# SVEUČILIŠTE U SPLITU FAKULTET ELEKTROTEHNIKE, STROJARSTVA I BRODOGRADNJE

# POSLIJEDIPLOMSKI DOKTORSKI STUDIJ STROJARSTVA

KVALIFIKACIJSKI RAD

# NANOMATERIJALI I SUPSTRATI PRILAGOĐENE MIKROTOPOGRAFIJE

**Boris Delipetar** 

Split, lipanj 2024.

## SADRŽAJ

1.	UV	OD	1
2.	NA	NOMATERIJALI I SUPSTRATI PRILAGOĐENE MIKROTOPOGRAFIJE	2
	2.1.	Grafen: uvod	2
	2.1.1.	Struktura i elektrokemijska svojstva grafena	3
	2.1.2.	Mehanička svojstva grafena	7
	2.1.3.	Proizvodnja grafena	.11
	2.1.4.	Detekcija i karakterizacija grafena	. 17
	2.1.5.	Primjena u biomedicini	. 20
	2.2.	Nanomaterijali kao supstrati za stanični uzgoj i elektrofiziologiju	. 21
3.	NE	UROFIZIOLOŠKI TEMELJI AUDITORNOG SUSTAVA	. 26
	3.1.	Auditorni sustav	. 26
	3.2.	Prijenos signala u živčanom sustavu	. 30
	3.3.	Osnove slušne protetike	. 38
	3.3.1.	Oštećenja auditornog sustava	. 38
	3.3.2.	Slušni aparat	. 39
	3.3.3.	Umjetna pužnica	. 40
	3.3.4.	Neuroanatomical gap	. 46
4.	OS	NOVNE METODE U ELEKTROFIZIOLOGIJI	. 48
	4.1.	Intracelularne metode snimanja: patch clamp	. 51
	4.1.1.	Voltage clamp i current clamp	. 51
	4.1.2.	Patch clamp: tehnike snimanja	. 54
	4.1.3.	Planarni patch clamp	. 55
	4.2.	Ekstracelularne metode snimanja	. 57
	4.2.1.	Vrste i procesiranje signala kod ekstracelularnih metoda snimanja	. 57
	4.2.2.	Tehničke izvedbe i ograničenja ekstracelularnih metoda snimanja	. 60

	4.3.	Kontaktno navođenje u neurofiziologiji	64
5.	Zł	AKLJUČAK I SMJERNICE ZA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA	69
LI	TEF	RATURA	70
SA	<b>\Ž</b> E'	ТАК	76

#### 1. UVOD

Trend starenja svjetske populacije i sve veća izloženost buci s jedne, te porast životnog standarda i dostupne medicinske skrbi s druge strane, jasno ukazuju na potrebu sveobuhvatnih napora s ciljem podizanja kvalitete života osobama s oštećenjima sluha. Kvaliteta sluha direktno utječe na poslovnu sposobnost, socijalne interakcije, te psihičko stanje pojedinca.

Moderna medicinska znanost nudi različite odgovore, ovisno o vrsti i stupnju oštećenja. Slušna pomagala poput slušnih aparata i umjetnih pužnica sve su dostupnija općoj populaciji, a napredak u tehnologiji posljednjih je desetljeća omogućio znatno poboljšanje performansi. U razvoju slušne protetike veliku je ulogu odigrao interdisciplinarni pristup koji kombinira spoznaje iz područja medicine s naglaskom na neurofiziologiju s jedne, te upotrebu suvremenih tehnologija, uglavnom s područja elektronike i novih nanostrukturnih materijala, s druge strane.

Kao i svako područje tehnologije, i slušna protetika nalazi se pred određenim izazovima koje treba savladati u svrhu postizanja daljnjeg napretka. Da bi se ti izazovi savladali, potrebno je razumjeti prirodu trenutnih prepreka te kroz sinergiju znanstvene zajednice, tehnoloških kompanija i uz potporu nadležnih institucija dodatno jačati interdisciplinarni pristup u traženju optimalnog rješenja.

## 2. NANOMATERIJALI I SUPSTRATI PRILAGOĐENE MIKROTOPOGRAFIJE

Prema Buzea et al. [1], nanomaterijalima se smatraju materijali kojima sastavne jedinice u barem jednoj dimenziji imaju dimenzije u intervalu od 1 do 100 nm. Standard ISO 80004-1:2023 nanomaterijale dijeli prema broju dimenzija u nanoskali:

- nanoploče (eng. *nanoplates*): jedna dimenzija u nanoskali
- nanoštapovi (eng. nanorods): dvije dimenzije u nanoskali
- nanočestice (eng. nanoparticles): tri dimenzije u nanoskali

Američki institut kemijskog inženjerstva (AIChE) razlikuje nanomaterijale prema sastavu:

- organski
  - o polimerski
  - o dendrimerski
  - o biološki
- anorganski
  - o metalni
  - o metalni oksidi
  - o metalni neoksidi
  - o ugljici
- miješani
  - o heterostrukture
  - o organsko-anorganski hibridi

#### 2.1. Grafen: uvod

Grafen (eng. *graphene*) je dvodimenzionalna alotropska modifikacija ugljika s atomima povezanim u heksagonalnu rešetku. U osnovi je riječ o jednom sloju grafita. Etimološki datira iz 1896. i pripisuje se Hannsu Peteru Boehmu spajanjem riječi "grafit" (eng. *graphite*) i sufiksa "-en" (eng. *-ene*) koji se koristi za policiklične aromatske ugljikovodike.

Jednoslojni se grafit u literaturi prvi put ozbiljnije teoretski razmatra u istraživanjima P. R. Wallacea iz 1947. godine [2] kao polazišna osnova za razumijevanje električkih svojstava grafita. U narednim su desetljećima bez većeg uspjeha ispitivane razne metode dobivanja stabilnog grafena. Jednoslojni grafen razvijan na drugim materijalima mijenjao je elektronsku strukturu pri interakciji s tim materijalima, a metodom eksfolijacije iz grafita nije se moglo postići manje od pedesetak slojeva.

Prekretnom točkom u polju nanomaterijala smatra se studija iz 2004. godine u kojoj su Novoselov i Geim [3] demonstrirali tehniku dobivanja stabilnog grafena eksfolijacijom iz grafita (eng. *scotch tape method*), za što su 2010. nagrađeni Nobelovom nagradom za fiziku. Svojstva grafena otkrivena u daljnjim su istraživanjima pobudila velik interes. Prema Web of Science, zaključno sa siječnjem 2024., grafen se kao naslov ili tema pojavljuje u gotovo 356 tisuća znanstvenih publikacija. Elektrokemijska i mehanička svojstva, biokompatibilnost, te nove metode dobivanja grafena, usmjerili su istraživanja u različitim pravcima s ciljem pronalaženja potencijalnih novih primjena.

#### 2.1.1. Struktura i elektrokemijska svojstva grafena

Grafen sačinjavaju atomi ugljika u ravnini raspoređeni u heksagonalnu rešetku ilustrativno prikazanu na slici 2.1.



Slika 2.1. Ilustracija grafenskih slojeva [4]

Atomski broj ugljika je 6, a elektronska konfiguracija orbitala glasi  $1s^2 2s^2 2p^2$ , stoga grafit u nepobuđenom stanju u zadnjoj ljusci ima četiri elektrona. Heksagonalna struktura grafena implicira povezanost svakog atoma ugljika s tri susjedna. Susjedni su atomi grafena udaljeni oko 1,42 Å (1 angstrem = 0,1 nm), a međusobna udaljenost slojeva grafita iznosi oko 0,335 nm. Slojevi grafita povezani su slabim van der Waalsovim vezama. Dva prisilno približena sloja grafena s ugljikovim atomima pozicioniranim jedan iznad drugoga međusobno tvore kovalentne veze u dvosloju (eng. *bilayer*) Takva se veza tvori na oko 0,155 nm. U tom se slučaju svaki atom ugljika veže na četiri atoma, a prethodno spomenuta udaljenost od 1,42 Å povećava se na 0,155 nm [5].

Navedena elektronska konfiguracija orbitala ugljika u nepobuđenom je stanju pri čemu su po dva elektrona u s orbitalama te po jedan elektron u dvije od tri p orbitale.

Pobuđivanjem elektrona dolazi do prelaska jednog elektrona iz 2s orbitale koja se nalazi na nižoj energetskoj razini u jednu slobodnu 2p orbitalu koja se nalazi na približno 4 eV višoj energetskoj razini. Preklapanjem tako popunjenih s i p orbitala nastaju hibridizirane sp<sup>2</sup> orbitale. Takva elektronska konfiguracija orbitala može se zapisati kao 1s<sup>2</sup> 2s<sup>1</sup> 2p<sup>3</sup>.

Promatrano s aspekta energetske razine, razlika pobuđenog i nepobuđenog stanja prikazana je na slici 2.2.



Slika 2.2. Usporedba elektronskih konfiguracija orbitala ugljika u pobuđenom i nepobuđenom stanju [6]

S obzirom na heksagonalnost strukture, svaki je ugljikov atom povezan s tri susjedna u ravnini pod kutom od 120°. Kovalentna veza između tih atoma koja nastaje preklapanjem sp<sup>2</sup> orbitala zove se  $\sigma$  veza. Takva  $\sigma$  veza ujedno je i najjača kovalentna kemijska veza i odgovorna je, između ostalog, za mehanička svojstva grafena. Svaki atom u  $\sigma$  veze daje tri elektrona, po jedan iz svake hibridizirane sp<sup>2</sup> orbitale. Preostali elektron nalazi se sam u 2p orbitali okomitoj na ravninu rešetke grafena, kao u prikazima na slici 2.3.



Slika 2.3. Vizualni prikaz orbitala grafena [7]

Elektroni 2p orbitala susjednih atoma preklapanjem tvore  $\pi$  kovalentnu vezu. Na slici 2.4. prikazane su dvije susjedne p orbitale u preklapanju (lijevo) i dvije kovalentne  $\pi$  veze formirane preklapanjem p orbitala (desno). Gustoća elektrona u ravnini simetrije je jednaka nuli.



Slika 2.4. Susjedne p orbitale u preklapanju (lijevo) i dvije kovalentne  $\pi$  veze formirane preklapanjem p orbitala (desno) [8]

Slobodni elektroni kao nositelji naboja ključni su za provođenje električne struje. Premda je grafen kao alotropska modifikacija ugljika nemetal, obzirom na provodljivost električne struje pokazuje karakteristike koje nisu svojstvene nemetalima.

Materijali se u krutom agregatnom stanju prema vodljivosti električne struje dijele na vodiče (eng. *conductors*), poluvodiče (eng. *semiconductors*) i izolatore (eng. *insulators*). Elektroni se kao nositelji naboja u metalima krutog agregatnog stanja slobodno se gibaju po kristalnim rešetkama te tako osiguravaju vodljivost električne struje. U metalima svaki atom nema konkretne pripadajuće elektrone, nego se oni kreću po cijeloj rešetci, što metalima daje povoljna vodička svojstva.

Kod nemetala i polumetala pitanje vodljivosti je složenije. Elektron može postojati u valentnom (eng. *valence band*) i vodljivom pojasu (eng. *conductive band*), ovisno o tome koliko mu se energije dovede. U valentnom pojasu, pri nižoj energiji, elektroni stvaraju veze s ostalim atomima i molekulama, npr. kovalentnu vezu. Takvi elektroni čvrsto su vezani i ne mogu se slobodno kretati te ne mogu provoditi električnu struju. Materijal je u takvom stanju izolator, a može biti i poluvodič.

Da bi se elektroni doveli u vodljivi pojas potrebno im je dovesti energiju dovoljnu da se premosti zabranjeni pojas (eng. *band gap*) između valentnog i vodljivog pojasa. Kod takvih se materijala, izolatora i poluvodiča, Fermijeva energija nalazi upravo u zabranjenom pojasu. Fermijeva energija  $E_F[eV]$  je najveća energija koju elektron u određenom materijalu može imati pri apsolutnoj nuli. Ukoliko se nalazi ispod praga za vodljivi pojas, materijal ne provodi električnu struju. Pri sobnoj temperaturi Fermijeva je energija nešto viša zbog dovedene topline. Ukoliko je razlika u energiji valentnog i vodljivog pojasa, tj. širina zabranjenog pojasa, dovoljno malena, značajnijim porastom temperature ili dovođenjem fotona moguće je prijeći u vodljivi pojas. U tom je slučaju riječ o poluvodičima. Ukoliko ni na kakav način nije moguće premostiti zabranjeni pojas, riječ je o izolatorima. Kod vodiča se pojasevi preklapaju.



Slika 2.5. Fermijeva energija i band gap za vodiče (lijevo), poluvodiče (desno) i izolatore (lijevo)

Nameće se pitanje gdje postaviti granicu između izolatora i poluvodiča. Odgovor je proizvoljan i rezultat je iskustva. Poluvodiče je moguće dovesti u vodljivi pojas dovođenjem manje energije. Kod izolatora je zabranjeni pojas toliko širok da je praktički nemoguće dovesti elektron u vodljivi pojas. Uzmimo za primjer silicij (Si), najčešći poluvodički materijal. Energija potrebna za premošćivanje zabranjenog pojasa kod silicija iznosi cca 1,17 eV pri 0 °K i 1,11 eV pri 300 °K. Orijentacije radi, energija vidljivog svjetla iznosi od 1,6 do 3,4 eV.

Kod grafena je situacija specifična. Valentni i vodljivi pojas dodiruju se u jednoj točki pa je širina zabranjenog pojasa praktički nula, a valentni i vodljivi pojas se ne preklapaju. Područja valentnog i vodljivog pojasa grafena oblika su stošca te se stoga opisuju Diracovom jednadžbom umjesto Schrodringerovom prema kojoj je veza energije  $E_k$  i momenta k kvadratna. Lijevo na slici 2.6. prikazani su valentni, zabranjeni i vodljivi pojasevi kod uobičajenih poluvodiča, a desno Diracovi stošci, tj. pojasevi kod grafena [5].



Slika 2.6. Usporedba tipičnog band gapa poluvodiča (lijevo) i Diracovih stožaca kod grafena (desno) [9]

S obzirom na navedeno grafen možemo okarakterizirati kao poluvodič s praktički nepostojećim zabranjenim pojasom. Njegova potencijalna primjena u elektronici predmet je istraživanja.

Električna vodljivost materijala  $\sigma$  [S/m] proporcionalna je mobilnosti elektrona:

$$\sigma = n e \mu_e \tag{2.1.}$$

pri čemu je:

n – mjera gustoće elektrona nositelja naboja

e - elementarni naboj elektrona [C]

 $\mu_e$  – mobilnost elektrona [m<sup>2</sup>/Vs]

Mobilnost elektrona često se izražava u cm<sup>2</sup>/Vs.

$$\sigma = ne\mu_e = \frac{1}{m^3} \times C \times \frac{m^2}{v_s} = \frac{A}{v_m} = S/m \quad (2.2.)$$

Izmjerena mobilnost elektrona iznosi 200 000 cm<sup>2</sup>/Vs za slobodni (obješeni ili izolirani) grafen pri koncentraciji  $10^{12}$ /cm<sup>2</sup> prema Novoselov et al. [10], te 20 000 cm<sup>2</sup>/Vs za grafen na SiO<sub>2</sub> supstratu prema Bolotin et al. [11]. Mobilnost elektrona grafena ne pokazuje značajniju zavisnost o temperaturi.



Slika 2.7. Mobilnost elektrona grafena [12]

#### 2.1.2. Mehanička svojstva grafena

Mehanička svojstva odnose se na ponašanje materijala pri djelovanju mehaničkih sila. Osnovni načini djelovanja mehaničkih sila s obzirom na smjer su:

- vlak
- tlak
- smik
- fleksija (savijanje)
- torzija (uvijanje)
- izvijanje

Osim po smjeru djelovanja, mehanička se opterećenja razlikuju se i po karakteristikama opterećenja:

- statičko opterećenje
  - o sila nepromjenjivog smjera i intenziteta u funkciji vremena
- dinamičko opterećenje
  - o sila promjenjiva po smjeru i/ili iznosu
  - o udarno
  - o pulsirajuće (promjenjivo po jednom smjeru)
  - o izmjenično (promjenjivo po više smjerova)

Vlačna čvrstoća

Vlačna čvrstoća (eng. *tensile strength*)  $\sigma_M$  je omjer maksimalne vlačne sile koju materijal može podnijeti i poprečnog presjeka predmeta pod djelovanjem sile te se računa po izrazu:

$$\sigma_M = \frac{F}{A} \tag{2.3.}$$

Vlačna se čvrstoća u praksi mjeri u megapaskalima (N/mm<sup>2</sup>) ili gigapaskalima (kN/mm<sup>2</sup>). Ispitivanje se vrši kidalicom na standardiziranim epruvetama. S obzirom na to da grafen zbog svoje strukture nije moguće testirati u identičnim uvjetima kao većinu ostalih materijala, dobivene rezultate treba uzeti s rezervom.

Iznosi izmjerene vlačne čvrstoće  $\sigma_M$  čistog grafena variraju. Za najrelevantniju vrijednost kod čistog grafena uzima se 130 GPa izmjerenih u studiji Honea et al. [13]. Bez obzira na razlike s obzirom na uvjete testiranja i geometriju, grafen pokazuje iznimnu vlačnu čvrstoću. Za usporedbu, čelici visoke čvrstoće imaju oko 50 puta manju  $\sigma_M$ .

Youngov modul elastičnosti

Youngov modul elastičnosti (eng. *Young's Modulus*) E je veličina koja opisuje svojstvo krutosti materijala, tj. otpora materijala promjeni oblika i dimenzija pri djelovanju vanjske mehaničke sile. Iskazuje se megapaskalima [N/mm<sup>2</sup>] ili gigapaskalima [kPa/mm<sup>2</sup>] i definiran je izrazom:

$$E \equiv rac{\mathrm{vla\check{c}\,no\,naprezanje}}{\mathrm{produljenje}} = rac{\sigma}{arepsilon} = rac{F/A_0}{\Delta L/L_0} = rac{FL_0}{A_0\Delta L},$$
 (2.4.)

pri čemu je:

 $\Delta L$  – produljenje uzorka [mm]

L<sub>0</sub> – početna duljina uzorka [mm]

 $\varepsilon$  – relativno produljenje

Hone et al. [13] navode vrijednost E= 1 000 GPa, dobivenu eksperimentalno.

#### Elastično naprezanje

Visok Youngov modul elastičnosti rezultira malim linearnim deformacijama pri djelovanju velikih sila. Njegova vrijednost intrinzično je svojstvo materijala i nije vezana uz oblik ili dimenzije ispitivanog uzorka. Ipak, i ovu veličinu treba uzeti s rezervom. Vrijednost Youngovog modula elastičnosti koristan je podatak za male promjene naprezanja te materijale kojima je karakteristika naprezanja u elastičnom području linearna. Kod grafena se naprezanje u funkciji relativnog produljenja i karakteristika materijala definira izrazom:

$$\sigma = E\varepsilon + D\varepsilon^2 \tag{2.5.}$$

pri čemu je:

D – modul elastičnosti trećeg reda [N/mm<sup>2</sup>]

Vrijednost D ima negativan predznak. Njegov utjecaj znatno je manji od utjecaja Youngovog modula elastičnosti E zbog kvadriranog relativnog produljenja za koje vrijedi  $\varepsilon$ <1. Ipak, zbog negativnog predznaka, modul elastičnosti trećeg reda dovodi do smanjenja krutosti pri višim vlačnim naprezanjima te povećanja krutosti pri višim tlačnim naprezanjima. Njegova vrijednost za grafen iznosi -2 000 GPa, također dobivena eksperimentalno [13]. Ispitivanja su ipak pokazala da se komponenta D pri gotovo cijelom režimu podnosivih opterećenja može zanemariti.

#### Posmično naprezanje

Posmično naprezanje  $\tau$  omjer je sile koja djeluje paralelno na opterećenu ravninu u površine ravnine. Najpoznatiji primjer posmične sile su škare. Ilustracija djelovanja posmične sile na sloj grafena na SiO<sub>2</sub> supstratu prikazana je na slici 2.8.



Slika 2.8. Ilustracija metode ispitivanja posmičnog naprezanja grafena

Wang et al. [14] proveli su istraživanje posmičnog naprezanja grafena na SiO<sub>2</sub> supstratu za jedan sloj grafena i za dvostruki sloj. Sila je u eksperimentu narinuta stlačenim zrakom. Na osnovu dubine i širine udubljenja te tlaka zraka na površini grafena dobivene su različite vrijednosti posmičnih naprezanja za iste tlakove zraka na oba uzorka. Eksperimentom je utvrđeno prosječno posmično naprezanje  $\tau_1$ = 1,64 MPa za jedan sloj grafena i  $\tau_2$ = 0,04 MPa za dva sloja grafena. Velika je razlika objašnjena slabim međudjelovanjem van der Waalsovih sila među slojevima grafena. Treba napomenuti da su navedene vrijednosti izmjerene u dopustivom području, tj. da pri tim naprezanjima ne dolazi do pucanja tako da se ne može govoriti o graničnom posmičnom naprezanju.

#### Žilavost

Žilavost je svojstvo materijala da izdrži nagla udarna opterećenja. Mjeri se postupkom Charpyjevog bata pri čemu standardiziranu epruvetu geometrije kvadra s "V" zarezom s nezarezane strane udari čekić pušten s određene visine. Razlika početne visine i visine koju dosegne energija je loma epruvete, tj. razlika početne potencijalne energije bata i energije nakon loma.

$$E_{loma} = E_p - E_2 = mgh_1 - mgh_2 \tag{2.6.}$$

pri čemu je:

m – masa bata [kg]

g – akceleracija gravitacije [m/s<sup>2</sup>]

h<sub>1</sub>, h<sub>2</sub> – visina bata prije udara i maksimalna visina nakon udara [m]

S obzirom na dvodimenzionalnost i dimenzije grafena i njegovog uzorka, bilo je potrebno kreirati posebnu napravu kako bi se što vjerodostojnije opisala žilavost strukture. Pukotina u uzorku napravljena je laserskom zrakom. Testiranje je izvršeno za više različitih duljina pukotine. Očekivano, produljenjem pukotine prikazano na slici 2.9.  $a_0$  smanjivalo se kritično naprezanje  $\sigma_C$  pri kojem dolazi do pucanja.



Slika 2.9. Povećanje pukotina pri testiranju žilavosti [15]

Energija otpuštena pri pucanju s obzirom na površinu  $G_C$  važna je karakteristika materijala. Definira se izrazom:

$$G_{\rm C} = \frac{U - V}{A} \tag{2.7.}$$

Veličine U i V odgovaraju prethodno navedenim veličinama  $E_p$  i  $E_2$  redom, dok veličina A predstavlja površinu novonastalog presjeka. Karakteristika žilavosti može se opisati ovom veličinom. Veći iznos  $G_C$  za posljedicu ima duže i postepenije pucanje veza unutar materijala po presjeku A, što znači da su se veze u materijalu postupno kidale, dakle pružile su bolji otpor udarnom opterećenju. Takve materijale nazivamo žilavima (eng. *tough*). Materijali koji pucaju

brže pucaju usred istovremenog kidanja veza po presjeku su krhki materijali (eng. *brittle*). Takvi materijali ne moraju nužno biti manje čvrsti ili tvrdi, a nedostatak žilavosti ne mora nužno biti negativno svojstvo materijala. Materijali male žilavosti i mogu imati povišenu statičku čvrstoću, stoga je kod projektiranja konstrukcija i upotrebe materijala važno voditi svojstva o svim svojstvima. G<sub>C</sub> grafena prema Zhang et al. [15] iznosi 15,9 J/m<sup>2</sup> što ga svrstava u krhkije materijale.

Faktor intenziteta kritičnog naprezanja  $K_C$  iznosi  $4 \pm 0,6$  MPa što je vrlo nisko s obzirom da visokožilavi čelici mogu dosegnuti vrijednost preko 100 MPa. Za ilustraciju, pojedina iskustva govore da grafenske pločice pucaju 50 % puta pri ispadanju iz ruku. Te tvrdnje, naravno, treba uzeti s velikom rezervom. Kod žilavosti grafena je problem između ostaloga i njegova dvodimenzionalna struktura zbog koje se svaka nepravilnost u rešetci tretira kao potencijalna pukotina koja znatno smanjuje žilavost. Kod trodimenzionalnih materijala takve sitne linearne nepravilnosti nemaju u toj mjeri izražen negativni utjecaj.

#### 2.1.3. Proizvodnja grafena

Prema Raccichini et al. [16], glavna svojstva koja karakteriziraju proizvodni postupak grafena su:

- kvaliteta grafena
- kontaminacija
- skalabilnost
- prinos
- troškovi

#### Čistoća grafena

Kvaliteta grafena ima značajan utjecaj na njegova mehanička, termodinamička i električna svojstva. Glavnom mjerom kvalitete smatra se prisutnost defekata. Liu et al. [17] defekte dijele na točkaste, tzv. bezdimenzionalne, te linijske, tzv. jednodimenzionalne. U točkaste efekte spadaju:

- Stone-Walesov (SW) defekt
- pojedinačne praznine (eng. single vacancies SV)
- dvostruke praznine (eng. *double vacancies* DV)

Stone-Walesov defekt javlja se pri formiranju neheksagonalnih rešetkastih struktura atoma ugljika rotiranjem C-C (ugljik-ugljik) veze za 90° formacijske energije 5 eV, kao na slici 2.10.



Slika 2.10. a) TEM snimka SW efekta. b) Simulacija SW defekta iz funkcionalne teorije gustoće (eng. density functional theory – DFT) [18]

Pojedinačne praznine javljaju se izostankom jednog atoma ugljika u rešetci grafena pri čemu se odvija Jahn-Tellerova distorzija koja dovodi do saturacije susjednih C-C veza što dovodi do formiranja prstenova s 5 i 9 atoma formacijske energije 8 eV, kao na slici 2.11.



Slika 2.11. a) TEM snimka SV-a. b) Simulacija SV-a iz DFT-a [18]

Dvostruke praznine nastaju formiranjem pojedinačnih praznina na susjednim prstenovima formacijske energije 8eV pri čemu se formiraju po dva prstena s 5 i jedan prsten s 8 atoma.

Najčešći jednodimenzionalni defekt je linijski defekt prikazan na slici 2.12. Uglavnom se radi o granicama dvaju segmenata rešetke u ravnini pod blagim nagibom pri čemu nastaje 5-8-5 struktura prstenova kao i kod višestrukih praznina, ali se za razliku od tog slučaja proteže linijski duž rešetke i dijelu je na dva dijela.



Slika 2.12. Linijski defekt grafena [19]

#### Kontaminacija

Tijekom proizvodnog postupka može doći do kontaminacije koja se dijeli na kontaminaciju ostacima procesa i kontaminaciju tvarima iz okoline. U ostatke procesa spadaju:

- Reagensi za sintezu grafena
- Katalizatori
- Otapala za obradu i čišćenje

Pod tvarima iz okoline najčešće se podrazumijeva kontaminacija zraka prašinom i drugim česticama te biološka kontaminacija.

#### Skalabilnost

Skalabilnost proizvodnog postupka je sposobnost postupka da održava učinkovitost i kvalitetu grafena pri povećanju obujma proizvodnje.

#### Prinos

Prinos proizvodnog postupka je omjer proizvedene količine grafena i korištenih sirovina i drugih resursa u postupku te predstavlja glavnu mjeru tehnološke efikasnosti.

#### Troškovi

Na troškove proizvodnog postupka utječe niz faktora poput složenosti postupka, korištenih sirovina, potrebne energije i opreme za proizvodnju.

Najčešće zastupljeni proizvodni procesi grafena su:

- mehanička eksfolijacija (eng. *mechanical exfoliation*)
- eksfolijacija tekućom fazom (eng. *liquid-phase exfoliation*)
- kemijsko taloženje pare (eng. *chemical vapour desposition* CVD)

- sinteza na silicijevom karbidu (eng. synthesis on SiC)
- bottom-up sinteza (eng. *bottom-up synthesis*)
- redukcija grafenovog oksida (eng. graphene-oxide reduction)

#### Mehanička eksfolijacija

Kao što je ranije navedeno, uspješni postupak mehaničke eksfolijacije prvi su put opisali Novoselov i Geim [3], za što su 2010. nagrađeni Nobelovom nagradom za fiziku. U naizgled jednostavnom procesu odvajanja slojeva orijentiranog pirolitičkog grafita (eng. *highly ordered pyrolytic graphite* – HOPG) selotejpom dobivene su pahuljice (eng. *flakes*) jednoslojnog (eng. *single layer graphene* – SLG) i višeslojnog (eng. *few layer graphene* – FLG) grafena dimenzija reda veličine nekoliko desetaka µm. Ilustracija postupka prikazana je na slici 2.13.



Slika 2.13. Shematski prikaz mehaničke eksfolijacije selotejpom [20]

Prilikom procesa mehaničke eksfolijacije na uzorak se djeluje normalnim i posmičnim silama koje kidaju Van der Waalsove veze među slojevima grafita. Postupak treba nastaviti sve dok se ne dobije jedan sloj grafita, tj. grafen. Premda ovako dobiveni grafen pokazuje veoma povoljna svojstva, sam postupak je izrazito mukotrpan i nije pogodan za proizvodnju značajnih količina.

S ciljem zadržavanja benefita mehaničke eksfolijacije uz ubrzavanje postupka, Jayasena et al. [21] demonstrirali su postupak preciznog tokarenja dijamantnim nožem HOPG-a fiksiranog epoksidnom smolom. Postupak je rezultirao povećanom skalabilnosti procesa, a za optimalna svojstva potrebno je poboljšati preciznost noža. Postupak je prikazan na slici 2.14.



Slika 2.14. Mehanička eksfolijacija dijamantnim nožem – shematski i stvarni prikaz [21]

Chen et al. [22] koristili su sustav triju grafitnih valjaka po uzoru na industriju gumenih proizvoda kao na slici 2.15. Polivinil klorid (eng. *poly vinyl chloride* - PVC) otopljen u dioktil ftalatu (eng. *dioctyl phthalate* - DOP) korišten je kao adheziv s ciljem imitacije efekta selotejpa. Usprkos dobrim mogućnostima automatizacije, postupak se nije pokazao optimalnim zbog prevelikog utjecaja nečistoća od kemikalija korištenih u procesu.



*Slika 2.15. Shematski prikaz metode triju grafitnih valjaka [22]* 

Eksfolijacija tekućom fazom

Hernandez et al. [23] demonstrirali su postupak u kojemu se grafitni prah otopljen u *N-methylpyrrolidonu* (NMP) podvrgava redom ultrazvučnim valovima i centrifugi pri čemu se postiže udio SLG-a od 28 %. Otapalo služi kao disperzant, pospješujući razdvajanje slojeva i stvarajući uvjete za stabilnu disperziju. Ultrazvučni valovi kidaju veze između slojeva grafita, a centrifugom se dobivene frakcije odvajaju. Postupak završava sušenjem dobivenog materijala i prikazan je na slici 2.16.



Slika 2.16. Shematski i stvarni prikaz eksfolijacije tekućom fazom [24]

Usprkos generalno vrlo povoljnim svojstvima u odnosu na ostale metode, postupak ipak pokazuje određene nedostatke zbog kojih se ne može smatrati optimalnom metodom. Kavitacija inducirana ultrazvučnim valom koja potpomaže procesu eksfolijacije istovremeno i stvara defekte zbog visokih lokalnih promjena temperatura i tlakova. Također, velik utjecaj na konačni prinos i kvalitetu ima oblik posude s obzirom na njegov utjecaj na djelovanje ultrazvučnih valova u otopini.

#### Kemijsko taloženje pare (CVD)

Postupkom kemijskog taloženja pare koristi se CH<sub>4</sub> zagrijan do 1000 °C kao plin perkusor pomoću kojeg se grafitni kristali nanose na foliju ili pločicu bakra ili nikla. Tijekom procesa taloženja grafit se razlaže na grafen [25]. Postupak je shematski prikazan na slici 2.17.



Slika 2.17. Shematski prikaz CVD postupka sinteze grafena [26]

Izazove kod CVD metode predstavljaju potreba za transferom grafena sa supstrata što postupak čini kompliciranijim te još uvijek nedovoljna mogućnost proizvodnje većih kontinuiranih površina uz prihvatljive troškove. Mogućnost transfera na tanke metalne filmove sugerira moguću primjenu u mikroelektronici.

Uz navedene najčešće korištene metode dobivanja grafena, postoje i ostale metode koje su još u početnim eksperimentalnim fazama [27].

Sintezom na SiC grafen se dobiva sublimacijom atoma silicija.

Bottom-up sinteza grafena je pristup kojim se grafen sintetizira iz manjih molekula ili atomskih struktura putem kemijskih reakcija ili samoorijentacije. Ovaj pristup omogućuje izgradnju grafenske strukture atom po atom, molekulu po molekulu, ili klastere po klastere, stvarajući sloj po sloj materijala.

Grafen se može dobiti i redukcijom grafenovog oksida pomoću oksidacijskih agenasa poput sumporne kiseline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i kalijevog permanganata (KMnO<sub>4</sub>). Ovaj proces dovodi do uvođenja funkcionalnih skupina poput hidroksila, karboksilnih grupa i epoksida u strukturu grafena.

Na slici 2.18. dan je pregled prethodno opisanih metoda s obzirom na navedene parametre: G – kvaliteta grafena, C – troškovi proizvodnog postupka, S – skalabilnost, P – čistoća, Y – prinos.



Slika 2.18. Svojstva grafena s obzirom na proizvodni postupak [16]

Novoselov et al. [27] zaključuju da će grafen postići široku industrijsku primjenu kad kvaliteta masovne proizvodnje dosegne kvalitetu najboljih uzoraka dobivenih u laboratorijskim uvjetima.

#### 2.1.4. Detekcija i karakterizacija grafena

S obzirom na prozirnost i dimenzije grafena, kao i na još uvijek nedovoljnu pouzdanost proizvodnih postupaka, tehnike detekcije imaju važnu ulogu u određivanju kvalitete uzorka prije korištenja. Osnovne metode detekcije grafena su:

- Ramanova spektroskopija (eng. Raman spectroscopy)
- TEM (eng. transmission electron microscopy) mikroskopija
- SEM (eng. scanning electron microscopy) mikroskopija
- Fotolektronska spektroskopija (eng. *X-ray photoelectron spectroscopy* XPS)
- Termogravimetrijska analiza (eng. thermogravimetric analysis TGA)

Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija temelji se na Ramanovom efektu (Nobelova nagrada za fiziku 1930.) prema kojem se energija i frekvencija svjetla mijenjaju prolaskom kroz materijal zbog interakcije s njegovim molekulama. Kada se svjetlost rasprši od materijala, većina fotona zadržava svoju početnu energiju i frekvenciju, ali mali postotak fotona (manje od 1 promila) doživljava promjenu u energiji i frekvenciji. Ovi fotoni čine Ramanovu raspršenu svjetlost, koja sadrži informacije o vibracijskim modovima i drugim karakteristikama materijala [28]. Glavni principi Ramanovog efekta su:

- Ramanov pomak: razlika između početne frekvencije incidentnog svjetla i frekvencije raspršene svjetlosti
- Vibracijski modovi: oscilacije atomske jezgre u odnosu na ravnotežni položaj
- Intenziteti vrhova: broj molekula koje sudjeluju u određenom vibracijskom modu i s vjerojatnošću pojave tog moda. Intenziteti vrhova mogu pružiti informacije o relativnoj koncentraciji različitih molekularnih vrsta u uzorku.

U Ramanovom spektru grafena identificiraju se tri karakteristična vrha: D, G i 2D vrh.

- D-vrh: povezan s defektima u strukturi grafena i pojavljuje na frekvenciji od oko 1350 cm<sup>-1</sup>.
- G-vrh: povezan s vibracijama sp<sup>2</sup> ugljičnih atoma u grafenu na frekvenciji od oko 1580 cm<sup>-1</sup>. Intenzitet G-vrha povezan je s količinom i kvalitetom sp<sup>2</sup> ugljičnih atoma u grafenu, pri čemu veći intenzitet ukazuje na veću koncentraciju sp<sup>2</sup> veza.
- 2D-vrh: povezuje se s dvodimenzionalnom strukturom grafena na frekvenciji između 2600 i 2700 cm<sup>-1</sup>. Koristi se za procjenu broja slojeva grafena i njihovu orijentaciju.

Ramanova spektroskopija predstavlja zlatni standard u detekciji grafena i česta je metoda za dokazivanje njegove prisutnosti u znanstvenim istraživanjima i komercijalnoj primjeni. Primjer Ramanove spektroskopije na SLG-u prikazan je na slici 2.19.



Slika 2.19. Ramanova spektroskopija za SLG [29]

#### TEM mikroskopija

Transmisijski elektronski mikroskop funkcionira na principu prolaska snopa elektrona kroz tanki uzorak pri čemu uslijed interakcije snopa s atomima uzorka dolazi do promjene u putanjama elektrona koje se detektiraju na atomskoj razini. S obzirom na dobru prilagođenost tankim uzorcima, TEM mikroskopija predstavlja vrlo učinkovitu metodu za detekciju i karakterizaciju grafena, prvenstveno za određivanje debljine i orijentacije slojeva te identifikaciju defekata što može dati precizne podatke o homogenosti strukture grafena. Primjer TEM snimke grafenskog uzorka s nepravilnostima prikazan je na slici 2.20.



Slika 2.20. TEM snimka nepravilnosti u grafenskom uzorku [30]

SEM mikroskopija

Skenirajući elektronski mikroskop funkcionira na principu interakcije snopa elektrona s površinom uzorka stvarajući sekundarne i obrnute elektrone, X-zrake ili karakteristične svjetlosti te se koristi za karakterizaciju površine grafena. Koristi se za određivanje površine i oblika uzorka te detekciju i raspored defekata na površini. Ovom tehnikom moguće je dobiti snimke iznimno visoke kvalitete. Primjer SEM snimke uzorka grafenovog oksida prikazan je na slici 2.21.



Slika 2.21. SEM snimka presjeka grafenovog oksida [31]

#### Fotoelektronska spektroskopija (XPS)

Fotoelektronska spektroskopija temelji se na interakciji fotona X-zraka s površinom uzorka pri čemu dolazi do emisije elektrona iz površinskog sloja. Energija elektrona izbačenih iz površine materijala proporcionalna je energiji X-zraka i svojstvena određenim kemijskim elementima. Mjerenjem kinetičke energije izbačenih elektrona određuje se sastav elemenata na površini. Ova metoda vrlo je učinkovita u određivanju sastava površine grafena, kao i supstrata na kojem se grafen nalazi te može dati jasan prikaz sastava i čistoće površine materijala.

#### Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogracimetrijska analiza bazirana je na principu promjene mase uzorka kao funkcije temperature pri čemu se termogravimetrijskom krivuljom karakterističnom za pojedine materijale mogu identificirati nečistoće u grafenu, ali i drugi korisni podaci poput termičke stabilnosti, udio vlage, razgradnja ili oksidacija.

#### 2.1.5. Primjena u biomedicini

Opći razvoj tehnologije prati njezina primjena u medicinske svrhe. Kontinuirano se razvijaju različiti neurološki implantati (NI) koji za cilj imaju poboljšanje izgubljenih ili oštećenih neuroloških funkcija. Primjena i razvoj neuroelektroničkog sučelja (NES) ključna je funkcionalnost implantata.

Prema smjeru djelovanja NI-ja razlikuju se oni koji snimaju podražaje okoline i prenose informaciju na neki od elemenata živčanog sustava te oni koji informaciju iz živčanog sustava prenose na periferiju. Očita je analogija s aferentnim i eferentnim putevima živčanog sustava. Prema temeljnim funkcijama Prema Kostarelos et al. [32], NI-ovi se razlikuju po oštećenoj ili nedostatnoj funkciji koju zamjenjuju, kao na slici 2.22.



Slika 2.22. Primjena neuroloških implantata prema funkciji [32]

Među faktorima koji utječu na učinkovitost i funkcionalnost sučelja i implantata veliku ulogu imaju primijenjeni materijali. Neki od zahtjeva vezanih uz materijale su:

- biokompatibilnost s okolnim tkivom
  - o minimiziranje upalnih procesa okolnog tkiva
  - sprečavanje pojave glioze
  - o mehanička usklađenost (odvajanje tkiva)
  - o biorazgradivost (u slučaju odvajanja materijala implantata)
- snimanje signala
  - o individualni neuroni (red veličine  $10^1 \,\mu V$ )
  - nakupine neurona (red veličine  $10^2 \,\mu V$ )
  - $\circ$  što veća površina snimanja (red veličine  $10^2$  cm<sup>2</sup>)
  - o visoka prostorna rezolucija (red veličine  $10^2 \,\mu m^2$ )
- stimulacija neurona
  - o naboj  $(10^2 \,\mu\text{C/cm}^2 10^0 \,\text{mC/cm}^2)$
  - o pulsiranje (100  $\mu$ s 1 ms)
  - o površine stimuliranja elektrodama ( $10^2 \,\mu m^2$ )

Zbog ranije navedenih svojstava grafen i njegovi derivati nameću se kao potencijalna rješenja za primjenu u neuroelektroničkim sučeljima.

#### 2.2. Nanomaterijali kao supstrati za stanični uzgoj i elektrofiziologiju

Specifična svojstva grafena i njemu srodnih nanomaterijala u kombinaciji s praktičnom dvodimenzionalnošću potakla su brojna istraživanja u području biomedicinske znanosti, ali i znanosti materijala s naglaskom na interakciju sa živim tkivom poput grafena kao supstrata za rast i razvoj različitih tkiva i stanica, diferencijaciju matičnih stanica, regeneraciju i potencijalnu primjenu u implantatima.

Park et al. [33] ispitali su utjecaj grafena kao supstrata na diferencijaciju matičnih stanica neurona (eng. *neural stem cells* - NSC). Matične stanice neurona mogu diferencirati u tri različite gradivne strukture živčanog sustava: neurone, oligodendrocite i astrocite. Matične stanice uzete iz iste kulture nanesene su paralelno na grafenski i stakleni supstrat kao na slici 2.23.



*Slika 2.23. Shema supstrata za eksperiment i nanošenje kulture [33]* 

Rezultati nakon mjesec dana paralelnog uzgoja pokazali su značajnu sklonost neuronskim matičnih stanica diferencijaciji u neurone (marker TUJ; obojen zeleno) na grafenu u odnosu na kontrolno staklo kao na slici 2.24. Ova je studija imala velik utjecaj na smjer istraživanja interakcije neurona i grafena.



Slika 2.24. Usporedba diferencijacije neuronskih matičnih stanica na grafenu i staklu [33]

Nastavno na Parka, Guo et al. [34] detaljnije su istražili mehanizam odgovoran za naglašenu neuronsku diferencijaciju. Dokazan je utjecaj grafena na pasivne i aktivne karakteristike membrane neurona i glijalnih stanica, uključujući i hiperpolarizaciju RMP-a (slika 2.25.). Osim otkrivanja mehanizma odgovornog za neuronsku diferencijaciju, u istoj je studiji dokazano da tako diferencirane stanice pokazuju normalnu neurofiziološku aktivnost na razini jednog signala što se očituje u analizi njezinih karakteristika u tablici 2.1.



Slika 2.25. Utjecaj grafena na RMP neurona i glijalnih stanica [34]

	Graphene (n = $38$ )	Control(n = 40)
Amplitude (mV)	82.2 ± 3.6	81.3 ± 4.1
Rise time (ms)	$0.68 \pm 0.04$	$0.70\pm0.03$
Duration (ms)	$2.07 \pm 0.11$	2.12 ± 0.10

Tablica 2.1. Utjecaj grafena na karakteristične veličine akcijskog potencijala neurona [34]

Tang et al. [35] na sličan su način ispitivali interakciju neurona i grafena i dobili znatno veći broj neurona na grafenu u usporedbi s kontrolnom površinom uz očekivano pojačanu neurofiziološku aktivnost na razini cijelog uzorka. Druge studije pokazale su slične rezultate.

S obzirom na dokazanu pozitivnu interakciju grafena i neurona na ravnim grafenskim površinama, te na ranije opisane mehanizme kontaktnog navođenja, kombinacija tih dvaju pristupa predstavlja velik potencijal.

Zhang et al. [36] nanijeli su grafenov oksid, derivat grafena s epoksidnim, karbonilnim, karboksidnim ili hidroksilnim grupama uključenim u manjoj mjeri u ugljikovi rešetku, na usmjerena PLLA (poly-L-lactide) nanovlakna i na njima uzgojili PC12 i Schwannove stanice štakora. Eksperiment je pokazao usmjeren rast i razvoj neurita stanica duž nanesenih slojeva te time direktan utjecaj topografije supstrata i u slučaju korištenja nanomaterijala.



Slika 2.26. PC12 i Shwannove stanice na podlozi grafenovog oksida [36]

Sakai et al. [37] postavili su disocirane hipokampalne neurone na dvostruki porozni sloj grafenovog oksida te ih potom zamotali u obliku mikrorolica. Stanice su nakon razvoja neurita kroz pore ostvarile kontakt s površinom uz zdrave neurofiziološke aktivnosti čime je dokazana mogućnost navođenja neurona uz zadržavanje normalne električne interakcije s okolinom.



Slika 2.27. Nanošenje stanične kulture na rolani grafenski dvosloj [37]

Yang et al. [38] u svoj su supstrat dodali i faktor dubine. Na slici 2.28. prikazan je postupak nanošenja grafenovog oksida na SiO<sub>2</sub> supstrat.



Slika 2.28. Postupak nanošenja grafenovog oksida u obliku mikrokanala [38]

Slika 2.29. prikazuje SEM i AFM snimku supstrata s obzirom na dimenzije uključujući i dubinu. Usporedbom rasta i razvoja neurona na kontrolnom staklu, ravnom grafenovom oksidu i supstratu s mikrokanalima demonstriran je najveći rast i razvoj na supstratu s mikrokanalima. Ovime je dokazano da je principe kontaktnog navođenja moguće kombinirati s karakteristikama derivata grafena i tako postići kumulativni efekt u rastu i razvoju neurona.



Slika 2.29. SEM i AFM snimka mikrokanala [38]

Du et al. [39] razvili su učinkovit MEA s grafenskim elektrodama povezanim zlatnim vodovima s kontrolnom jedinicom sustava na SiO<sub>2</sub> supstratu SNR-a usporedivog s konvencionalnim sustavima.



Slika 2.30. MEA baziran na grafenskim elektrodama [39]

Navedene studije samo su dio od ukupnog broja provedenih istraživanja vezanih uz upotrebu grafena i ostalih nanomaterijala u neuroinženjerstvu. Kumar et al. [40] u preglednom članku prikazuju porast zanimanja za tu tematiku uz izvjesnu daljnju perspektivu rasta. Poboljšane metode izrade grafena i grafenskih derivata te razvoj MEA tehnologija posljednjih godina otvaraju veliko područje za daljnja istraživanja.



Slika 2.31. Broj publikacija vezanih uz nanomaterijale u neuroinženjerstvu [40]

### 3. NEUROFIZIOLOŠKI TEMELJI AUDITORNOG SUSTAVA

#### 3.1. Auditorni sustav

Funkcija auditornog sustava je primanje, obrada i prosljeđivanje zvuka iz okoline prema specijaliziranim dijelovima središnjeg živčanog sustava. Zvuk se prostorom širi u formi longitudinalnog vala koji periodičkim titranjem sabija medij kojim se širi (zrak, voda, tkivo, kruti medij itd.) paralelno s pravcem širenja. Kao kod svake valne pojave, osnovne karakteristike zvuka kao vala su valni oblik, faza, amplituda i frekvencija. Pri nepromijenjenim uvjetima jačina zvuka (mjerna jedinica decibel: dB) definirana je amplitudom pri čemu s porastom amplitude raste i jačina zvuka koju percipiramo kao glasnoću. Visina zvuka definirana je frekvencijom (mjerna jedinica herz: Hz) pri čemu s porastom frekvencije raste visina tona. Čujna frekvencija zdravog ljudskog uha kreće se u intervalu od 20 Hz do 20 kHz.

Intenzitet zvuka definiran je kao snaga koju zvučni val prenosi po jedinici površine okomito na tu površinu. Jedinica intenziteta je  $W/m^2$ . Intenzitet je definiran formulom:

$$I = 2\pi^2 v^2 \delta^2 \rho c \tag{3.1.}$$

pri čemu je:

 $\delta$  – amplituda [m]

 $\rho$  – gustoća medija [kg/m<sup>3</sup>]

*c* – brzina zvuka kroj medij [m/s]

Jačina zvuka, tj. glasnoća, odnos je intenziteta nekog zvuka I i referentne vrijednosti intenziteta u nekom mediju  $I_0$ . Definirana je formulom:

$$L = 10 \log_{10} \left(\frac{I}{I_0}\right) \tag{3.2.}$$

Za referentni iznos u zraku  $I_0$  uzima se 1 pW/m<sup>2</sup>. Intenzitet se može definirati i kao umnožak akustičnog tlaka i brzine širenja. Intenzitet opada s kvadratom udaljenosti.



Slika 3.1. Struktura uha [41]

Slika 3.1. prikazuje strukturu uha s pripadajućim cjelinama: vanjskim, srednjim i unutarnjim uhom.

#### A) Vanjsko uho

Temeljna funkcija vanjskog uha je prikupljanje i provođenje zvučnih valova iz okoline do srednjeg uha. Sastoji se od ušne školjke, ušnog otvora i ušnog kanala, tj. zvukovoda.

Ušna školjka (eng. *auricle, pinna*, lat. *auricula*) hrskavična je struktura koja svojim oblikom djelomično usmjerava zvučne valove prema ušnom otvoru. Kroz ušni otvor (eng. i lat. *concha*) zvučni val ulazi u ušni kanal (eng. *ear canal*) kojim propagira do srednjeg uha.

#### B) Srednje uho

Srednje se uho sastoji od timpanske membrane, tj. bubnjića, triju koščica te mišića srednjeg uha. Sustav srednjeg uha u cjelini ima funkciju pojačivača zvuka iz okoline u svrhu prenošenja vibracije dovoljnog intenziteta na pužnicu. Osnovni je problem prijenosa zvučnog signala iz okoline prigušivanje pri prijelazu iz medija manjeg otpora titranju u veći, budući da zvuk koji propagira kroz zrak dolazi do pužnice u kojoj se nalazi tekućina koja ima značajno veći otpor titranju i koja bi bez posrednog mehanizma atenuirala više od 99,9 % signala.

Taj je problem "riješen" sustavom bubnjića i triju slušnih koščica. Zvučni val vanjskim uhom dolazi do bubnjića i izaziva titranje zategnute opne. Središte bubnjića spojeno je s čekićem (lat. *malleus*), slušnom koščicom na koju se prenosi titranje opne. Čekić titranje prenosi na nakovanj (lat. *incus*), a nakovanj na stremen (lat. *stapes*), koji titranje prenosi na

ovalni prozor na pužnici pri rubu unutarnjeg uha. Sustav srednjeg uha pojačava sve frekvencije u čujnom području (od 20 Hz do 20 kHz), ali ne pojačava ih jednoliko. Najveće pojačanje događa se u intervalu od 2 kHz do 5 kHz u kojem se nalaze mnogi zvukovi iz prirodnog okruženja. Oštećenje bubnjića i slušnih koščica osim mehaničkim podražajem može biti izazvano i zvukovima iznimno velikog intenziteta. Takvu pojavu djelomično sprječavaju dva mišića srednjeg uha, *tensor tympani* i *stapedius*, koji zatezanjem bubnjića smanjuju intenzitet titranja i time čuvaju strukture srednjeg uha.

#### C) Unutarnje uho

Unutarnje uho najsloženiji je dio auditornog sustava koji spaja srednje uho sa središnjim živčanim sustavom. Glavni dijelovi unutarnjeg uha prikazani su na slici 3.2.



Slika 3.2. Glavni dijelovi unutarnjeg uha [41]

Osnovni dio unutarnjeg uha je pužnica (eng. *cochlea*, lat. *cochleam*). Savijena je dva i pol puta i ime duguje karakterističnom izgledu. Pužnica složenim mehanizmom periodička titranja zraka, tj. zvučne valove, pretvara u interpretativan električni živčani signal. Pužnica je u presjeku približno kružnog oblika promjera 10 mm te ispružene duljine 35 mm. Dvije djelomično odvojene šupljine pužnice koje se protežu od bazalnog do apikalnog dijela, *scala vestibuli* i *scala tympani*, ispunjene su perilimfom koju dijele preko *helicoterme*, otvora kroz koji perilimfa prelazi imeđu dviju šupljina. *Scala media* odvojena je i u njoj se nalazi endolimfa. Presjek pužnice prikazan je na slici 3.3.





#### Slika 3.4. Cortijev organ [41]

Proces pretvorbe titranja u živčani signal odvija se u Cortijevom organu. Titranje perilimfe izazvano djelovanjem zvučnog vala na ovalni prozor preko sustava srednjeg uha u *scali mediji* izaziva pravilno titranje bazilarne membrane na kojoj su smještene osjetne stanice s dlačicama (eng. *hair cells*) na vrhu kojih se nalaze stretocile (eng. i lat. *stretocilla*), strukture nalik dlačicama koje su vršcima naslonjene na tektoralnu membranu fiksiranu za potporno tkivo. Pomicanjem bazalne membrane stretocile u kontaktu s fiksiranom tektoralnom membranom djelovanjem posmične sile mijenjaju svoje usmjerenje pri čemu se odvija otpuštanje iona kalija u osjetne stanice koji sudjeluju u procesu generiranja živčanog signala. Taj je proces prikazan na slici 3.4.

Na slici 3.5. detaljniji je prikaz mehanizma. Na vrhovima velikog broja nakupina nalik na snopove od cca 30 stretocila nalaze se ionski kanali permeabilni prema K<sup>+</sup> ionima iz endolimfe. Pomicanjem stretocila uslijed titranja bazilarne membrane prema najvišoj stretocili u snopu, tj. kinociliumu, kalijevi se kanali otvaraju i omogućuju ulazak iona osjetilnu stanicu uslijed kojeg se u depolarizira potencijal u citoplazmi, što izaziva otvaranje Ca<sup>2+</sup> permeabilnih kanala koji izazivaju otpuštanje neurotransmitera iz osjetilne stanice prema bipolarnom primarnom auditornom neuronu (eng. spiral ganglion neuron: SGN) koji provodi signal mehanizmom akcijskog potencijala prema središnjem živčanom sustavu.



Slika 3.5. Depolarizacija osjetilnih stanica [41]

Stretocille snimljene elektronskim mikroskopom prikazane su na slici 3.6. Pomicanjem u suprotnom pravcu prema najmanjoj *stretocilli* odvija se suprotan proces. Ionski se kanali zatvaraju i dolazi do hiperpolarizacije. Ovi procesi odvijaju se velikom brzinom. Reakcija sustava od ulaska zvuka u uho do deloparizacije iznosi cca 10 ms.



Slika 3.6. Mikroskopska snimka stretocilla [42]

#### 3.2. Prijenos signala u živčanom sustavu

Živčani je sustav prema uvriježenoj definicji specijalizirani sustav u višestaničnim organizmima koji prima i prenosi obavijesti iz okoline i iz unutrašnjosti tijela, obrađuje ih i priprema odgovarajuće odgovore.

Osnovne gradivne jedinice živčanog sustava su neuroni. U ljudskom ih organizmu samo u mozgu prema nekim procjenama ima 86 milijardi [43]. Njihova zadaća je provođenje senzornih i motornih informacija u obliku električnih signala. Osnovne gradivne jedinice neurona su soma, te aksoni i dendriti, skupno zvani neuritima. Soma je tijelo stanice koja sadrži jezgru (eng. i lat. *nucleus*) u kojem se odvija sinteza proteina i ostali osnovni procesi važni za život stanice. Akson je dugi izdanak koji provodi električni signal, a dendriti su kratki izdanci koji primaju podražaje iz okoline. U pravilu većina neurona ima jedan (unipolarni neuroni) ili nekoliko aksona (bipolarni, tripolarni, multipolarni...) te veliki, najčešće neodređen broj dendrita. Također postoje i anaksonski neuroni kod kojih nije moguće razlikovati neurite. Osim osnovnih jedinica neuron se sastoji i od ostalih koje su s pripadajućim funkcijama prikazane na slici 3.7. Promjer jezgre neurona u prosjeku se kreće od 3 do 18 µm, a masa većeg neurona može dosegnuti 1 µg. Duljina varira od nekoliko µm (primarni auditorni neuroni glodavca) do nekoliko metara (primarni aferentni neuron žirafe), ovisno o funkciji.



Slika 3.7. Shematski prikaz neurona [44]

Prema organizacijskom načelu živčani sustav dijeli se na centralni i periferni. U centralni živčani sustav (eng. *central nervous system*; CNS) spadaju mozak i leđna moždina, a u periferni kranijalni (12 pari neurona) i spinalni neuroni (32 para neurona) koji se granaju po ostatku tijela. U perifernom se dijelu odvija provođenje senzornih informacija iz okoline prema CNS-u gdje se informacije analiziraju i integriraju u motorne informacije koje periferni sustav izvršava.

Prema smjeru toka informacija živčani se sustav dijeli na aferentni i eferentni. Aferentni (senzorni) neuroni prenose informacije iz okoline prema CNS-u, a eferentni (motorni) neuroni primaju informacije iz CNS-a i izvršavaju radnje. Eferentni dio živčanog sustava moguće je još podijeliti na voljni i autonomni. Voljnim se sustavom upravlja svjesno i namjerno (primjeri: govor, hodanje, podizanje tereta...), a autonomni sustav radnje izvršava neovisno o volji (primjer: suženje zjenica, širenje dišnih puteva, reguliranje srčanog ritma...). Voljni sustav djeluje primarno na mišiće poprečno-prugastog tkiva, a autonomni na mišiće glatkog te srčanog tkiva.

Komunikacija među neuronima odvija se preko sinapsi, uskih šupljina između završetaka aksona i dendrita. Emitivni neuron električnog signala na završetku aksona ispušta neurotransmitere koji pobuđuju susjedni neuron koji nastavlja propagaciju signala. Neuroni se s obzirom na sinaptičko poticanje aktivnosti dijele na ekscitatore i inhibitore. Ekscitatori pobuđuju prijenos signala, a inhibitori ga zaustavljaju. Informacije se u živčanom sustavu prenose mehanizmom akcijskog potencijala (eng. *action potential*; AP). AP predstavlja promjenu električnog potencijala na membrani u točno određenom iznosu koja točno određenom brzinom propagira aksonom. Temeljni problem prijenosa informacija električnim putem je duljina na kojoj je potrebno očuvati signal zbog nedovoljne pasivne električne vodljivosti tkiva. Mehanizam AP-a čuva amplitudu signala dužinom cijelog aksona i na taj način osigurava stabilnost informacije od periferije prema CNS-u i obratno, neovisno o udaljenosti mjesta podražaja od CNS-a.

Tjelesne tekućine, intracelularne i ekstracelularne, sadrže brojne ione o čijem omjeru ovisi električni potencijal na pojedinoj lokaciji. Tablica 3.1. prikazuje intracelularne i ekstracelularne koncentracije iona kod neurona lignje i sisavaca.

	Concentration (mM)		
Ion	Intracellular	Extracellular	
Squid neuron			
Potassium (K+)	400	20	
Sodium (Na <sup>+</sup> )	50	440	
Chloride (Cl <sup>-</sup> )	40-150	560	
Calcium (Ca2+)	0.0001	10	
Mammalian neuron			
Potassium (K <sup>+</sup> )	140	5	
Sodium (Na <sup>+</sup> )	5-15	145	
Chloride (Cl-)	4-30	110	
Calcium (Ca <sup>2+</sup> )	0.0001	1–2	

Tablica 3.1. Intracelularne i ekstracelularne koncentracije iona [41]

Iznos električnog potencijala pri mirovanju (eng. *resting membrane potential*; RMP) iznosi od -40 mV do -90 mV, ovisno o vrsti i funkciji neurona. Točan iznos RMP-a ovisi o omjeru koncentracija iona unutar i izvan stanice te je definiran Nernstovom jednadžbom:

$$E_{\rm X} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_2}{[X]_1} \tag{3.3.}$$

pri čemu je:

- R plinska konstanta,
- z valencija iona
- F Faradayeva konstanta

Izmjene iona na staničnoj se membrani odvijaju dvama osnovnim putevima: ionskim kanalima i ionskim transporterima. Ionski kanali prenose ione niz koncentracijski gradijent, tj. iz područja veće u područje manje koncentracije. Ionski transporteri prenose ione suprotno koncentracijskom gradijentu, tj. iz područja manje u područje veće koncentracije. Kanali i transporteri najčešće su permeabilni samo za jednu vrstu iona. Pri većem broju različitih iona RMP je određen permeabilnošću membrane (ionskih kanala, a ne ionskih transportera) za određeni ion. Primjerice, ako se izvan neurona nalazi znatno više Na<sup>+</sup> iona nego unutar neurona, tada će električni potencijal unutar stanice biti pozitivniji što je permeabilnost za Na<sup>+</sup> veća jer u tom slučaju omogućava veći dotok pozitivnih iona u neuron (eng. *influx*). Za ion kalija K<sup>+</sup>, čija je koncentracija prema tablici 3.1. znatno veća unutar stanice s porastom permeabilnosti membrane, RMP će pasti zbog istjecanja pozitivnih iona iz neurona (eng. *efflux*). U tom je slučaju RMP definiran Goldmanovom jednadžbom:

$$V = 58 \log \frac{P_K [K]_2 + P_{Na} [Na]_2 + P_{Cl} [Cl]_1}{P_K [K]_1 + P_{Na} [Na]_1 + P_{Cl} [Cl]_2}$$
(3.4.)

Akcijski potencijal nastaje kada vanjski podražaj (mehanički, akustični, toplinski ili svjetlosni podražaj, neurotransmiter...) svojim posrednim djelovanjem izazove porast RMP-a na vrijednost veću od vrijednosti praga akcijskog potencijala (eng. *treshold*) pri čemu neuron iz pasivnog vođenja prelazi u aktivno vođenje te nastaje signal koji konstantnom amplitudom propagira duž cijelog neurona. Iznos *tresholda* za ljudske se neurone kreće oko -50 mV.

Razmotrimo dva slučaja:

U prvom dolazi do podražaja koji uzrokuje skok potencijala koji ne prelazi *treshold*. U tom slučaju ne dolazi do pokretanja akcijskog potencijala i stabilnog prijenosa informacije. Neuron se ponaša poput pasivnog vodiča (npr. metalne žice) i amplituda takvog signala opada u prostoru po jednadžbi 3.5. koja glasi:

$$V_x = V_0 e^{-\frac{x}{\lambda}} \tag{3.5.}$$

pri čemu je:

Vo-električni potencijal na mjestu podražaja

 $V_x$  – električni potencijal na udaljenosti x od mjesta podražaja

x – udaljenost od mjesta podražaja

 $\lambda$  – konstanta duljine aksona

Konstanta duljine definirana je jednadžbi 3.6. koja glasi:

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_0 + r_i}} \tag{3.6.}$$

pri čemu je:

 $r_m$  – otpor membrane

 $r_0$  – otpor intracelularnog medija

 $r_i$  – otpor ekstracelularnog medija

Pasivno širenje signala prikazano je na slici 3.8.


Slika 3.8. Pasivno širenje signala neuronom [41]

U drugom slučaju podražaj uzrokuje skok potencijala koji prelazi *treshold* pri čemu dolazi do pokretanja mehanizma akcijskog potencijala i stabilnog prijenosa informacije cijelim aksonom kao na slici 3.9.



Slika 3.9. Aktivno širenje signala neuronom [41]

Mehanizam okidanja akcijskog potencijala prikazan je na slici 3.10.

Područje 0: Pretpostavimo da početni RMP neurona iznosi -70 mV. Vanjski podražaj pri dolasku na membranu neurona otvara ionske kanale permeabilne prema Na<sup>+</sup> ionima. Pozitivni Na<sup>+</sup> ioni ulaze u stanicu te dolazi do sporog rasta električnog potencijala, tj. spore depolarizacije. U ovom se trenutku signal aksonom još uvijek može širiti samo pasivno.

Područje 1: Intenzitet otvaranja ionskih kanala ovisi o električnom potencijalu koji djeluje na ustrojstvo i raspored gradivnih proteina kanala. Kada iznos potencijala dođe do vrijednosti *tresholda* (u promatranom slučaju -50 mV), ionski se kanali permeabilni prema

natriju znatno otvaraju pri čemu dolazi do naglog influksa velikog broja Na<sup>+</sup> iona koji uzrokuju brzu depolarizaciju neurona.

Područje 2 i 3: Natrijevi kanali zatvaraju se zbog pada razlike u koncentraciji i elektrokemijske sile. U tom trenutku amplituda signala doseže maksimalnu vrijednost, tj. *peak*. Istovremeno znatan porast potencijala u neuronu uzrokuje brzo otvaranje ionskh kanala permeabilnih prema kaliju pri čemu dolazi do naglog efluksa K<sup>+</sup> iona.

Područje 4: Nagli efluks kalijevih iona uzrokuje brzu repolarizaciju pri čemu potencijal ponovno poprima negativnu vrijednost.

Područje 5: Pad potencijala uzrokuje zatvaranje kalijevih ionskih kanala, no zbog razlike u građi u odnosu na natrijeve kanale, kalijevi se kanali zatvaraju sporije što rezultira repolarizacijom do iznosa nižeg od početnog RMP-a (eng. *undershoot*). Ovaj se segment signala akcijskog potencijala naziva refrakcijski period. Ionski transporteri potom sporom izmjenom nadoknađuju nastalu razliku i vraćaju potencijal na početnu vrijednost RMP-a.



Slika 3.10. Akcijski potencijal: segmenti [45]

Propagacija akcijskog potencijala po aksonu opisana je Hodkin-Huxleyjevim modelom za koji je 1963. dodijeljena Nobelova nagrada za medicinu i fiziologiju. Elementi neurona predstavljeni su kondenzatorima (lipidni sloj membrane), električnom vodljivosti (ionski kanali) te naponskim (elektrokemijski gradijent) i strujnim (ionski transporteri) izvorima.

Pojednostavljeni mehanizam propagacije signala po aksonu prikazan je na slici 3.11.

U trenutku  $t_1$  vanjski podražaj depolarizira membranu u području A te otvara natrijeve ionske kanale. Na<sup>+</sup> ioni svojim pozitivnim nabojima pasivnim mehanizmom depolariziraju susjedno područje B unutar neurona do razine potencijala na kojem se otvaraju natrijevi ionski kanali tog područja.

U trenutku  $t_2$  uslijed naglog otvaranja natrijevi ionskih kanala dolazi do pojave akcijskog potencijala u području B. Influks Na<sup>+</sup> iona u području B depolarizira susjedno područje C. U području A završen je efluks K<sup>+</sup> iona te je potencijal vraćen na razinu RMP-a.

U trenutku t<sub>3</sub> područje C je depolarizirano te dolazi do influksa Na<sup>+</sup> iona. U području B potencijal je vraćen na razinu RMP-a. Na<sup>+</sup> ioni depolariziraju sljedeće područje te signal nastavlja s propagacijom do kraja aksona.

*Undershoot* K<sup>+</sup> iona u refrakcijskom periodu repolarizira potencijal na dovoljno nisku razinu da spriječi ponovnu depolarizaciju Na<sup>+</sup> ionima iz susjednog područja te na taj način sprječava povratno širenje signala.



Slika 3.11. Mehanizam propagacije signala po aksonu [41]

Brzina propagacije akcijskog potencijala po aksonu kreće se u intervalu od 1 do 100 m/s. Faktori koji utječu na brzinu su:

- temperatura: porast temperature → porast transmembranske difuzije iona → porast brzine propagacije
- promjer aksona: veći promjer aksona → manji otpor (po modelu pasivnog vodiča) → porast brzine propagacije
- mijelinska ovojnica: Mijelinska ovojnica obavija segmente aksona u pravilnom razmaku i onemogućuje dužinski kontinuiranu transmembransku izmjenu iona. Izmjena iona odvija se samo na segmentima bez mijelinske ovojnice, tj. Ranvierovim čvorovima, što omogućava skokovitu propagaciju signala (eng. *saltatory conduction*) te dodatno sprječava povratnu depolarizaciju (animacija na poveznici https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/48/Saltatory\_Conduction.g if/1024px-Saltatory\_Conduction.gif ).



Slika 3.12. Osnovne karakteristične veličine signala akcijskog potencijala [46]

Slika 3.12. prikazuje osnovne karakteristične veličine signala akcijskog potencijala. Uz RMP i *treshold*, važne su veličine i latencija (eng. *latency*), trajanje (eng. *duration*), amplituda (eng. *amplitude*) te akomodacija (eng. *accommodation*). Očitavanja nekih vrijednosti mogu varirati ovisno o tehnici snimanja.

Akomodacija je način na koji neuron reagira na stimulus. Tri su oblika odgovora:

- pojedinačna akomodacija (eng. *unitary accommodation*; UA): jedan podražaj → jedan AP; neovisno o duljini trajanja stimulusa
- brza akomodacija (eng. *rapid accommodation*; RA): jedan podražaj → određeni broj AP-a; neovisno o duljini trajanja stimulusa
- spora akomodacija (eng. *slow accommodation*; SA): jedan podražaj → generiranje APa u pravilnom ritmu za vrijeme trajanja stimulusa; ovisno o duljini trajanja podražaja

Orijentacije radi, pri aktivaciji akcijskog potencijala duž aksona promjera 10  $\mu$ m površina membrane na kojoj se odvija izmjena iona iznosi cca 314  $\mu$ m<sup>2</sup>. Pretpostave li se iznosi koncentracija Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> iona iz tablice 3.1., dobije se iznos od cca 2 000 000 Na<sup>+</sup> iona i 2 000 000 K<sup>+</sup> iona koji se izmijene pri jednoj aktivnosti.

Osim stimulirane neurofiziološke aktivnosti, postoji i spontana aktivnost, tj. nastanak i propagacija AP-a bez vanjskog podražaja. Takvi su slučajevi česti kod neurona u ranoj fazi razvoja te kod nekih neuroloških poremećaja [47].

# 3.3. Osnove slušne protetike

## 3.3.1. Oštećenja auditornog sustava

Gubitak sluha najčešće je uzrokovan oštećenjem auditornog sustava te se ovisno o prirodi oštećenja može manifestirati kao:

- potpun ili djelomičan
- simetričan ili asimetričan
- privremen ili trajan
- progresivan ili statičan

Oštećenja sluha dijele se po dvije osnove: lokaciji nastanka i vrsti oštećenja. Podjela po lokaciji praktične je naravi i odnosi se na područja u uhu (vanjsko, srednje i unutarnje) te oštećenja u središnjem živčanom sustavu. Podjela po vrsti odnosi se načelno na opću etiologiju oštećenja. Razlikuju se dvije vrste oštećenja:

- provodno ili konduktivno oštećenje (eng. *conductive hearing loss*); uzrokovano promjenama koje onemogućavaju učinkovito provođenje zvučnog signala do unutarnjeg uha:
  - o opstrukcija ušnog kanala
  - o upala srednjeg uha
  - o ozljeda
  - o otoskleroza
  - o tumori
- senzorneuralno ili perceptivno oštećenje (eng. *sensorineural hearing loss*); reverzibilna ili ireverzibilna nemogućnost auditornog sustava da adekvatno prevede zvučne valove iz okoline u razumljiv živčani signal s uzrokom u unutarnjem uhu ili CNS-u. Najčešće se manifestira trajnim oštećenjima slušnih dlačica, a uzroci su:
  - o prezbiakuzija (staračka nagluhost)
  - ototoksični lijekovi
  - o infekcije
  - o barotrauma
  - o autoimune bolesti
  - o izlaganje buci
  - o genetski poremećaji

Metoda liječenja ovisi o vrsti i stupnju oštećenja. S obzirom na to da procesi mogu biti ireverzibilni jer neke strukture u uhu, poput osjetilnih slušnih stanica u pužnici, imaju slabu ili nikakvu sposobnost regeneracije, kod mnogih navedenih oštećenja medicinskim tretmanom nije moguće otkloniti uzrok nastanka niti sanirati gubitak sluha. Na složenost prirode oštećenja utječe i mikrolokacija nastanka. Primjerice, apikalni dio pužnice zadužen je za tonove niske, a bazalni za tonove visoke frekvencije, kao što je prikazano na slici 3.13. Takav princip raspodjele se zove tonotopija. Dvjema osobama s oštećenjem osjetilnih slušnih stanica na različitom mjestu pužnice gubitak sluha će se manifestirati na različite načine.



Slika 3.13. Tonotopijska distribucija u pužnici [41]

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, oko 5% svjetskog stanovništva pati od umjerenog ili težeg stupnja gubitka sluha [48]. Umjereno jakim gubitkom sluha smatra se gubitak sluha s pragom čujnosti 35 do 40 dB ispod stvarne jačine zvuka na zdravijem uhu. Ukoliko uzrok gubitka sluha nije moguće otkloniti, već pri umjereno jakom gubitku preporučuje se korištenje slušnih pomagala. Osnovne vrste slušnih pomagala su slušni aparat i umjetna pužnica.

#### 3.3.2. Slušni aparat

Slušni aparat (eng. *hearing aid*) je naprava koja funkcionira na principu pojačavanja zvukova točno onih frekvencija koje korisnik zbog oštećenja lošije čuje.

Tri osnovne komponente slušnog aparata su:

- jedinica za primanje signala iz okoline
- jedinica za obradu signala
- jedinica za slanje signala korisniku

Slušni su aparati učinkovito rješenje za široki spektar problema sa sluhom. Korištenje i održavanje uglavnom su jednostavni, a dijagnostika brza i ne zahtijeva složenu medicinsku obradu. U SAD-u se 2019. prodalo 4,23 milijuna različitih slušnih aparata, što predstavlja rast od 6,5 % u odnosu na prethodnu godinu [49]. S obzirom na uglavnom zadovoljavajuće rezultate kod korisnika s prezbiakuzijom te na trendove starenja populacije i poboljšanja standarda zdravstvene skrbi, u bliskoj se budućnosti očekuje daljnji rast upotrebe.

Ipak, usprkos navedenim prednostima, slušni aparati nisu optimalno rješenje za sve korisnike što se prvenstveno odnosi na osobe s teškim oštećenjima sluha, posebice kod nekih senzorneuralnih oštećenja, kao i kod urođenih oštećenja. Suvremeni aparati efikasni su u pojačavanju točno određenih frekvencija zvuka, no kod dijela pacijenata takav pristup ne donosi značajne benefite. U tom je slučaju potrebno primijeniti drugu vrstu tehnologije.

## 3.3.3. Umjetna pužnica

Umjetna pužnica (eng. *cochlear implant*: CI) vrhunac je tehnološkog napretka u slušnoj protetici te općenito najuspješnija neuralna protetička naprava. Preteča umjetne pužnice datira iz 1957. kada su francuski liječnici Journo i Eyriès električnom stimulacijom indukcijskom zavojnicom direktno na završecima slušnih živaca pacijentu s odstranjenim pužnicama vratili sluh do razine grubog raspoznavanja visine tonova [50]. U narednim se desetljećima umjetna pužnica prometnula u učinkovito rješenje za pacijente kojima klasični slušni aparati nisu predstavljali adekvatnu pomoć [51]. Ukupni broj ugrađenih umjetnih pužnica u svijetu do 2022. godine prešao je milijun primjeraka [52].

Princip rada umjetne pužnice zasnovan je na pretvaranju zvučnih valova u električni signal koji se dovodi direktno u pužnicu koja signale prevodi u informaciju interpretabilnu CNS-u. Prikaz ugrađene umjetne pužnice s glavnim komponentama dan je na slici 3.14. Mikrofon (2) prikuplja zvučne valove iz okoline koji se potom prema korisnikovim potrebama obrađuju u mikroprocesoru (1). Obrada signala općenito se sastoji od pretvaranja signala u digitalni oblik koji se potom pretvara u oblik radiofrekvencijskog signala te se odašiljačem, tj. antenom (3) šalje do unutarnjeg prijemnika (4) ugrađenog ispod kože korisnika. Antena je magnetski pričvršćena za unutarnji prijemnik. Radiofrekvencijski signal iz unutarnjeg prijemnika u električnom se stimulatoru (5) dekodira i pretvara u električni signal odakle se žicom (6) šalje do elektroda (7) implantiranih u *scali tympani* te stimulira primarne auditorne neurone (8).



Slika 3.14. Model ugrađene umjetne pužnice [53]

Umjetna se pužnica može podijeliti na unutarnje komponente koje se ugrađuju kirurškim zahvatom, te vanjske koje se mogu jednostano ukloniti ili zamijeniti po potrebi. Shematski prikaz unutarnjih i vanjskih komponenti za obradu signala prikazan je blok dijagramom na slici 3.15.



Slika 3.15. Unutarnje i vanjske komponente za obradu signala [54]

Najvažniji proces u umjetnoj pužnici je pretvorba zvučnog signala u električni impuls u procesoru. Često korišten princip obrade signala je CIS (eng. *continuous interleaved sampling*) i izvodi se u 4 koraka:

1) Filtriranje: U prvom se koraku filtriranjem zvuk iz okoline snimljen mikrofonom razdvaja po različitim frekvencijskim pojasevima pri čemu je svaki pojas uparen s jednom elektrodom. Elektrode s filterima viših frekvencija spojene su na bazalni dio pužnice, a elektrode s filterima nižih frekvencija na apikalni dio prema karakteristikama na slici 3.13.

2) *Band envelope*: Ispravljanjem vala i niskopropusnim filterom formira se envelopa/ovojnica signala kako bi se odredila amplituda svakog električnog pulsa. Slika 3.16. prikazuje frekvencije originalno snimljenog zvuka rečenice "drive round picked my children back up" i njegovu envelopu.



Slika 3.16. Zvuk i njegova envelopa [55]

3) Komprimiranje: Metodom nelinearnog mapiranja signal se komprimira s razine okolne buke (cca do 100 dB) na razinu električno evociranog potencijala (cca 10 dB).

4) Modulacija: Komprimirana envelopa (kao modulacijski signal) amplitudno modulira bifazične pulseve (kao prijenosne signale) fiksnog trajanja i ritma okidanja (eng. *firing rate*). Originalni zvuk, spektralne envelope i različiti modulacijski pojasevi riječi "pan" prikazani su na slici 3.17.



Slika 3.17. Spektralne envelope i pojasevi modulacije [56]

Tako modulirani bifazični pulsevi okidaju na elektrodama nesimultano, tj. ni u jednom trenutku istodobno ne okidaju više elektroda te tako sprječavaju negativne posljedice moguće interferencije. Suvremeni uređaji s *firing rateom* od 1000 do 2000 pulseva u sekundi po elektrodi korisnicima omogućavaju zadovoljavajuću rezoluciju. Amplitudno modulirani *pulse train* prikazan na slici 3.18. predstavlja konačni output jedne od elektroda.



Slika 3.18. Amplitudno modulirani pulse train [57]

Aktivnost elektroda prikazuje se spektrogramom s električnim aktivnostima po frekvencijskom području ili elektrodogramom s korištenim elektrodama kao na slici 3.19. za rečenicu "A large size in stockings is hard to sell". Spektrogram je pseudo 3D grafički prikaz na kojemu x os predstavlja vrijeme, a y os frekvenciju te u ovom slučaju i mjesto stimulacije jer su frekvencije povezane s elektrodama. Bojom je označen intenzitet, tj. amplituda stimulacije bifazičnog pulsa. Zumiranjem segmenta elektrodograma vidljivo je da je u svakom trenutku aktivna samo jedna elektroda.



Slika 3.19. Spektrogram i elektrodogram iste rečenice [54]

U slučaju sa slike 3.19. aktivno je samo 8 elektroda. Suvremeni uređaji raspolažu s maksimalno 22 elektrode čime je ograničena rezolucija zvuka. Na kvalitetu zvuka utječe i broj pulseva po sekundi. Slika 3.20. prikazuje isti originalni zvuk jednog kanala/elektrode pretvoren u električne signale s 200 i 2000 pulseva po sekundi.



Slika 3.20. Razlike u firing rateu istog originalnog zvuka [58]

Komunikacija interne i eksterne jedinice odvija se radiofrekvencijama kroz kožu. Obrađeni se signal iz mikroprocesora indukcijskom zavojnicom šalje u internu jedinicu u kojoj se dekodira prema shemi na slici 3.15. Parametri koji se proslijeđuju stimulatoru su ciljana elektroda, amplituda i trajanje pulsa te razmak između pulseva za svaku elektrodu (eng. *puls gap*). Pulsevi moraju biti bifazni jer dugotrajna stimulacija monofaznim pulsevima pozitivnog ili negativnog naboja može uzrokovati narušavanje ravnotežnog potencijala na mjestu stimulacije. Prije slanja signala potrebno je izvršiti *bit coding*, najčešće po ASK (Amplitude shift leying) postupku, *frame coding* i *back telemetry* [54]. Osim informacije o zvuku, indukcijskom se zavojnicom prenosi i energija za rad unutarnje jedinice. Trenutni dosezi iznose 20 do 40 mW s cca 40 % efikasnosti [54]. Prijenos energije povećava se s porastom zavojnice, ali ograničen je praktičnim i ergonomskim zahtjevima korisnika.

Interna se jedinica sastoji od recievera i stimulatora kojima se upravlja ASIC (Application Specific Integrated Circuit) čipom koji se dijeli na *forward pathaway* i *backward pathaway*. U *forward pathaway* uključeni su dekođer radiofrekvencijskog signala, sustav za provjeru grešaka i distribusijcki sustav koji programabilnih strujnih izvora i multipleksera šalje adekvatan signal do pojedine elektrode u pravom trenutku. *Backward pathaway* uključuje povratnu telemetriju koja šalje podatke o radu unutarnje jedinice i interakciji sustava s tkivom (potencijali na elektrodama, impedancija, odgovori neurona itd). Elektrode mogu biti spojene monopolarnom konfiguracijom, tj. s referentnom elektroda jedna od neaktivnih elektroda u pužnici.

Elektrode se izrađuju uglavnom od legure platine i iridija omjera 9:1 na podlozi od silikonske gume. Nekoliko izvedbi s tehničkim opisom prikazano je u tablici 3.2.

	Current electrode arrays					Experimental electrode arrays		
Parameters	Advanced Bionics HiFocus 1J	Advanced Bionics Helix	Cochlear Contour Advance	Med-El Combi 40+	Med-El FlexSoft	Cochlear Hybrid	Cochlear Hybrid-L	Med-El FlexEAS
Active Length	17mm	13.25mm	15.5mm	26.4mm	26.4mm	6mm	15mm	20.9mm
Total Length	20mm	20mm	25mm	31.5mm	31.5mm	6mm/10mm	16mm	25mm
Carrier Material	Silicon rubber (LSR-70)	•	Silicon rubber (LSR-30)	Silicon rubber (LSR-40)		Silicon rubber (LSR 30)		Silicon rubber (LSR-40)
Carrier Diameter (base to tip)	0.8-0.4mm	1.16- 0.66mm 1.2-0.7mm	0.8-0.5mm	0.8x0.78mm at base 0.58x0.48mm at apex			0.35x0.25 mm at tip	0.8x0.78mm at base 0.58x0.35mm at apex
Number of Electrodes	16	16	22	12 pairs	7 basal pairs + 5 apical singles	6	22	7 basal pairs + 5 apical singles
Spacing	1.1mm	0.85mm	0.75mm	2.4mm	2.4mm	0.75mm	0.75mm	1.9mm
Shape	Straight	Pre-curved	Pre-curved	Straight	Straight	Straight	Straight	Straight
Stylet	No	Yes	Yes	No	No	No	No	No

Tablica 3.2. Popis primijenjenih i eksperimentalnih elektroda [54]

Pri samom procesu ugradnje, tj. umetanja elektroda u pužnicu, potrebno je voditi računa o načinu i dubini umetanja kako se ne bi oštetile osjetljive strukture u *scali tympani*. Umetanje se u nekim izvedbama potpomaže sondom (eng. *Stylet*) s ciljem smanjenja grubih kontakata s unutarnjim strukturama kao na slici 3.21. Zbog dimenzija *scale tympani* i još uvijek nedovoljno fleksibilnim i tkivu neškodljivim izvedbama elektroda, sigurnim i rutinskim smatra se umetanje do 400°. Sam operativni zahvat rutinska je procedura i traje 3 do 4 sata.



Slika 3.21. Umetanje elektroda poptomognuto sondom [54]

Kratak pregled povijesnog razvoja tehnologije umjetne pužnice dan je na slici 3.22.



*Slika 3.22. Pregled povijesnog razvoja umjetne pužnice* [54]

Prema Wilsonu i Dormanu [59] za daljnji je napredak u performansama umjetnih pužnica potrebno raditi na sljedećim koracima:

- razvoj sustava s većim brojem elektroda
- razvoj novih modova za precizniju prostornu kontrolu stimulacije
- bolje moduliranje fundamentalne frekvencije (najniža frekvencija periodičkog valnog oblika; npr. za muški glas 85-180 Hz, a za ženski 165-255 Hz)
- primjena EAS principa (Electric and acoustic stimulation) za korisnike s djelomičnim gubitkom sluha
- očuvanje postojećih zdravih struktura unutarnjeg uha (prvenstveno neurona i osjetilnih slušnih stanica) metodama stimulacije i farmakološkim pripravcima
- razvoj strategija za oponašanje kompleksnih procesa i interakcija u zdravoj pužnici
- novi dizajn elektroda i nosača kako bi se što više približili neuronima
- potpomaganje kretanja i rasta neurona prema elektrodama

3.3.4. Neuroanatomical gap

Pri umetanju nosača implantata s elektrodama u pužnicu nije moguće ostvariti idealan kontakt svih elektroda s ciljanim primarnim auditornim neuronima. Razmak između elektroda i neurona naziva se neuroanatomska šupljina (eng. *neuroanatomical gap*: NAG).

Problematiku NAG-a prvi su obradili Shepherd et al. [60] promatrajući vezu između položaja elektroda unutar *scale tympani* mačke i razine praga pobuđivanja auditornih neurona moždanog debla (eng. *evoked auditory brainstem responses*: EABR) kao metode potvrde prenesenog signala s elektroda na primarne auditorne neurone u pužnici. Studija je pokazala značajne razlike u iznosu EABR-a za različite položaje elektroda (slika 3.23.).



Slika 3.23. EABR s obzirom na položaj elektrode [60]

Gstoettner et al. [61] su na temelju rendgenskih snimaka *scale tympani* za 8 različitih slučajeva i 3 vrste elektroda na ljudskim truplima s umetanjem implantata do točke otpora dobili jasan i realan prikaz položaja elektroda u presjeku pužnice (Slika 3.24.).

Hahnewald et al. [62] istraživali su neposredan utjecaj NAG-a na ekscitabilnost primarnih auditornih neurona miševa. Rezultati su pokazali značajno slabije odgovore neurona s porastom udaljenosti od elektroda (Slika 3.25.).

O' Leary et al. [63] pristupili su problematici NAG-a prijedlogom regeneracije dendrita primarnih auditornih neurona prema elektrodi pomoću neurotrofina (NT-3) i faktora rasta (BDNF).



Slika 3.25. Veza NAG-a i ekscitabilnosti neurona [62]



Slika 3.24. Rendgenska snimka presjeka implantata s elektrodama u pužnici [61]

Navedene studije otvorile su novo područje interesa u slušnoj protetici. Savladavanje NAG-a potencijalno je koristan novi pristup kod dizajniranja neuroelektroničkih sučelja kao alata u istraživanju i razvoju temeljnih tehnologija umjetnih pužnica.

# 4. OSNOVNE METODE U ELEKTROFIZIOLOGIJI

Prema općeprihvaćenoj definiciji elektrofiziologija je grana fiziologije koja proučava električna svojstva stanica i tkiva mjereći i stimulirajući promjene napona ili struje. U neuroznanosti glavni predmet interesa elektrofiziologije je električna aktivnost neurona, s naglaskom na AP, koja se može promatrati na pojedinačnoj i na makroskali [64]. Povijesni razvoj elektrofiziologije treba promatrati u kontekstu paralelnog razvoja prirodnih i medicinskih s jedne, te tehničkih znanosti s druge strane. Prvom primjenom u kliničkim ispitivanjima smatra se eksperiment iz 1967. u kojem su Durrer i Wellens ostvarili kontrolu aritmije pacijentu s Parkinson-White sindromom [65]. Usporedno s tim razvija se primjena i u drugim granama medicine i biotehnologije, pa tako i u području neuroznanosti. U ovom poglavlju ukratko su predstavljene najčešće korištene metode, opisani su temeljni principi funkcioniranja, razvoj i upotreba te usporedba specifičnih karakteristika navedenih metoda, shematski prikazanih na slici 4.1.



Slika 4.1. Metode snimanja u elektrofiziologiji [66]

Prikazane su sljedeće metode (u sljedećim potpoglavljima predstavljene zajedno s naglaskom na patch clamp i ekstracelularne metode):

- a) Patch clamp tehnika bez prodiranja u stanicu
- b) Patch clamp tehnika s prodiranjem u stanicu
- c) Ekstracelularno snimanje
- d) Snimanje s tzv. Mushroom-shaped electrodes
- e) Snimanje nanopilarnim elektrodama bez probijanja membrane
- f) Snimanje nanopilarnim elektrodama s probijanjem membrane
- g) Snimanje upravljačkom elektrodom (eng. Gate) MOSFET-a
- h) Planarni patch clamp

Metode snimanja neurofizioloških aktivnosti po mjestu snimanja načelno se dijele na intracelularne i ekstracelularne. Kod intracelularnih metoda snimajuća elektroda, bez obzira na tehničku izvedbu, u direktnom je kontaktu sa staničnim medijem. Ovisno o izvedbi, kod nekih metoda dolazi do miješanja medija stanice i medija iz okruženja elektrode, a kod nekih samo do kontakta elektrode i staničnog medija. Kod intracelularnog se snimanja promatra neposredan učinak djelovanja ionskih struja.

Kod ekstracelularnog snimanja ne dolazi do direktnog kontakta između staničnog medija i elektrode. Snimljeni signali rezultat su međudjelovanja ionskih struja i okoline. Pod okolinom se smatra okruženje stanice u mjestu snimanja (npr. stanična kultura kod *in vitro* snimanja) ili utjecaj okolnog tkiva (npr. utjecaj tkiva između elektrode i promatranih stanica kod *in vivo* snimanja).

Uz ranije opisane AP-e na kojima je fokus većine snimanja, u staničnoj kulturi (kod snimanja *in vitro*) i promatranom tkivu (kod snimanja *in vivo*) mogu biti prisutne i druge aktivnosti poput postsinaptičkih potencijala ili *local field potentiala* (LFP). LFP je električni potencijal u međustaničnom okruženju (tkivu, mediju, staničnoj kulturi...) koji nastaje kao rezultat disbalansa lokalnoj u koncentraciji iona uzrokovanoj različitim električnim aktivnostima stanica. Može se pojaviti kao zasebni signal ili kao oscilacija, ovisno o okolnostima. Postsinaptički potencijali niz su različitih električnih aktivnosti u predjelu sinapse uzrokovanih izmjenom različitih neurotransmitera među neuronima. Moguće su i manje pojave signala kao rezultat izmjene iona između stanice i okoline ispod praga aktivacije. Razvojem tehnologije snimanja i softverske podrške velika se pozornost posvećuje filtriranju i sortiranju signala različitog podrijetla.

Jedan od važnih faktora pri snimanju aktivnosti neovisno o metodi je *electric coupling*. *Electric coupling* predstavlja "kvalitetu" spoja snimane stanice i uređaja (elektrode za intracelularno ili ekstracelularno snimanje, mikropilara i slično). Mjera *electric couplinga* je omjer maksimalnog napona koji se može snimiti određenom metodom i maksimalnog napona generiranog u promatranoj stanici. Njezin iznos može varirati ovisno o vrsti snimanih stanica, materijalu elektrode i supstrata te tehnologiji snimanja. Shematski prikaz elektrode i neurona zajedno s vrstama signala opisanih u prethodnom paragrafu prikazan je na slici 4.2., a utjecaj mjere *electric couplinga* na vrste navedene signala prikazan je na slici 4.3.



Slika 4.2. Shematski prikaz elektrode, neurona i vrsta signala [66]



Slika 4.3. Utjecaj electric couplinga na karakteristične veličine u elektrofiziologiji [66]

Prema Spiri i Haiju [66], idealna metoda intracelularna snimanja neurofizioloških aktivnosti trebala bi zadovoljavati sljedeće kriterije:

- istovremeno snimanje i stimulacija velikog broja neurona
- održavanje mogućnosti snimanja i stimulacije te stabilnog kontakta s neuronima kroz duži vremenski period
- promatranje aktivnosti u relevantnom intervalu potencijala (od -80 mV do 30 mV)
- mogućnost detekcije postsinaptičkih potencijala i aktivnosti ispod tresholda s malim amplitudama (±0,5 – 10 mV) i trajanjem ispod 1 ms te membranskih oscilacija 1-50 Hz
- mogućnost snimanja akcijskih potencijala trajanja do 500 ms

#### 4.1. Intracelularne metode snimanja: patch clamp

Patch clamp metoda predstavlja zlatni standard u elektrofiziologiji, posebno kada je riječ o znanstvenim primjenama. Razvijena je 1970-ih i 1980-ih godina, a za njezin je razvoj 1991. dodijeljena Nobelova nagrada za medicinu i fiziologiju (Neher i Sakmann). Etimološki je složenica od riječi za zakrpu (eng. *patch*) i stezaljku (eng. *clamp*). Temeljna funkcija metode je mjerenje iznosa aktivnosti kanala na membrani pri influksu i efluksu iona, najčešće kod neurona ili miocita.

Stanične kulture uronjene su u otopinu elektrolita. U staklenoj pipeti standardnog vršnog vanjskog (cca  $1,5 \pm 0,3 \mu m$ ) i unutarnjeg (cca  $1,2 \pm 0,24 \mu m$ ) promjera te dužine (cca 5 cm) ispunjenoj elektrolitskom otopinom (najčešće istovjetnoj ili otopini u Petrijevoj posudi ili citoplazmi stanice, ovisno o metodi mjerenja) nalazi se glavna elektroda (srebro presvučeno srebrovim kloridom; AgCl) priključena na operacijsko pojačalo. Druga elektroda, uronjena otopinu u posudi, također je spojena na operacijsko pojačalo i predstavlja referentnu elektrodu. Pipetom se upravlja posredno preko mikromanipulatora, a postupak se promatra pod mikroskopom. Vrh pipete prisloni se na malo područje na membrani neurona, tzv. *patch*, izvrši se djelomični usis (eng. *suction*) kako bi se spriječilo curenje iona izvan područja *patcha* i stvori se tzv. *gigaseal*, otpora reda veličine gigaohma (G $\Omega$ ). Glavna elektroda registrira promjene u naponu ili struji izazvane influksom i efluksom iona. Na slikama 4.4. i 4.5. su shematski prikazi postavki patch clamp metode.



Slika 4.4. Prikaz patch clamp metode - 1 [67] Slika 4.5. Prikaz patch clamp metode - 2 [68]

#### 4.1.1.Voltage clamp i current clamp

Neurofiziološke aktivnosti mogu se kvantitativno promatrati kroz promjenu napona ili struje na membrani izazvane vanjskim podražajem ili spontanom aktivnošću. Iznosi napona i struje pojednostavljeno su definirani Ohmovim zakonom (I = U / R). S obzirom da se pri aktivaciji ionskih kanala događaju promjene i u struji (influks i efluks iona) i u naponu (promjena membranskog potencijala), za snimanje jedne od dviju veličina potrebno je onu drugu držati konstantnom uz pretpostavku da je otpor R konstantan. Iz toga proizlazi podjela patch clamp metode na dvije tehnike snimanja: voltage clamp i current clamp.

Pri snimanju voltage clamp tehnikom sustav upravlja iznosom napona i mjeri razlike u struji na membrani. Analogno tome, pri snimanju current clamp tehnikom sustav upravlja iznosom struje i mjeri razlike u naponu na membrani.



Slika 4.6. prikazuje i opisuje originalnu voltage clamp metodu koju je 1940-ih osmislio Kenneth Cole, a koju su ranije spomenuti Hodkin i Huxley koristili pri dokazivanju svojih teza.

Slika 4.6. Prikaz i opis originalnog voltage clamp sustava [41]

Snimajuća elektroda mjeri membranski potencijal i uspoređuje ga s potencijalom referentne elektrode. Pojačalo uspoređuje razliku u potencijalu snimajuće i referentne elektrode te kroz treću, emitivnu elektrodu, šalje struju proporcionalnu razlici u naponu koja taj napon stabilizira i drži konstantnim. Napon ostaje isti, a uređaj mjeri struju koja se šalje u neuron. Tako snimljena struja istog je iznosa i s negativnim predznakom u odnosu na struju kationa koji ulaze u membranu, tj. kationa čiji učinak anulira. Na slici 4.7. dan je primjer takve snimke koja prikazuje isti neurofiziološki događaj snimljen voltage clamp i current clamp tehnikom.



Slika 4.7. Usporedba snimljenog signala current clamp i voltage clamp tehnike [69]

U svrhu izazivanja neurofiziološke aktivnosti kod voltage clamp tehnike moguće je strujom koju sustav šalje u neuron depolarizirati membranski potencijal i na taj način ga stabilizirati na razinu koja izaziva pojavu AP-a. Primjerice, neuronu čiji je RMP na -65 mV, a *treshold* na -50 mV, voltage clamp metodom moguće je postaviti potencijal na -40 mV te promatrati struje koje nastaju uslijed pojave AP-a. Tako izazvane struje reda su veličine od nekoliko pA do nekoliko nA. Shema takvog sustava prikazana je na slici 4.5., pri čemu se spajanjem različitih otpora ( $R_{F1}$ ,  $R_{F2}$  i  $R_{F3}$ ) na sklopku S<sub>1</sub> postižu različite stabilne vrijednosti membranskog potencijala. Također, moderan sustav kao na slici 4.5. snimanje i regulaciju vrši istom elektrodom (smjer struje  $I_{cell}$ ) za razliku od originalne inačice sa slike 4.6.

Current clamp tehnika mjeri promjene u membranskom potencijalu izazvane strujnom stimulacijom. Signal dobiven ovom tehnikom predstavlja sam akcijski potencijal. Slika 4.8. prikazuje shemu current clamp konfiguracije.



Slika 4.8. Shematski prikaz current clamp konfiguracije [70] Slika 4.9. Bridge balance [70]

Klasična shema current clampa sastoji se od dva operacijska pojačala, A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>. Pojačalo A<sub>2</sub> je izvor struje *I* određenu zadanim naponom  $V_{cmd}$  koja se regulirana otpornikom R<sub>0</sub> šalje u mikropipetu i potom u stanicu. Pojačalo A<sub>1</sub> služi kao *unity gain buffer* kojemu faktor pojačanja iznosi 1. Njegova funkcija je smanjenje struje povučene iz izvora (neurofiziološka aktivnost stanice) pomoću visokog otpora reda veličine većeg od otpora mikropipete i izvora, tj. stanice. Signal ( $V_p$ ). predstavlja napon na mikropipeti. On je zbroj napona na membrani (akcijskog potencijala) i pada napona na mikropipeti. Da bi se riješio problem razlike u naponima i generira se signal proporcionalan umnošku struje u mikropipeti i otpora mikropipete koji se oduzme od ukupnog napona  $V_p$ . Ovako dobiven signal  $V_m$  predstavlja pravu vrijednost akcijskog potencijala uz očuvanje izvornog oblika signala. Navedena tehnika rješavanja problema naziva se *bridge balance* i prikazana je na slici 4.9. Iznos signala koji se oduzima određen je kalibriranjem prije izvođenja pokusa.

Drugi problem predstavljaju spojni potencijali (eng. *junction potential*) koji nastaju na mjestima kontakta različitih vodiča. U current clamp konfiguraciji to su spoj žice pojačala i elektrolita te spoj dvaju elektrolita na vrhu pipete (ukoliko je pokusom zadano). Ovaj problem rješava se DC offsetom reda veličine mV.

# 4.1.2. Patch clamp: tehnike snimanja

Osim po outputu snimanja (membranski potencijal, ionske struje) patch clamp metoda dijeli se i po načinu izvođenja snimanja. Na slici 4.10. prikazane su neke od tehnika.



Slika 4.10. Patch clamp metoda s obzirom na način izvođenja [71]

Četiri su najčešće korištene tehnike:

- Cell-attached:
  - o pipeta prislonjena uz stijenku stanice
  - $\circ$  suction manjeg intenziteta  $\rightarrow$  gigaseal
  - pogodno za snimanje akcijskih potencijala
  - o nemogućnost utjecaja na unutarnje procese stanice
  - za snimanje nekih aktivnosti (ligandi) potrebno uključiti neurotransmitere u fluid s elektrolitima u pipeti
  - o stabilno održavanje konfiguracije snimanja
- Whole-cell:
  - o prethodni korak: cell attached
  - o pipeta prislonjena uz stijenku stanice
  - $\circ$  suction većeg intenziteta  $\rightarrow$  pucanje membrane
  - o postupno miješanje elektrolita u pipeti s citoplazmom → preporučljivo izvršiti snimanje prije potpunog prodora elektrolita u stanicu zbog gubitka svojstava
  - o prednost: bolji pristup elektrode unutrašnjosti stanice
  - o pogodno za snimanje akcijskih potencijala
- Inside-out:
  - o prethodni korak: cell attached
  - o patch se pipetom odvaja od stanice i stavlja u otopinu ciljanih svojstava
  - o reakcija kanala u različitim uvjetima ovisno o otopini

- Outside-out:
  - o prethodni korak: whole-cell
  - o fluid s elektrolitima u pipeti simulira citoplazmu
  - o mogućnost mjerenja ionskih struja na istom mjestu za više različitih medija
  - $\circ$  zahtjevna tehnika  $\rightarrow$  potreban iskusan rukovatelj

Teoretski bi svi signali snimljeni u nepromjenjivim uvjetima na istom neuronu kroz dulji vremenski period trebali imati isti oblik, trajanje i amplitudu. Tehničke nesavršenosti u sustavu, lokalne razlike u otporima, nehomogenosti unutar samog neurona i ranije navedeni *coupling coefficient* mogu uzrokovati neznatne razlike u točnim mjerenjima. Uzrok različitim izmjerenim vrijednostima mogu biti i greške, poput primjerice pogreške u mjerenju aktivnosti ionskih kanala uzrokovane generiranjem transmembranskog napona pri snimanju cell attached metodom [72].

## 4.1.3. Planarni patch clamp

Prednosti klasične patch clamp metode između ostalog su standardiziranost protokola i procedura, dobro poznavanje teorijskih osnova, razvijena i široko dostupna tehnologija, točnost i preciznost te predvidljivost i ponovljivost rezultata. Nedostatci patch clamp metode prema Chenu et al. [73] su nedovoljan protok (eng. *throughput*) podataka (mjeri se u *data points per day*) te nemogućnost izmjene medija bez stručnog i vještog rukovatelja. Također se navodi i nemogućnost snimanja neuronskih mreža, tj. istovremenog ukupnog rezultata aktivnosti većeg broja neurona na nekoj površini.

Za navedene je probleme od 1990-ih za navedene ponuđeno nekoliko potencijalnih rješenja različitih tehničkih izvedbi i sličnog koncepta. Na supstratu izrađenom od različitih materijala uzgoji se veći broj neurona. Jedan dio neurona membranom nalegne na neki od otvora (eng. *aperture*) jednog od čipova (najčešće na bazi silicija) na supstratu (najčešće SiO<sub>2</sub>) ispod kojeg se nalazi određeni medij. Medij kao i kod klasičnog patch clampa ovisno o potrebi

može biti sličan i različit u odnosu na intracelularni medij. Također, kao i kod klasičnog patch clampa potrebno je postići gigaseal. Usisom se postiže efekt cell-attached tehnike. а primjenom tlaka koji probija membranu na mjestu otvora postiže se whole-cell tehnika snimanja. Slika 4.11. prikazuje shemu planar patch clamp konfiguracije u voltage clamp načinu rada s mjerenjem prosječne struje svih promatranih neurona.



Slika 4.11. Shematski prikaz planar patch clamp metode [74]

Cilj eksperimenta bila je analiza učinka kemijski spojeva tetrakain, lidokain i 4-aminopiridin na gen hERG kodira koji protein  $K_V11.1$ , gradivni protein kalijevih ionskih kanala. Navedeni ionski kanali utječu na repolarizacijsku struju srčanog mišića te samim time direktno na srčani ritam. Na supstrat sa 64 kružna otvora dimenzija 1-2 µm dodana je kultura s uzgojenim stanicama. Aplikacijom *suctiona* i probijanjem membrane postiže se *whole cell* tehnika snimanja. Mjeri se ukupni iznos svih ionskih struja izazvanih dodavanjem spojeva te se dijeljenjem tog iznosa umanjenog za iznos *leak currenta* sa 64 dobije prosječan učinak spoja na stanicu [74].

Prednosti ovakvog pristupa su jasne. U odnosu na klasični patch clamp moguće je promatrati utjecaj određenog faktora (npr. lijeka, anestetika i slično) na veliki broj stanica istovremeno, zbirno ili u prosjeku, te na taj način ubrzati istraživanja. Problemi s kojima se susreće u praksi su perfuzija neurona medijem koji otežava dugotrajnije snimanje te ostvarivanje *gigaseala* čiju vrijednost nije uvijek lako postići na potrebnom iznosu. Primjerice, kod prethodno opisanog eksperimenta postignute su vrijednosti *gigaseala* u intervalu od 50 do 120 M $\Omega$ , dok su se za isti eksperiment proveden klasičnom tehnikom te vrijednosti kretale u intervalu od 50 do 300 M $\Omega$ . Na slici 4.12. različite su izvedbe planar patch clamp metode.



Slika 4.12. Izvedbe planar patch clamp tehnike [75]

#### 4.2. Ekstracelularne metode snimanja

Ekstracelularnim se metodama smatra široki spektar tehnički različitih metoda snimanja svih električnih neurofizioloških aktivnosti prisutnih u području snimanja. Područje snimanja mogu predstavljati površina tkiva u kojem se aktivnost generira (npr. elektrokortikografija; ECoG), površina tkiva u kojem se aktivnost ne generira (npr. elektroencefalografija; EEG) ili međustanični medij (npr. *in vitro* ispitivanja staničnih kultura). Svrha snimanja varira od znanstvenih eksperimenata ispitivanja temeljnih svojstava neurona do direktne medicinske dijagnostike. Metode se razlikuju i po samom principu rada, vremenskoj i prostornoj rezoluciji snimanja, trajanju snimanja, obliku, materijalu i rasporedu elektroda itd. U ovom poglavlju ukratko su prikazani osnovni principi rada ekstracelularnih metoda, njihov razvoj i upotreba, usporedba s ostalim metodama te daljnja tehnološka perspektiva s pripadajućim problemima i ograničenjima.

#### 4.2.1. Vrste i procesiranje signala kod ekstracelularnih metoda snimanja

Glavna razlika između ekstracelularnog i intracelularnog snimanja sam je signal koji se snima. Dok se s intracelularnim metodama snima izolirani segment neurofiziološke aktivnosti neurona, ekstracelularnom metodom snima se signal koji nastaje kombinacijom aktivnosti različitih izvora i karakteristika. Prema Buzsaki et al. [76], razlikuju se sljedeće aktivnosti:

- a) Akcijski potencijali
- b) Sinaptičke i postsinaptičke aktivnosti
- c) Aktivnosti izazvane kalcijem (eng. *Calcium spikes*)
- d) Intrinzične struje i rezonance
- e) Spike afterhyperpolarizations i down stanje
- f) Interakcije neurona i glijalnih stanica
- g) Efaptični efekt

Pri snimanju ukupne aktivnosti važno je uzeti u obzir pojedinačni utjecaj svake od ovih aktivnosti te, ukoliko je potrebno, razdvojiti ih od ciljane aktivnosti, najčešće AP-a. Svaka od navedenih aktivnosti ima svoje specifične karakteristike poput amplitude, trajanja, oblika, učestalosti pojavljivanja itd. LFP nastaje superponiranjem svih signala i ima učinak na signal u cjelini (agregirani signal).

a) Akcijski potencijal: Akcijski potencijali detaljnije su obrađeni u prethodnoj cjelini. Karakteriziraju ih relativno velike amplitude, uniforman oblik i kratko trajanje (> 2 ms)

b) Sinaptičke i postsinaptičke aktivnosti: Sinaptičke i postsinaptičke aktivnosti rezultat su prelaska uglavnom natrijevih i kalcijevih iona u neurotransmiterima iz jednog neurona u drugi. Pritom se događa prijelaz iz ekstracelularnog u intracelularno područje što dovodi do lokalnog ekstracelularnog ponora (eng. *sink*). Da bi se postigla elektroneutralnost ponor se balansira ionskom strujom suprotnog smjera iz intracelularnog područja. Ovisno o izvoru ove aktivnosti mogu imat različit doprinos ukupnom potencijalu (amplituda i trajanje).

c) *Calcium spikes: Spikeovi* izazvani strujama Ca<sup>2+</sup> iona trajanja su 10 do 100 ms. Mogu biti izazvani pri djelomičnom povratnom širenju akcijskog potencijala na kratkom segmentu neurona.

d) Intrinzične struje i rezonance: Dovoljno snažna intracelularna depolarizacija može se poklapati s rezonantnim svojstvima membrane i izazvati samoodržive oscilacije napona. Različite stanice imaju različite frekvencije i teško je s velikom sigurnošću predvidjeti reakciju. Utjecaj rezonance na konačni LFP može biti raznolik, s obzirom na to se sastoji od amplitude i frekvencije.

e) *Spike afterhyperpolarizations* i *down* stanje: Promjena intracelularne koncentracije jedne vrste iona uslijed različitih dugotrajnih neurofizioloških aktivnosti može uzrokovati influks druge vrste iona preko kanala koji se aktiviraju ligandima. Ove pojave znatno se razlikuju kod različitih stanica i procesa. Primjerice, kod jedne faze sna mogu biti periodičke prirode, a u određenim okolnostima mogu trajati do dvije sekunde. *Down* stanje smatra se stanjem ispod RMP-a. Pri ovim pojavama moguća je nagla periodička izmjena *spikeova* i suprotnog stanja, tj. *down* stanja.

f) Interakcije neurona i glijalnih stanica: Promjene potencijala moguće su i kod glijalnih stanica. One se u pravilu odvijaju znatno sporije od promjene potencijala neurona, bez obzira o vrsti neuronske aktivnosti.

g) Efaptični efekt: Efaptični efekt je fenomen pri kojem depolarizacija jednog električno aktivnog neurona može uzrokovati hiperpolarizaciju drugog električno neaktivnog neurona ako se nalaze u fizičkom kontaktu. Prisutan je, između ostaloga, kod nekih epileptičnih napadaja.

Slika 4.13. prikazuje ukupni snimljeni signal kao zbroj akcijskog potencijala i LFP-a te svaki od tih segmenata zasebno nakon filtriranja po frekvencijskoj domeni.



Slika 4.13. Ukupni signal kao zbroj AP-a i LFP-a [77]

Osnovna tehnika procesuiranja signala za vrijeme snimanja je filtriranje. Suvremeni uređaji za stimulaciju i snimanje opremljeni su elektroničkim sklopovima za učinkovito filtriranje signala po različitim frekvencijama. Jednostavnim visokopropusnim (eng. *high-pass filter*) ili niskopropusnim (eng. *low-pass filter*) filterom moguće je primjerice odvojiti kratki signal akcijskog potencijala od dugog signala glijalne stanice.

Filtriranje je kao tehnika odvajanja signala za vrijeme snimanja učinkovita za razdvajanje signala različitih frekvencija. Klasično filtriranje ne može pomoći u dva slučaja. Prvi je slučaj kada signali različite vrste (npr. sinaptička aktivnost i *calcium spike*) imaju istu frekvenciju. Drugi je slučaj kada signal istog tipa i frekvencije (npr. akcijski potencijal) dolazi iz više različitih izvora, primjerice različitih neurona. Primjer takvog snimanja je klasično *in vitro* ispitivanje staničnih kultura MEA (eng. *microelectrode array*) tehnikom uzgojenih na CMOS (eng. *Complementary metal–oxide–semiconductor*) čipu. Ovaj problem naziva se i *cocktail party problem*, tj. analogno velikom broju govornika na koktel partiju čije je glasove teško raspoznati.

U tim je slučajevima, ukoliko cilj snimanja to traži, potrebno softverskim metodama razdvojiti signale na temelju nekih njihovih obilježja i pridodati im izvornim neuronima. Takva procedura zove se *spike sorting*. Obilježja mogu biti različita, poput oblika ili širine vala, koeficijenta i monotonosti rasta i pada, iznosa maksimuma i minimuma, latencije u odnosu na podražaj (ukoliko podražaj postoji), *peak to peak* vrijednosti i slično. Neki od alata za *spike sorting* su: ClusterLizard (C++), bpsort i Wave\_clus (MATLAB), OpenElectrophy (Phyton), SpikeSorter.jl (Julia) itd.



Slika 4.14. Izvođenje spike sorting postupka u alatu Wave\_clus [78]

*Spike sorting* postupak složen je od različitih numeričkih metoda među kojima se ističe *Indepentend component analysis* – ICA, posebno pogodna za vrijednosti signala koji se ne ponašaju po Gaussovoj razdiobi. Prema Stoneu [79], temeljni principi miješanja signala za ICA metodu su:

- nezavisnost: iako su pojedinačni signali nezavisni, ukupni signal nije nezavisan.
- normalizacija: skupovi različitih podataka koji pojedinačno nemaju Gaussovu razdiobu u globalu teže Gaussovoj razdiobi.
- kompleksnost: skup različitih signala uvijek je kompleksniji od njegovih pojedinačnih komponenti.

# 4.2.2. Tehničke izvedbe i ograničenja ekstracelularnih metoda snimanja

Navedeni CMOS čip vrsta je MOSFET-a (eng. *metal–oxide–semiconductor field-effect transistor*). Mikroelektrode reda veličine nekoliko µm postavljeni su na površinu čipa na bazi silicija i povezani su (npr. preko MISO-MOSI Serial peripheral interfacea) na uređaj za stimulaciju/snimanje. Glavna je prednost ove konfiguracije mogućnost istovremenog snimanja i stimulacije iste elektrode na čipu što omogućava direktno praćenje neurofizioloških aktivnosti.



Slika 4.15. Stanična kultura na CMOS čipu [80]

Na slici 4.15. shematski je prikazana stanična kultura na CMOS čipu, Hierlemann et al. [40]. Prikazani sustav ima 59 760 elektroda spojenih na 2048 zasebnih kanala. Ovakav sustav nudi veliku rezoluciju i mogućnost detaljnog uvida u aktivnosti neurona. Prostorni prikaz aktivnosti ključan je u velikom broju različitih ispitivanja, od temeljnih ispitivanja u znanosti do direktne medicinske dijagnostike. Blok dijagram sustava u cjelini prikazan je na slici 4.16.



Slika 4.16. Blok dijagram sustava za snimanje i stimulaciju [80]

Sustavom na slici snimljena je aktivnost hipokampalnih neurona štakora nakon 17 i 20 dana *in vitro*, što je prikazano na slici 4.17. Neuron je stimuliran na jednom mjestu.



Slika 4.17. Ekstracelularne snimke aktivnosti neurona [80]

Kod snimanja neurofizioloških aktivnosti, a posebno kod ekstracelularnih metoda, od velike je važnosti iznos omjera signala i šuma (eng. *signal to noise ratio*; SNR). Za vrijednosti SNR<1 u neobrađenom signalu (eng. *raw data*) nije moguće razaznati signal od šuma. U takvim je situacijama potrebno primijeniti filtriranje po frekvencijskoj domeni u intervalu očekivane vrijednosti traženog signala. Osim prethodno opisanim klasičnim električnim filterom, problem šuma može se riješiti i korištenjem Fourierove transformacije (eng. *fast Fourier transform*; FFT). Prednosti u odnosu na klasični analogni filter su bolja ponovljivost i veća preciznost u različitim uvjetima, pogotovo ukoliko postoji potreba za filtriranjem jako uskog frekvencijskog raspona.

Osnovne karakteristike MEA sustava su prostorna i vremenska rezolucija. Prostorna rezolucija raste obrnuto proporcionalno s površinom elektrode. Ograničavajući faktor ovog problema je činjenica da i impedancija raste obrnuto proporcionalno s površinom elektrode što znači da za svaki sustav (ovisno o ciljanim signalima, tehničkoj izvedbi i materijalima) postoji granica u kojoj impedancija postaje toliko velika da smanjuje SNR do razine da se otežava očitavanje ciljanog signala. Kao jedno od potencijalnih rješenja tog problema nameće se upotreba nanomaterijala. Ovisnost dimenzija elektroda i šuma prikazana je na slici 4.18.



Slika 4.18. Međuovisnost dimenzija elektrode, impedancije i šuma [77]

Materijali su važni i u kontekstu kompatibilnosti s okolnim tkivom, posebno kod dugotrajnog kontakta s tkivom, primjerice kod implantata. Youngov modul i fleksijska krutost imaju znatan utjecaj na biokompatibilnost. Načelno, vrijednosti bliže vrijednostima moždanog tkiva znače i veću biokompatibilnost. Vrijednosti za neke od najčešće korištenih materijala prikazane su na slici 4.19.



Slika 4.19. Usporedba Youngovog modula i savojne krutosti različitih materijala [77]

Atenuacijski faktor kod ekstracelularnih metoda (utjecaj membrane, medija i okoline) u pravilu se kreće u rasponu od 1/100 do 1/1000. Zbog toga su amplitude signala snimljenih ekstracelularno na znatno nižim vrijednostima od istih signala snimljenih intracelularnim metodama. Usporedba takvog slučaja prikazana je na slici 4.20.



Slika 4.20. Usporedba istih signala snimljenih različitim metodama [66]

Neki od primjera upotrebe ekstracelularnih metoda snimanja neurofizioloških aktivnosti u medicinskoj dijagnostici su:

- elektroencefalografija (EEG)
- elektrokortikografija (ECoG)
- elektrokardiografija (EKG)
- elektromiografija (EMG)

Prostorna i vremenska rezolucija važni su parametri svake metode ispitivanja neurofizioloških aktivnosti, kao i ostale medicinske dijagnostike općenito. Na slici 4.21. navedene karakteristike prikazane su za relevantne dijagnostičke i istraživačke tehnologije.



Slika 4.21. Prostorna i vremenska rezolucija različitih tehnologija [77]

Pred svakom od navedenih tehnika drugačiji su zahtjevi, stoga su i rezolucije drugačije. Ipak, bez obzira na to što suvremene tehnike pružaju relativno dobre mogućnosti snimanja neurofizioloških aktivnosti, napredak na području MEA tehnologije ne prati Mooreov zakon ovisnosti porasta broja tranzistora na mikročipu o vremenu, što je prikazano na slici 4.22.



Slika 4.22. Mooreov zakon za MEA u elektrofiziologiji [77]

Tri su glavna uzroka tom trendu:

- Dimenzije implantata su ograničene utjecajem na tkivo.
- Povećanjem gustoće elektroda i kanala povećava se tehnička složenost sustava snimanja i stimulacije.
- Međuzavisnost dimenzija, impedancije i šuma (slika 4.18.) onemogućuju smanjivanje površine elektroda bez negativnih utjecaja na snimljeni signal.

# 4.3. Kontaktno navođenje u neurofiziologiji

Smjernice Wilsona i Dormana [59] o potrebi novog dizajna elektroda u svrhu približavanja neuronima te potpomaganje kretanja i rasta neurona prema elektrodama sugeriraju novi pristup problematici NAG-a. Ipak, kontaktno navođenje (eng. *contact guidance*: CG) neurona i stanica općenito predmet je istraživanja već dulje vremena. Još 1934. Weiss [81] je razmotrio mehanizme CG-a kod neurona. Na temelju tadašnjih istraživanja i spoznaja definirana su tri mehanizma:

- mehanotaksija
- elektrotaksija
- kemotaksija

Navedeni mehanizmi predstavljaju fenomene usmjerenog kretanja, rasta i razvoja stanice djelovanjem mehaničkih vodilica, električnih impulsa ili kemijskih tvari. Razvojem tehnologije umjetne pužnice i uočavanja potrebe za savladavanjem NAG-a mehanizmi CG-a postali su predmetom interesa dijela neurofizioloških i elektrofizioloških istraživanja pri čemu je posebna pozornost posvećena topografiji supstrata i fenomenu mehanotaksije.

Brojne studije pokazale su sklonost neurona mehanotaksiji variranjem geometrije topografije površine supstrata na mikro i nano razini. Supstrati se načelno mogu podijeliti na tri skupine:

Supstrati s okomitim usmjerenjem struktura topografije površine i kanala

U jednoj od prvih suvremenih studija na području mehanotaksije kod neurona Hirono et al. [81] uzgojili su *in vitro* dorzalne ganglije odraslih miševa na litografski oblikovanim mikrokanalima širine 2 µm i dubine 1 µm. Neuroni su pokazali sklonost usmjerenom rastu po mikrokanalima u odnosu na kontrolnu površinu.

Fozdar et al. [82] uzgojili su *in vitro* hipokampalne neurone embrija štakora na supstratima s kanalima širine 2 µm i rupama promjera 300 nm. Neuroni na supstratima pokazali su značajnu sklonost morfološkoj polarnosti i veću elongaciju neurita u odnosu na kontrolu.



Slika 4.23. Topografija supstrata i utjecaj na polarnost i elongaciju neurita [82]

Ferrari et al. [83] izmjerili su mehanička svojstva na rešetkastoj strukturi i utjecaj dimenzija strukture na morfološke karakteristike diferencijacije PC12 s naglaskom na polarnost. U eksperimentu su korištene širine segmenata rešetke u iznosima od 500 (A), 750 (B), 1000 (C), 1250 (D), 1500 (E), i 2000 (F) nm. S povećanjem širine segmenata raste i udio multipolarnih neurona nakon diferencijacije kao na slici 4.24.



Slika 4.24. Veza polarnosti neurona i topografije rešetke supstrata [83]

Supstrati s nizovima diskretnih struktura topografije površine

Seo et al. [84] su u eksperimentu sa supstratima od h-PDMS-a (polydimethylsiloxane) s nepravilno raspoređenim nano pilarima promjera < 500 nm pokazali sklonost hipokampalnih neurona štakora prema razvijanju izdanaka iz glavnih aksona.

Leclech et al. [85] dokazali su utjecaj topografije na migraciju kortikalnih neurona miševa.

Supstrati s višesmjernom topografijom površine

Dowell-Mesfin et al. [86] na supstratima s višesmjernom topografijom radi boljeg oponašanja ekstracelularnog matriksa ispitali su orijentaciju i rast hipokampalnih neurona embrija štakora. Struktura se sastojala od kvadratnih mikropilara duljine stranice 0,5 i 2  $\mu$ m te međusobnog razmaka u intervalu od 1 do 5  $\mu$ m s korakom od 0,5  $\mu$ m. Najveće usmjerenje i elongacija neurita zabilježena je na uzorku s 1,5  $\mu$ m razmaka.



Slika 4.25. Utjecaj dimenzija strukture na usmjerenje i elongaciju neurita [86]

Kundu et al. [87] kombinirali su kontaktno navođenje mehanizmom mehanotaksije mikropilarima i kemotaksije upotrebom Netrina-1 za s hipotezom o eliminiraciji negativnog utjecaja kemorepelenta Semaphorin3A na rast i usmjerenje hipokampalnih neurona miševa. Rezultati su pokazali sinergijski utjecaj mehanotaksije i kemotaksije.



Slika 4.26. Utjecaj topografije na usmjerenje neurita [87]

Detaljniji utjecaj topografije s mikropilarima na morfologiju primarnih auditornih neurona štakora nakon 7 DIV *in vitro* ispitali su Mattotti et al. [88] te Radotić et al. [89, 90]. Dokazana je jasna pozitivna veza između geometrije površine  $SiO_2$  supstrata i morfoloških karakteristika poput elongacije neurita, površine some te polarnosti neurona. Kao supstrat je korišten CMOS čip bez upotrebe stimulacije.



Slika 4.27. Utjecaj razmaka među pilarima na usmjerenje neurita primarnih auditornih neurona obojanih Tuj1+ markerom [46]

# 5. ZAKLJUČAK I SMJERNICE ZA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA

Uvidom u aktualno stanje tehnologije te suvremenu znanstvenu spoznaju vezanu uz savladavanje NAG-a vidljivo je da postoji znatan prostor za napredak.

Prvo, kontaktno navođenje prepoznato je kao obećavajući pristup opisanoj problematici. Velika je pažnja posvećena mikro i nanotopografiji površine supstrata i njezinom utjecaju na različite stanice i tkiva. Značajan broj radova u fokusu ima neurone i njihovo ponašanje s aspekta rasta, razvoja i kretanja. Moderni alati za analizu slike omogućavaju brzu i efikasnu kvantifikaciju morfoloških karakteristika pomoću kojih je moguće dobiti jasnu sliku o utjecaju pojedinih topografija. Najčešće varirani parametar topografije je dimenzija mikro i nanostruktura na površini čipa. Oblici koji prevladavaju su rešetke, kanali, izbočenja te mikropilari. Parametri dimenzija pretežno su širina i visina strukture te njihov razmak. Uz navedeno ulogu igra i sam raspored struktura s obzirom na kutove pod kojim se međusobno nalaze. Na brojnim je primjerima dokazano da se neuroni mogu do određene mjere navoditi po supstratima te da se može utjecati na njihova morfološka svojstva u pravcu povoljnom za potencijalno savladavanje NAG-a.

Drugo, nanomaterijali s naglaskom na grafen i njegove derivate pokazuju značajan utjecaj na neuronske kulture pri interakciji te kumulativni efekt s fenomenom kontaktnog navođenja, a postojeće metode proizvodnje nanomaterijala te tehnike detekcije i karakterizacije materijala omogućuju visoki stupanj kontrole i analize kvalitete uzorka.

Treće, elektrofiziologija kao znanstveno-tehnička disciplina ima široku primjenu u analizi neurofizioloških karakteristika. Na tržištu postoje brojni MEA sustavi za istraživačku namjenu pomoću kojih je moguće snimati prethodno opisane neurofiziološke aktivnosti, a tehnologija mikročipova razvijena je do razine koja omogućava veliki stupanj prilagodbe specifičnim potrebama.

Peto, ne postoji veliki broj studija koje pobliže istražuju interakciju primarnih auditornih neurona s navedenim tehnologijama. Potrebno je nastaviti s nadogradnjom na dosadašnje studije vezane uz primarne auditorne neurone.

Sve navedeno sugerira da postoji prostor za daljnja istraživanja kombinacijom opisanih pristupa. Razvoj neuroelektroničkog sučelja s MEA-om posebno prilagođene topografije dizajnirane na temelju principa kontaktnog navođenja i utjecaja na morfologiju omogućio bi analizu ponašanja primarnih auditornih neurona *in vitro* pri interakciji s mikrostrukturama površine supstrata. U proces izrade sučelja potrebno je uključiti detaljan dizajn površine čipa prilagođene topografije, visoko precizne tehnologije izrade čipa kao supstrata i napredne metode analize sastava supstrata s naglaskom na plemenite metale kao vodiče i TiO<sub>2</sub> kao materijal elektroda. Potrebno je i koristiti metode detekcije i karakterizacije materijala površine supstrata. Karakterizacija neurofizioloških aktivnosti primarnih auditornih neurona ekstracelularnim elektrofiziološkim tehnikama u kombinaciji s MEA-om mogla bi dati odgovor na pitanje mogu li primarni auditorni neuroni ostati neurofoziološki aktivni i u takvim okruženjima te postoji li potencijal za napredak u razvoju eksperimentalnih metoda za savladavanje NAG-a.
## LITERATURA

[1] Buzea, C. et al.: "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity", Biointerphases, Vol. 2, 2007.

[2] Wallace, P. R.: "The band theory of graphene", Physical review, Vol. 71, 1947.

[3] Novoselov, K. S., Geim, A., et al.: "Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films", Science, Vol. 306, 2004.

[4] Shapton, Krista: ilustracija s Interneta, https://i0.wp.com/sitn.hms.harvard.edu/wp-content/uploads/2011/06/graphene\_fig2.jpg, pristupljeno 18.1.2024.

[5] Neto Castro, A. H., et al.: "The electronic properties of graphene, Reviews of modern physics", Vol. 81, 2009.

[6] S Interneta, https://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/bindung/hybridisierung.html, pristupljeno 22.1.2024.

[7] S Interneta, http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/724/741576/Instructor\_Resources/Chapter\_01/Te xt\_Images/FG01\_15.JPG, pristupljeno 7.1.2020.

[8] S Interneta, https://en.wikipedia.org/wiki/File:Pi-Bond.svg, pristupljeno 7.1.2020.

[9] Hatsugai, Y.: S Interneta, https://courses.physics.illinois.edu/phys596/fa2013/StudentWork/team7\_final.pdf, pristupljeno 25.1.2024.

[10] Novoselov, K. S. et al: "Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene", Nature, Vol. 438. 2005.

[11] Bolotin, K. I.: " Ultrahigh electron mobility in suspended graphene", Solid State Communications, Vol. 146, 2008.

[12] Bunch, J. S.: Doktorska disertacija naslova "Mechanical and electrical properties of graphene sheets", Cornell University, 2008.

[13] Hone, J. et al.: "Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene", Science, Vol. 321, 2008.

[14] Wang, G. et al.: "Measuring Interlayer Shear Stress in Bilayer Graphene", Physical Review Letters, Vol. 119, 2017.

[15] Zhang, P. et al.: "Fracture toughness of graphene", Nature Communications, Vol. 5, 2014.

[16] Raccichini, R. et al.:,,The role of graphene for electrochemical energy storage", Nature Materials, Vol. 16, 2015.

[17] Liu, L. et al.: "Defects in Graphene: Generation, Healing, and Their Effects on the Properties of Graphene: A Review", Journal of Materials Science & Technology, Vol. 31, 2015.

[18] Meyer, J. C. et al.: "Direct Imaging of Lattice Atoms and Topological Defects in Graphene Membranes", Nano Letters, Vol. 8, 2008.

[19] Lahiri, J. et al.: "An extended defect in graphene as a metallic wire", Nature Nanotechnology, Vol. 5m 2010.

[20] Demon, S. Z. N. et al.: "Graphene-based Materials in Gas Sensor Applications: A Review", Sensors and Materials, Vol. 32, 2020.

[21] Jayasena, B. et al.: "A novel mechanical cleavage method for synthesizing few-layer graphenes", Nano Express, Vol. 6, 2011.

[22] Chen, J. et al.: "Continuous mechanical exfoliation of graphene sheets via three-roll mill", Journal of Material Chemistry, Vol. 22, 2012.

[23] Hernandez, Y. et al.: "High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite", Nature Nanotechnology, Vol. 3, 2008.

[24] Bracamonte, M. V. et al.: "On the Nature of Defects in Liquid-Phase Exfoliated Graphene", Jpurnal of Physical Chemistry, Vol. 118, 2014.

[25] Zhang, Y. et al.: "Review of Chemical Vapor Deposition of Graphene and Related Applications", Accounts of Chemical Research, Vol. 46, 2013.

[26] Naseem, H. A., Al-Shurman, K. M.: "CVD Graphene Growth Mechanism on Nickel Thin Films", poster, Proceedings of the 2014 COMSOL Conference in Boston, 2014.

[27] Novoselov, K.S. et al.: "A roadmap for graphene", Nature, Vol. 490, 2012.

[28] Gardiner, D.J., Graves, P. R.: "Practical Raman spectroscopy", Springer, 1989.

[29] S Interneta, https://ramanlife.com/applications/raman-spectroscopy-carbon-materials/, pristupljeno 29.4.2024.

[30] Zubeltzu, J. et al.: "Knock-on damage in bilayer graphene: indications for a catalytic pathway", Physical Review B, Vol. 88, 2013.

[31] Rezaee, R. et al.: "Fabrication of ultrathin graphene oxide-coated membrane with hydrophilic properties for arsenate removal from water", Journal od Advances in Environmental Health Research, Vol.4, 2016.

Veitinger, S., DeRose, J., Greb, C.: "What is the Patch-Clamp Technique? An introduction to patch clamping", 2023., s Interneta, https://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/, pristupljeno 18.8.2023.

[32] Kostarelos, K. et al.: "Graphene in the Design and Engineering of Next-Generation Neural Interfaces", Advanced Materials, Vol. 29, 2017.

[33] Park et al.: "Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene", Advanced Materials, Vol. 26, 2011.

[34] Guo, R. et al.: "Accelerating bioelectric functional development of neural stem cells by graphene coupling: Implications for neural interfacing with conductive materials", Biomaterials, Vol. 106, 2016.

[35] Tang, M. et al.: "Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films", Biomaterials, Vol. 34, 2013.

[36] Zhang, K. et al.: "Aligned PLLA Nanofibrous Scaffolds Coated with Graphene Oxide for Promoting Neural Cell Growth", Acta Biomaterialia, Vol. 37, 2016.

[37] Sakai, K. et al.: "Graphene-based neuron encapsulation with controlled axonal outgrowth", Nanoscale, Vol. 11, 2019.

[38] Yang, K. et. al.: "Graphene Oxide Hierarchical Patterns for the Derivation of Electrophysiologically Functional Neuron-like Cells from Human Neural Stem Cells", Applied Materials and Interfaces, Vol. 8, 2016.

[39] Du, X. et al.: "Graphene microelectrode arrays for neural activity detection", Journal of Biological Physics, Vol. 41, 2015.

[40] Kumar, R. et al.: "Graphene-Based Nanomaterials for Neuroengineering: Recent Advances and Future Prospective", Advanced Functional Materials, Vol. 31, 2021.

[41] Grupa autora: "Neuroscience: Third Edition", Sinauer Associates, Sunderland, 2004.

[42] Hair cells of inner ear. Dr David Furness. Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0), s Interneta, https://wellcomecollection.org/works/en4kavac, pristupljeno 10.8.2023.

[43] Herculano-Houzel, S.: "The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain." Frontiers in Human Neuroscience 3, 31, 2009.

[44] S Interneta, https://www.sciencefacts.net/wp-content/uploads/2019/12/Parts-of-a-Neuron-Diagram.jpg, 10.8.2023.

[45] PhysiologyWeb at www.physiologyweb.com, s Interneta, https://www.physiologyweb.com/lecture\_notes/neuronal\_action\_potential/neuronal\_action\_p otential.html, pristupljeno 10.8.2023.

[46] Davis, R. L., Crozier, R. A.: "Dynamic firing properties of type I spiral ganglion neurons", Cell and Tissue Research vol. 361, str. 115–127, 2015.

[47] Tritsch, N. X. et. al.: "The origin of spontaneous activity in the developing auditory system", Nature, Vol. 450, Issue 7166, 2007.

[48] Podaci WHO-a, s Interneta, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss, pristupljeno 11.8.2023.

[49] Storm, K.: "Hearing Aid Unit Sales Increase by 6.5% in 2019, Hearing Aids, Industry News, Surveys & Statistics," s Interenta, https://hearingreview.com/inside-hearing/industry-news/hearing-aid-unit-sales-increased-by-6-5-in-2019, pristupljeno 11.8.2023.

[50] Seitz, P. R.: "French origins of the cochlear implant", Cochlear Implants International Vol. 3, 2002.

[51] Blume, S.S: Poglavlje u knjizi " Sources of Medical Technology: Universities and Industry", Institute of Medicine (US) Committee on Technological Innovation in Medicine, 1995., s Interneta, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232047/, pristupljeno 12.8.2023.

[52] Zeng, F. G.: "Celebrating the one millionth cochlear implant" JASA Express Letters, Vol.2, 2022.

[53] Gaylor J. M. et al.: "Cochlear Implantation in Adults. A Systematic Review and Metaanalysis." JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2013;139(3):265–272.

[54] Zeng, F. G. et al.: "Cochlear Implants: System Design, Integration, and Evaluation", IEEE Reviews in Biomedical Engineering, Vol. 1, 2008.

[55] Goswami, U., Leong, V.: "Speech rhythm and temporal structure: Converging perspectives?", Laboratory Phonology, Vol. 4, 2013.

[56] Leong, V., Goswami, U.: "Acoustic-Emergent Phonology in the Amplitude Envelope of Child-Directed Speech", PLOS ONE, 2015.

[57] McDermott, H. J.: "Music Perception with Cochlear Implants: A Review", Trends in Hearing, Vol. 8, 2004.

[58] Loizou, P. C., Poroy, O.: "The effect of parametric variations of cochlear implant processors on speech understanding", The Journal of the Acoustical Society of America, Vol. 108, 2000.

[59] Wilson, B. S., Dorman, M. F.: "Cochlear implants: a remarkable past and a brilliant future", Hearing Research, Vol. 242, 2008.

[60] Shepherd, R.K., Hatsushika, S., Clark, G.M.: "Electrical Stimulation of the Auditory Nerve: The Effect of Electrode Position on Neural Excitation." Hear Research, Vol. 66, 1993.

[61] Gstoettner, W. et al.: "Intracochlear Position of Cochlear Implant Electrodes." Acta Oto-Laryngologica, Vol. 119, 1999. [62] Hahnewald, S. et al.: "Response Profiles of Murine Spiral Ganglion Neurons on Multi-Electrode Arrays." Journal of Neural Engineering, Vol. 13, 2015.

[63] O'Leary, S.J., Richardson, R.R., McDermott, H.J.: "Principles of Design and Biological Approaches for Improving the Selectivity of Cochlear Implant Electrodes." Journal of Neural Engineering, Vol. 6, 2009.

[64] Scanziani, S., Häusser, M.: "Electrophysiology in the age of light", Nature, Vol. 461, 2009.

[65] M.J.C. Kuijpers, M. J. C.: "History in medicine: the road to clinical electrophysiology", e-Journal of Cardiology Practice, Vol. 21, 2021.

[66] Spira, M. E., Hai, A.: "Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology", Nature Nanotechnology, Vol. 8, 2013.

[67] Vogt, A. K.: Doktorska disertacija na temu: "Synaptic Connectivity in Micropatterned Networks of Neuronal Cells", Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2003.

[68] Harrison, R. R. et al.: "Microchip amplifier for in vitro, in vivo, and automated whole cell patch-clamp recording", Journal of neurophysiology, Vol.113, 2015.

[69] Stanneck, D. et al.: "The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats", Parasites & Vectors, Vol. 5, 2012.

[70] Tehnički vodič: "Axon Guide", Molecular Devices, Treće izdanje, 2012., s Interneta https://www.moleculardevices.com/en/assets/user-guide/dd/cns/axon-guide-to-electrophysiology-and-biophysics-laboratory-techniques, s Interneta, psistupljeno, 18.8.2023.

[71] Hierlemann, A. et al.: "In Vitro Multi-Functional Microelectrode Array Featuring 59 760 Electrodes, 2048 Electrophysiology Channels, Stimulation, Impedance Measurement, and Neurotransmitter Detection Channels", IEEE Journal of Solid-State Circuits, Vol. 52, 2017.

[72] Williams, S. R., Wozny, C.: "Errors in the measurement of voltage-activated ion channels in cell-attached patch-clamp recordings", Nature Communications, Vol. 2, 2011.

[73] Chen, P. et al.: "Development of planar patch clamp technology and its application in the analysis of cellular electrophysiology", Progress in Natural Science, Vol. 19, 2009

[74] Finkel, A. et. al.: "Population Patch Clamp Improves Data Consistency and Success Rates in the Measurement of Ionic Currents", Journal of Biomolecular Screening, Vol. 11, 2006.

[75] Long, Y., Li, Z.: "Drug Screening and Drug Safety Evaluation by Patch Clamp Technique", poglavlje u knjizi "Patch clamp technique", IntechOpen, 2012.

[76] Buzsaki, G. et al.: "The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes", Nature Reviews Neuroscience, Vol. 13, 2016.

[77] Hong, G., Lieber, C. M.: "Novel electrode technologies for neural recordings", Nature Reviews Neuroscience, Vol. 20, 2019.

[78] Pedreira, C., et al.: "How many neurons can we see with current spike sorting algorithms?" Journal of Neuroscience Methods, Vol. 211, 2012.

[79] Stone, J. V.: "Independent component analysis: A tutorial introduction", MIT Press., 2004.

[80] Hierlemann, A. et al.: "In Vitro Multi-Functional Microelectrode Array Featuring 59 760 Electrodes, 2048 Electrophysiology Channels, Stimulation, Impedance Measurement, and Neurotransmitter Detection Channels", IEEE Journal of Solid-State Circuits, Vol. 52, 2017.

[81] Weiss, P.: "In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber", Journal of Experimental Zoology, Vol. 68, 1934.

[82] Fozdar, D. Y. et al.: "Hippocampal neurons respond uniquely to topographies of various sizes and shapes", Biofabrication, Vol. 2, 2010.

[83] Ferrari, A. et al.: "Nanotopographic Control of Neuronal Polarity", Nanoletters, Vol. 11, 2010.

[84] Seo, J. et al.: "Nanotopography-Promoted Formation of Axon Collateral Branches of Hippocampal Neurons" Nano Micro Small, Vol. 14, 2018.

[85] Leclech, C. et al.: "Topographical cues control the morphology and dynamics of migrating cortical interneurons", Biomaterials, Vol. 214, 2019.

[86] Dowell-Mesfin, N. M. et al.: "Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons", Journal of Neural Engineering, Vol. 1, 2004.

[87] Kundu, A. et al.: "Superimposed topographic and chemical cues synergistically guide neurite outgrowth", Lab on a Chip, Vol.13, 2013.

[88] Mattotti, M., Micholt, L., Braeken, D., Kovačić, D.: "Characterization of spiral ganglion neurons cultured on silicon micro-pillar substrates for new auditory neuro-electronic interfaces", Journal of Neural Engineering, Vol. 12, 2015.

[89] Radotić, V., Braeken, D., Drviš, P., Mattoti, M., Kovačić, D.: "Advantageous environment of micro-patterned, high-density complementary metal–oxide– semiconductor electrode array for spiral ganglion neurons cultured in vitro", Scientific Reports, Vol.8, 2018.

[90] Radotić, V., Bedalov, A., Drviš, P., Braeken, D., Kovačić, D.: "Guided growth with aligned neurites in adult spiral ganglion neurons cultured in vitro on silicon micro-pillar substrates", Journal of Neural Engineering, Vol. 16, 2019.

## SAŽETAK

U radu su sažeto opisani prijenos signala u živčanom sustavu te principi funkcioniranja auditornog sustava i umjetne pužnice. Ukazano je na neuroanatomsku šupljinu kao jednu od glavnih zapreka napretku i poboljšanju performansi.

Prikazan je razvoj grafena s osnovnim karakteristikama. Opisane su metode proizvodnje grafena te tehnike detekcije i karakterizacije materijala. Dan je pregled mogućih primjena u području interesa rada s primjerima iz relevantnih studija.

Opisana je elektrofiziologija i njezina uloga u razumijevanju funkcioniranja živčanog sustava s naglaskom na auditorni sustav. Predstavljene su osnovne intracelularne i ekstracelularne tehnike s pregledom neurofizioloških aktivnosti te je prikazan opći razvoj i primjena.

Ukratko je objašnjen fenomen kontaktnog navođenja kao potencijalnog mehanizma za savladavanje neuroanatomske šupljine kroz njegovu upotrebu u elektrofiziologiji i istraživanjima na području neurofiziologije te su prikazani rezultati i spoznaje iz tog područja. Ukazano je na potrebu za kombinacijom elektrofizioloških metoda i kontaktnog navođenja topografijom supstrata kao pristupa navedenoj problematici.

U kontekstu navedenih primjera te stanja u tehnici i trenutne znanstvene spoznaje, dan je okvir za daljnji znanstveno-istraživački rad.