

HJÄRTATTACK PÅ ETT CHIP

Av Emelie Leht, augusti 2013

Vårt hjärta - en blodpumpande muskel som blivit en symbol för liv. Dess betydelse går inte att ta miste på, då svikande funktionalitet i hjärtat orsakar nästan hälften av alla naturliga dödsfall i Europa. Den pågående hjärtforskningen är därför ständigt pressad att hitta orsakerna bakom de många hjärtsjukdomarna och att utveckla nya hjälp- och botemedel för att kunna hålla en åldrande befolkning vid liv.

EN MODELL AV ETT HJÄRTA

För att kunna förebygga uppkomsten av hjärtsjukdomar måste man först förstå hjärtats funktioner och varför de ibland fallerar. Till sin hjälp har man under lång tid utvecklat så kallade *in vitro* studiemodeller med vilka man studerar olika biologiska fenomen och utför experiment. Att arbeta *in vitro* innebär att man använder cellodlingar för sina experiment och undviker därigenom försök på levande djur, *in vivo*, vilka är omgivna av många restriktioner. *In vitro* modellen ger inte bara forskare större frihet i vilka typer av experiment de kan utföra utan ger även ett mer hanterbart experiment, både gällande uppställning och analys.

Hjärtceller är vad man kallar elektrogena, vilket innebär att de genom att transportera joner in och ut genom cellmembranet och från cell till cell, påverkar de elektriska potentialerna i sin närhet. Hjärtats *aktionspotential* är ett resultat av detta. Aktionspotentialen är en elektrisk signal som sprids från cell till cell i hjärtat och det är under denna aktivering som hjärtat kontraherar [1].

Många av de vanligaste hjärtsjukdomarna är relaterade till rytm-avvikelser i den pulserande aktionspotentialen eller till felaktig spridning av aktionspotentialen genom hjärtats vävnad vilket kan leda bland annat till hjärtattack eller förmaksflimmer. Dessa elektrofysiologiska abnormiteter har länge gått att mäta genom t ex diagnostiseringsmetoden EKG och den välkända pacemakern har även denna länge använts för att

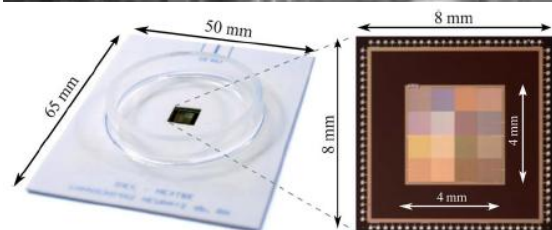
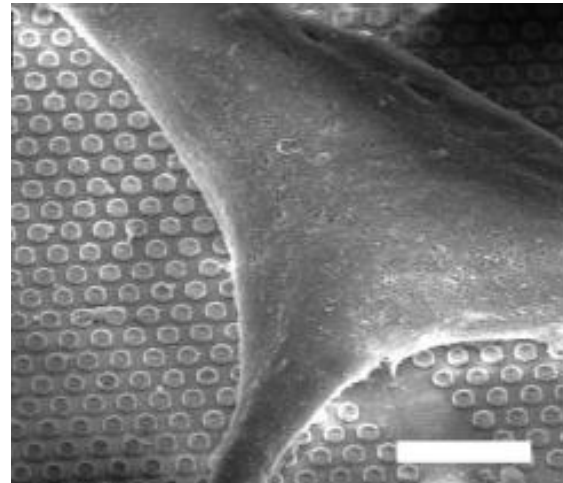


Bild 1: Hjärtcell på Imecs biochip med microelektroder.
Överst: En SEM-bild av en hjärtcell som sträcker sig ut över några av de minsta elektrodena på Imecs biochip. Skallinjen är 10 µm. Anpassad från [2] **Underst:** Bilden visar chipet monterat i sin odlingskål och en förstoring av själva chipytan. Chipet är uppdelat i områden som har olika stora elektroder vilket syns som olikfärgade kvadrater. Anpassad från [3].

hjälpa sjuka hjärtan att uppehålla en normal hjärtrytm genom att tillföra frekventa elektriska pulser [4]. *In vitro* har man använt sig av liknande grepp och spelat in hjärtvävnadens elektriska signaler med hjälp av elektroder placerade i eller direkt ovanför cellodlingen. Man har också studerat hur olika typer av elektrisk stimulering påverkar hjärtats aktionspotential och funnit att det går att framkalla sjukdomsliknande tillstånd där den normala pulsen i vävnaden rubbas av den elektriska stimuleringen [5], [6].

Initialt använde man sig av en eller ett fåtal externa elektroder både vid inspelning av elektriska signaler eller vid elektrisk stimulering. Uppställningarna var ofta bulkiga och

millimeterstora elektroder gav varken optimal upplösning eller precision. Icke desto mindre har många givande upptäckter om hjärtats elektrofysiologiska egenskaper gjorts med just denna typ av experiment.

ETT CHIP KAN KARTLÄGGA HJÄRTCELLERS ELEKTRISKA AKTIVITET

De senaste årtiondenas utveckling av mikrosystem har dock resulterat i möjligheten att producera biokompatibla chip med integrerade kretsar och mät-elektroder vars diameter sträcker sig ner mot mikrometer- och nanometerskalan. Denna utveckling har öppnat upp vägar för att skapa lab-on-a-chip lösningar där man kan undersöka tex elektriska signaler i hjärtvävnad genom *in vitro* modeller där man alltså odlar sina celler direkt på chipet [7]. Målet är ett chip helt täckt av elektroder som på grund av sin storlek gör det möjligt att få både en otroligt hög upplösning och precision. Detta innebär att man skulle kunna spela in signaler från, och stimulera en enda enskild cell. I det ideala fallet har man dessutom avancerad integrerad elektronik på chipet som klarar att individuellt adressera så många elektroder som möjligt och samtidigt behandla den stora mängden data som kan erhållas när man har ett högt antal elektroder. Ett chip med alla dessa egenskaper skulle kunna användas för att simultant spela in elektriska signaler från hundra, kanske till och med tusentals, celler samtidigt vilket skulle ge en otroligt detaljerad kartläggning av hur den elektriska aktiviteten fungerar både i de enskilda cellerna och hur den sprids över cellodlingen från cell till cell och därmed visa dess interaktion. Det fina med den typ av elektroder som oftast används i sammanhang som dessa är att dess funktion är reversibel. Samma elektroder som används för inspelning av elektriska signaler kan därför också agera som stimuli-elektroder och skicka elektriska pulser. Det tänkta chipet blir inte då bara ett verktyg för kartläggning utan även ett mycket precist instrument för elektrisk stimulering och kan, när det realiserats, bli ett mycket användbart verktyg inom hjärtforskningen.

Chipet i dess ultimata form existerar inte i dagsläget. En av de stora begränsningarna är fortfarande den integrerade elektronikens output som inte når upp till önskemålen om individuell

simultan output eller input till ett stort antal elektroder. Dock så har man kommit så långt att man lyckats tillverka chip med ett stort antal elektroder med diametrar på mikrometer, och till och med nanometerskalan, som fungerar både för inspelning och stimulering. En av många varianter på dessa lab-on-a-chip lösningar finns på Imec, Institute of microtechnology i Leuven, Belgien.

Chipet, utvecklat i ett samarbete mellan flera olika avdelningar på Imec, används i en rad *in vitro*-studier av både hjärtceller och neuron som också uppvisar elektrofysiologiska egenskaper. Ett av de pågående projekten undersöker om det är möjligt att inducera ett tillstånd som liknar förmaksflimmer i cellodlingen genom att skicka elektriska pulser från chipets mikroelektroder [3].

RE-ENTRY LOOPAR OCH FÖRMAKSFLIMMER

Det fenomen man försöker återskapa kallas för re-entry och kan uppstå om hjärtceller kopplas samman i en liten cirkel-liknande struktur, vi kan kalla den en loop. Detta kan exempelvis hända om man på grund av en tidigare skada har ärr i hjärtvävnaden. I ett friskt hjärta sprider sig aktionspotentialen från sinusnoden genom förmaken och kamrarna, se bild 2, och får dem att kontrahera i rätt ordning.

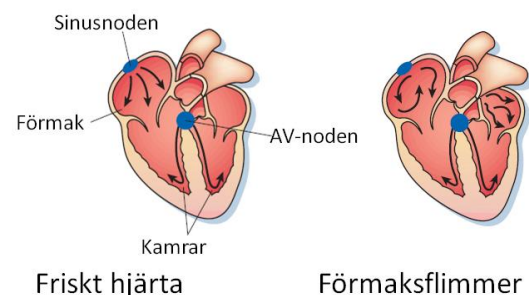


Bild 2: Spridning av aktionspotentialen i ett friskt och ett skadat hjärta. I det friska hjärtat till vänster sprids aktionspotentialen (de svarta pilarna) från sinusnoden genom vänstra förmaket till det högra och till AV-noden som skickar signalen vidare till kamrarna. I ett hjärta med förmaksflimmer, som det till höger, sprids signalen okontrollerat i de båda förmaken utan aktivering från sinusnoden. Kamrarna upprätthåller fortfarande en relativt stabil slagtakt som kontrolleras av 'back up-systemet' AV-noden. Anpassad från [8].

Om aktionspotentialen i stället stöter på en av de loopar som ofta finns runt ärr-vävnad så kan aktionspotentialen 'fastna' i dessa cirkelspår. Resultatet blir att aktionspotentialen propagerar runt, runt i loopen eftersom den hela tiden återaktiverar sig själv. Loopen bildar därmed ett självuppehållande system som inte längre behöver aktivering från sinusnoden. Det farliga med detta tillstånd, som alltså kallas re-entry, är att aktionspotentialen i loopen återaktiverar sig själv i en takt som kan bli mycket högre än den som i normala fall sätts i sinusnoden. Detta orsakar störningar i hjärtfrekvensen och kan därmed leda till hjärtflimmer [9].

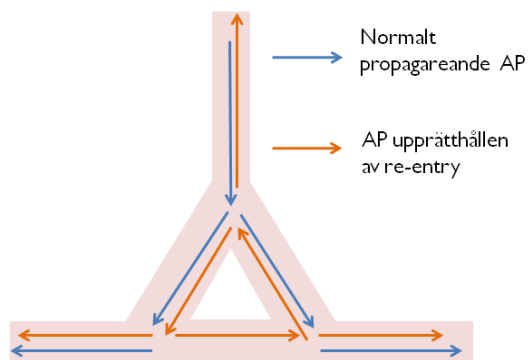


Bild 3: Så funkar en re-entry loop. De blå pilarna visar hur en aktionspotential (AP) aktiverad av sinusnoden närmar sig en nod uppifrån. I noden delas spridar sig AP genom de två grenarna och utåt sidorna. De orangea pilarna visar vad som händer när re-entry uppstår. AP kommer då propagera runt loopen och istället spridas utåt sidorna, även uppåt. Loopen har blivit självuppehållande och behöver ingen aktivering från sinusnoden.

Re-entry kan uppstå spontant i cellodlingar men för att lära sig mer om dess mekanism söker man vägar att både inducera och terminera dem genom exempelvis elektrisk stimulering. Lyckade försök med både inducering och terminering av re-entry *in vitro* har gjorts tidigare men främst med externa elektroder. På Imec undersöker man därför om det är möjligt att uppnå samma resultat med elektrisk stimulering från mikroelektroden på deras chip.

FÖRSÖKER STARTA OCH STOPPA RE-ENTRY

I det ideala fallet hade man naturligtvis använt sig av chipets elektroder för att spela in

aktionspotentialens propagering genom cellodlingen och på så sätt kunnat avgöra om den elektriska stimuleringen har någon effekt eller ej. Som tidigare nämnt har dock inte den tekniska utvecklingen nått det stadiet där vi har en hög parallell output från chipet och man får därför se sig om efter andra metoder att visualisera aktionspotentialen. Ett av de vanligaste sätten är att använda infärgning av celler för att synliggöra antingen elektriska fält i cellmembranen och dess eventuella ändringar eller en infärgning som skiftar i intensitet med mängden calcium i cellen. Infärgning av calcium fungerar som alternativ eftersom calciumnivåerna i cellerna ändras med aktionspotentialen och det är denna metod som använts på Imec.

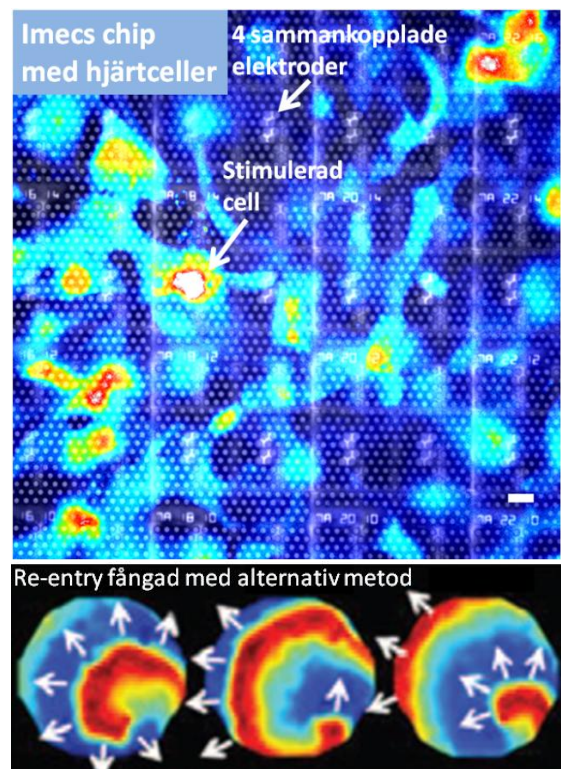
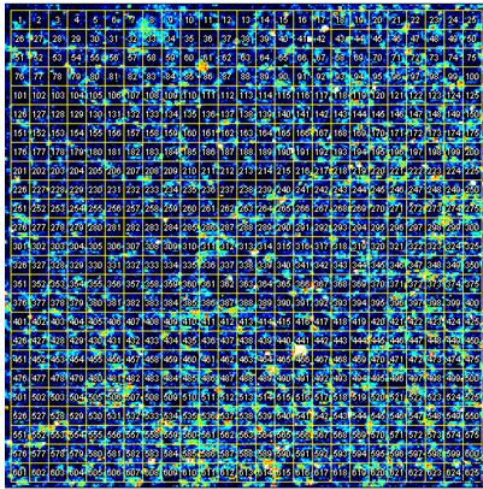


Bild 4: Stimulerade celler och re-entry spiraler. Överst: En bild tagen med konfokalmikroskop och visar hjärtceller på Imec chip. De små prickarna är elektrodena och de som är omgivna av ett vitt område är inkopplade och kan användas för stimulering, t ex som de fyra markerade överst i bilden. De infärgade cellerna syns som blå-gul-röda former. En cell, nästan mitt i bilden har blivit stimulerad och lyser upp. Skallinjen är 10 μm . Underst: En re-entry spiral fångad med en av de specialutvecklade mikroskopieringsmetoderna. Tiden mellan bilderna är 70 ms visar hur aktionspotentialen rör sig runt i en spiralliknande rörelse. Skalan är här något större, diametern är 17 mm. Anpassad från [6].

Imecs bildanalys

Videosekvens



AP-vågor under olika tidpunkter

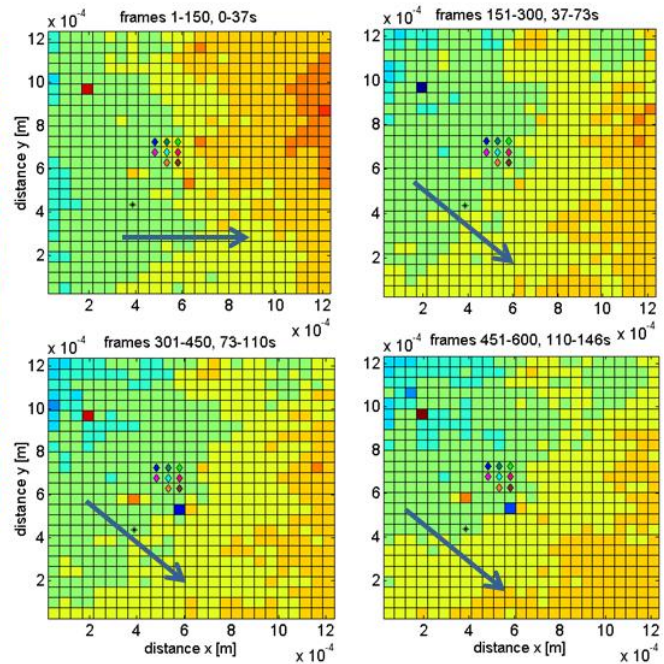


Bild 5: Specialutvecklad programvara hittar vågrörelsen. Till vänster är en bild ur en videosekvens som blivit uppdelad i ett rutnät inför analysen och till höger ser vi hur aktionspotential (AP)-vågorna rör sig under olika tidpunkter i videosekvensen. I analysen delas videosekvensen upp i ett rutnät och signalerna analyseras ruta för ruta. De rutor som har en tidiga aktivering av aktionspotentialen (AP) får en blå eller grön färg medan de som har sen aktivering får gul färg. Därmed kan man ser i vilken riktning AP-vågorna rör sig genom cellodningen. I exemplet ovan visar pilarna hur vågen bytt riktning. Den går först från vänster till höger sida och sedan från övre vänstra till nedre högra hörnet. Det analyserade området är $1200 \times 1200 \mu\text{m}$.

När man tittar på de infärgade cellerna i mikroskopet ser man hur aktionspotentialen sprider sig som vågor genom cellodningen och ibland hittar man även re-entry loopar som uppstått spontant och istället ger en spiral-liknande våg. Under experimenten försöker man sedan både inducera re-entry spiraler och terminera propagerande vågor eller spontana spiraler med hjälp av elektrisk stimulering. Det som skiljer försöken åt är främst frekvensen på de elektriska pulser som skickas. För inducering används relativt låga frekvenser, 1-3 Hz, alltså ett till ett par slag per sekund. Målet är att pulsa cellen på elektroden till att skicka ut aktionspotentialer i samma takt som stimuli vilket sedan kan leda till att en re-entry spiral startas. För att terminera spiraler och blockera vågor använder man istället en högfrekvent signal, 1000-5000 Hz, alltså upp till 5000 pulser per sekund. Här är hypotesen istället att den högfrekventa signalen helt ska blockera

cellens förmåga att skicka vidare en aktionspotential och alltså stoppa dess spridning. Varje experiment filmas och videosekvenserna körs sedan genom ett specialutvecklat bildanalysprogram som visar hur aktionspotentialens spridning ser ut under olika tidpunkter i experimentet. Förhoppningen är naturligtvis att man ska fånga upp en ändring i vågmönstret som orsakats av den elektriska stimuleringen.

MED SKRÄDDARSYDD PROGRAMVARA BEHÖVS INGET SPECIAL-MIKROSKOP

Utvecklingen av programvaran för bildanalys har varit ett viktigt steg i processen menar man på Imec. Det finns åtminstone två eleganta mikroskoperingmetoder som utvecklats just för att kunna analysera spridningen av vågrörelserna i *in vitro* experiment med hjärtceller [10, 11]. Båda metoderna kräver dock att cellerna odlas på en

genomsiktig yta, som till exempel glas, och kan därmed inte användas när man vill göra experiment med chip som i de allra flesta fall är ogenomsiktiga. För Imecs bildanalysprogram räcker det med ett 'vanligt' mikroskop, dock så ska det helst ha en snabb kamera för att kunna fånga upp vågeffekten så korrekt som möjligt. Att det går att använda, för ett bio-lab, standardmikroskop som kompletteras med bildanalysprogrammet är naturligtvis både praktiskt och ekonomiskt gynnsamt. Eftersom det endast är mikroskopets objektiv som begränsar den rumsliga upplösningen kan man analysera områden ner på mikrometerskalan vilket är långt bättre än för de specialdesignade mikroskopmetoderna som snarare används på millimeterstora områden.

ÄVEN EN LOKAL EFFEKT KAN LEDA TILL NÅGOT STÖRRE

Än så länge har man inte sett något storskaligt resultat av stimuleringen från mikroelektrodena, åtminstone inte till den grad att det går att inducera eller stoppa en re-entry spiral. Effekten verkar snarare vara främst lokaliserad till cellen ovanpå elektroden och några av dess grannar. Resultatet behöver dock inte ses som ett nederlag eftersom det är precis detta chipet är designat för, extremt lokaliserad stimulering och inspelning. Nästa generations chip kan förhoppningsvis ge svar på fler frågor. När man inför parallell input, så flera elektroder kan aktiveras för stimulering samtidigt, blir det möjligt att undersöka väldigt precist hur stor area man måste stimulera för att uppnå önskad effekt. En stor fördel med individuellt adresserbara mikroelektroder är att det kommer bli möjligt inte bara att bestämma arean på området som ska stimuleras utan även att skapa avancerade mönster och i en väldigt hög utsträckning kunna bestämma den exakta positionen för var stimuleringen ska utföras. Detta är av stor vikt, speciellt för terminering av re-entry spiraler. I föreläsningen söker man metoder att kunna stoppa re-entry tillstånd innan de gjort en för stor skada. Om man, med hjälp av den chipbaserade *in vitro* modellen, lyckas identifiera exakt var och vilken typ av område som behöver stimuleras för att stoppa re-entry har man tagit ett stort steg inom hjärtforskningen.

Steget till en *in vivo*-lösning, alltså ett chip som går att operera in i utsatta områden i ett instabilt hjärta, är långt men inte outhärligt. Med fullt ut dubbel-funktionella mikroelektroder skulle man kunna skapa ett chip som både detekterar uppkomsten av re-entry genom inspelade signaler och sedan terminerar re-entryn med elektrisk stimulering innan den hunnit orsaka till exempel förmaksflimmer. Inom en inte alltför avlägsen framtid skulle ett väldigt litet chip kunna rädda många sjuka hjärtan från att stanna.

REFERENSER

- [1] T. Laske et al. "The cardiac conduction system," in *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*, P. A. Iaizzo, Ed. Humana Press, 2009, pp. 159–175.
- [2] D. Braeken et al. "Open-cell recording of action potentials using active electrode arrays," *Lab Chip*, vol. 12, pp. 4397–4402, 2012.
- [3] R. Huys et al. "Single-cell recording and stimulation with a 16k micro-nail electrode array integrated on a 0.18 μm cmos chip," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 7, pp. 1274–1280, 2012.
- [4] T. Laske et al. "Pacing and defibrillation," in *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*, P. A. Iaizzo, Ed. Humana Press, 2009, pp. 443–473.
- [5] W. Bian and L. Tung, "Structure-related initiation of reentry by rapid pacing in monolayers of cardiac cells," *Circulation research*, vol. 98, no. 4, pp. e29–e38, 2006.
- [6] M. G. Chang et al. "Spiral waves and reentry dynamics in an *in vitro* model of the healed infarct border zone," *Circulation research*, vol. 105, no. 11, pp. 1062–1071, 2009.
- [7] A. Hierlemann et al. "Growing cells atop microelectronic chips: Interfacing electrogenic cells *in vitro* with cmos-based microelectrode arrays," *Proceedings of the IEEE*, vol. 99, no. 2, pp. 252–284, 2011.
- [8] S. Nattel, "New ideas about atrial fibrillation 50 years on," *Nature*, vol. 415, no. 6868, pp. 219–226, 2002.
- [9] M. Janse and M. Rosen, "History of arrhythmias," in *Basis and Treatment of Cardiac Arrhythmias*, ser. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg, 2006, vol. 171, pp. 1–39.
- [10] S.-m. Hwang et al. "Regular and alternant spiral waves of contractile motion on rat ventricle cell cultures," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 92, p. 198103, May 2004.
- [11] L. Tung and Y. Zhang, "Optical imaging of arrhythmias in tissue culture," *Journal of electrocardiology*, vol. 39, no. 4, pp. S2–S6, 2006.