pelkistyy elävissä soluissa substraatiksi, joka siirtyy kasvatusväliaineeseen. Lusiferaasi käyttää substraattia luminesenssin tuottamiseen. RealTime-Glo MT CVA-määrityksessä dynaaminen mittaustapa mahdollistaa signaalin toistuvan mittaamisen ajan kuluessa, mikä antaa reaaliaikaista tietoa solujen elinkelpoisuudesta ja proliferaatiosta jopa 72 tunnin ajan. Luminesenssi heikkenee nopeasti apoptoosin yhteydessä, mikä puolestaan mahdollistaa

menetelmän yhdistämisen muiden lysaatiovaiheen sisältävien luminesenssimääritysten kanssa ja vähentää näin häiriötä myöhemmissä määrityksissä.¹²

3 Reaaliaikainen soluanalyysi

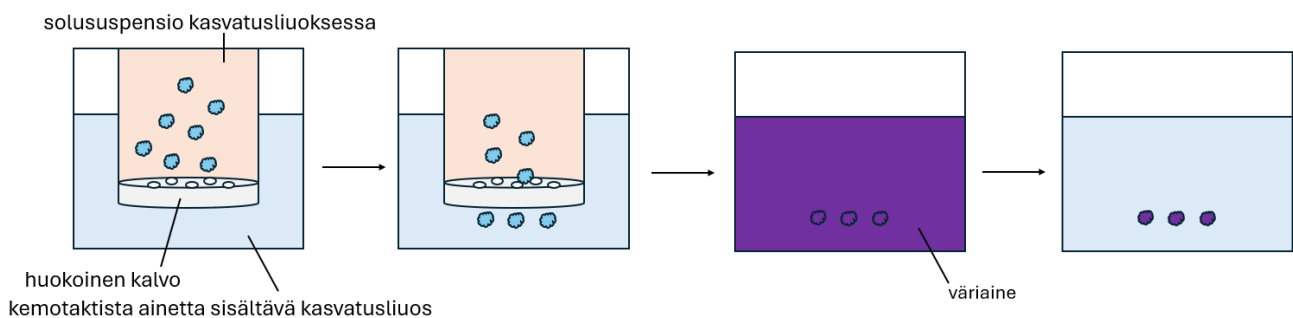
Solupohjaiset määritykset ovat avainasemassa toksisten vasteiden määrittämisessä, sillä tällaiset menetelmät mahdollistavat solun biologisten ominaisuuksien, kuten liikkumisen ja kajoavuuden, havaitsemisen. Monet markkinoilla olevista migraatioon ja invasiivisuuteen perustuvista testeistä (esimerkiksi Transwell ja xCELLigence RTCA) perustuvat Boydenin kammioon (*engl.* the Boyden chamber), jossa solut liikkuvat huokoisen kalvon läpi ylemmästä säiliöstä alempaan kohti kemotaktista ainetta. Reaaliaikainen soluanalyysi (*engl.* real-time cell assay, RTCA) on kehittynyt biosensoripohjainen menetelmä, joka mahdollistaa monipuolisesti solun erilaisten fysiologisten ominaisuuksien seurannan dynaamisesti ilman ylimääräisiä kemiallisia aineita. Reaaliaikaisuuden ansiosta menetelmä on hyvin herkkä, ja sillä onkin laajasti sovelluskohteita esimerkiksi lääkeseulonnessa sekä solu- ja mikrobiologisissa tutkimuksissa. Seuraavaksi tarkastellaan lyhyesti solujen sitoutumiseen perustuvia menetelmiä, ja perehdytään tarkemmin RTCA-teknologiaan ja sen sovelluksiin.

3.1 Solujen adheesioon perustuvat menetelmät

Solujen migraatio ja invasiivisuus ovat keskeisiä tekijöitä monissa suotuisissa fysiologisissa prosesseissa, kuten haavan paranemisessa, ja toisaalta haitallisissa patologisissa ilmiöissä, kuten syövän leviämisessä. Monet kaupalliset kvantitatiiviset *in vitro* -migraatio- ja invasiivisuustestit, kuten Transwell ja xCELLigence, perustuvat 1960-luvulla kehitettyyn Boydenin kammioon (*engl.* the Boyden chamber), jolla tutkittiin alun perin leukosyyttien kemotaksista eli solujen pitoisuuseroista riippuvaa liikkumista. Perinteinen Boydenin kammio koostuu kahdesta säiliöstä, joiden välissä on huokoinen kalvo. Huokokset ovat noin 3-12 µm kokoisia ja syöpäsolut liikkuvat vaivattomasti niiden läpi, mutta lymfosyytit pysyvät paikoillaan. Ylemmässä säiliössä on solujen kasvatusliuosta ja alemmassa kemotaktista ainetta sisältävää kasvatusliuosta, jota kohti solut liikkuvat tavallisesta kasvatusliuoksesta huokosten läpi. Paikoillaan pysyvät solut poistetaan säiliöstä ja liikkuvat solut värjätään niiden lukumäärän osoittamiseksi (kuva 6). Kasvainsolujen leviävyyttä voidaan tutkia tarkemmin peittämällä mikrohuokoinen kalvo esimerkiksi kollageenilla tai Matrigel-valmisteella, jotka muistuttavat rakenteeltaan soluväliainetta. Tällöin kasvainsolut voivat olla vuorovaikutuksessa soluväliaineen komponenttien kanssa, kiinnittyä niihin tai proteolyttisesti

hajottaa soluväliainetta. Tällaisessa kolmiulotteisessa ympäristössä solut ovat luonnollisemmin polarisoituneita ja niiden fenotyyppi vastaa näin paremmin in vivo -olosuhteita.¹⁵

Transwell-invaasiomäärityksessä käytetään kertakäyttöisiä monikaivoisia kuoppalevyjä, joissa on mikrohuokoinen kalvo. Kalvo voi olla valmistettu erilaisista materiaaleista, esimerkiksi polykarbonaatista, polyetyleenitereftalaatista (PET) tai polytetrafluoroetyleenistä. Nämä materiaalit eroavat toisistaan koon, huokosten tiheyden, solun kiinnittymisominaisuuksien ja mikroskooppisopivuuden suhteen. Boydenin kammion toimintaperiaatetta mukaillen kalvon huokosten päälle voidaan levittää soluväliainetta kasvainsolujen leviävyyden tutkimiseksi. Invasiivisuus riippuu soluväliaineen rakenteiden proteolyttisestä hajoamisesta. Halutun ajanjakson jälkeen solut värjätään fluoresenssivärjäyksellä tai kiinnitetään ja värjätään kristallivioletilla. Liikkuvien solujen lukumäärä voidaan laskea sen perusteella, kuinka suuri osa soluista on liikkunut kalvon läpi kohti kemotaktista ainetta. Tämän menetelmän etu on sen hyvin korkea herkkyys: jo hyvin pieni pitoisuus kemotaktista ainetta voi aiheuttaa solujen liikkumisen kalvon läpi. Tutkimuksen kesto on kuitenkin rajallinen, sillä pitoisuudet tasaantuvat nopeasti osastojen välillä ja solujen visualisointi niiden liikkussa ei ole mahdollista.¹⁵



Kuva 6. Boydenin kammion ja Transwell-määrityksen toimintaperiaate. Ylemmässä säiliössä solut ovat tavallisessa kasvatusliuoksessa ja osa soluista liikkuu huokoisin kalvon läpi alempaan säiliöön, joka sisältää kemotaktista ainetta sisältävää kasvatusliuosta. Ei-liikkuvat solut poistetaan säiliöstä ja kalvon läpi liikkuneet solut värjätään kristallivioletilla niiden laskemiseksi.

Elävien solujen mikroskopiolla voidaan leimavapaasti tai vähäisin vaikutuksin määrittää solujen proliferaatiota ja morfologiaa. Tekniikka perustuu faasikontrasti-, kirkaskenttä- tai fluoresenssikuvantamiseen, joiden avulla voidaan tunnistaa solujen konfluenssi, liikkuminen ja jakautuminen. Ajastettu mikroskopia muodostaa kasvukäyrän määrittämällä muutokset solujen tiheydessä tai niiden peittämällä alueella käyttäen automatisoitua analyysiohjelmistoa. Pitkälle kehitetyillä järjestelmillä, kuten IncuCyte-, CellVoyager- ja Cytation-alustoilla voidaan tehdä

korkeasisältöistä kuvantamista monikaivoisissa kuoppalevyissä. Menetelmien tukena voidaan käyttää tumaa tai sytoplasmaa värjääviä merkkiaineita (esimerkiksi Hoechst), mikä mahdollistaa solusyklin, mitoottisten tapahtumien ja morfologisten muutosten seuraamisen.¹²

Solut kohdistavat vetovoimia mikroympäristöönsä ja naapurisoluihinsa sekä vastaanottavat näitä mekaanisia ärsykeitä, mikä vaikuttaa solunsisäisten signaalintiketjujen aktivoitumiseen. Näiden signaalintiketjujen käynnistyminen voi vaikuttaa esimerkiksi solun adheesioon ja proliferaatioon, ja tämän vuoksi solun vetovoimien mittaaminen on välttämätöntä. Vetovoimamikroskopia (*engl.* traction force microscopy, TFM) on laajasti käytetty menetelmä solujen supistumiskyvyn mittaamiseen. TFM:ssä pehmeälle hydrogeelipinnalle upotetaan fluoresoivia helmiä ennen soluviljelyä. Solujen kiinnittyessä pinnalle ne supistuvat ja venyvät, ja kohdistavat tällä tavoin voimia alustaan, mikä aiheuttaa helmien liikkeitä hydrogeelipinnalla. Helmien siirtymät voidaan muuttaa vetovoimiksi, kun tunnetaan hydrogeelin mekaaniset ominaisuudet.¹⁶

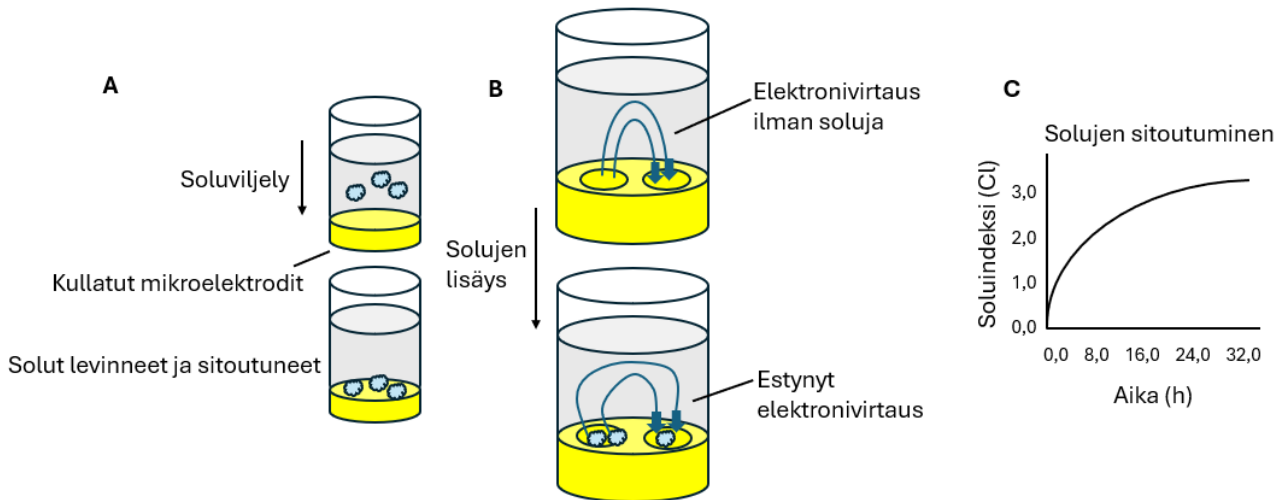
3.2 Reaaliaikainen soluanalyysi

Reaaliaikainen soluanalyysi (*engl.* real-time cell assay, RTCA) on impedanssipohjainen menetelmä, joka mahdollistaa dynaamisella tavalla solujen fysiologisten ominaisuuksien, kuten proliferaation ja sitoutumiskyvyn sekä sytotoksisuuden havaitsemisen.¹⁷ Tutkijat Giaever ja Keese kehittivät ensimmäinen RTCA-järjestelmän vuonna 1984 tutkiessaan solujen käyttäytymistä yhdistämällä elektrodien kautta sähkövirran nisäkkäiden fibroblastisoluviljelmään. Soluviljelmään lisättiin 4000 Hz:n vaihtosähkökenttä ja mitattiin sen rajan ja pienen elektrodin välistä jännitehäviötä, johon vaikutti impedanssi eli virtapiirin vaihtovirralla aiheuttama vastus. Muutokset solujen liikkeissä vaikuttivat suoraan impedanssiin muuttaen sen arvoa.¹⁸ Näiden tutkimusten pohjalta Giaever ja Keese kehittivät sähköiseen biosensortechnologiaan pohjautuvan sirupohjaisten menetelmien prototyypin, ECIS-järjestelmän (*engl.* electrical cell-substrate impedance sensing, ECIS). Nykyistä RTCA-järjestelmää käytettiin ensimmäisen kerran vuonna 2008, ja se on modernimpi versio reaaliaikaisesta solujen elektronisesta tunnistusjärjestelmästä eli RT-CES-menetelmästä (*engl.* real-time cell electronic sensing, RT-CES).¹³ RTCA:lla on jo useita sovelluksia mikrobiologiaan, metaboliitteihin, ympäristötoksikologiaan, solutoimintoihin ja uusiin potentiaalsiin syöpälääkkeisiin keskittyvissä tutkimuksissa.¹

Syöpäsolujen soluviljelytutkimuksissa RTCA-järjestelmällä voidaan käsitellä kolmea levyä samaan aikaan: adheesio-, sytotoksisuus- ja migraatiolevyjä. Adheesio- ja sytotoksisuuslevyinä käytetään E-16-levyjä, jotka mittaavat solujen sitoutumisherkkyyttä, kasvua ja lisääntymistä. Migraatiolevyinä käytetään CIM-levyjä, jotka mittaavat solujen liikkumista ja invasiivisuutta.

RTCA-menetelmällä voidaan suorittaa erikseen solujen proliferaatioon, sytotoksisuuteen, migraatioon, invaasioon sekä yhteisviljelytutkimuksiin liittyviä määrittämiä.¹⁷ Mittaus tapahtuu kullatuilla elektrodeilla, jotka on upotettu edellä mainittujen levyjen pohjiin. Elektrodeihin johdetaan 22 mV jännite, joka ei vaikuta solujen terveyteen tai käyttäytymiseen. Solun erilaiset fysiologiset tilat, kuten kasvu, morfologiset muutokset, apoptoosi ja kiinnittyminen alustaan, mitataan mikroelektronisesti sähköisenä impedanssina, johon vaikuttaa elektrodin ioninen ympäristö niin elektrodin rajapinnassa kuin myös koko liuoksessa. Silloin kun soluja ei ole läsnä kaivossa tai sitoutuneena kaivon pohjaan, elektrodien impedanssi määrittyy ionisen kasvatusliuoksen mukaan. Ilman soluja sähkövirtauksen aiheuttava elektronivirtaus tapahtuu vapaasti kasvatusliuoksen läpi. Adherentit solut muodostavat eristeen elektrodien pinnalle ja muuttavat näin elektrodiliuoksen ionista ympäristöä, mikä kasvattaa impedanssia. Solujen sitoutuminen elektrodien pinnalle tai muutokset adherenttien solujen proliferaatioissa estävät virtausta, mikä mahdollista mm. solujen määrän ja elinkyvyn herkän mittauksen.¹⁸

Perinteisessä RTCA-määrittämisessä (kuva 7) solut lisätään ensin levyille ja ensimmäisten tuntien aikana solut levittäytyvät ja sitoutuvat levyihin, mikä puolestaan näkyy nopeana impedanssin muutoksena.¹⁹ Impedanssierot voidaan laskea matemaattisilla algoritmeilla ja muuttaa soluindeksiksi eli CI-arvoksi (*engl.* cell index (CI)), johon vaikuttavat esimerkiksi solujen määrä, koko ja keskinäinen vuorovaikutus.^{17,20} Mikäli solut eivät peitä koko viljelypinnan alaa elektrodeihin kiinnittymisen jälkeen, ne alkavat lisääntyä, levitä ja kasvaa, mikä aiheuttaa tasaisen CI-arvon kasvun. Solujen saavuttaessa konfluenssin eli vaiheen, jossa ne peittävät kokonaan kaivon alan, CI-arvo tasaantuu. Tällöin kasvatusliuokseen kosketuksissa olevan elektrodin pinta-ala ei enää muutu. CI-arvo putoaa tässä vaiheessa nolnaan, jos kaivoon lisätään apoptoosin eli solukuoleman indusoijaa. Ilmiötä selittää solujen pyörityminen ja irtoaminen kaivon pohjasta. Elektrodit ovat yhdistetty tietokoneeseen, jonka RTCA-ohjelmisto muodostaa impedanssimuutosten perusteella soluindeksikäyriä.¹⁹



Kuva 7. RTCA-teknologian toimintaperiaate. **A)** Adherentit solut lisätään E-levyn kaivoihin, joissa ne sitoutuvat inkubaation aikana kullattuihin elektrodeihin. **B)** Solujen sitoutuminen häiritsee elektronivirtausta muuttaen impedanssia. **C)** Elektrodeihin yhdistetyn tietokoneen RTCA-ohjelmisto mittaa soluissa tapahtuvia fysiologisia muutoksia soluindeksinä.

Soluindeksi voidaan määrittää laskennallisesti kaavalla 2, jossa parametri R_{cell} tarkoittaa solujen ja elektrodin välistä impedanssia soluja sisältävässä kaivossa ja parametri R_b taustaimpedanssia kaivossa, jossa on ainoastaan kasvatusliuosta.^{20,21} Useiden fysiologisesti samoissa olosuhteissa olevien solujen kiinnittyessä elektrodeihin R_{cell} -arvo kasvaa ja näin ollen myös Cl-arvo kasvaa. Parametri N edustaa impedanssia mittaavien taajuuspisteiden lukumäärää ja luku 1 normalisoitua soluindeksiä vertailuarvona toimivassa aikapisteessä. Tietyn aikapisteen normalisoitu Cl-arvo lasketaan jakamalla kyseisen aikapisteen Cl-arvo vertailuaikapisteen Cl-arvolla ja tällöin vertailuajanhetkellä normalisoidun soluindeksin arvoksi saadaan 1. Normalisointi tehdään valitsemalla viimeisin aikapiste ennen yhdisteen lisäystä, mikä mahdollistaa tarkemman vertailun eri testattujen pitoisuuksien vaikutusten ja kontrolliyhdisteen välillä.²¹

$$Cl = \max_{i=1,\dots,N} \left(\frac{R_{cell}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right) \quad (2)$$

3.3 RTCA-teknologia ja sen sovellukset

xCELLigence RTCA on reaaliaikaisen soluanalyysin perusmenetelmä, joka hyödyntää 16-, 96- tai 384 kuoppaisia mikrotiiterilevyjä. ACEA Biosciences (nykyään Agilent Technologies) lanseerasi ensimmäisen xCELLigence-järjestelmän vuonna 2008. xCELLigencea käytetään solujen

proliferaation ja erilaistumisen tutkimisessa sekä solujen laadunvalvonnassa.¹³ Tällä järjestelmällä on myös useita sovelluskohteita lääkeseulonnassa, ja näitä ovat laaja-alainen seulonta, kohdennettu seulonta tietyn lääkevasteen arvioimiseksi ja lääkeainefarmakologia.¹⁸ Lisäksi xCELLigence-menetelmää on hyödynnetty uusien potentiaalisten syöpälääkkeiden etsintään keskittyvissä tutkimuksissa. xCELLigence-järjestelmästä on kehitetty iCELLigence RTCA, joka hyödyntää samaa teknologiaa, ja menetelmillä on samoja sovelluksia.^{13,18} xCELLigenceen verrattuna iCELLigence-järjestelmässä voidaan käyttää suurempia kaivotilavuuksia ja pienempiä kaivomääriä.¹⁸ Tämä mahdollistaa solujen käytön lisätutkimuksissa, kuten sekvensointianalyyseissä, virtausytometriassa, Western blot -analyyseissä sekä kuvantamisessa.¹³

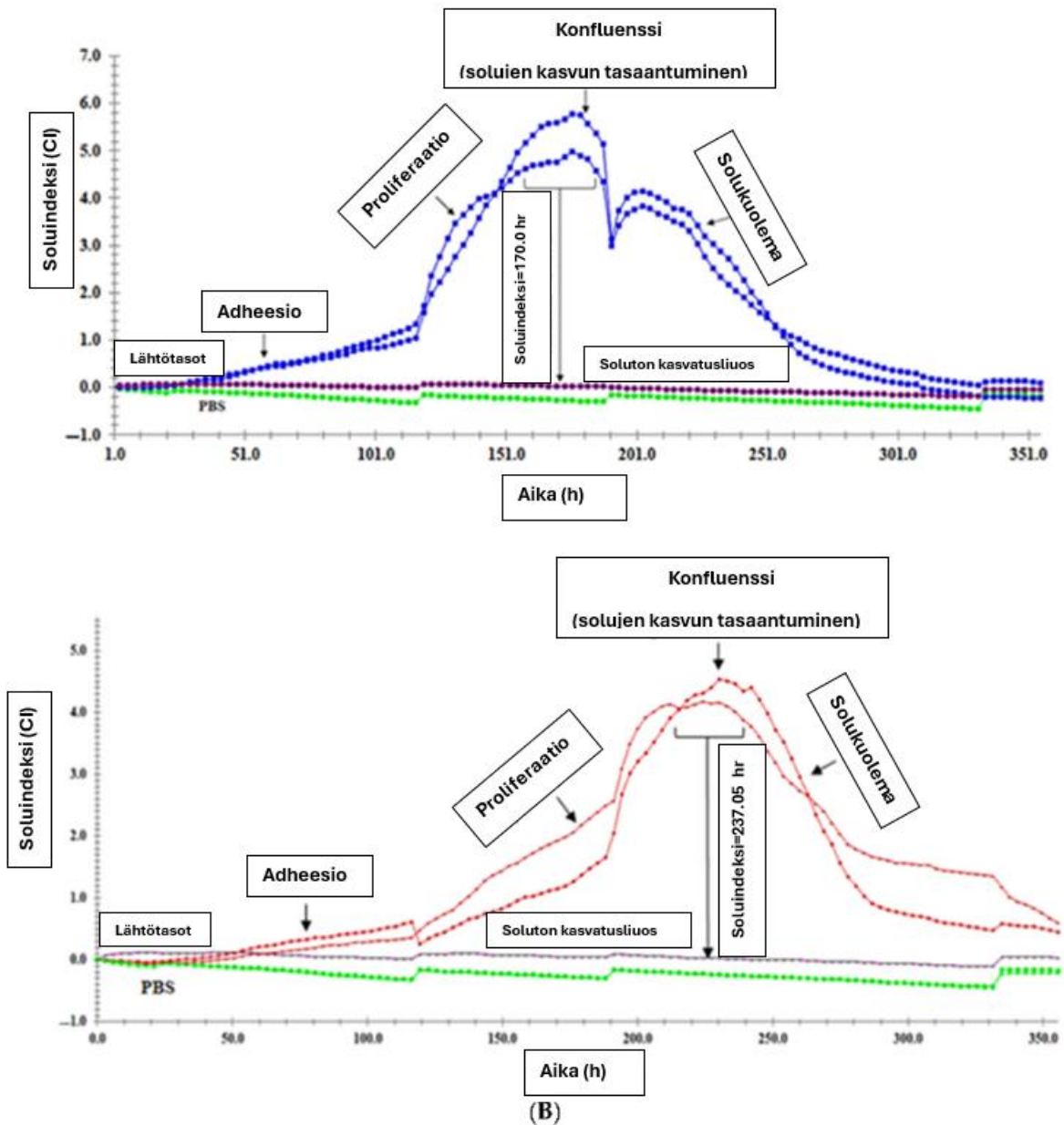
xCELLigence RTCA-järjestelmästä on saatavilla useita laitteita. xCELLigence RTCA SP (Single Plate)- ja MP (Multiple Plate)-laitteistoja käytetään solun elinkyvyn, immuunisolvälitteisen tuhon, virusten sytopaattisten vasteiden, sytotoksisuuden, solujen kiinnittymisen, soluesteen ja solusignaloinnin tutkimisessa. xCELLigence RTCA eSight -laitteistoa puolestaan voidaan hyödyntää kirkaskenttä- ja fluoresenssikuvantamisessa. xCELLigence RTCA DP (Dual Purpose) mittaa solujen invaasiota ja migraatiota sekä seuraa solujen elinvoimaisuutta ja käyttäytymistä. xCELLigence RTCA HT (High Throughput Model) on liitetty osaksi BioTek Instruments BioSpa 8 -automaattinkubaattoria, ja laitteisto soveltuu terapeuttisten vasta-aineiden, lääkeaineiden ja sytotoksisuuden tehoseulontaan. Laitteista edistynein malli, xCELLigence RTCA CardioECR (Cardiomyocyte Contractility & Electrical Activity) on suunniteltu sydänlihassolujen supistumiskyvyn, elinvoimaisuuden ja elektrofysiologian mittaamiseen.²² Järjestelmä mahdollistaa kardiotoksisuuden määrittämisen ja menetelmää hyödynnetäänkin syöpälääketutkimuksessa.²³

xCELLigencella voidaan tutkia erilaisten solulinjojen fysiologisia ominaisuuksia. Caco-2-solulinjan (ihmisen epiteelin kolorektaalisen adenokarsinooman solulinja) biologisia toimintoja tutkittiin käyttäen xCELLigence RTCA S16 -järjestelmää. Tavoitteena oli varmistaa mahdollisuus Caco-2-solujen elinkelpoisuuden, monokerroksen muodostumisen ja eheyden tutkimiseen järjestelmällä. Solukonsentraation optimointiin keskittyvän mittauksen tuloksista havaittiin, että kun Caco-2-solut pipetoitiin sarjalaimennoksina (5000 solua / kaivo ja 3000 solua / kaivo) kasvatusliuoksessa, mitattavien pitoisuusriippuvaisten käyrien CI-arvot erosivat toisistaan. Kaiken kaikkiaan tulokset osoittivat pitoisuusriippuvaista solujen pohjaan kiinnittymistä, proliferaatiota ja kasvun tasaantumista (kuva 8). Caco-2-solujen erilaistumista ja solujen tiiviiden sidosten muodostamispotentiaalia tutkittiin tarkemmin toisessa kokeessa. Erilaistuneiden Caco-2-solujen keskeisiä ominaisuuksia ovat tiiviiden liitosten muodostaminen, mikrovillukset ja enterosyyttispesifisten proteiinien ilmentäminen. Vastaavasti erilaistumattomat solut ilmentävät heikosti enterosyyttispesifisiä entsyymejä ja suoliston kuljettajaproteiineja, ja solut ovatkin alttiimpia

toksisuudelle. Tämä voisi selittää CI-arvon eron erilaistuneiden ja erilaistumattomien solujen välillä.²² RTCA:lla voidaan tutkia myös solujen supistumiskykyä, joka kertoo tarkemmin solujen morfologiasta. Lihassolujen ja fibroplastien supistumisprosessia seurattiin xCELLigence RTCA MP-järjestelmällä havaiten, että pienemmät ja löyhemmin kiinni olevat solut aiheuttivat pienemmän ja vastaavasti suuremman ja tiukemmin kiinnittyneet solut suuremman impedanssiarvon.²⁴ Syöpäsolujen ja somaattisten solujen lisäksi menetelmä mahdollistaa geenimuokattujen solulinjojen tutkimisen. xCELLigencella voidaan määrittää, kuinka tehokkaasti kasvaimen antigeenille spesifiä T-solureseptoria (TCR) tai kimeeristä antigeenireseptoria (CAR) ilmentävät T-solut kohdentuvat syöpäkasvaimiin.¹⁹

RTCA on osoittautunut monipuoliseksi työkaluksi mikrobiologisessa tutkimuksessa. Menetelmällä voidaan analysoida virusten kykyä tappaa kohdesoluja. Onkolyttinen virusterapia on syövän hoitomuoto, joka perustuu replikoivien virusten käyttöön. Tällaiset virukset tartuttavat selektiivisesti syöpäsoluja, aiheuttavat sytotoksisuutta ja synnyttävät antitumor-immuunivasteen. Korkean mittausherkkyyden ja merkkiaineettomuuden ansiosta xCELLigence mahdollistaa virusten ja kohdesolujen välisen vuorovaikutuksen tarkastelun olosuhteissa, jotka vastaavat suunnilleen ihmisen fysiologiaa.¹⁹ Lisäksi järjestelmällä voidaan tutkia antibioottisia vasteita ja biofilmejä. xCELLigence-menetelmällä on osoitettu eteläafrikkalaisen *G. africana* -kasvin vaikutus eräiden hiivojen muodostamien biofilmien syntyyn sekä kasvin antibioottiset vaikutukset biofilmiin.²⁵

xCELLigencea on hyödynnetty laajasti perinteisten sekä uusien sytostaattien ja sytotoksisten lääkkeiden tutkimuksessa.¹³ On tutkittu, miten valitut sytostaatit – sisplatiini, paklitakseli, karboplatiini, gemsitabiini, topotekaani ja etoposidi – vaikuttavat ihmisen munasarjasyöpäsolulinjaan A2780. Menetelmällä seurattiin solujen proliferaatiota ja arvioitiin sytostaattien antiproliferatiivisia vaikutuksia. RTCA-ohjelmisto määrittä kvantitatiivisesti EC50-arvot osoittaen, että karboplatiinihoidolla oli suurin ja paklitakselihoitolla matalin konsentraatiovaste. Tutkimuksessa havaittiin, että järjestelmän laskemat EC50-arvot olivat matalampia kuin MTT-testin antamat arvot.²⁶



Kuva 8. Caco-2-solujen sitoutumisen perusteella muodostetut CI-käyrät. (A) 5000 solua / kaivo (siniset viivat) ja (B) 3000 solua / kaivo (punaiset viivat). Soluja viljeltiin 360 tuntia täydellä kasvatusalustalla (20 % FBS). Lähtötasoviivat ovat soluton kasvatusalusta (violetti viiva) ja PBS (vihreä viiva). Kuva on muokattu Open Access-kuvasta. CC BY-NCND 4.0, <https://www.mdpi.com/2076-3417/15/15/8298>, 13.5.2026.

4 RTCA:n ja muiden menetelmien vertailua

Tetrazoliumsuolamääritykset MTT, XTT ja CCK-8 (kuva 3) ovat nopeita, helppokäyttöisiä ja suhteellisen edullisia menetelmiä, jotka soveltuvat suuren lääkeyhdistemäärän seulontaan laajalla pitoisuusalueella.¹³ Värillisten formatsaanikiteiden ansiosta tulokset ovat nähtävissä visuaalisesti, mikä on käytännöllistä, kun tarvitaan nopeasti havaittavia laadullisia tuloksia. Lisäksi määritysten toteuttaminen ei vaadi solujen kiinnittymistä pintaan. Menetelmän suurin rajoite on kokeen optimointi yksittäisiin ajankohtiin, minkä vuoksi määritykset eivät sovellu dynaamisten muutosten seurantaan. Toinen merkittävä rajoite on se, että viljelyalustassa olevat tai siellä syntyvät aineet saattavat pelkistää formatsaanituotteet ja antaa näin vääriä positiivisia tuloksia. Tämän vuoksi ennen varsinaista mittausta on tärkeää suorittaa soluriippumaton kemiallinen kontrollikoe.¹³ Tetrazoliumsuolamääritykset mittaavat ainoastaan solun metabolista aktiivisuutta, minkä vuoksi tulokset eivät kerro kattavasti kaikista solukuolemaan ja toksisiin vaikutuksiin liittyvistä tekijöistä.⁷ Kolorimetrisen mittaustavan vuoksi määritykset eivät sovellu värillisten lääkeaineiden testaamiseen, sillä värilliset yhdisteet voivat häiritä määritystä aiheuttamalla spektroskooppista haittaa.¹⁴

Tetrazoliumsuolamääritysten rinnalla Alamar Blue on myös laajasti käytetty solun metabolisen aktiivisuuden mittaukseen perustuva määrittely. MTT:hen verrattuna resatsuriini läpäisee elävien solujen membraanin ja sen pelkistynyt tuote resorufiini pysyy liukoisena, jolloin kiteen liuottamista vaativaa vaihetta ei tarvita ollenkaan. Resatsuriini ei myöskään vaadi elektroninvälittäjiä, mikä tekee reagensseista yksinkertaisempia ja vähentää välittäjäaineisiin liittyviä toksisuusongelmia. Resorufiini voidaan lukea sekä absorbanssin että fluoresenssin avulla, mikä vähentää optisten häiriöiden mahdollisuutta ja antaa laajan dynaamisen alueen ja suuremman herkkyuden. Myös useiden mittausten yhdistäminen ja kineettiset mittaukset samoissa kuopissa ovat mahdollisia. Tetrazoliumsuolamääritysten tavoin Alamar Bluen rajoite on se, että signaalia voivat häiritä elinkelpoisten solujen lukumäärä, muutokset solujen aineenvaihdunnassa ja elatusalustan redox-yhdisteet. Lisäksi resorufiinin liiallinen pelkistyminen voi tuottaa värittömiä sivutuotteita, jotka eivät fluoresoi. Tämä voi johtaa solun elinkyvyn aliarviointiin metabolisesti hyvin aktiivisissa soluissa. Eräät yhdisteet, kuten nanomateriaalit ja oksidatiivista stressiä aiheuttavat aineet, voivat keinotekoisesti lisätä tai estää resatsuriinin pelkistymistä, mikä hankaloittaa tulosten tulkintaa. Ongelmien minimoimiseksi resatsuriinipohjaiset määritykset kannattaa yhdistää muihin elinkykyä indikoiviin merkkiaineisiin, kuten solukalvon eheys- tai ATP-kvantifiointimäärittelyihin, jotta sytotoksisuutta voitaisiin arvioida luotettavammin.¹²

ATP-pohjainen CellTiter-Glo on herkkä menetelmä, joka mahdollistaa hyvin matalien solutiheyksien havaitsemisen, ja homogeenisen protokollan ansiosta menetelmä on helppo

automatisoida tehoseulonnan sovelluksissa. Kolorimetriin ja fluoresoiviin menetelmiin verrattuna ATP-määrityksen dynaaminen alue on laajempi ja taustakohina mittauksessa alhaisempi. Suurivolyymisissä mittauksissa laajempi dynaaminen alue mahdollistaa pienemmät reagenssi- ja näytemäärät mittauspistettä kohden, suuremman levytiheyden ja pienemmän määrän mittauskertoja tehden määrittämisestä kustannustehokkaamman. CellTiter-Glo on yksittäisen mittauspisteen suhteen kalliimpi määrittäminen kuin tetrazoliumsuolamääritys ja Annexin V, mutta määrittäminen 4-logaritminen lineaarinen mittausalue tukee mittauksen pienentämistä 384- ja jopa 1536-kuoppaisiin malleihin ilman, että signaalin laatu heikkenisi matalammilla solumäärillä. Luminesenssianalyysit tuottavat vakaan signaalin 10 minuutin kuluessa, mikä vähentää levyn käsittelyä ja kokeellista vaihtelua. ATP-määrittäminen käyttöä toksisuusmittauksissa rajoittaa se, että määrittämisellä ei pystytä erottamaan sytostaattisia ja sytotoksisia lääkevasteita, sillä metabolisesti inaktiiviset mutta eheät solut voivat varastoida ATP:tä. ATP:n stabiilisuuteen vaikuttavat lämpötila, entsyymiaktiivisuus ja solunulkoiset olosuhteet, minkä vuoksi näytteitä täytyy käsitellä huolellisesti ATP:n hajoamisen tai kontaminaatioiden estämiseksi.¹²

Väriin poissulkuun perustuva Trypan Blue-määritys on tetrazoliumsuolamääritysten tavoin edullinen, nopea ja helppo toteuttaa. Värjätyt solut voidaan helposti erottaa värittömistä elinkykyisistä soluista valo- tai fluoresenssimikroskoopin tai virtausytometrian avulla, mikä tekee menetelmästä luotettavan tavan arvioida solukalvon läpäisevyyttä. Trypaanin sininen väriaine saattaa kuitenkin olla toksinen eläville soluille, ja se voi antaa vääriä negatiivisia tai vääriä positiivisia tuloksia, minkä vuoksi inkubaatioaika ja väriaineen pitoisuus ovat optimoitava huolellisesti. Erytrosiini B on vähemmän toksinen vaihtoehto trypaanin siniselle. Näiden väriaineiden käyttöön liittyy kuitenkin rajoituksia matalalla solumäärillä, jolloin mikroskoopin automaattinen tarkennus vaikeutuu ja se voi johtaa virheellisiin johtopäätöksiin solumääristä ja epätarkkoihin elinkelpoisuusarvioihin. Laite voi myös antaa epätarkkoja tuloksia eroteltaessa eläviä ja kuolleita soluja. Toinen oleellinen rajoitus liittyy erilaisiin solutyyppeihin, kuten lipidirikkaisiin soluihin (esimerkiksi adiposyytit), jotka voivat ottaa väriainetta epätasaisesti, mikä vaikeuttaa analyysiä.¹²

Apoptosimäärityksistä aneksiini-V (kuva 5) on laajasti käytetty sen korkean spesifisyyden, reaaliaikaisuuden ja nopean värjäysprotokollan ansiosta. Menetelmään liittyy kuitenkin useita rajoituksia. PS ei esiinny ainoastaan apoptoosin yhteydessä, vaan määrittäminen voi antaa vääriä positiivisia tuloksia esimerkiksi nekroottisissa tai vakavasti vaurioituneissa soluissa, joissa solukalvo ei ole enää ehyt. Lisäksi menetelmä on kalsiumriippuvainen, joten määrittäminen toteuttamisen kannalta tarkat puskuriolosuhteet ovat välttämättömät aneksiini-V:n sitoutumisen takaamiseksi. Tulosten varmistamiseksi menetelmän yhteydessä käytetään usein solukalvoa läpäisemättömiä väriaineita, kuten PI:tä, jotta apoptoottiset ja nekroottiset solut voidaan erottaa toisistaan.¹²

RealTime-Glo MT CVA:lla on useita sovelluskohteita sen monipuolisen mittaustavan ansiosta ja perinteisiin päätepistemäärityksiin verrattuna menetelmä antaa kattavammin tietoa solumuutoksista sekä sytotoksisista vasteista. Menetelmän keskeinen ominaisuus on luminesenssin heikkeneminen apoptoosin yhteydessä, mikä helpottaa mittauksen yhdistämistä muihin luminesenssiin perustuviin määrittäisiin, joissa solut hajotetaan. Tämä minimoi myöhempään mittaukseen liittyvät häiriöt. Proliferaatiomääritystä rajoittaa pro-substraatin mahdollinen loppuminen metabolisesti erittäin aktiivisten solujen vaikutuksesta. Luminesenssi kertoo yleensä metabolisesti aktiivisten solujen lukumäärästä, mutta signaalin lineaarinen riippuvuus solumäärästä pysyy rajallisen ajan, joka riippuu solutiheydestä ja solujen metabolisesta aktiivisuudesta. Johdonmukaisen lineaarisuuden varmistamiseksi ja näin määrittämissä tarkkuuden ylläpitämiseksi on hyvä määrittää empiirisesti optimaalinen inkubaatioaika kullekin tietylle solutyypille ja kylvötiheydelle.¹²

Anneksiini-V:n ja RealTime-Glo MT CVA:n tavoin RTCA:n merkittävin etu on dynaamisuus, joka mahdollistaa solujen proliferaation, morfologiaan ja käyttäytymiseen liittyvien muutosten havaitsemisen reaaliaikaisesti. Toksisuuden arvioinnin kannalta dynaamisesta mittaustavasta on merkittävästi hyötyä, sillä lääkeaineiden toksisuuden alkaminen ja kehittyminen ovat tällöin helpompi havaita. Morfologisten vasteiden havaitseminen puolestaan antaa tarkempaa tietoa tekijöistä, jotka aiheuttavat erilaisia soluvasteita. Suurin ero RTCA:n ja muiden toksisuusmittausten välillä on se, että RTCA tuottaa mittaustulosten perusteella soluindeksikäyriä, jotka kuvaavat solun fysiologisten ominaisuuksien muutoksia ennen ja jälkeen yhdisteen lisäämisen. RTCA:n toinen merkittävä etu on aikariippuvaisen IC₅₀-arvon määrittäminen, mikä mahdollistaa lääkeyhdisteen tehon ja vaikutuksen voimakkuuden arvioinnin kinetiikan näkökulmasta. Keskeinen rajoite RTCA-määrittämissä on mittausten rajoittuminen adherentteihin soluihin, mutta menetelmällä on kokeiltu ei-kiinnittyvien solulinjojen tutkimista. Ei-adherenttien leukemia- ja lymfoomasolujen sitoutuminen on osoitettu esipäälyllyttämällä soluviljelypinta spesifeillä substraateilla, jotka lisäävät tutkittavien solujen adheesiota.²⁰ RTCA-määrittämissä ainoastaan solujen lukumäärä ja morfologia vaikuttavat sähkökemiallisten signaalien syntymiseen, kun taas muut fysikaalis-kemialliset tekijät, kuten solukomponenttien absorbanssi, eivät vaikuta mittaukseen. Soluja voidaan käyttää jatkoanalyysissä, kuten Western-blottauksessa tai kuvantamisessa. RTCA:han perustuvissa sytotoksisuusmittauksissa on kuitenkin kiinnitettävä huomiota lääkevalmisteisiin, jotka saattavat sisältää sähköä johtavia lisäaineita. RTCA vaatii impedanssia mittaavan laitteen sekä impedanssieroista saatua dataa käsittelevän tietokoneen, mikä tekee siitä kalliimman ja monimutkaisemman järjestelmän päätepistemäärityksiin verrattuna.^{7,13,14}

5 Reaaliaikaisen soluanalyysin haasteet ja tulevaisuus

Biosensoripohjaisella xCELLigence-järjestelmällä on useita sovelluksia niin perinteisessä tutkimuksessa kuin myös kliinisessä lääkekehityksessä. Etenkin kliinisten sovelluskohteiden määrä tulee kasvamaan tulevaisuudessa, sillä xCELLigence mahdollistaa tehokkaan lääkeaineiden toksisuuden seulonnan ihmissoluilla.²³ Perinteisiin toksisuusmittauksiin verrattuna xCELLigencella on monia etuja, kuten merkkiaineettomuus ja ei-invasiivisuus, mutta järjestelmään liittyy vielä myös olennaisia haasteita. Merkittävin RTCA-tekniikan käyttöä rajoittava tekijä on järjestelmän korkea hinta.¹³ Osalle tutkijoista järjestelmän alkuinvestointikustannukset sekä jatkuvat kulut kertakäyttöisistä E-levyistä voivat olla liian suuria. ACEA on pyrkinyt ratkaisemaan ongelman tuomalla markkinoille PET-pohjaiset (polyeteenitereftalaatti) levyt, jotka ovat edullisempi vaihtoehto kalliimmille lasipohjaisille kuoppalevyille.²³ E-levyjen uudelleenkäyttöä on kuitenkin tutkittu, ja osa tutkimuksista osoittaa, että levyjä ja niiden pohjissa olevia mikroelektrodeja voitaisiin käyttää enemmän kuin yhden kerran. Levyjen uudelleenkäyttö edellyttäisi trypsiinikäsittelyä, levyjen huuhtelua etanolilla ja vedellä sekä metallisirujen sentrifugointia.¹³

Mittauksen suhteen menetelmää rajoittavat selkeästi datan monitulkintaisuus ja se, että RTCA ei mahdollista suoraa mittausta ei-kiinnittyvistä tai heikosti kiinnittyvistä soluista, kuten neuroneista. Järjestelmä ei myöskään havaitse muutoksia suspensioviljelmässä kasvavissa soluissa.²³ xCELLigence mittaa solujen kokonaiskiinnittymistä, johon vaikuttavat useat eri tekijät, mikä voi vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Etenkään järjestelmän uudelle käyttäjälle ei ole aina selvää, mistä muutoksista tulokset tarkalleen kertovat. Tästä syystä soluindeksikäyrästä tehtyä johtopäätöstä, esimerkiksi ”solukuolema”, pitäisi tukea täydentävällä tiedolla, joka vahvistaisi solumäärän muutoksen tai osoittaisi solukuoleman mekanismin (tai molemmat). Näin ollen RTCA-profiilien tulkinta vaatii standardointia, jota voisi tukea luotettava analyysityökalu, esimerkiksi tulkinta- tai luokittelualgoritmi.²¹ Dynaamisen mittaustavan vuoksi järjestelmän antama data viittaa vahvasti soluvasteeseen, mutta muutoksen todistamiseen vaaditaan sitä tukevaa lisätietoa. xCELLigence-menetelmää saatetaankin joissain tapauksissa käyttää varmistuksena, että vaste on tapahtunut, tai osoittaa vasteen ilmenemisaika. Tällöin menetelmän antaman datan perusteella voidaan tehdä lisäanalyysijä johtopäätösten muodostamiseksi.²³

Kuten aikaisemmassa kappaleessa mainittiin, impedanssiprofiilit voivat olla vaikeatulkintaisia, mikä hankaloittaa merkittävästi sytotoksisuusmittauksia. Soluindeksin lasku on yleensä yhteydessä sytotoksisiin vasteisiin, mutta tämä ei aina pidä paikkaansa, koska useat eri sekoittavat tekijät voivat vaikuttaa analyysiin. Esimerkiksi solun tukirankaan vaikuttavat yhdisteet, kuten sytokalaasiini B,

voivat aiheuttaa äkillisen soluindeksiaron laskun, joka kertoo muutoksista solujen morfologiassa ja sitoutumisessa myös ei-sytotoksisissa pitoisuuksissa.²¹

RTCA-menetelmä on osoittanut lupaavaa potentiaalia lääkekehityksellisissä sovelluksissa, mutta varhaisen toksisuusseulonnan kannalta lisätutkimusta tarvitaan vielä. Järjestelmän käyttömäärät voitaisiin saada kasvuun osoittamalla vahva korrelaatio solujen impedanssimittausten ja perinteisten toksisuusmittareiden (esimerkiksi solujen määrä tai ATP) välillä suurella yhdistemäärällä. Tällaisesta korrelaatiosta on kuitenkin ollut vain rajallisesti tutkimusaineistoa saatavilla.²¹

6 Yhteenveto

Biosensoriteknologiaan perustuva RTCA on ei-invasiivinen menetelmä, joka mahdollistaa soluissa tapahtuvien fysiologisten muutosten mittaamisen dynaamisesti ja leimattomasti. RTCA:n perusjärjestelmä xCELLigence on potentiaalinen menetelmä lääkeseulontaan ja uusien syöpälääkkeiden etsintään. Yleisiin toksisuusmittauksiin verrattuna leimavapaa ja dynaaminen RTCA on kehittyneempi menetelmä, joka mahdollistaa soluindeksikäyrien mittaamisen. Menetelmän käyttöä rajoittaa kuitenkin tulosten monitulkintaisuus, ja RTCA-mittausten tueksi tarvitaankin luotettavia analyysityökaluja, joilla tulosten tulkintaa voitaisiin helpottaa. Lisäksi tietokonepohjaisen järjestelmän ja kertakäyttöisten E-levyjen vuoksi RTCA:n käyttökustannukset ovat toistaiseksi hyvin korkeat.

Viitteet

1. Basak, D., Arrighi, S., Darwiche, Y. & Deb, S. Comparison of anticancer drug toxicities: paradigm shift in adverse effect profile. *Life* **12**, 48 (2021).
2. Paşayeva, L. L., Arslan, A. K. K., Demirpolat, E. & Tugay, O. Dynamic monitoring of the cytotoxic effects of *Cousinia iconica* extracts on A549 and RL95-2 cells using the xCELLigence RTCA system. *Indian J. Tradit. Knowl. IJTK* **23**, 569–573 (2024).
3. Jang, J. S. *et al.* Imaging findings of complications of new anticancer drugs. *Korean J. Radiol.* **26**, 156 (2025).
4. Garg, P. *et al.* Next-generation immunotherapy: advancing clinical applications in cancer treatment. *J. Clin. Med.* **13**, 6537 (2024).

5. Xu, X., Yu, T. & Wang, Z. Antibody-drug conjugates in oncology: A spotlight on overcoming resistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **217**, 105015 (2026).
6. Bukowski, K., Kciuk, M. & Kontek, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3233 (2020).
7. Coşkun Demirkalp, A. N. Use and comparison of MTT, XTT and iCELLigence methods in the evaluation of drug toxicity. *J. Med. Palliat. Care* **6**, 66–71 (2025).
8. Gielecińska, A. *et al.* Apoptosis, necroptosis, and pyroptosis as alternative cell death pathways induced by chemotherapeutic agents? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1878**, 189024 (2023).
9. Chiorcea-Paquim, A.-M. & Oliveira-Brett, A. M. Electrochemistry of chemotherapeutic alkylating agents and their interaction with DNA. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **222**, 115036 (2023).
10. Yilmaz, G. & Özdemir, F. Novel anti-tumor strategy for breast cancer: synergistic role of oleuropein with paclitaxel therapeutic in MCF-7 cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* **24**, 224–234 (2024).
11. Kathare, J., Mbaria, J., Kaluwa, C., Mapenay, I. & Moriasi, G. Systemic toxicity profile of chemotherapeutic agents in a wistar rat model: a preliminary report. *J. Toxicol.* **2025**, 8811238 (2025).
12. Naveen, K. V., Tyagi, A., Ibrahim, O. M. H., Fischer, R. E. A. W. & Ostafe, R. From dye exclusion to high-throughput screening: a review of cell viability assays and their applications. *Biotechnol. Adv.* **87**, 108764 (2026).
13. Stefanowicz-Hajduk, J. & Ochocka, J. R. Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. *Toxicol. Rep.* **7**, 335–344 (2020).
14. Cai, L. *et al.* Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method. *Acs Omega* **4**, 12036–12042 (2019).

15. Bouchalova, P. & Bouchal, P. Current methods for studying metastatic potential of tumor cells. *Cancer Cell Int.* **22**, 394 (2022).
16. Desjardins-Lecavalier, N. & Costantino, S. A new approach for high-content traction force microscopy to characterize large cell ensembles. *Biophys. J.* **125**, 113–124 (2026).
17. Roshan Moniri, M. *et al.* Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology* **67**, 379–386 (2015).
18. Türker Şener, L., Albeniz, G., Dinç, B. & Albeniz, I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp. Ther. Med.* **14**, 1866–1870 (2017).
19. Cancer immunotherapy, Agilent xCELLigence RTCA handbook [online], Agilent Technologies Inc; Yhdysvallat, 2025. Viitattu 12.5.2026. Saatavilla: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-cancer-immunotherapy-xcelligence-5994-1303en-agilent.pdf>
20. Martinez-Serra, J. *et al.* xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *OncoTargets Ther.* 985 (2014).
21. Atienzar, F. A. *et al.* The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models. *SLAS Discov.* **16**, 575–587 (2011).
22. Khan, N., Kurnik-Łucka, M., Kudrycka, M., Gil, K. & Latacz, G. Optimization of impedance-based real-time assay in xCELLigence RTCA SP16 Device for the analysis of fully differentiated caco-2 cells. *Appl. Sci.* **15**, 8298 (2025).
23. Kho, D. *et al.* Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors* **5**, 199–222 (2015).

24. Bravo, D. D., Chernov-Rogan, T., Chen, J. & Wang, J. An impedance-based cell contraction assay using human primary smooth muscle cells and fibroblasts. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **89**, 47–53 (2018).
25. Abrantes, P. M. dos S., Chesnay Stuurman, K., Arthur Klaasen, J. & Joyce Africa, C. W. Monitoring of *Candida* biofilm inhibition by *Galenia africana* using real-time impedance-based technology. *Curr. Med. Mycol.* **10**, e2024.345240.1541 (2024).
26. Caltová, K. & Červinka, M. Antiproliferative effects of selected chemotherapeutics in human ovarian cancer cell line A2780. *Acta Medica Hradec Kralove Czech Repub.* **55**, 116–124 (2015).