

***In vitro*-uppställning för grundläggande test av mikro- och nanoelektroder menade för kroniska implantat**

Allteftersom nanovetenskapen går från att vara ett abstrakt koncept till konkret verklighet ökar vårt behov av att förstå våra nya verktyg. Med den stora potential inom en mängd olika vetenskapliga områden som nanovetenskapen tillför drivs utvecklingen oundvikligen framåt; inte minst inom biomedicinsfären. Men nanovetenskapens kanske starkaste aspekt – och samtidigt det som gör begreppet svåröverskådligt – är i möjligheten att överbrygga denna enorma, tvärvetenskapliga bredd. Om vi använder oss väl av den aspekten kan vi hitta helt nya infallsvinklar, där nya användningar av material, metoder eller diagnostik uppenbarar sig.

Idag är mikroelektroder en del av den normala arsenalen i flera vetenskapliga fält; bland andra neurobiologi – där de kan användas som registrerande elektroder, för att exempelvis mäta elektrokemisk aktivitet – och neurokirurgi – där de används som implantat. Hjärnkirurgi är ett drastiskt ingrepp, och lämnandet av ett metall- eller halvledarimplantat sker inte utan att irritera vävnad, varför det är en metod som endast används vid allvarliga neurologiska sjukdomar eller syndrom.

Forskning menad att ta fram nya, effektivare implantat – ofta kallade BMI (brain-machine interface) – är huvudsakligen inriktad mot att förbättra två attribut hos implantaten: specificitet och biokompatibilitet. Bådadera kan till stor del förbättras genom användandet av produkter på nanoskalan.

En starkt bidragande anledning till att vilja använda mindre BMI är att reducera vävnadsresponsen i hjärnan. De inflammatoriska och framförallt ärrbildande skyddsmekanismer som sätts igång av främmande (inte biokompatibla) objekt är destruktiva i sammanhanget. Speciellt ärrvävnaden kan störa funktionaliteten hos implantatet, dels genom att ersätta närliggande nervceller – med vilka BMI:et var menat att interagera – med gliaceller (normalt stabiliserande och skyddande celler i hjärnan), dels genom att gliacellerna isolerar BMI:et från nervcellerna bortom. När man övergår den isolerande vävnaden sänker man specificiteten avsevärt, vilket utöver minskad avsedd respons kan ge upphov till en mängd (i hjärnan ofta svårförutsedda) bieffekter.

Det har visats att mindre elektroder är ett sätt att minska ärrvävnadsbildningen, men det är inte enda angreppspunkten. Nya material – ofta designade på nanoskalan – ökar möjligheterna. Man kan bädda in själva elektroden i skyddande, konfirmerat mer biokompatibla material som inte stör interaktionen alltför mycket. Och man kan förbättra designen av BMI:et i sin helhet – elektrodens förankring, dess förmåga att följa med hjärnans naturliga rörelser (med varje andetag, varje rörelse vi utför, rör sig vår hjärna – för lite för att det ska märkas på vår nivå, men inte på mikrometerskalan), och dess informationshantering.

Den användning som antytts ovan – att med implantatet stimulera nervceller – kallas DBS (deep brain stimulation) och är ett accepterat och använt ingrepp i Parkinsons sjukdom, essentiell tremor, dystoni och tvångssyndrom, men det kan mycket väl komma att användas för fler neurologiska sjukdomar och syndrom (bl.a. depression, epilepsi och kronisk smärta). Man kan också använda

implantat till att registrera hjärnaktivitet i syfte att styra externa maskiner; robotiska extremiteter, rullstol, elektronisk röst. Även om den vetenskapen är i sin vagga så är det inte science fiction, utan har gjorts – även om processen är både väldigt dyr och ännu ofullständigt.

Inom alla växande vetenskapliga fält är det viktigt att ha respekt för de etiska implikationer som utvecklingen medför. Hjärnimplantat rör ett ovanligt känsligt område, och kontinuerlig, kritisk granskning är nödvändig. Dels behöver oro stillas (sakligt om den är obefogad, annars efter att lämpliga justeringar gjorts), dels kan det vara bra för vetenskapen att kvantifiera sina syften. Vad gäller DBS är det debatterbart huruvida det finns grundläggande skillnader mellan sjukdomar med fysiska symptom (såsom Parkinsons) och psykiska, som till exempel allvarlig depression. Det är också under diskussion om de regelverk som finns för farmaka i sammanhanget är tillräckliga för att appliceras direkt på implantat.

Etiska överväganden är inte bara för applikationer, eller angående vilken forskning som bör få bedrivas, utan i högsta grad angeläget för *hur* forskning bedrivs. Ett av de klaraste exemplen angår djurrätt, där man väger djurs liv och lidande mot medicinsk vinning. Det grundläggande kravet på alla djurförsök är att det endast ska tillämpas om inga andra tillräckliga försöksmodeller finns att tillgå. Mellan testning med elektronisk eller maskinella hjälpmedel och djurförsök *in vivo*, i levande vävnad, ligger *in vitro*-modellen, där man använder sig av odlade celler. Den är inte lika komplex som *in vivo*-modellen, och har inte lika många parametrar inblandade. Detta gör den inkomplett, och cellodlingar kan aldrig vara ett fullständigt substitut till djurförsök, men det innebär också en möjlighet i vissa sammanhang. Speciellt om man vill utföra en större mängd relativt enkla försök – men dock i en naturtrogen miljö. Det jag har försökt ta fram i mitt examensarbete är en *in vitro*-plattform för att snabbt och enkelt kunna testa olika elektroders förmåga att registrera signaler från nervcellslänkande celler.

Jag använde mig av en uppställning som tidigare införskaffats för den så kallade *patch clamp*-tekniken. Det är en metod som kräver bra signal, och jag kan lita på utrustningens kvalitet och att den begränsar väldigt lite – jämfört med framför allt de elektroder jag använder. Det var från början tänkt att jag skulle testa ett antal av the NRC:s (Neuronano Research Center, ett suprainstitutionellt samarbete på LU och LTH, fysiskt stationerat på Biomedicinskt Centrum i Lund) i uppställningen, men det begränsades till att få det hela att fungera, samt utvärdera eventuella förbättringar.

Jag började mina tester med väldigt enkla, relativt stora, vajerelektroder (en isolerad wolframtråd, tiotal mikrometer i diameter) på en cellinje kallad PC12. Cellerna kommer ursprungligen från en cancerform i råttans binjuremärg. När man odlar dem kan de stimuleras med den så kallade neurotropiska ("nervväxande") substansen NGF (nerve growth factor; den första neurotropiska substansen funnen), vilket gör att cellerna differentierar mot ett nervcellslänkande tillstånd. De är inte kompletta nervceller, men de används ofta för att undersöka den signalering som nervceller använder sig av, celler emellan. Formen av signalering är frisättande av kemiska signalämnen och kallas exocytosis. Tyvärr var det tveksamt huruvida jag skulle kunna detektera den formen av signalering; det jag egentligen ville var att cellerna skulle sända elektriska (elektrokemiska) signaler inom cellen i den form som kallas aktionspotentialer. Aktionspotentialer används när cellkroppen i ett neuron skickar direktiv längs långa armar (ofta axon) för att exempelvis initiera exocytosis (vilket sker vid s.k. synapser, där signalering till andra celler sker).

Men eftersom mina celler inte var riktiga nervceller, och började som små runda celler utan tillstymmelse till den nervliknande utväxt jag eftersökte, var jag inte säker på till vilken nivå de skulle bli som nervceller. Jag valde att försöka stimulera cellerna att skicka aktionspotentialer genom att tillsätta kaliumjoner (i form av KCl-lösning; kaliumklorid), vilket ska fungera på nervceller. Litteraturstudie kunde endast säga mig att kalium kan inducera exocytosis, och att elektriskt stimulerande av PC12-celler har kunnat ge "aktionspotentialslänkande" svar. Lovande, men inte några löften. Vidare förstår jag från litteratur att cellernas utskottsväxt är till viss del ett mått på hur nervcelllika de blivit, men utväxt är ingen garanti för respons. Jag väljer mängden kaliumklorid utifrån vad som bör krävas för att inducera exocytosis med motiveringen att om jag inte får några aktionspotentialer kanske exocytosis kan registreras, och att nivån för att inducera aktionspotentialer bör vara lägre än den för exocytosis.

Till en början svarar inte cellerna på NGF, och de växer i stora klumpar, ett tiotal celler djupa. Det visar sig ha att göra med ytan de växer på, och efter att den byts växer cellerna i ett jämt lager och bildar nervliknande utskott. Men inga aktionspotentialer uppmäts.

Det sammanföll med byte av celltyp till neuronala stamceller (från mus) att jag insåg att den troligaste anledningen att inget registrerats – om nu någonting funnits att registrera – var elektrodens storlek. Även de minsta jag använt var lite bredare än cellernas diameter. Det betyder att elektroden huvudsakligen mätte mot bakgrunden, mot detsamma som min jordelektrod mäter, och att signaler inte skulle kunna urskiljas.

I och med bytet till vad som utvecklas till väldigt nära ordentliga nervceller omvärderar jag också den mängd KCl som tillsätts. Istället för att efterlikna andras försök räknar jag ut den mängd jag behöver tillsätta om cellerna jag har vore prototyp-nervceller, för att däri inducera aktionspotentialer. Jag har också gjort förbättringar i den elektromagnetiska skärmningen och fått luftfickor att dämpa laborationsbordet jag arbetar på.

För mina mätningar använder jag köpta volframelektroder med någon mikrometers öppning och acceptabel impedans (komplex resistans; för hög ger för dåligt signal-brusförhållande), men vid sidan om försöker jag konstruera egna i form av dragna glaskapillärer fyllda med koncentrerad saltlösning. Mina kapillärer har antingen för stor öppning eller för hög impedans, och jag får inga bra registreringar från dem; däremot registrerades vad som skulle kunna vara aktionspotentialer med den köpta elektrodtypen.

Jag prövade på de huvudsakliga delarna i cellodlandet, för att få en ökad förståelse för modellen – substratbeläggning av odlingsflaska; tinande och sådd av celler; celltillväxt; celldifferentiering – men det var inte mitt fokus, och tack vare att jag fick celler av Agneta SanMartin kan jag, med hennes labbvana i åtanke, i så stor utsträckning som möjligt eliminera odlandet som en felkälla.

Om vi tillåter oss att tro att de registreringar jag nådde fram till mot slutet av projektet var aktionspotentialer – sannolikt med anledning av deras amplitud och varaktighet samt

frånvaron av liknande event på baslinjen (inspelning innan KCl tillsätts) – står det dock fast att jag fick utföra ganska många experiment för att ens hitta dem. Om signalerna ska användas som bas för empiriska undersökningar av skillnader mellan olika typer av elektroder så behöver man kunna vara säker på att de kommer att infinna sig. Ifall osäkerheten kommer ur mitt utförande är det ett smärre problem, som större labbvana och övande av rutinerna kring testandet borde kunna övervinna. Men om det ligger en mer grundläggande osäkerhet kring cellernas responsvilja så är det värre. Det är svårt att veta vilket.

Det finns vissa förbättringar man skulle kunna försöka göra i uppställningen. Vad gäller utrustning skulle det kunna införskaffas en provhållare med värmeplatta och CO₂-tillförsel, för att hålla cellerna vid konstant temperatur och, viktigare, pH. Det skulle ge längre tid under vilken man kan arbeta med samma omgång celler. Men en sådan investering kan vara bortkastad om inte uppställningen fungerar redan innan.

En annan aspekt man kan ändra är cellodlingarnas form. De jag använde växte i ett lager på botten av skålen, men det är en dålig simulering av de förhållanden (den levande hjärnan) som de specialdesignade mikro- och nanoelektroder uppställningen i grunden är tänkt för. Om man använder sig av en tredimensionell cellkultur skulle det kunna förbättra modellen, och dessutom ta bort tvivel om infallsvinkel som finns i nuläget – det är svårt att inte låta en del av elektroden mäta mot bakgrunden istället för mot cellerna, vilket försämrar signalbrusförhållandet. Med celler istället för vätska mellan "ovandelen" av elektroden och jordelektroden skulle cellerna fungera som isolering och elektroderna skulle inte mäta samma sak, därigenom eliminera problemet. Ett problem med sådana 3D-kulturer skulle kunna vara att få KCl eller motsvarande ämnen in bland cellerna, men eventuellt skulle det kunna kringgåas genom att använda den registrerande elektroden först som stimulerande, vilket jag aldrig gav mig på.

Sammanfattningsvis kan jag bara säga att jag inte baserat på projektet kan anse uppställningen redo för mer kvantitativa undersökningar. Jag kan inte heller säga att mer tid och pengar bör investeras i uppställningen om inte den grundläggande aspekten med konsekvent respons från cellerna kan uppnås. Huruvida den ska eftersökas aktivt och om det i så fall ska göras i denna uppställning låter jag vara osagt. Slutorden är att ingenting kan sägas definitivt och att ytterligare forskning behövs.