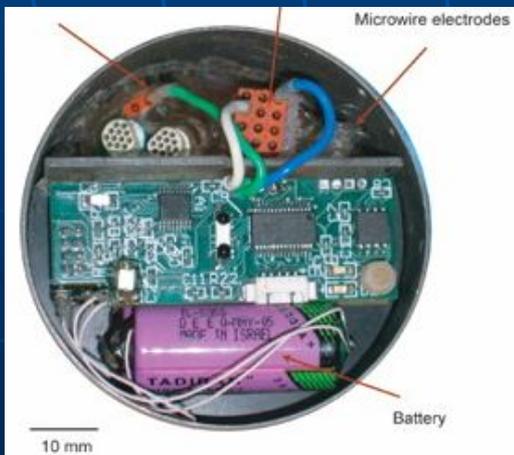
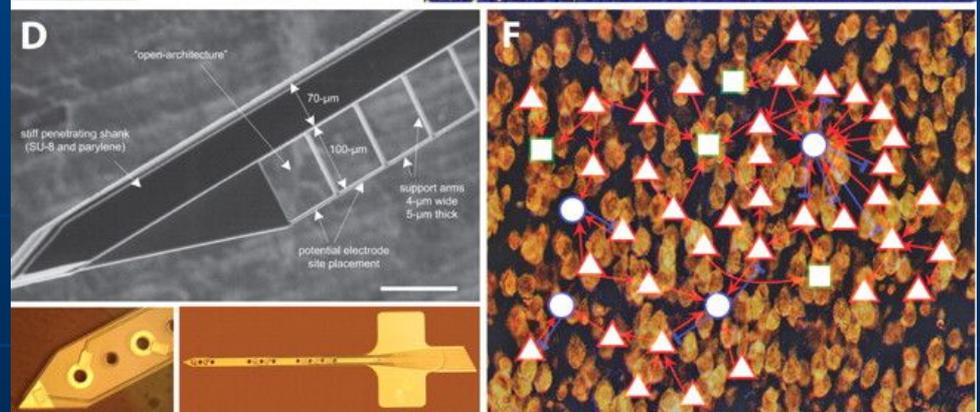
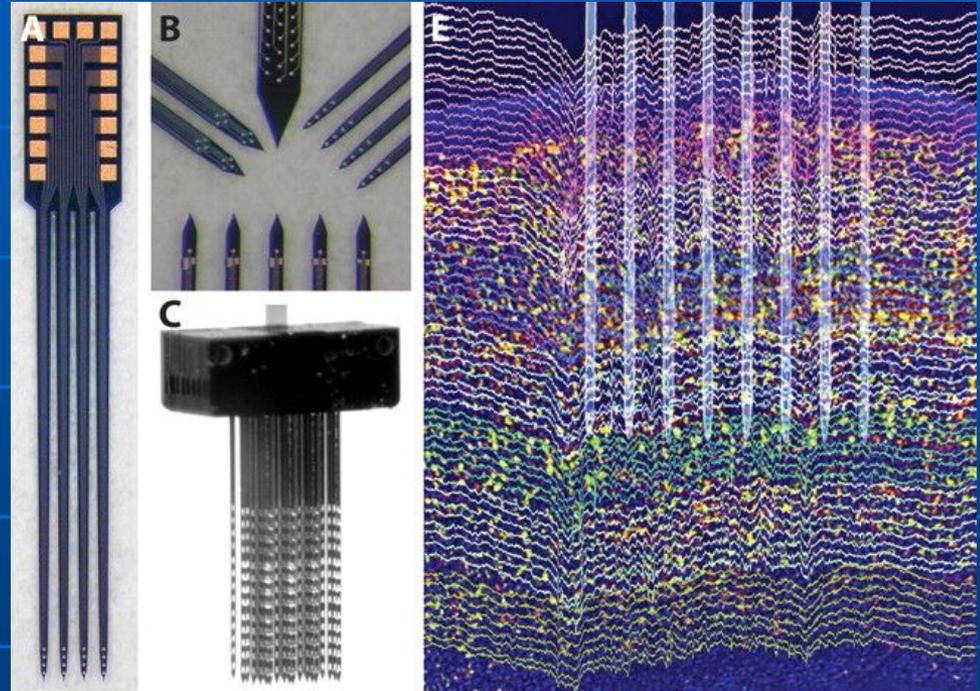
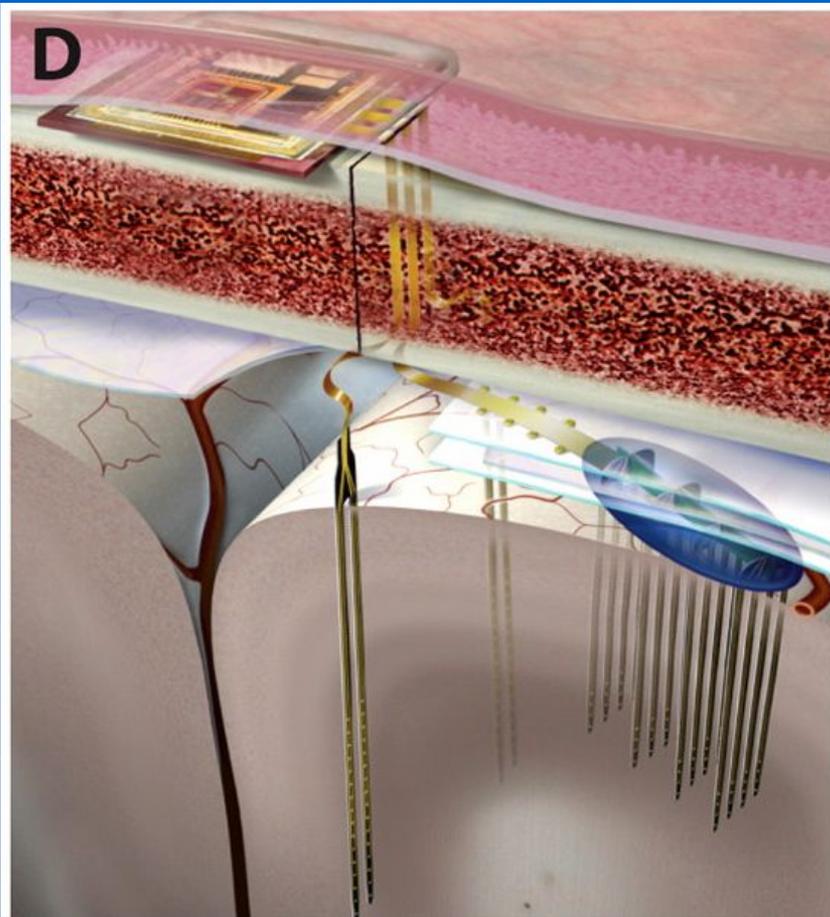


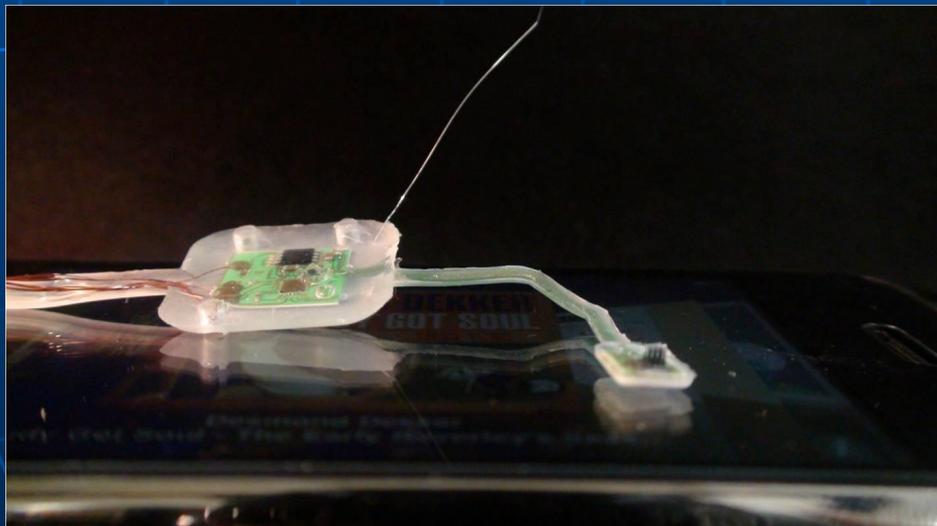
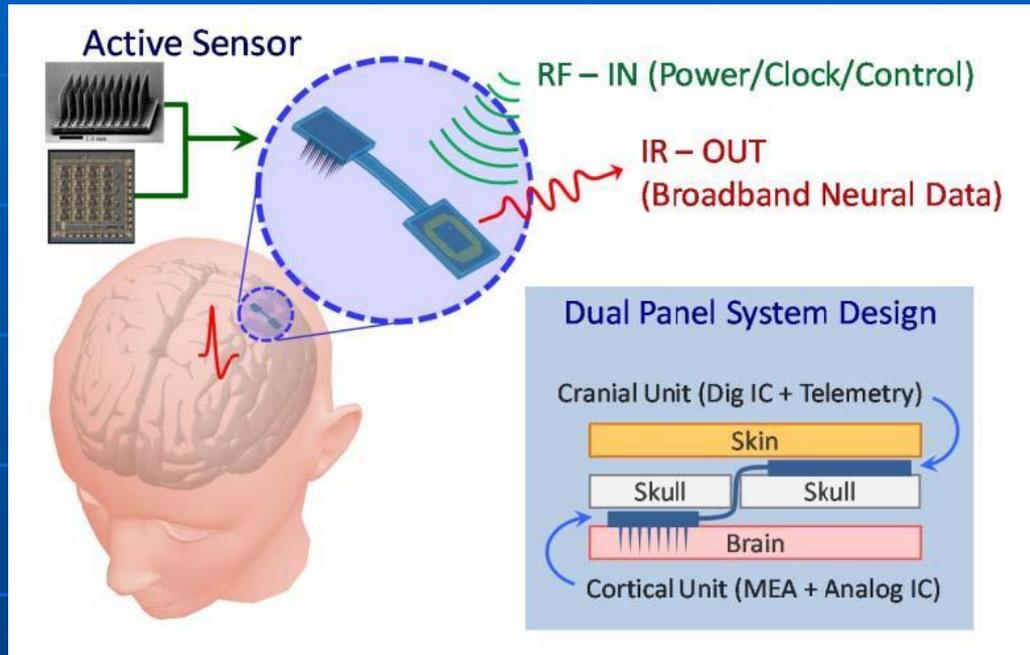
# Проблема биосовместимости

Лекция 3

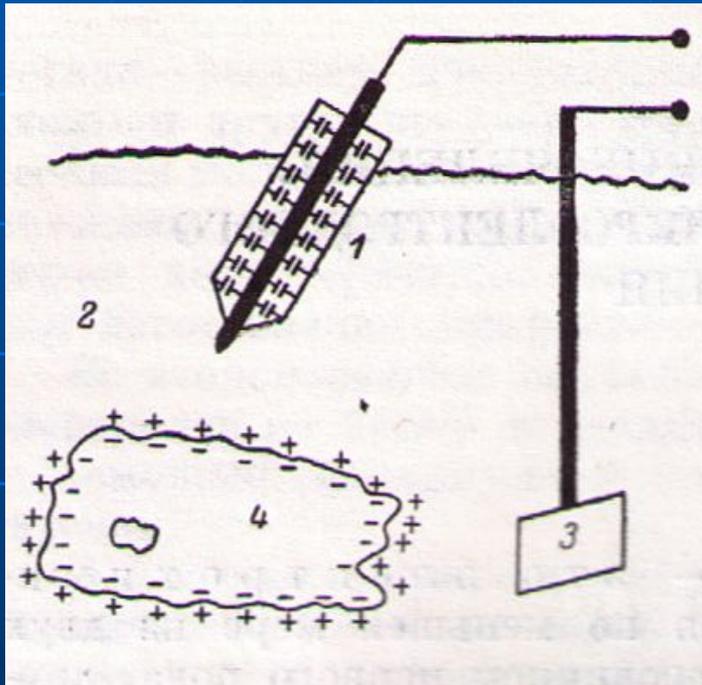
# Современные устройства и микро электроды



# Технология Brain gate



# Схема микроэлектродной измерительной ячейки



1. Микроэлектрод
2. Физиологический раствор
3. Индифферентный электрод
4. Нервная клетка

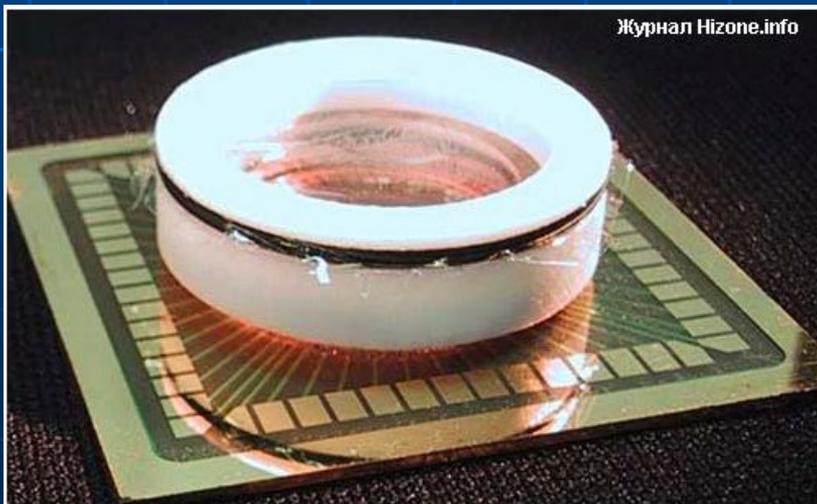
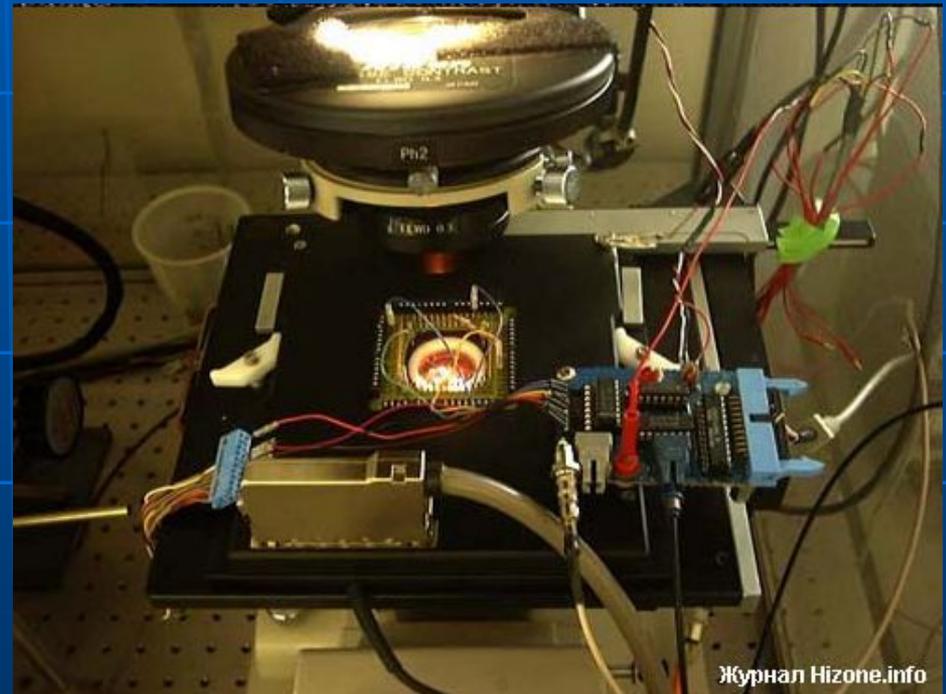
# Воздействие электродов на ткань

Помещение серебряных микроэлектродов в ткань на длительные сроки, как правило, приводит к нежелательным явлениям. Около кончика микроэлектрода в результате химического взаимодействия металла с тканевыми жидкостями сосредоточиваются продукты реакции, которые являются токсичными и могут вызвать необратимые явления в клетках.

С помощью спектрографического анализа было показано, что из кончика хронически вживленного стального микроэлектрода происходит выделение в окружающую ткань ионов железа, которые изменяют возбудимость клеток или химический состав среды. При пропускании постоянного и переменного тока силой от 0.1 до 2 мА в течение 20 с через стальные и вольфрамовые электроды (диаметр кончика 10 мкм) на кончике каждого из них наблюдается образование металлического грибообразного нароста, величина которого возрастает по мере удлинения срока использования микроэлектрода.

Платина обладает хорошей электрической проводимостью, химически инертна к тканям, и микроэлектроды из ее сплавов с другими металлами (иридием) механически прочны. Платина не окисляется, что делает ее незаменимой при изготовлении хронически имплантируемых электродов.

# Общий вид МЕА-чипов



# Гистологические аспекты

- При использовании искусственных конструкций возникают трудности, преодолеть которые еще не удалось. Самой существенной из них является отторжение интерфейса организмом после сравнительно короткого периода работы.
- Вживленные электроды постепенно обрастали рубцами, искажающими электрические импульсы. И в итоге связь чипа с нейронами прерывалась.
- Создание технического устройства на современном уровне технологий – преодолимая проблема. Нет возможности надёжно подключить этот интерфейс к мозгу.
- Если ставить больным подобные импланты сейчас, то через небольшие промежутки времени придется делать повторные операции. При этой переустановке чипов тканям может быть причинен дополнительный вред.
- Обучиться пользоваться имплантом требует нескольких месяцев. После повторной операции обучение придётся начинать сначала.
- **Необходимо искать более совместимые с биологическими тканями материалы. И пока не будет возможности безопасной работы искусственных нейрочипов в течении хотя бы 2-х лет, речи о их реальном массовом использовании вестись не должно**

# Проблемы, которые предстоит решать

- Поверхность субстрата легко эродирует когда погружается в раствор на долгое время;
- Фиксация клеток. Зазор между клетками и электродами затрудняет контроль при смещениях клеток в случае плохого прилипания к MEA-чипу;
- **Клеточные культуры нейронов плохо приживаются по сравнению с другими тканями и недолговечны;**
- **Приживаемость и выживаемость клеточных культур может служить критерием биосовместимости материала подложки для оценки перспективности использования этого материала в качестве микроэлектрода.**

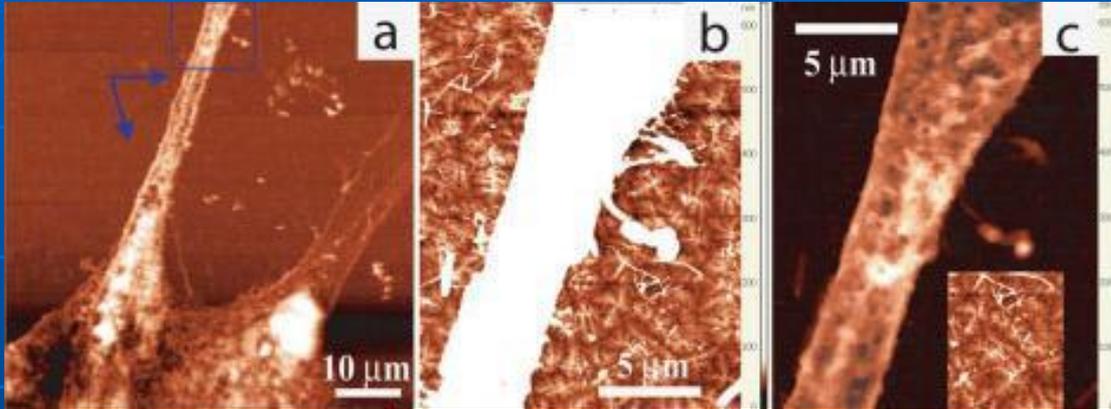
# Трудности культивирования нейронов

- Нейрон – очень капризная клетка. Клеточные культуры нейронов плохо приживаются по сравнению с другими тканями и недолговечны;
- Существует практика органных культур или целых фрагментов тканей, в которых частично поддерживается гистологическая целостность.
- Органных культур нервной ткани вообще получить не удаётся (только переживающие срезы). При помощи MEA-чипов от срезов удаётся зарегистрировать только суммарную, но не импульсную активность.
- Приживаемость переживающего среза к субстрату была бы наилучшим основанием для имплантации такого чипа непосредственно в мозг.
- «Взрослые» ткани характеризуются пониженным пролиферативным пулом и более высоким содержанием неделящихся специализированных клеток, часто ассоциированных с внеклеточным матриксом. Получение культур клеток «взрослых» тканей и их размножение являются более сложной задачей, и продолжительность жизни таких культур, как правило, невелика.
- **Культуры из эмбриональных тканей имеют лучшую выживаемостью и более активный рост по сравнению с «взрослыми» тканями. Это отражает более низкий уровень специализации и наличие реплицирующихся клеток-предшественников или стволовых клеток в эмбрионах.**

# Регенерация нервной ткани при помощи СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

- Исследования на мышах и крысах показали, что впрыснутые эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) дифференцируются и восстанавливают нарушенные связи между нервами. Подопытные крысы с повреждённым спинным мозгом, получившие клеточную инъекцию, владели задними лапами значительно лучше, чем контрольные крысы, которых не лечили.
- То же самое относится и к мезенхимным стволовым клеткам (МСК). Вдобавок к этому они поставляют нервам ценные вещества, которые необходимы для нормального функционирования и роста.

# Возможности стволовых клеток для биосовместимости



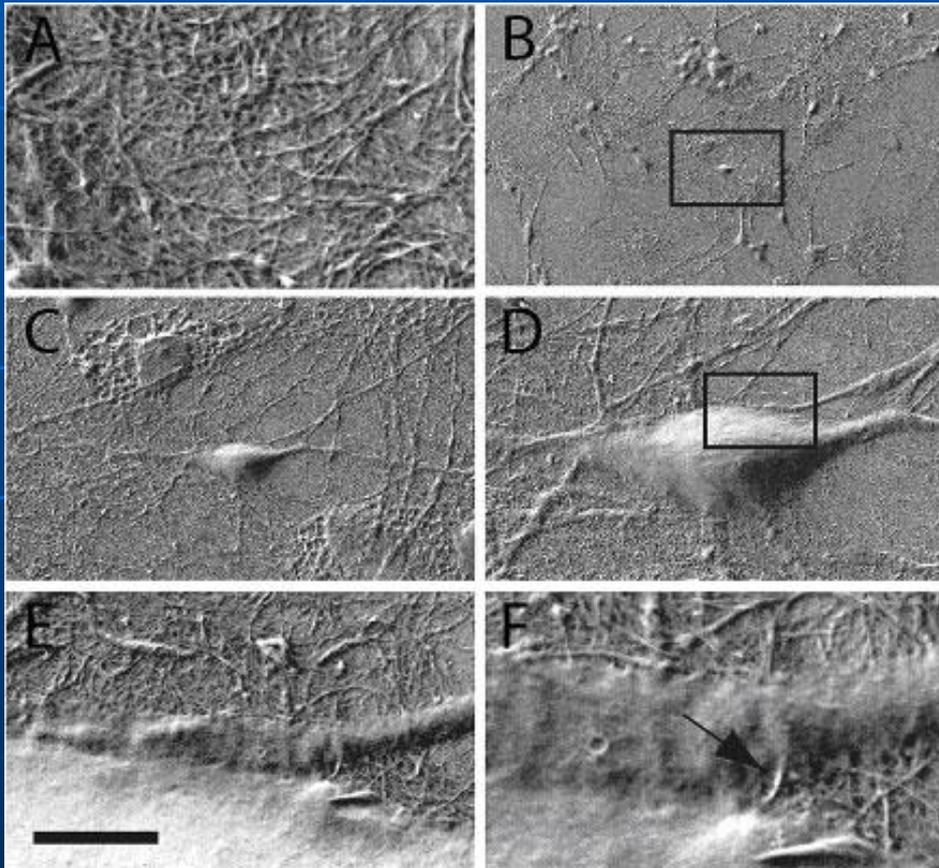
- а) Изображение выделенного нейрона,, полученное с помощью атомного силового микроскопа;
- в) увеличенное изображение показывает, что морфология тонкой пленки пентацена не нарушена и не изменена при взаимодействии с клеткой;
- с) то же самое изображение, что б) при иной фокусировке микроскопа для демонстрации морфологии аксона (вставка показывает неизмененную пленку пентацена из б)

- Стволовые клетки могут быть «прилеплены» к пленке пентацена - одного из наиболее подходящих органических полупроводников. Эти клетки способны к росту на поверхности пентацена и, оставаясь жизнеспособными в продолжение многих дней, в конце концов разделяются на нейроны и глиальные клетки.
- Это показывает, что органические электронные материалы могут напрямую контактировать с живыми клетками и при этом не возникает серьезных проблем.
- Существует много видов органических полупроводников, которые могут быть проверены экспериментально на биологическую совместимость

# Перспективы наноматериалов

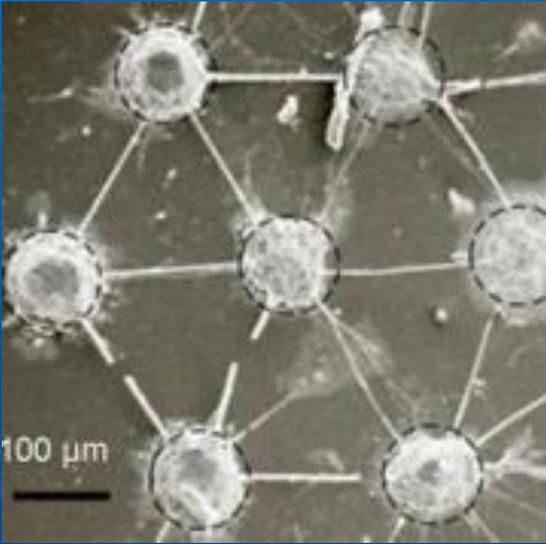
- Наносенсоры имеют потенциал для мониторинга ин-виво процессов обмена отдельной клетки со средой, причём с учётом специфической локализации на клетке.
- **Наноструктурные материалы, которые подражают наномерной топографии настоящих тканей, могут улучшить биосовместимые реакции и привести к лучшей тканевой интеграции в медицинских имплантах. Понимание различных аспектов нанотопографии особенно важно для лучшего проектирования этих устройств.**
- Микро/наночастицы собираются в узоры и формируют субстрат для присоединения белков и клеток. Смонтированные частицы (модули) создают на поверхности нанотопографию, зависящую от размера задействованных частиц.
- Неплоская структура может увеличить площадь поверхности для присоединения биомолекул и этим усилить чувствительность биосенсора.
- Наноструктурированный субстрат может воздействовать на конформацию и функционирование присоединённых к нему белков
- Реакция клеток с точки зрения морфологии, адгезии, пролиферации, дифференциации и т.п. может усиливаться выступающими из поверхности микро- и нано-структурами.
- Способность устанавливать клетки на субстрат с точно контролируемым размером и пространственной организацией позволит провести фундаментальное исследование клеточных реакций.

# Культура клеток на подложке из нанотрубок



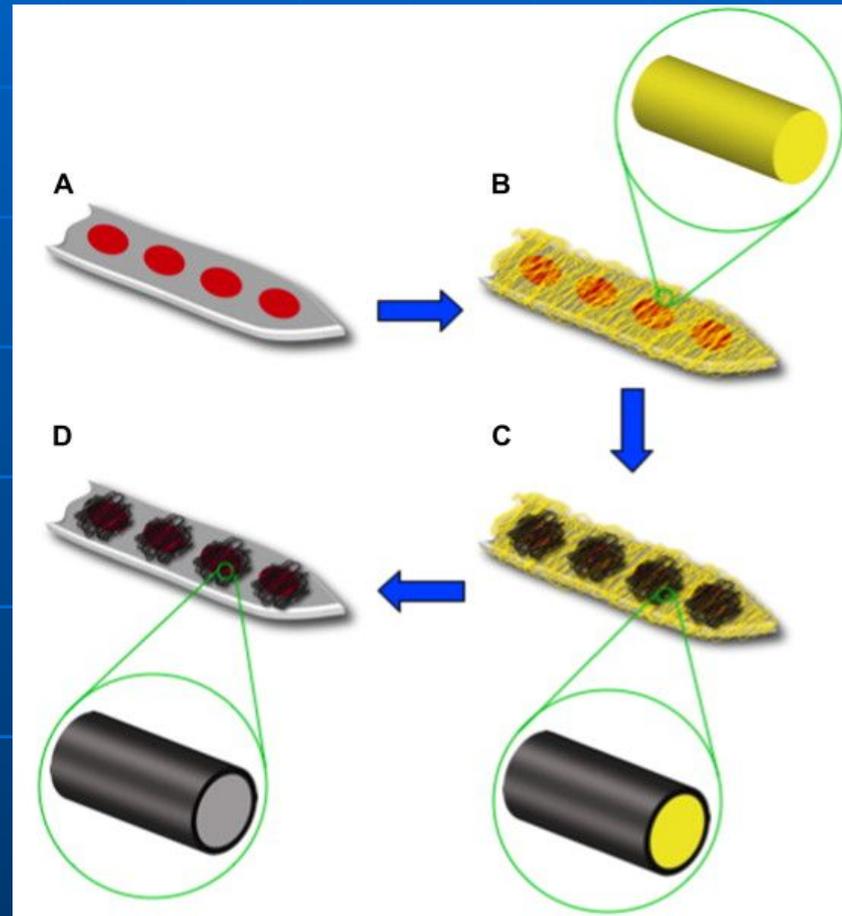
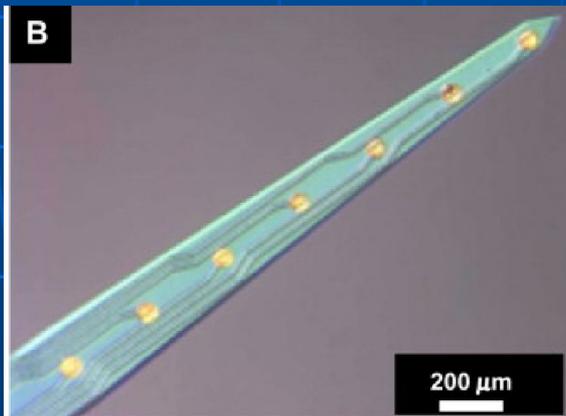
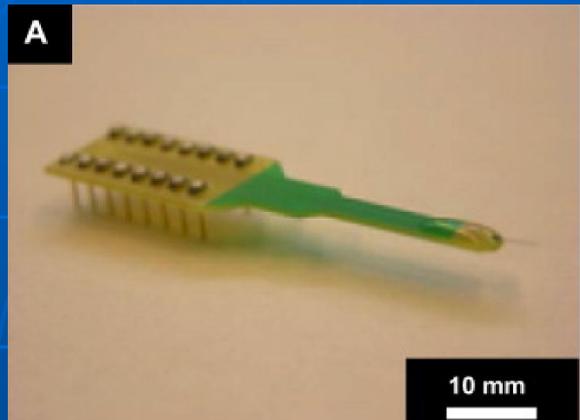
- Коллектив из Италии 8–12 дней культивировал нервные клетки гиппокампа крыс на подложках из одностенных нанотрубок.
- Для получения подложек раствор нанотрубок осаждали на стекло, где после термообработки образовывалась пленка толщиной 50–70 нм.
- По всей подложке разрослись нейроны, имеющие размеры и морфологию, типичные для здоровых клеток.
- При этом они тесно соединились с нанотрубками (D).
- Анализ выявил плотный контакт мембраны нейрона с нанотрубкой (E-F), что очень важно для создания интерфейса «нейронная ткань-внешнее устройство».
- **Рост нейронов и образование функциональной сети указывает на хорошую биосовместимость.**

# Формирование искусственной нейросети при помощи нанотрубок



- В основе чипа — пластинка из кварца. На ней расположили каркас из участков, покрытых нанотрубками, с шагом между узлами 100 мкм.
- Аксоны и дендриты хорошо связывались с нанотрубками и использовали их как своего рода «строительные леса». В результате образовывались кластеры клеток по 20-100 штук в каждом.
- Отдельные кластеры начали формировать отростки в направлении других кластеров, образуя правильную сеть.
- Кластеры проявляли электрическую активность, свойственную нервным клеткам.
- Нанотрубки упрощают электрический контакт между отдельными клетками и могут функционировать в качестве электродов.

# Имплантируемые микроэлектроды, модифицированные проводящими полимерными нанотрубками



Микроэлектродные массивы для стимуляции и записи. Зонд будет вставлен в моторную или слуховую кору, остальные контакты закреплены на черепе.

(А) Восьмиканальный зонд с кремниевой подложкой для острых опытов.

(В) Изображения зонда высокого увеличения демонстрирует кремниевую подложку и золотые электродные сайты с площадью поверхности  $1250 \text{ мкм}^2$

Процедура модификации поверхности нейронных микроэлектродов для того, чтобы создать слой нанотрубок.

(А) Микроэлектроды перед модификацией поверхности.

(В) Электропрядение биоразлагаемым полимером из нановолокон вокруг микроэлектродов.

(С) Электрохимическая полимеризация вокруг нановолокон.

(D) Удаление исходного волокна для создания нанотубулярных площадок.

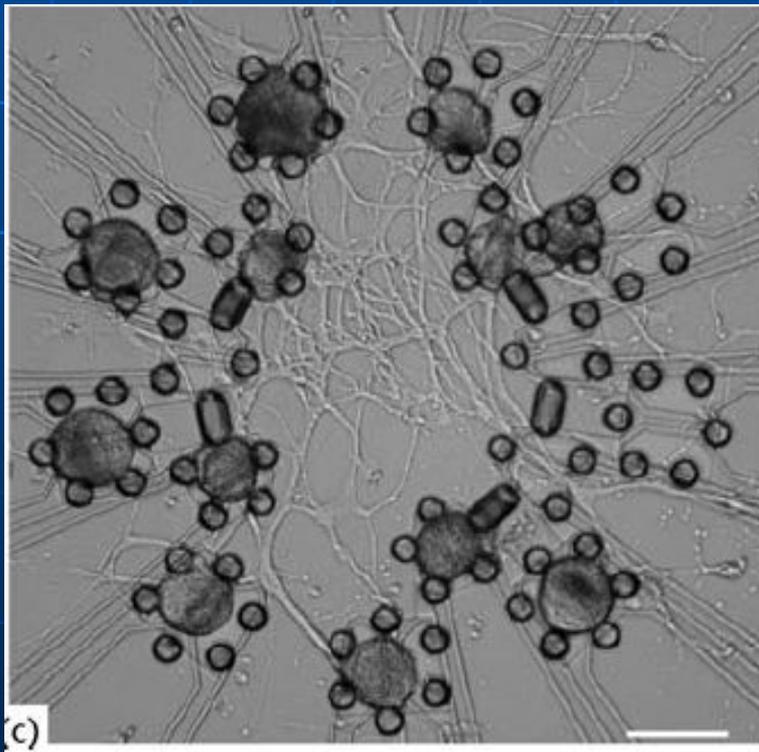
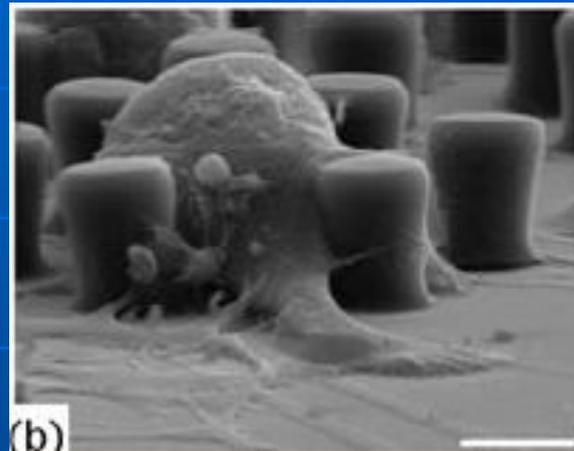
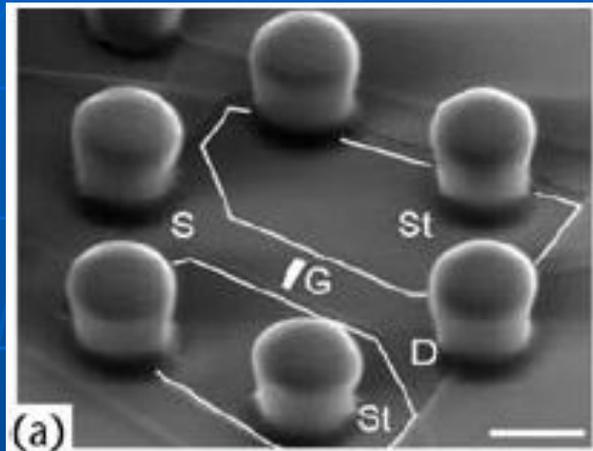
## Совместное применение стволовых клеток и наноматериалов

1. После имплантирования в поврежденные участки мозга специальных матриц из нанотрубок в растворе стволовых клеток уже через восемь недель было обнаружено восстановление нервной ткани.
2. При использовании нанотрубок либо стволовых клеток отдельно друг от друга аналогичного результата не было.

## Недостатки нанотрубок

1. Осаждаемые из раствора нанотрубки невозможно откалибровать по размеру.
2. Нанотрубочное покрытие легко слущивается

# Нейрональная культура на силиконовом чипе

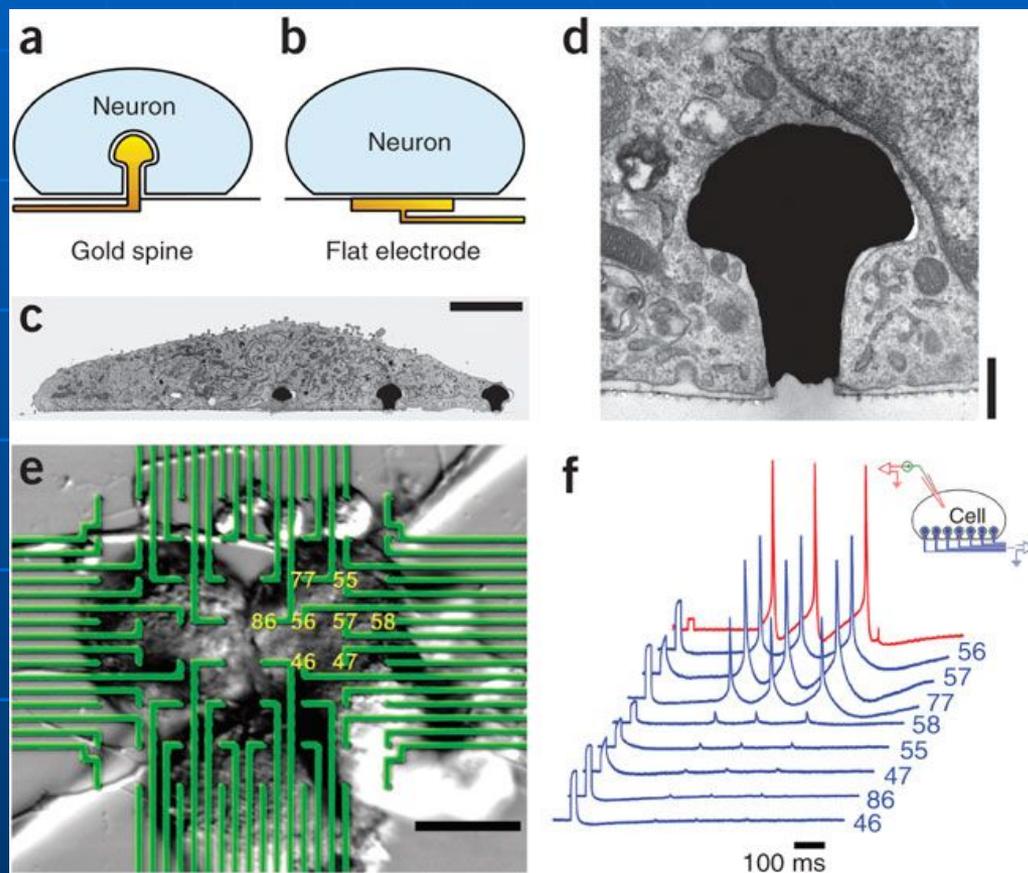


- (a) Крылья стимулятора (St) и транзистор (S, источник, D, сток, G, ворота), обозначаемый как силиконовый чип. Черта - 20 мкм.
- (b) Отдельный нейрон был захвачен внутрь столбиков, отростки распространились наружу и соединились с другими. Черта - 20 мкм.
- (c) Несколько полиимидных столбиков на биосенсоре.
- Черта - 100 мкм.

# Идея «Нанопесок»

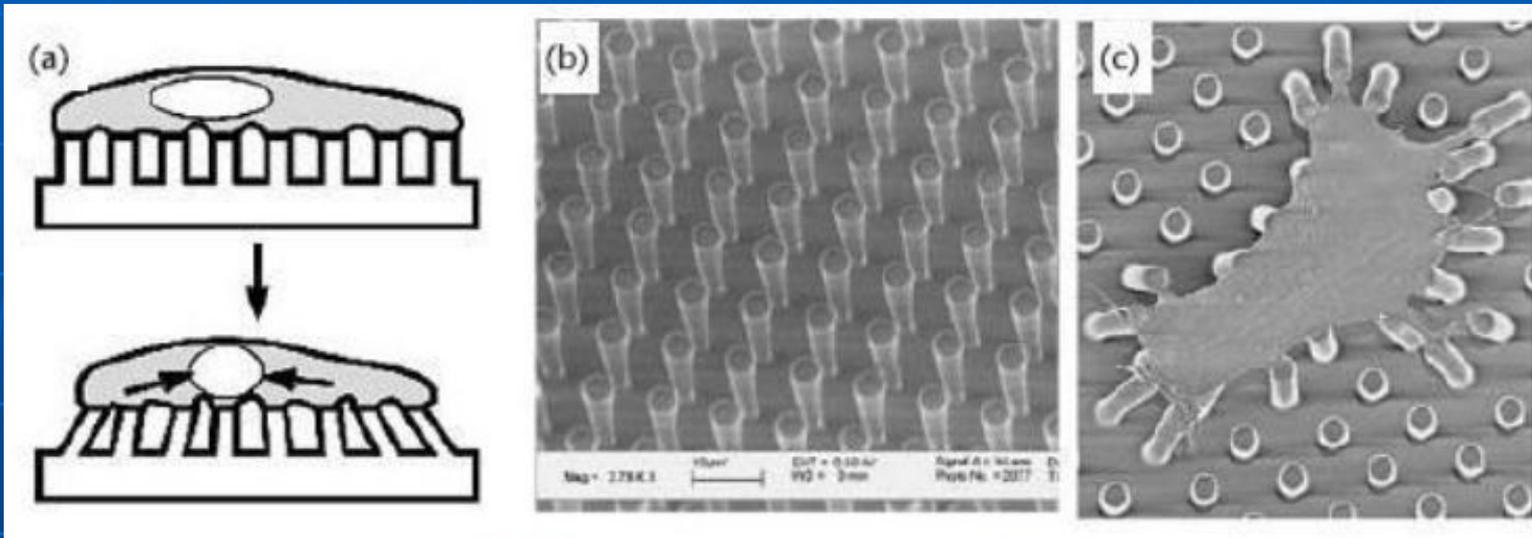
# Золотые электроды-шипы

- **(a,b)** Схематическое представление нейрона, обволакивающего золотой шип-электрод (a) и нейрон на плоском электроде (b).
- **(c)** Электронная микрофотография среза через нервную клетку PC12, обволакивающую три золотых шипа-электрода.
- **(d)** Электронная микрофотография золотого шипа, покрытого клеткой PC12.
- **(e)** Три нейрона *Aplysia* на массиве из многих золотых шипов.
- Шкалы масштаба -5 мкм (c), 500 нм (d) и 50 мкм (e).
- **(f)** Одновременная запись импульсов (синий) от 8-и шипов-электродов (см числа на e) на внутриклеточную стимуляцию обычным игольчатым микроэлектродом (красный).



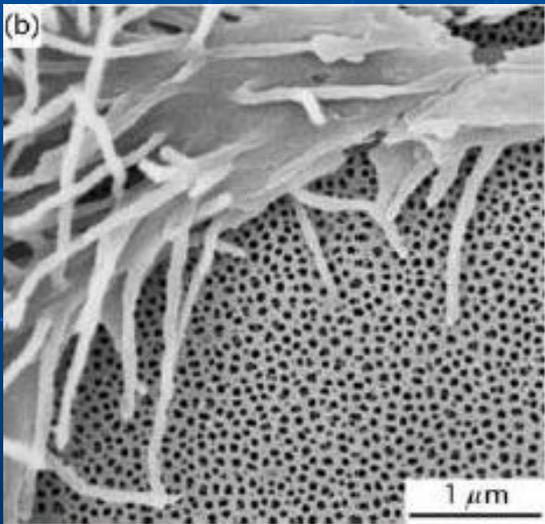
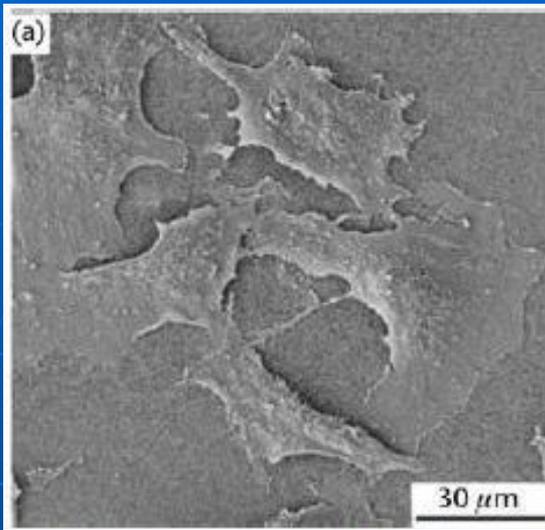
- Нейроны культивируемые на матрицах с выступающими золотыми шипами-электродами микронного размера.
- **Полипептид с цепочкой Арг-Гли-Асп стимулирует фагоцитоподобные реакции у нейронов и в высокой степени улучшает обволакивание клеткой золотых шипов (EPP).**

# Нано-микроузорные клеточные культуры



Гладкая мышечная клетка лежит на подстилке из микротрубок.  
(a) При подходящей поверхности плотность вертикальных столбиков, установленных на субстрате клетка должна расплзтись по верх многих столбиков как нарисовано.  
(b) Калиброванный массив столбиков.  
(c) SEM-микрофотография трансформации клеткой столбиков в ходе присоединения.  
(из [16], репродуцировано из Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America. 2003, с разрешения National Academy Sciences of the USA)

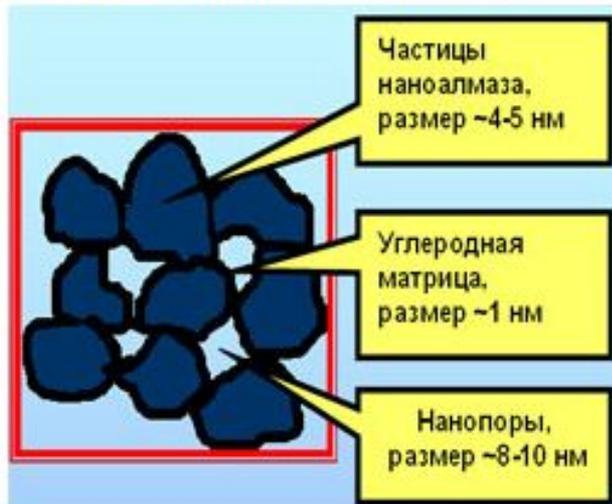
# Биосенсоры, основанные на нанопорах



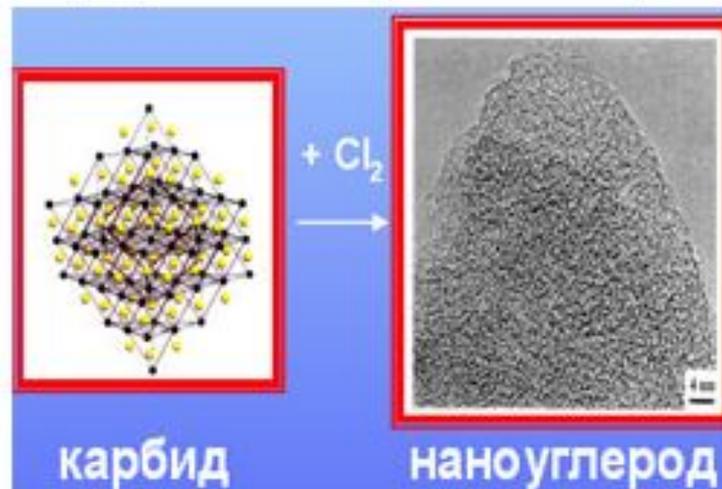
- Очень высокое соотношение площади поверхности к объёму – самое важное свойство нанопористых материалов.;
  - Контроль размера пор, морфологии и распределения компонентов ведёт к существенному прогрессу при применении этих материалов как катализаторов, электродов, хроматографических, сепарирующих и посылающих элементов;
  - В биоинженеринге использовался нанопористый анодированный оксид алюминия (ААО или алюмин) по причине его отличной биосовместимости и хорошо отлаженной технологии изготовления;
  - Алюмин применялся как субстрат для культивирования тканей. В том числе **культура остеобластов культивировалась на нём в течении 3-х лет.**
  - **Одним из самых критических факторов является реакция клетки на топографию поверхности. Поверхность алюминия демонстрирует существенную биоинтеграцию и вращание клеток внутрь.**
  - Реакция клеток может быть ещё улучшена через нано-масштабную архитектуру;
  - Биосенсорная система была настроена для процедуры измерения импеданса клеточной культуры.
- Остеобласты на пластинке оксида алюминия (диаметр пор примерно 75 нм). (а) Общий вид и (б) увеличенный край клетки

# Нанопористые материалы ФГУП ЦНИИ Материалов

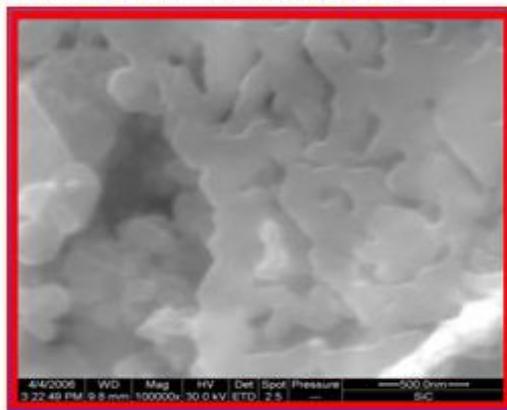
Углеродный наноккомпозит из наноалмаза



Углеродный нанопористый материал



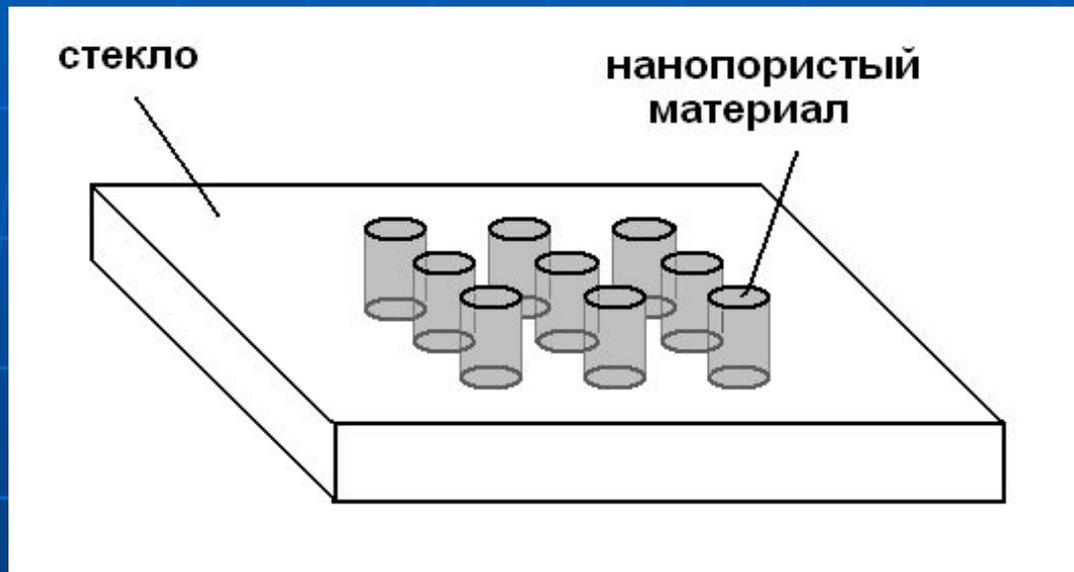
Наноструктурный карбид кремния



Характеристики композиционных материалов алмаз-углерод

Материал	Плотность г/см <sup>3</sup>	Пористость %	Удельная поверхность м <sup>2</sup> /г	Средний размер пор (S/V), нм	Размер пор геометрич., нм
НАК-30	0.85	65	280	12	13
АСМ 0.25/0	2.16	33	28	22	95
АСМ 1/0	2.26	30	11	48	125
АСМ 2/1	2.03	36	7	100	840

# Стекланный композит

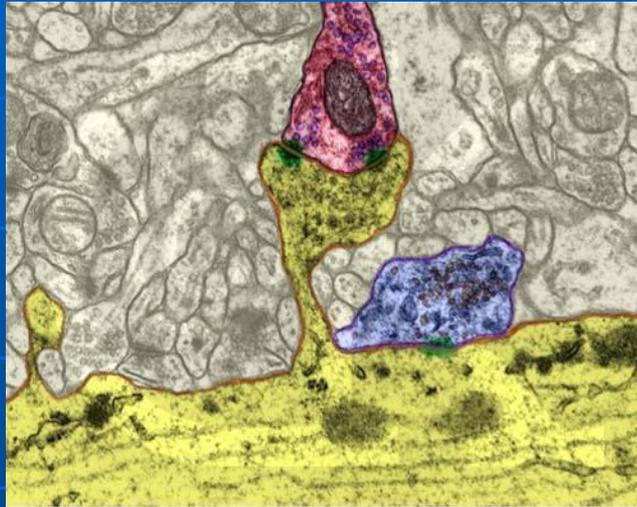


- В стеклянной пластинке создаются сквозные поры, заполненные нанопористым материалом;
- Поры занимают определённую площадь на пластинке и располагаются с регулярным чередованием;
- Диаметр пор и расстояние между ними могут быть заданы при изготовлении;
- **На основании этого материала возможно создание МЭА-чипа с раздельной электрической адресацией контактных площадок.**

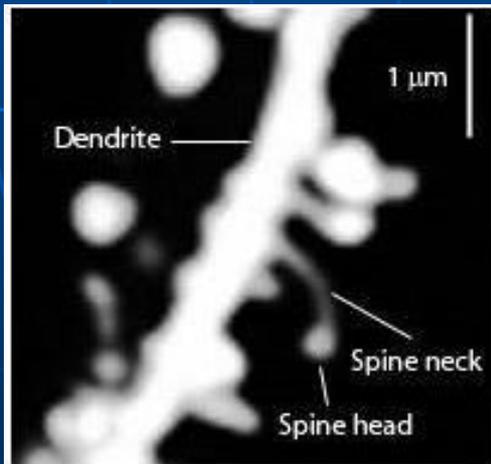
# Шипики дендритов



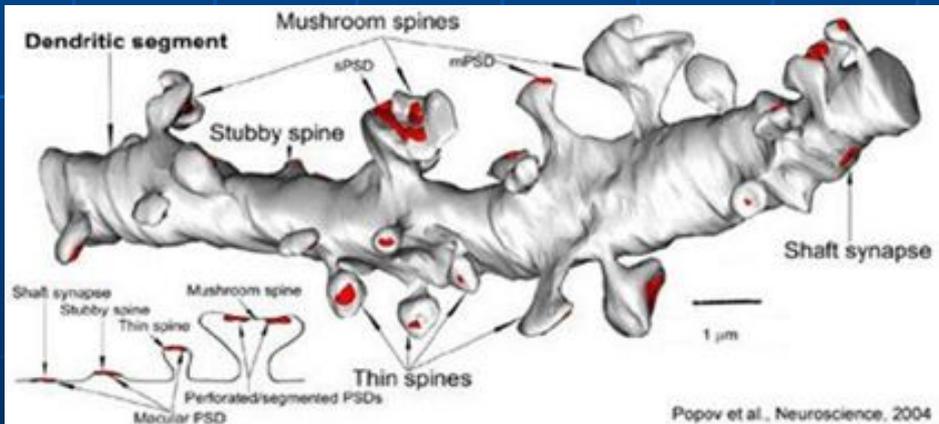
**Фрагмент дендрита**



Один шипик с синапсом  
(электронный микроскоп)

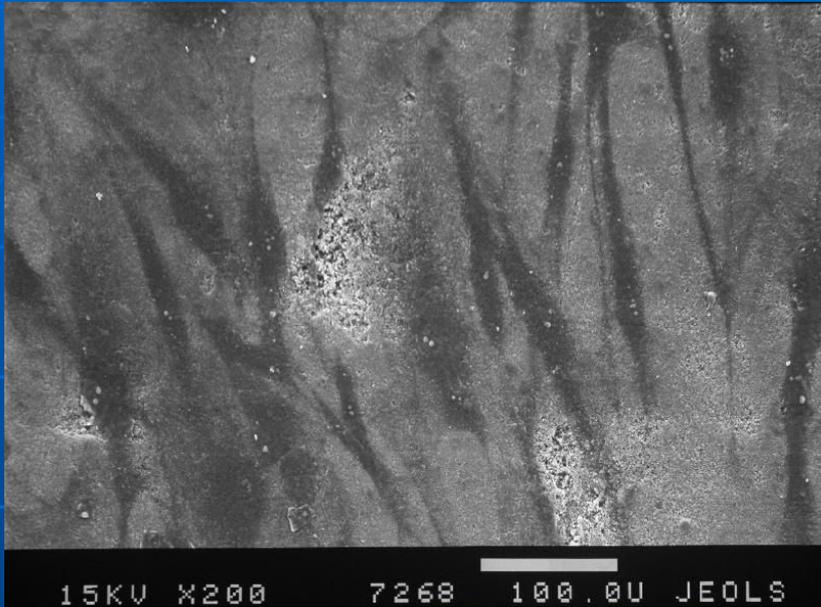


**Шипики крупно**

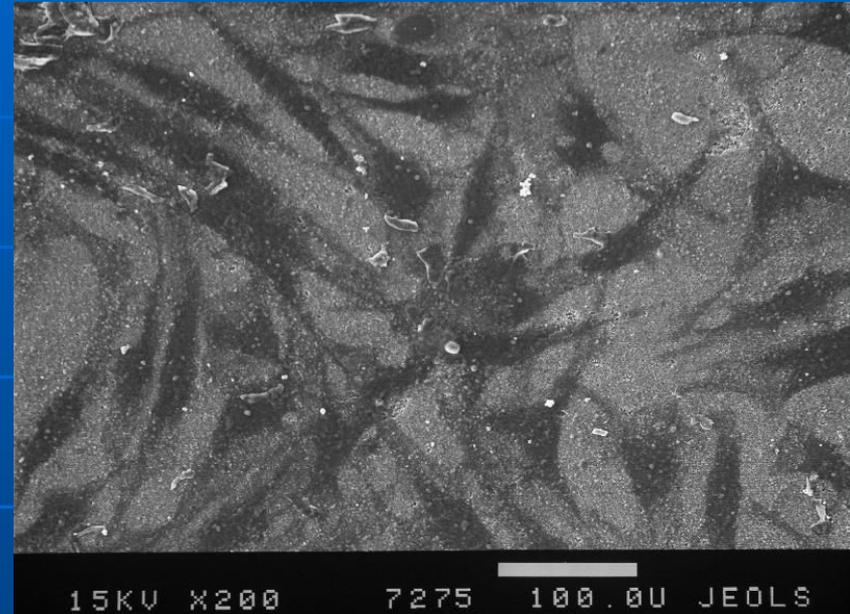


Фрагмент дендрита с шипиками разных типов -  
пеньковые, тонкие, грибовидные.  
(сканирующий электронный микроскоп).

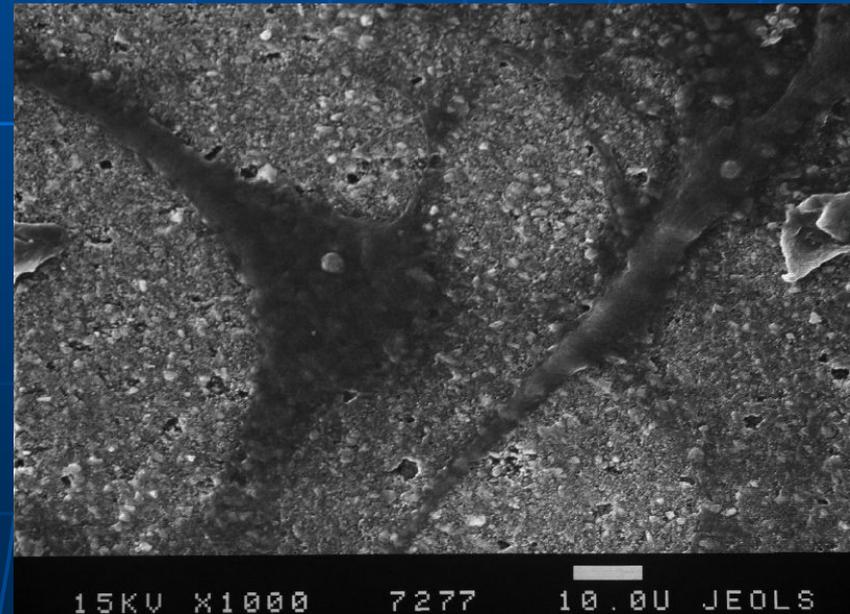
# Культуры фибробластов на разных НАК (Б.А. Моргулис)



100 мкм – клетки,  
плавающие в растворе

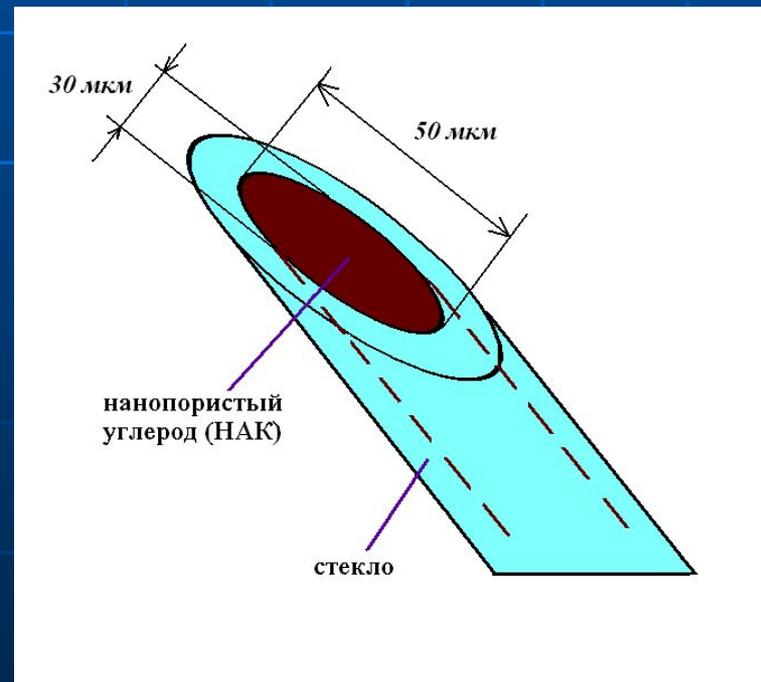
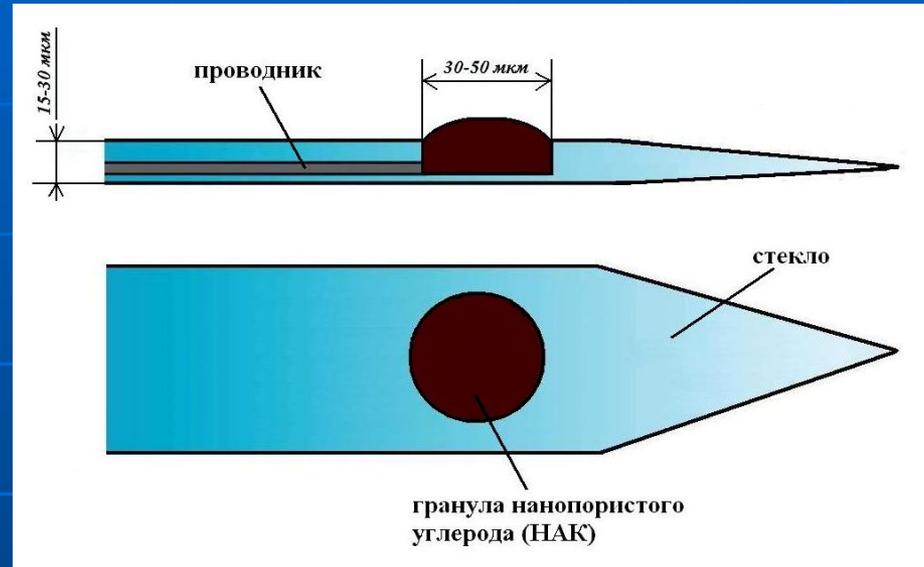
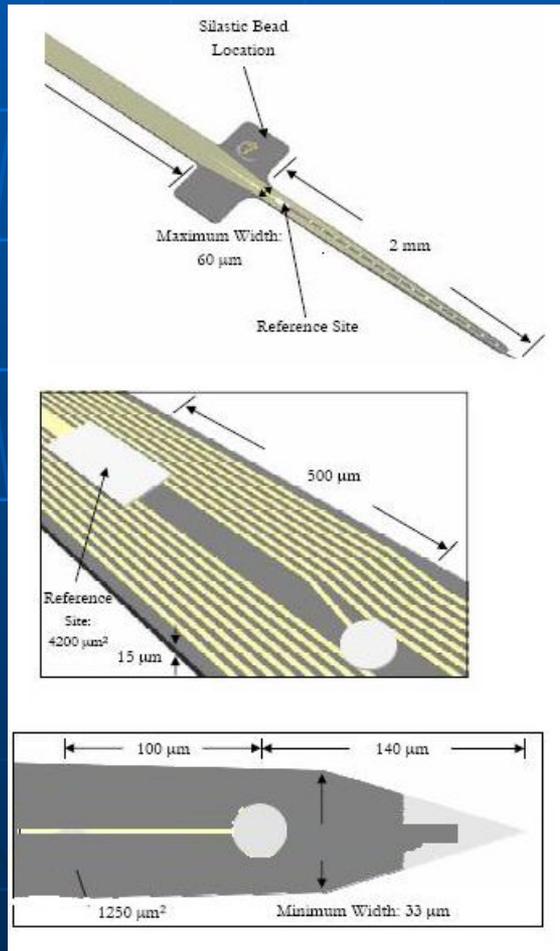


Клетки, осевшие на  
субстрат:  
100 мкм  
10 мкм



# Конструкции биосовместимых зондов с использованием НАК

## Нейрозонды, имеющиеся в продаже



■ Спасибо за внимание