

УДК 57.08:004.5

НЕЙРОИНТЕРФЕЙСЫ: ОБЗОР, РАЗРАБОТКА

© 2014 г. С.Н. Речкунов¹, А.В. Принц¹, В.А. Селезнев¹, С.В. Голод¹,
Р.А. Соотс¹, А.И. Иванов¹, А.С. Ратушняк², В.Я. Принц¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова
Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия, e-mail: prinz@isp.nsc.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Конструкторско-технологический институт вычислительной техники
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 17 октября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Изучение электрической активности в нейронных сетях необходимо для расшифровки на клеточном уровне механизмов информационных процессов и объяснения таких явлений, как долговременная память, обучение и синаптическая пластичность. Необходимо создание многоэлектродных приборов для фундаментальных исследований и практических применений, предназначенных для одновременной записи и стимуляции нейронной активности. В работе представлено современное состояние дизайна, тенденций развития, преимуществ и недостатков многоэлектродной концепции. Главной задачей в дизайне нейроинтерфейсов является достижение необходимого уровня биосовместимости и малой инвазивности при сохранении высокого пространственно-временного разрешения. Мы предложили и описали оригинальные нейроинтерфейсы. Один из них основан на плотном массиве вертикальных полупроводниковых микротрубок и предназначен для будущих *in vivo* нейроинтерфейсов. Другой является экспериментальным *in vitro* многоэлектродным прибором, сформированным из 60 жидкостных пэтч-кламп электродов. Описаны результаты измерения сигналов с нейронов с помощью сформированных пэтч-кламп электродов, каждый из которых представляет собой своеобразную пипетку (диаметром 2 мкм) и позволяет реализовать контакт с мембраной клетки путем присасывания. Достоинством этого подхода является то, что клетки не имеют непосредственного контакта с металлом электродов, а контактируют с проводящей жидкостью в микроканале (ионным проводником), что обеспечивает правильность электрических измерений и повышает выживаемость клеток в процессе измерений.

Ключевые слова: нейроинтерфейс, пэтч-кламп, полупроводниковые нанотрубки.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение информационно-когнитивного функционирования больших нейронных ансамблей является глобальной фундаментальной задачей современной науки. Нейронные ансамбли демонстрируют коллективную электрическую активность и коммуникативные способности передачи электрических сигналов по нейросети, что, по современным представлениям, является основой информационного процессинга в нейронных популяциях. В основе электрической

активности, демонстрируемой нейронными ансамблями, лежат физические процессы «разряда» нейронов через трансмембранные ионные каналы. При открытии локализованного ионного канала становится возможным переток ионов через мембрану, что приводит к локальному изменению концентрации ионов вблизи канала и, как следствие, к возмущению локального электрического поля и потенциала (Buzsaki *et al.*, 2012). Изменения потенциала вблизи мембраны нейрона при активации ионного канала имеют характерный вид импульсных

сигналов (спайков) миллисекундного временного диапазона. Возмущение электрического поля может спровоцировать открытие других ионных каналов и распространиться далее, охватывая определенный фрагмент нейросети. Экспериментальное исследование пространственно-временной динамики электрической активности больших нейронных ансамблей является необходимым базовым уровнем изучения механизмов кодирования и обработки информации мозгом.

Одной из важнейших задач экспериментального исследования является создание эффективных нейроинтерфейсов между нейронной популяцией и внешним миром (Rutten, 2002; Grill *et al.*, 2009). Известные оптические методы регистрации активности больших нейронных ансамблей (обычно визуализации кальция) дают изображение активной области, усредненное на достаточно большом промежутке времени (сотни миллисекунд); детектирование отдельных спайков представляет трудно разрешимую техническую проблему. В противоположность этому, микроэлектродные системы прямой регистрации действующего потенциала позволяют наблюдать электрическую активность нейросети с временным разрешением субмиллисекундного диапазона, а также возбуждать активность нейросети электрическими стимулами сложного пространственно-временного шаблона. Отпадает и необходимость в трансгенных мутациях для выработки нейронами специфических фотоактивных белков, как в случае использования оптических методов. Хотя микроэлектродное зондирование пока не позволяет однозначно идентифицировать клеточные типы нейронов (Ruz, Schultz, 2014), тонкое временное разрешение делает данный метод исключительно эффективным для изучения спайковой динамики в больших нейронных ансамблях (Buzsaki, 2004; Wise *et al.*, 2008). Более того, нейроинтерфейсы на основе электрических сигналов наиболее просто могут быть интегрированы в сложные электронные системы сбора и обработки данных. Интегрированные системы с плотными массивами микроэлектродов в силу малых размеров могут быть использованы в экспериментах на активных животных, а в перспективе – и в целях реабилитационного нейропротезирования (Schwartz,

2004; Weiland, Humayun, 2008; Wise *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2008) и создания эффективных интерфейсов «мозг–машина» (Lebedev, Nicolelis, 2006; Schwartz, 2006).

За последние десятилетия со времени пионерской работы Д. Хьюбеля (Hubel, 1957) технология нейронального зондирования претерпела революционные изменения в направлении развития устройств с большими массивами микроэлектродов. Устройства с мультиэлектродными массивами (МЭМ), имеющие десятки и сотни электродов, дают намного более богатую пространственную информацию, чем простые системы типа тетродов. МЭМ устройства высокой плотности позволяют одновременно регистрировать активность десятков нейронов в ансамбле на клеточном уровне (Nicolelis *et al.*, 2003; Schwartz, 2004). В последнее время становится все более очевидно, что нейронные «микросхемы» коры головного мозга имеют прецизионную пространственную организацию (Lee, Huguenard, 2011; Oberlaender *et al.*, 2011; Levy, Reyes, 2012; Ruz, Schulz, 2014). В этой связи создание *in vivo* зондовых систем с большими 3-D массивами микроэлектродов является как никогда актуальным для экспериментального изучения архитектуры мозга на разных системных уровнях организации. Примерами 3-D систем могут служить уже созданные МЭМ устройства типа «Utah» (Najafi *et al.*, 1985) с массивом игольчатых электродов разной длины (Du *et al.*, 2009; Herwik *et al.*, 2009) или с несколькими электродными сайтами на конце каждой иглы (Chang, Chiou, 2010), МЭМ устройства глубокого зондирования типа «Michigan» (Campbell *et al.*, 1991) с протяженным (свыше одного миллиметра) массивом микроэлектродов (Du *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2012), универсальные МЭМ устройства синхронного зондирования и стимуляции коры и внутренних отделов мозга (McCarthy *et al.*, 2011).

Создание больших МЭМ систем, необходимых для современных исследований, сталкивается с рядом принципиальных ограничений. Увеличение числа микроэлектродов в массиве неразрывно связано с проблемой ввода/вывода физических сигналов, связанных с индивидуальными электродами. Кардинальное решение проблемы интерфейса видится в создании интегрированных МЭМ систем,

включающих помимо самого массива электродов микроэлектронные схемы усиления и преобразования данных, а также фильтрации и сжатия информационных потоков, что позволяет на один–два порядка уменьшить число необходимых интерфейсных линий. В случае имплантируемых *in vivo* МЭМ систем помимо интерфейсных ограничений имеются и серьезные ограничения на энергопотребление, что требует разработки специальной энергосберегающей архитектуры процессорного микрочипа и алгоритмов преобразования множественных нейрональных данных в малое число функционально значимых сигналов (Wattanapanitch *et al.*, 2007; Chandrakasan *et al.*, 2008; Sarpeshkar *et al.*, 2008; Sodagar *et al.*, 2009). На современном этапе интегрированные *in vivo* МЭМ системы, имеющие ~100 электродов, можно считать приемлемым компромиссом для обеспечения функций нейроинтерфейса.

Другое ограничение касается проблемы обеспечения малой инвазивности массива микроэлектродов, иными словами, в присутствии электродов нормальное функционирование нейронного ансамбля не должно нарушаться. Для надежного детектирования и выделения активного нейрона электрод должен находиться не далее ~100 нм от сомы, поскольку амплитуда внеклеточного действующего потенциала быстро спадает с расстоянием, а в случае удаленного электрода имеет место и интерференция сигналов нескольких нейронов (Henze *et al.*, 2000; Shoham *et al.*, 2006; Vuzsaki *et al.*, 2012). Уменьшение межэлектродного расстояния повышает пространственное разрешение и отношение сигнал/шум, так как в среднем часть микроэлектродов будет расположена вблизи нейронов (Maccione *et al.*, 2010). С другой стороны, с уменьшением расстояния между электродами искажения объемного распределения потенциала, вносимые эквипотенциальной поверхностью электродов, могут стать существенными, что ведет к необходимости уменьшать размеры микроэлектродов и даже применять нанотехнологии для обеспечения малой инвазивности МЭМ устройства (Du *et al.*, 2011).

Уменьшение площади микроэлектрода ведет к ухудшению функциональных характеристик (увеличение шума, входного импеданса, уменьшение связанного заряда и величины инъекти-

руемого заряда (Cogan, 2008)). Эффективную площадь электрода можно увеличить за счет развитой морфологии поверхности, используя специальные технологические приемы или покрытия, например, пористые электроды (Urbanova *et al.*, 2011), органические проводники (Ludwig *et al.*, 2011; Aregueta-Robles *et al.*, 2014) или даже углеродные нанотрубки (Baranauskas *et al.*, 2011; Bareket-Keren, Hanein, 2013). Тем не менее на сегодняшний день вопрос оптимальных биосовместимых материалов для микроэлектродов *in vivo* и *in vitro* МЭМ систем остается все-таки открытым, как и сопутствующая проблема взаимодействия нейронов с наноструктурированной поверхностью (Brunetti *et al.*, 2010).

Нейрональные *in vivo* исследования с помощью МЭМ систем трудоемки, дороги и ограничиваются в основном опытами на полностью или частично иммобилизованных животных. Продолжительные *in vivo* эксперименты крайне затруднительны из-за иммунного ответа организма и высокого риска инфицирования в области аппликации МЭМ системы. Имплантируемые автономные МЭМ системы дистанционного *in vivo* мониторинга находятся в стадии разработки и труднодоступны. Вместе с тем имеется широкий круг проблем, которые могут решаться в ходе *in vitro* исследований.

Технология *in vitro* МЭМ систем совершенствуется год от года, становится доступнее и все шире применяется для исследования культивированных *in vitro* нейросетей и поиска ответа на фундаментальные вопросы, касающиеся обучения, долговременной памяти и синаптической пластичности на клеточном уровне (Zemianek *et al.*, 2012). *In vitro* МЭМ системы позволяют исследователям неинвазивным способом проводить долговременные (до нескольких месяцев) наблюдения электрической активности нейросети, культивированной на поверхности матрицы микроэлектродов, имея в то же время возможность воздействовать внешними стимулами в течение всего периода эволюции популяции. Несмотря на обилие исследований, многие функциональные, химические и структурные механизмы развития электрической активности в нейросети остаются неясными (Spitzer, 2006) так же, как количественные критерии оценки развития сети и адекватные методы анализа больших объемов данных спай-

ковой активности сети (Carandini, 2012; Napoli *et al.*, 2014). Приоритетная цель современных исследований культивированных нейронных ансамблей состоит в изучении связи между архитектурой нейросети и поведением, в том числе получение устойчивой желаемой реакции в ответ на определенные стимулы. Перспективным преимуществом *in vitro* МЭМ систем является то, что они могут стать прецизионной инструментальной платформой для разработки биогибридных нейроэлектронных обучаемых микросистем с гибкой функциональностью (Cullen *et al.*, 2011).

Проблема формирования массивов жидкостных пэтч-кламп электродов

Известен метод регистрации локального потенциала (patch-clamp, пэтч-кламп). Этот электрофизиологический метод, используемый для изучения свойств ионных каналов, является «золотым стандартом» в электрофизиологии. Это очень чувствительный метод, он позволяет отслеживать единичные ионы и молекулы. Суть метода состоит в изоляции небольшого фрагмента клеточной мембраны с помощью микропипетки и дальнейшего исследования его электрофизиологических свойств. Метод позволяет измерять ионные токи, проходящие через мембрану, контролировать разность потенциалов между сторонами мембраны и делать выводы о том, как ионные каналы реагируют на электрическое и химическое воздействие.

Между пэтч-кламп электродом и открытым электродом, поверхность которого частично или полностью (в случае матрицы с электродами малых размеров) занята клеткой, имеются серьезные различия. Открытый электрод изолирован от межклеточной среды и находится на некотором удалении от мембраны клетки, таким образом, регистрируются внеклеточные потенциалы. Пэтч-кламп электроды присоединяются непосредственно к клеточной мембране, но (в конфигурации Whole-cell) не разрушают ее, за счет этого не шунтируется потенциал на поверхности мембраны и достигается высокий уровень сигнала по сравнению с шумом.

Для регистрации процессов, протекающих в нейронах, и для исследования механизмов передачи информации в нейросетях необходим

массив электродов, которые бы не разрушали нейроны и в то же время регистрировали сигнал, генерируемый непосредственно нейроном. Пэтч-кламп электроды удовлетворяют этим требованиям. В идеальном варианте каждая клетка в нейронной сети должна быть присоединена к пэтч-кламп электроду и должна быть возможность регистрировать электрические сигналы от каждого электрода матрицы в каждый момент времени. Такой идеальной системы еще не существует.

Трудоемкость традиционного пэтч-клампа является причиной того, что исследователи стремятся создать системы автоматизированного и множественного пэтч-клампа, позволяющие регистрировать сигналы от множества клеток одновременно.

В отличие от массивов планарных металлических площадок электродов большие массивы пэтч-кламп электродов до сих пор не изготовлены. Перспективным является именно разработка технологии изготовления планарных пэтч-кламп электродов, что позволит создавать пэтч-кламп электродов массовыми методами.

Многие исследователи ведут работы по технологии изготовления отдельных (или небольшого количества) планарных пэтч-кламп электродов разными способами: формированием пор в $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ мембране (Fertig *et al.*, 2000), формированием отверстий в кремнии, покрытом PECVD-оксидом плазменным травлением (Pantoja *et al.*, 2004); с использованием полиимидной пленки с порами (Kiss *et al.*, 2003); трэжковой мембраны (Fertig, 2002); сопла из оксида кремния (Lehnert *et al.*, 2002); стеклянных подложек (Bruggemann *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003).

В работе Klemic с соавт. (2002) описана матрица пэтч-кламп электродов с размером отверстий 4–20 мкм, их изготавливали путем отливки из ПДМСа (полидиметилсилоксан), используя в качестве шаблона ямки травления в кремнии. Однако большие размеры отверстий ограничивают область применения изучением больших клеток типа ооцитов лягушки.

В работе Ionescu-Zanetti с соавт. (2004) изготовили из ПДМС систему для множественного пэтч-клампа, в которой клетки присасываются через поры в вертикальных (боковых) стенках микрожидкостного канала. Система позволяет

снимать сигналы одновременно от 14 клеток. Пэтч-кламп электроды не являются планарными, клетки находятся в жидкостном канале, поэтому система плохо подходит для культивирования нейронов и изучения нейронных сетей.

В работе Li с соавт. (2006) изготовили линейный массив из 8 пэтч-кламп электродов из ПДМС, в котором реализован гигаомный контакт с нейронами. Однако для изучения нейронных сетей необходимо больше электродов, расположенных с более высокой плотностью.

В работе Aryasomayajula с соавт. (2011) для получения микроотверстий для системы планарного пэтч-клампа использовали стандартную ПЭТФ-мембрану для фильтрации растворов с отверстиями диаметром 3 мкм. Основа конструкции содержала 4 жидкостных канала и изготовлена из ПДМС. Конструкция позволяла одновременно регистрировать сигнал только от 4 клеток.

Группа ученых из Канады использовала для получения массового планарного пэтч-клампа полиимидную мембрану с микропорами (4 мкм) на основе из ПДМС. В такой системе одновременно культивировали 12 нейронов моллюска, 6 из которых имели контакт с порами (Martinez *et al.*, 2010; Martina *et al.*, 2011). Развитием этой работы стала система с мембраной из нитрида и оксида кремния с отверстиями диаметром 2–3 мкм. Нейроны культивировали непосредственно на поверхности кремниевого чипа (Pu *et al.*, 2010). Такие чипы приходится тестировать на работоспособность, так как половина из них оказываются неработоспособными (Pu *et al.*, 2014).

Одним из развитий пэтч-кламп метода является многоканальный (популяционный) пэтч-кламп, позволяющий проводить измерения трансмембранных токов интегрально в популяции клеток. Дно культуральной ячейки содержит массив отверстия для удерживания клеток и измерения трансмембранных токов по аналогии с пэтч-кламп измерениями, но измерительный электрод – один, общий для всех клеток. Популяционный пэтч-кламп не подходит для изучения нейросетей, так как используется один электрод для множества клеток, но он полезен для тестирования фармакологически перспективных соединений, потому что позволяет регистрировать влияние веществ на

ионные каналы клеток (Kiss *et al.*, 2003; Guthrie *et al.*, 2006; Dale *et al.*, 2007; John *et al.*, 2007). Коммерческие системы для скрининга веществ предлагаются компаниями Molecular Devices Inc. (<http://www.moleculardevices.com>) и Nanion Technologies (<http://www.nanion.de>).

Разработка нейроинтерфейса, содержащего 60 планарных пэтч-кламп электродов

В данной работе мы предлагаем оригинальную конструкцию матрицы прямоугольной конфигурации, состоящей из 60 электродных ячеек (сайтов), каждая из которых является своеобразной электродной «пипеткой», позволяющей реализовать локальный контакт к мембране клетки. На рис. 1 приведено поперечное сечение индивидуальной ячейки матрицы с клеткой нейрона в режиме пэтч-кламп эксперимента.

Матрица выполнена на стеклянной подложке толщиной 0,7 мм в форм-факторе, полностью совместимом с популярной матрицей MEA64 и измерительным оборудованием компании «Multichannel Systems» (Германия), которое широко используется во многих лабораториях мира для электрофизиологических исследований клеточных ансамблей, в том числе и нейронов.

Микроотверстия имеют размер 2 мкм, что много меньше размера клетки и позволяет проводить измерения в режиме пэтч-кламп. Проблема формирования массива микроотверстий, которые контактируют с клетками, была решена с использованием метода штамповой литографии.

Надежный контакт с клетками обеспечивается за счет того, что микроотверстия переходят в жидкостные каналы, проходящие сквозь всю систему, что позволяет, присасывать клетки к отверстиям при отрицательном давлении.

Внутри каждого канала расположен золотой электрод с выводом на индивидуальную контактную площадку. Каналы электрически изолированы друг от друга, что дает возможность одновременно измерять электрические сигналы от 60 клеток независимо друг от друга.

Достоинством является то, что клетки не имеют непосредственного контакта с металлом электродов, а контактируют с проводящей жид-

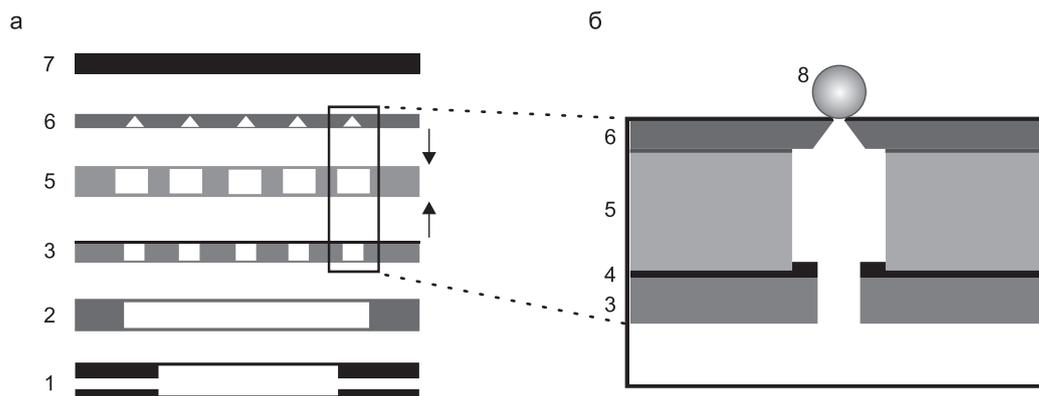


Рис. 1. Схема предлагаемой мультиэлектродной системы.

а – схема системы; б – увеличенный фрагмент пленочной структуры системы после сборки. Обозначение слоев (снизу вверх): 1 – нижнее жесткое оргстекло с отверстием для присасывания клеток; 2 – печатная плата с внешними контактами; 3 – полимерная пленка с отверстиями диаметром 30 мкм и напыленными золотыми электродами; 4 – напыленные золотые контакты; 5 – слой из ПДМС с микроканалами диаметром 50 мкм; 6 – полипропиленовая мембрана с коническими отверстиями (верхняя часть отверстия менее 2 мкм); 7 – верхнее жесткое оргстекло; 8 – клетка.

Fig. 1. Scheme of proposed MEA device.

а – set of constituting layers; б – enlarged view of electrode site after assembling. Layer notations (bottom-up): 1 – rigid polymer substrate with fluid cavity and pumping channels; 2 – printed wire board with contact outlines; 3 – perforated flexible polymer foil (hole diameter is about 30 μm); 4 – Au-electrodes and outline wires deposited on top of the layer (3); 5 – PDMS layer with microchannels of 50 μm in diameter; 6 – perforated polypropylene membrane with conical shape holes (opening size of holes on top surface is less than 2 μm); 7 – rigid polymer lid; 8 – attached cell.

костью в микроканале (ионным проводником), что повышает выживаемость клеток в процессе измерений.

На рис. 1 приведена схема разработанной матрицы. Система состоит из слоев: 1 и 2 – стеклянное основание со сквозным отверстием, обеспечивающее необходимую жесткость и возможность создания отрицательного давления для присоса клеток; 3 – полимерная пленка с напыленными золотыми электродами и дорожками-выводами (4) на периферию матрицы к контактным площадкам для подключения измерительных приборов. Electrodes имеют площадки внутри каналов, что обеспечивает электрический контакт с жидкостью (остальная часть изолирована слоем (5)). В центральной части площадок в пленке с помощью лазера изготовлены сквозные отверстия, таким образом сформированы каналы сквозь все слои; 5 – слой из ПДМС (сформированный методом отливки), содержащий массив каналов диаметром 50 мкм; 6 – полипропиленовая мембрана с микроотверстиями, совмещенными с отверстиями полимерной пленки с электродами, на стороне пленки, контактирующей с клетками, диаметр отверстий составляет 2 мкм. Задача

этой пленки – уменьшить размер (от 50 до 2 мкм) жидкостных каналов, к которым присасываются клетки. Полипропиленовая мембрана толщиной 15 мкм с микроотверстиями изготавливалась методом термического штампования с использованием штампа из массива кремниевых пирамид. В результате формировалась пленка со сквозными отверстиями от кремниевых пирамид, на выходе размер отверстий составлял менее 2 мкм.

Все слои необходимо было совместить между собой, чтобы совпали отверстия и сформировались сквозные каналы, и обеспечить надежное герметичное соединение. Проблема соединения слоев решалась с использованием технологии низкотемпературного химического бондинга.

Клетки контактируют непосредственно с микроотверстиями, соединенными с жидкостным каналом, а металлические электроды находятся на противоположном конце жидкостного канала. На рис. 2 показан общий вид системы и поле рабочих электродов. Клетки наносятся на чип, плотно присасываются к отверстиям с помощью насоса, после чего регистрируются ионные токи и потенциалы клеток. Был разработан

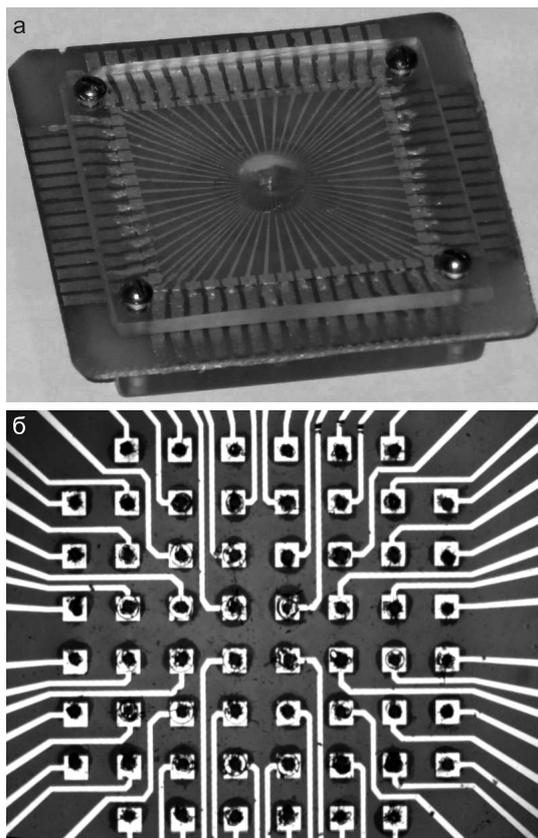


Рис. 2. Разработанная мультиэлектродная система для исследования нейронов на основе 60 жидкостных пэтч-кламп электродов.

а – общий вид; б – увеличенное изображение золотых микроэлектродов в центральной камере системы, каждый микроэлектрод имеет сквозное отверстие в центре квадратной площадки. Расстояние между площадками электродов 200 мкм.

Fig. 2. Fabricated MEA system for neuronal recording based on array of sixty planar ‘patch-clamp’ electrodes.

а – general view of assembled device; б – top view of arrayed Au-microelectrodes in working space of the device, each electrode has a through-hole in the middle of the square shaped contact area. Spacing between the recording sites is about 200 μm .

коммутатор на основе многоканального мультиплексора, позволяющий считывать сигналы путем опроса всех контактов поочередно.

С помощью разработанной и изготовленной матрицы проведены измерения на монослойной культуре нейронов, показавшие работоспособность системы. Система позволяет стимулировать нейроны и регистрировать ответную реакцию клеток в виде ионных токов или потенциалов действия. Часть клеток нервной сети

будут покрывать электродные сайты матрицы, которые можно использовать в режиме пэтч-кламп электродов. На рис. 3 показаны фрагмент матрицы с нейронами моллюска *Lymnaea stagnalis* и пример регистрации токов после стимулирующего воздействия. 9 электродных сайтов представляют собой металлизированную область (90 мкм) с отверстием внутри и отходящей металлической дорожкой. Клетки нейронов имеют сферическую форму (диаметр 40–60 мкм).

Предложенная конструкция матрицы сочетает возможности как исследования пространственно-временной динамики потенциалов в сетях нейронов на площади $\sim 2 \text{ мм}^2$, так и регистрации потенциала и стимуляции локального участка мембраны индивидуальной клетки сети во временном масштабе, необходимом для разрешения тонкой структуры спайков.

Разработка массива вертикальных трубчатых микроэлектродов

Одной из назревших задач является формирование интерфейсов от нервной системы к компьютеру. В течение многих лет в ведущих лабораториях мира ведутся работы в этом направлении, однако задача является чрезвычайно сложной.

В настоящее время для получения электрического сигнала используются контактные площадки, металлические иглы и стеклянные капилляры. Каждый вариант имеет свои достоинства и недостатки. В качестве альтернативы вышеперечисленным инструментам мы предлагаем использовать микротрубки, свернутые из полупроводниковых GaAs/InGaAs пленок. Этот метод формирования микро- и нанотрубок путем сворачивания напряженных полупроводниковых пленок разработан в ИФП СО РАН (Prinz *et al.*, 2000; Принц и др., 2008; Принц, 2013). Стенки трубки формирует изолирующая GaAs/InGaAs пленка, внутри трубки находится жидкость, таким образом, обеспечивается ионная проводимость канала трубки. Данные полупроводниковые нанотрубки (Prinz *et al.*, 1998, 2000; Принц и др., 2003), свернутые из сверхтонких пленок, показали свою эффективность и малоинвазивность при работе с клетками (Prinz A.V., Prinz V.Ya., 2003; Prinz *et al.*, 2003). Особенностью таких трубок являются

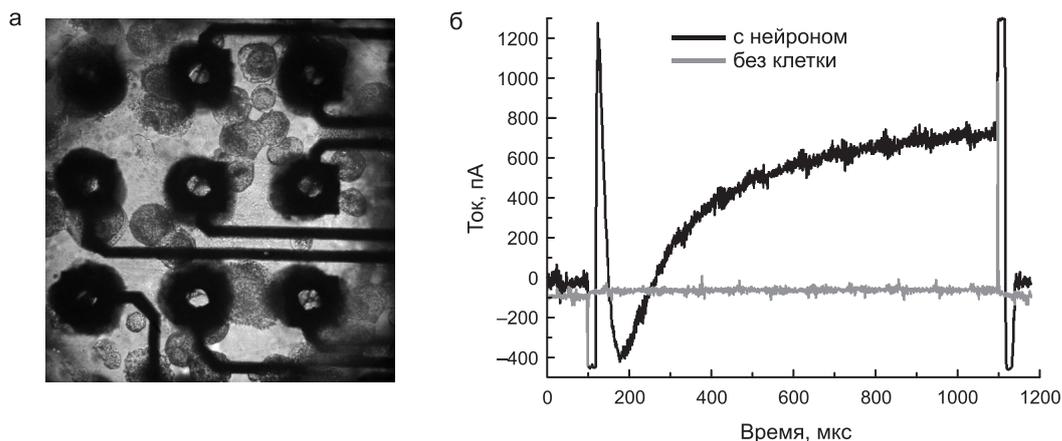


Рис. 3. Пример регистрации трансмембранных токов, полученных от матричного электрода после приложения к системе, стимулирующей разность потенциалов.

а – увеличенное изображение участка матрицы электродов с нейронами *Lymnaea stagnalis*; б – черная кривая на графике – сигнал, полученный от электрода, на котором находился нейрон; серая кривая – от электрода без клетки.

Fig. 3. Examples of recorded ion current transient response on external stimulus.

а – top view of selected MEA area populated with *Lymnaea stagnalis* neurons; б – black curve – signal from the electrode site occupied by neuron, gray curve – signal from an empty site.

высокая воспроизводимость геометрических параметров и механическая прочность; возможность массового изготовления с использованием развитых полупроводниковых технологий. Диаметр формируемых трубок определяется толщиной сворачиваемой гетеропленки и величиной упругих напряжений в ней. Достижимы диаметры от единиц нанометров до сотен микрометров. Для работы с клетками необходимы микротрубки субклеточного диаметра от 0,1 мкм до 2 мкм.

Высокая прочность микротрубок, свернутых их пленок Si/SiGe, была показана с использованием микроманипуляций под сканирующим электронным микроскопом (Zhang *et al.*, 2008). Расчеты также показывают, что прочность микро- и нанотрубок на несколько порядков превышает необходимую для прокалывания клеток (Копылов, Принц, 2010).

Благодаря совместимости с полупроводниковыми технологиями достигается массовость изготовления; за счет малой толщины стенок трубок (несколько нм) клетка гораздо меньше повреждается механически.

На рис. 4 в тестовом эксперименте демонстрируется возможность использования единичной InGaAs/GaAs микротрубки в качестве внутриклеточного электрода.

Для изучения нейросетей и групп клеток необходимы двумерные массивы вертикальных микротрубок-электродов. Ранее в патенте Принц с соавт. (2008) предложили способ подъема свернутых трубок относительно подложки (рис. 5). Этот способ развили с целью формирования двумерных массивов вертикальных трубок. Суть способа заключается в том, что помимо области бипленки, предназначенной для сворачивания в трубку (прямоугольная область на подложке на рис. 5, а), формируют дополнительную область (треугольную область, примыкающую к прямоугольной), изгиб которой приводит к поднятию трубок над подложкой. При удалении жертвенного слоя сначала из прямоугольной напряженной бипленки на подложке сворачиваются трубки, которые затем поднимаются за счет изгиба дополнительной треугольной области бипленки (петли) у одного из концов трубки (рис. 5, а). Показанная на рис. 5, а конструкция неустойчива, более того, ее создание требует точного расчета; часто трубки не только поднимаются, но и переворачиваются (см. рис. 5, б). Для формирования более прочной конструкции из полимера Su 8 с помощью дополнительной литографии нами изготовлен стопорный элемент (стенка). Наличие этого элемента (см. рис. 5, в) позволяет не только

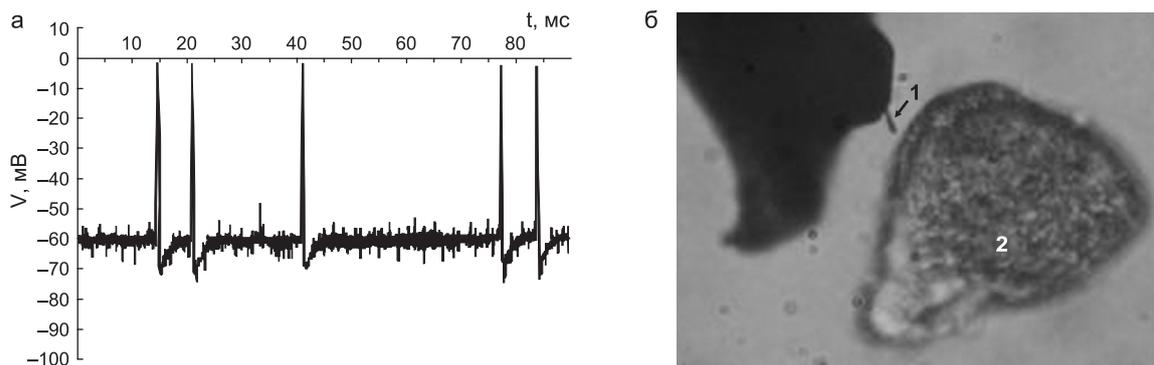


Рис. 4. Пример спонтанной активности нейронов, зарегистрированной с помощью внутриклеточной InGaAs/GaAs микротрубки (а). Оптическая фотография зонда (б) с микротрубкой (1), около клетки (2).

Fig. 4. Example of spontaneous activity of neuron (namely, membrane potential spikes) recorded with an intracellular InGaAs/GaAs microtube probe (a). Optical image (b) of microtube probe (1) nearby the target cell (2).

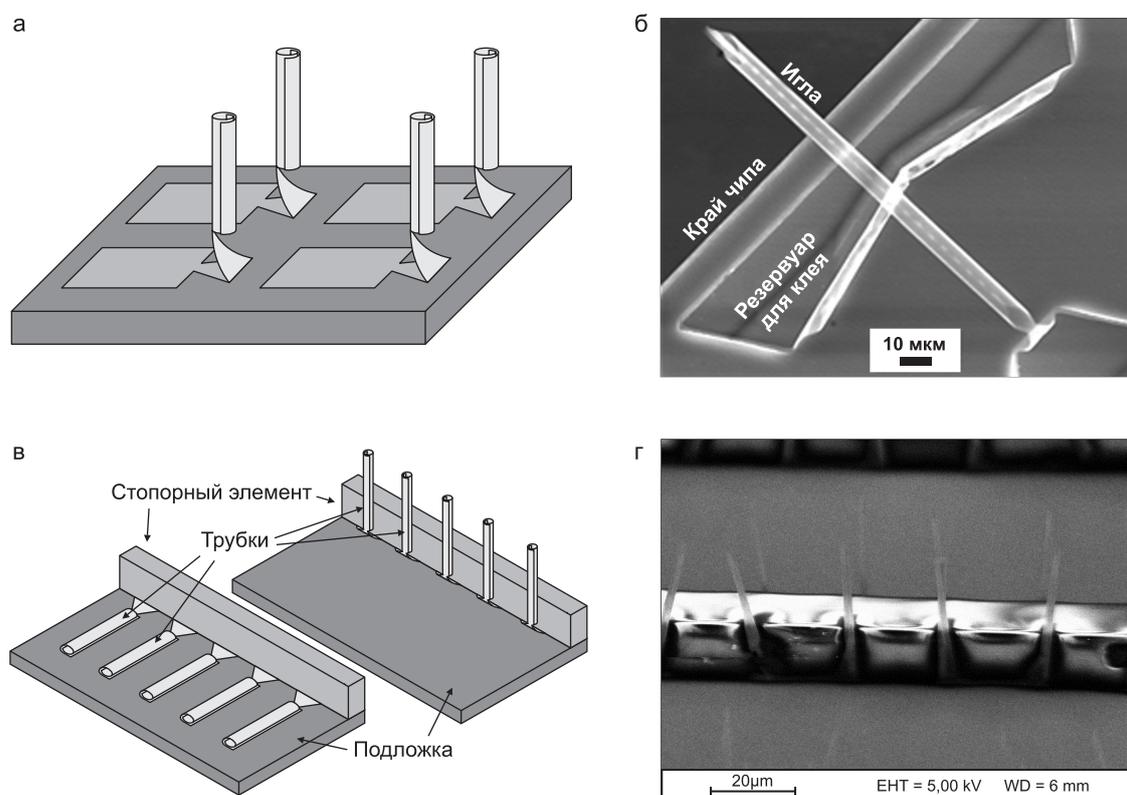


Рис. 5. Вертикальные микротрубки.

а – схематичное изображение трубок, поднятых в вертикальное положение; б – изображение трубки, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), у которой изгибающий момент дополнительного элемента оказался больше рассчитанного, что привело к перевороту трубки за край подложки (Принц и др., 2008); в – схематичная иллюстрация формирования массива вертикальных трубок с фиксацией в вертикальном положении; г – СЭМ изображение массива вертикальных трубок, свернутых из InGaAs/GaAs бипленки (Принц, 2013).

Fig. 5. Vertically standing microtubes.

а – schematic view of tubes put in a vertical position; б – scanning electron microscopy (SEM) image showing an example of tube overturned in opposite horizontal position, in this case the bending moment of auxiliary element was over the expected one (Prinz *et al.*, 2008); в – schematic diagram showing the implemented approach to fix microtubes in vertical position; г – SEM image of arrayed vertically standing microtubes made by rolling up of InGaAs/GaAs bilayer film (Prinz, 2013).

остановить процесс подъема трубки, но и зафиксировать ее в вертикальном направлении.

На рис. 5, г приведено СЭМ изображение массива вертикальных микротрубок. К сожалению, под пучком электронов в электронном микроскопе происходит интенсивная зарядка высокоомного резиста Su-8 и непроводящих трубок, что приводит к появлению электростатических сил, которые изгибают и даже ломают трубки при длительном воздействии электронного пучка. Этот эффект значительно затрудняет получение контрастных электронно-микроскопических снимков. Плотность массива вертикальных трубок при использованных нами литографических размерах достигает 70–80 тыс. трубок на см². В реализованном нами технологическом маршруте длина трубок составляет 40 мкм.

В отличие от разработки интерфейса, который описан в предыдущем разделе, разработка плотного массива вертикальных трубок является только составляющей, хотя и важнейшей на пути создания нейроинтерфейсов нового поколения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ современного состояния проблемы формирования нейроинтерфейсов. Разработан, изготовлен и испытан нейроинтерфейс, содержащий 60 жидкостных пэтч-кламп электродов. Разработан массив вертикальных трубок с плотностью 70 тыс. трубок на см², предназначенных для формирования нейроинтерфейсов нового поколения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана Интеграционным проектом СО РАН № 136.

ЛИТЕРАТУРА

Копылов А.В., Принц В.Я. Графен-полупроводниковые трубчатые иглы для работы с живыми клетками // Вестн. НГУ. Сер. Физика. 2010. Т. 5. № 1. С. 91–96.
 Kopylov A.V., Prinz V.Ya. Graphene-semiconductor tubular needles for operation on living cells // Vestnik NGU. Seriya: fizika. 2010. V. 5. No. 1. P. 91–96 (In Russian).
 Принц А.В. Метод формирования массива длинных вертикальных полупроводниковых микротрубок // Нано- и микросистемная техника. 2013. № 10. С. 5–7.

Prinz A.V. Method for fabrication of array of extended semiconductor microtubes // Nano- i mikrosistemnaya tekhnika. 2013. No. 10. P. 5–7 (In Russian).
 Принц В.Я., Голод С.В., Принц А.В. Полая игла в интегральном исполнении и ее изготовление: Патент России № 2341299. 2008.
 Prinz V.Ya., Golod S.V., Prinz A.V. Integrated hollow needle and method for its fabrication // Patent Rossii. 2008. No. 2341299 (In Russian).
 Принц В.Я., Селезнев В.А., Чеховский А.В. Самоформирующиеся полупроводниковые микро- и нанотрубки // Микросистемная техника. 2003. № 6. С. 29–34.
 Prinz V.Ya., Seleznev V.A., Chekhovski A.V. Self-forming of semiconductor micro- and nanotubes // Mikrosistemnaya tekhnika. 2003. No. 6. P. 29–34 (In Russian).
 Aregueta-Robles U.A., Woolley A.J., Poole-Warren L.A. *et al.* Organic electrode coatings for next-generation neural interfaces // Front. Neuroeng. 2014. V. 7. article 15 (18P), DOI: 10.3389/fneng.2014.00015.
 Aryasomayajula A., Perike S., Hensel R., Posseckardt J., Gerlach G., Funk H.W. A novel patch micro electrode array for sensing ionic membrane currents // Proc. Eurosensors XXV. September 4–7, 2011. Athens, Greece.
 Baranauskas G., Maggiolini E., Castagnola E. *et al.* Carbon nanotube composite coating of neural microelectrodes preferentially improves the multiunit signal-to-noise ratio // J. Neural Eng. 2011. V. 8. 066013.
 Bareket-Keren L., Hahein Y. Carbon nanotube-based multi electrode arrays for neuronal interfacing: progress and prospects // Front. Neural Circuits. 2013. V. 6. article 122 (16P), DOI: 10.3389/fncir.2012.00122.
 Bruggemann A., George M., Klau M., Beckler M., Steindl J., Behrends J.C., Fertig N. High quality ion channel analysis on a chip with the NPC technology // Assay Drug Dev. Technol. 2003. V. 1. No. 5. P. 665–673.
 Brunetti V., Maiorano G., Rizello L. *et al.* Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. No. 14. P. 6264–6269.
 Buzsaki G. Large-scale recording of neuronal ensembles // Nat. Neurosci. 2004. V. 7. P. 446–451.
 Buzsaki G., Anastassiou C.A., Koch C. The origin of extracellular fields and currents – EEG, ECoG, LFP and spikes // Nat. Rev. Neurosci. 2012. V. 13. P. 407–420.
 Campbell P.K., Jones K.E., Huber R.J. *et al.* A silicon-based, three-dimensional neural interface: manufacturing processes for an intracortical electrode array // IEEE Trans. Biomed. Eng. 1991. V. 38. P. 758–768.
 Carandini M. From circuits to behavior: a bridge too far? // Nat. Neurosci. 2012. V. 15. No. 4. P. 507–509.
 Chandrakasan A.P., Verma N., Daly D.C. Ultralow-power electronics for biomedical applications // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2008. V. 10. P. 247–274.
 Chang C.-W., Chiou J.-C. Development of a three dimensional neural sensing device by a stacking method // Sensors. 2010. V. 10. P. 4238–4252.
 Cogan S.F. Neural stimulation and recording electrodes // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2008. V. 10. P. 275–309.
 Cullen D.K., Wolf J.A., Vernekar V.N. *et al.* Neural tissue engineering and biohybridized microsystems for neurobiological investigation *in vitro* (Part 1) // Crit. Rev. Biomed. Eng. 2011. V. 39. P. 201–240.

- Dale T.J., Townsend C., Hollands E.C., Trezise D.J. Population patch clamp electrophysiology: a breakthrough technology for ion channel screening // *Mol. Biosyst.* 2007. V. 3. P. 714–722.
- Du J.G., Blanche T.J., Harrison R.R. *et al.* Multiplexed, high density electrophysiology with nanofabricated neural probes // *PLoS ONE.* 2011. V. 6. No. 10. e26204.
- Du J.G., Roukes M.L., Masmanidis S.C. Dual-side and three-dimensional microelectrode arrays fabricated from ultra-thin silicon substrates // *J. Micromech. Microeng.* 2009. V. 19. 075008.
- Fertig N., Blick R.H., Behrends J.C. Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 3056–3062.
- Fertig N., Tilke A., Blick R.H., Kotthaus J.P., Behrend J.C., ten Bruggencate G. Stable integration of isolated cell membrane patches in a nanomachined aperture // *Appl. Phys. Lett.* 2000. V. 77. P. 1218–1220.
- Grill W.M., Norman S.E., Bellamkonda R.V. Implanted neural interfaces: biochallenges and engineered solutions // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2009. V. 11. P. 1–24.
- Guthrie H., Livingston F.S., Gubler U., Garippa R. A place for high-throughput electrophysiology in cardiac safety: screening hERG cell lines and novel compounds with the IonWorks HT system // *J. Biomol. Screen.* 2006. V. 10. No. 8. P. 832–840.
- Henze D.A., Borhegyi Z., Csicsvari J. *et al.* Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus *in vivo* // *J. Neurophysiol.* 2000. V. 84. P. 390–400.
- Herwik S., Kisban S., Aarts A.A.A. *et al.* Fabrication technology for silicon-based microprobe arrays used in acute and sub-chronic neural recording // *J. Micromech. Microeng.* 2009. V. 19. 074008.
- Hubel D.H. Tungsten microelectrode for recording from single units // *Science.* 1957. V. 125. P. 549–550.
- John V.H., Dale T.J., Hollands E.C., Chen M.X., Partington L., Downie D.L., Meadows H.J., Trezise D.J. Novel 384-well population patch clamp electrophysiology assays for Ca²⁺-activated K⁺ channels // *J. Biomol. Screen.* 2007. V. 12. P. 50. DOI: 10.1177/1087057106294920.
- Kiss L., Bennett P.B., Uebele V.N., Koblan K.S., Kane S.A., Neagle B., Schroeder K. High throughput ion-channel pharmacology: planar-array-based voltage clamp // *Assay Drug Dev. Technol.* 2003. V. 1. P. 127–135.
- Klemic K.G., Klemic J.F., Reed M.A., Sigworth F. Micro-molded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells // *Biosens. Bioelectron.* 2002. V. 17. P. 597–604.
- Lai H.-Y., Liao L.-D., Lin C.-T. *et al.* Design, simulation and experimental validation of a novel flexible neural probe for deep brain stimulation and multichannel recording // *J. Neural Eng.* 2012. V. 9. 036001 (15 p.).
- Lebedev M.A., Nicolelis A.L. Brain-machine interfaces: Past, present and future // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. No. 9. P. 536–546.
- Lee C.K., Huguenard J.R. Martinotti cells: community organizers // *Neuron.* 2011. V. 69. No. 6. P. 1042–1045.
- Lehnert T., Gijs M.A.M., Netzer R., Bischoff U. Realization of hollow SiO₂ micronozzle for electrical measurements on living cells // *Appl. Phys. Lett.* 2002. V. 81. P. 5063–5065.
- Levy R.B., Reyes A.D. Spatial profile of excitatory and inhibitory synaptic connectivity in mouse primary auditory cortex // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. No. 16. P. 5609–5619.
- Li X., Klemic K.G., Reed M.A., Sigworth F.J. Microfluidic system for planar patch clamp electrode arrays // *Nano Lett.* 2006. V. 6. No. 4. P. 815–819.
- Ludwig K.A., Langhals N.B., Joseph M.D. *et al.* Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) polymer coatings facilitate smaller neural recording electrodes // *J. Neural Eng.* 2011. V. 8. 014001.
- Maccione A., Gandolfo M., Tedesco M. *et al.* Experimental investigation on spontaneously active hippocampal cultures recorded by means of high-density MEAs: analysis of the spatial resolution effects // *Front. Neuroeng.* 2010. V. 3. article 4, P. 1–12, DOI: 10.3389/fneng.2010.00004.
- Martina M., Luk C., Py C., Martinez D., Comas T., Monette R., Denhoff M., Syed N., Mealing G.A. Recordings of cultured neurons and synaptic activity using patch-clamp chips // *J. Neural Eng.* 2011. V. 8. 034002, (10 p).
- Martinez D., Py C., Denhoff M.W., Martinac M., Monette R., Comas T., Luk C., Syed N., Mealing G. High-fidelity patch-clamp recordings from neurons cultured on a polymer microchip // *Biomed. Microdevices.* 2010. 12:977-985 DOI 10.1007/s10544-010-9452-z.
- McCarthy P.T., Rao M.P., Otto K.J. Simultaneous recording of rat auditory cortex and thalamus via a titanium-based, microfabricated, microelectrode device // *J. Neural. Eng.* 2011. V. 8. 046007.
- Najafi K., Wise K.D., Mochizuki T. A high-yield IC-compatible multichannel recording array // *IEEE Trans. Electron. Devices.* 1985. V. 32. P. 1206–1211.
- Napoli A., Xie J., Obeid I. Understanding the temporal evolution of neuronal connectivity in cultured networks using statistical analysis // *BMC Neuroscience.* 2014. V. 15. No. 1. P. 17–27.
- Nicolelis M.A.L., Dimitrov D., Carmena J.M. *et al.* Chronic, multisite, multielectrode recordings in macaque monkeys // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 11041–11046.
- Oberlaender M., Boudewijns Z., Kleelec T. *et al.* Three-dimensional axon morphologies of individual layer 5 neuron indicate cell type-specific intracortical pathways for whisker motion and touch // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. No. 10. P. 4188–4193.
- Pantoja R., Nagaraj J.M., Starace D.M., Melosh N.A., Blunck R., Bezanilla F., Heath J.R. Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 20. P. 509–517.
- Prinz A.V., Prinz V.Ya. Application of semiconductor micro- and nanotubes in biology // *Surface Science.* 2003. V. 532–535. P. 911–915.
- Prinz A.V., Prinz V.Ya., Seleznev V.A. Semiconductor micro- and nanoneedles for microinjections and ink-jet printing // *Microelectronic Engineering.* 2003. V. 67/68. P. 782–788.
- Prinz V.Ya., Seleznev V.A., Gutakovskiy A.K. Self-formed InGaAs/GaAs Nanotubes: Concept, Fabrication, Properties // *Proc. of the 24th Intern. Conf. on the Physics of Semiconductors* / Ed. D. Gershoni. World Scientific, Singapore, 1998.
- Prinz V.Ya., Seleznev V.A., Gutakovskiy A.K., Chehov-

- skiy A.V., Preobrazenskii V.V., Putyato M.A., Gavrilova T.A. Free-standing and overgrown InGaAs/GaAs nanotubes, nanohelices and their arrays // *Physica E*. 2000. V. 6. No. 1/4. P. 828–831.
- Py C., Denhoff M.W., Martinac M., Monette R., Comas T., Ahuja T., Martinez D., Wingar S., Caballero J., Laframboise S., Mielkec J., Bogdanov A., Luk C., Syed N., Mealing G. A novel silicon patch-clamp chip permits high-fidelity recording of ion channel activity from functionally defined neurons // *Biotechnology and Bioengineering*. 2010. V. 107. No. 4. P. 593–600.
- Py C., Denhoff M.W., Sabourin N., Weber J., Shiu M., Zhao P. Priming and testing silicon patch-clamp neurochips // *New Biotechnol.* 2014. V. 31. No. 5. P. 430–435. doi: 10.1016/j.nbt.2014.04.003.
- Rutten W.L.C. Selective electrical interfaces with the nervous system // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002. V. 4. P. 407–452.
- Ruz I.D., Schulz S.R. Localizing and classifying neurons from high density MEA recordings // *J. Neurosci. Methods*. 2014. V. 233. P. 115–128.
- Sarpeshkar R., Watanapanitch W., Arfin S.K. *et al.* Low-power circuits for brain-machine interfaces // *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* 2008. V. 2. No. 3. P. 173–183.
- Schwartz A.B. Cortical neural prostheses // *Annu. Rev. Neurosci.* 2004. V. 27. P. 487–507.
- Schwartz A.B., Weber D.J., Cui X.T. *et al.* Brain-controlled interfaces: Movement restoration with neural prosthetics // *Neuron*. 2006. V. 52. P. 205–220.
- Seo J., Ionescu-Zanetti C., Diamond J., Lal R., Lee L.P. Integrated multiple patch-clamp array chip via lateral cell trapping junctions // *Applied Physics Letters*. 1973. (2004) V. 84. P. 1973. doi: 10.1063/1.1650035.
- Shoham S., O'Connor D.H., Segev R. How silent is the brain: is there a «dark matter» problem in neuroscience? // *J. Comp. Physiol. A*. 2006. V. 192. P. 777–784.
- Sodagar A.M., Wise K.D., Najafi K. A wireless implantable microsystem for multichannel neural recording // *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.* 2009. V. 57. No. 10. P. 2565–2573.
- Spitzer N.C. Electrical activity in early neuronal development // *Nature*. 2006. V. 444. No. 7120. P. 1207–1214.
- Urbanova V., Li Y., Vytras K. *et al.* Macroporous microelectrode arrays for measurements with reduced noise // *J. Electroanal. Chem.* 2011. V. 656. P. 91–95.
- Wattanapanitch W., Fee M.S., Sarpeshkar R. An energy-efficient micropower neural recording amplifier // *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* 2007. V. 1. No. 2. P. 136–147.
- Weiland J.D., Humayun M.S. Visual prosthesis // *Proc. IEEE*. 2008. V. 96. No. 7. P. 1076–1084.
- Wise K.D., Sodagar A.M., Yao Y. *et al.* Microelectrodes, microelectronics and implantable neural microsystems // *Proc. IEEE*. 2008. V. 96. No. 7. P. 1184–1202.
- Xu J., Guia A., Rothwarf D., Huang M., Sithiphong K., Ouang J., Tao G., Wang X., Wu L. A benchmark study with sealchip planar patch-clamp technology // *Assay Drug Dev. Technol.* 2003. V. 1. No. 5. P. 675–684.
- Zemianek J.M., Serra M., Guaraldi M. *et al.* Stimulation with a low-amplitude, digitized synaptic signal to invoke robust activity within neuronal network on multielectrode arrays // *Biotechniques*. 2012. V. 52. No. 3. P. 177–182.
- Zeng F.-G., Rebscher S., Harrison W. *et al.* Cochlear implants: System design, integration, and evolution // *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 2008. V. 1. P. 115–142.
- Zhang L., Dong L., Nelson B.J. Bending and buckling of rolled-up SiGe/Si microtubes using nanorobotic manipulation // *Appl. Phys. Lett.* 2008. V. 92. 243102.

NEUROINTERFACES: REVIEW AND DEVELOPMENT

**S.N. Rechkunov¹, A.V. Prinz¹, V.A. Seleznev¹, S.V. Golod¹,
R.A. Soots¹, A.I. Ivanov¹, A.S. Ratushnyak², V.Ya. Prinz¹**

¹ Rzhanov Institute of Semiconductor Physics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: prinz@isp.nsc.ru;

² Design Technological Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Electrical activity seems to be the key issue for disclosing information processing mechanisms in neuronal networks; however, the related phenomena such as long-term memory, learning behavior and synaptic plasticity have not been adequately understood yet on cellular level. A great challenge in the fundamental research and practical implementation of those phenomena is to build up multi-electrode array (MEA) devices for simultaneous neuronal recordings and stimulation. We outline the state-of-the-art MEA designs, development trends, and benefits and shortcomings of the MEA concept. As a rule, the general task in neuro-interface designing is to achieve biocompatible, low-invasive interface performance and the spatio-temporal resolution. In this paper, we propose and describe two innovative neuro-interface designs. One of these designs is introduced as a conceptual device based on a dense array of vertically standing semiconductor microtubes which can be implemented in future in vivo interfaces. Another design is a pilot in vitro MEA device formed by 60 planar 'patch-clamp' electrode sites.

Here, we report results of neuron-signal measurements performed with the help of patch-clamp sucker electrodes, each of the electrodes presenting a kind of a 2- μm diameter pipette that can be used for making contacts to cell membranes. An advantageous feature of the method consists in that the treated cells have no immediate contact with the metal as they contact with the microchannel conducting liquid, or ionic conductor; the latter approach ensures more adequate measurements and, simultaneously, it improves the cell survivability during measurements.

Key words: patch clamp electrodes, neurointerface, brain-computer interface, semiconductor nanotube array.