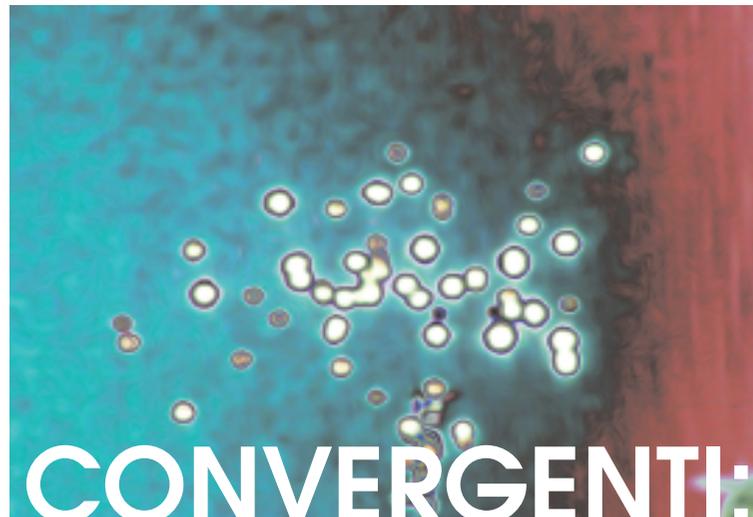


*Emilio Carbone, Davide Lovisolo
 Centro di Eccellenza NIS
 Unità di Ricerca CNISM
 Università di Torino
 emilio.carbone@unito.it*



TECNOLOGIE CONVERGENTI:

quando le neuroscienze incontrano le nanotecnologie

Attualmente si riscontra un grande interesse scientifico verso nuove tecnologie, materiali e dispositivi che permettano di sviluppare micro e nano-dispositivi finalizzati alla ricerca di base e allo sviluppo di biosensori per analisi di laboratorio, studi clinici e trattamenti terapeutici.

L'eccitabilità neuronale e la trasmissione sinaptica sono funzioni cellulari fondamentali per la sopravvivenza e sono controllate da meccanismi molecolari che si generano a livello della membrana plasmatica. L'evento più importante associato allo stato di eccitabilità di un neurone è il potenziale d'azione, indotto da una variazione del potenziale di membrana di circa 100 mV (del tipo tutto-o-niente) che persiste per pochi millisecondi. La registrazione di un potenziale d'azione equivale a valutare la funzionalità di un neurone ed è tipicamente effettuata mediante microelettrodi conduttivi che permettono il contatto elettrochimico tra neurone e strumentazione esterna. RegISTRAZIONI di potenziali d'azione ripetibili e protratte nel tempo attraverso sistemi miniaturizzati, come nel

caso di protesi e dispositivi a microelettrodi, richiedono una continua ricerca di nuovi materiali ad alta conduttività, stabilità e biocompatibilità. Al momento esiste un forte interesse scientifico per nuove tecnologie, materiali e dispositivi che semplifichino il lavoro sperimentale e permettano di sviluppare micro e nano-dispositivi finalizzati alla ricerca di base e allo sviluppo di biosensori per analisi di laboratorio, studi clinici e trattamenti terapeutici. D'altra parte, l'interfacciamento con superfici a stato solido di neuroni (di dimensioni micrometriche) o di porzioni cellulari funzionalmente attive, quali la sinapsi, i neuriti e le vescicole secretorie (di dimensioni nanometriche), ha evidenziato l'esistenza di nuove problematiche scientifiche sui tipi di materiali da utilizzare, sulla loro struttura superficiale, biocompatibilità e bioreattività

con la materia vivente a livello nano- e micrometrico. Risolvere questi problemi, equivale a creare le basi per lo sviluppo di nuovi biosensori capaci di mimare funzioni cerebrali, poter costruire protesi per uso terapeutico che stimolino specifiche aree del sistema nervoso centrale e automatizzare il test di farmaci su scala industriale.

Un numero crescente di laboratori internazionali (europei, americani e asiatici) è attualmente impegnato in questo vastissimo campo di ricerca con risultati confortanti anche se assai lontani dagli obiettivi preposti. Al momento, sono disponibili sul mercato: 1) dispositivi di microelettrodi di nitrito di titanio (MEAs, microelectrode arrays, www.multichannelsystems.com) che permettono la registrazione simultanea e non invasiva dell'attività elettrica di un numero

elevato di neuroni mantenuti in coltura per giorni o settimane;

2) microchips di vetro contenenti camerette singole (www.nanion.de) o multiple (www.cytocentrics.com) per la registrazione di correnti di membrana simultaneamente da 10-20 cellule, con alto grado di automazione e semplificazione delle operazioni di approccio alla cellula e di aderenza agli elettrodi di registrazione.

Attualmente in Italia esistono alcuni gruppi di ricerca di elettrofisiologi e biofisici che utilizzano questi dispositivi per lo studio di reti neuronali, fettine di cervello e applicazioni *in vivo* e solo pochissimi gruppi di fisici e chimici delle superfici interessati a sviluppare nuovi materiali e neurochips lungo questa linea di ricerca.

In questo contesto nazionale ed internazionale si è svolto a Torino lo scorso giugno un Colloquium sponsorizzato dal Centro di Ec-

giornata di lavoro gruppi di ricercatori di varia estrazione (biologi, medici, farmacisti, chimici, fisici, ingegneri) interessati sia all'utilizzo di nuovi micro-dispositivi per la misura di segnali neuronali sia allo sviluppo di nuovi biosensori di dimensioni micro-nanometriche per la misura di attività biologiche. Dato l'alto grado di interdisciplinarietà dei partecipanti, i relatori, provenienti da laboratori di ricerca italiani ed esteri, hanno fornito in maniera informale ma efficace un quadro aggiornato ed esauriente delle varie problematiche, presentando vantaggi e svantaggi dei diversi approcci tecnologici ed indicando i possibili sviluppi futuri delle varie metodologie attualmente disponibili.

Di rilievo nel campo dei microelettrodi metallici è stato osservato come l'utilizzo dei MEAs disponibili sul mercato (Fig. 1, sx) permetta lo studio dettagliato delle proprietà di eccitabilità di reti neuronali mantenute in col-

cellenza NIS (v. scheda a pag. 27) dal titolo "Cells and biomolecules on nanostructured surfaces" (www.nis.unito.it/NIS_29_06_05.-pdf).

Il Colloquium aveva lo scopo di riunire in una

tura per lunghi periodi di tempo (E. Wanke, Milano; S. Martinoia, Genova). Le informazioni che provengono da registrazioni extracellulari di treni di potenziali d'azione sono paragonabili a quelle ottenute da registrazio-

Illustrato sulla sinistra è costituito da 60 microelettrodi di TiN delle dimensioni di 20 μm con relative piste che portano ai punti di contatto con la strumentazione esterna [1]. Nel centro e sulla destra sono illustrate la disposizione di una struttura organotipica in coltura ottenuta da una fettina d'ippocampo di ratto con relative registrazioni di treni di potenziali d'azione con ampiezze dell'ordine di frazioni di millivolt [2]

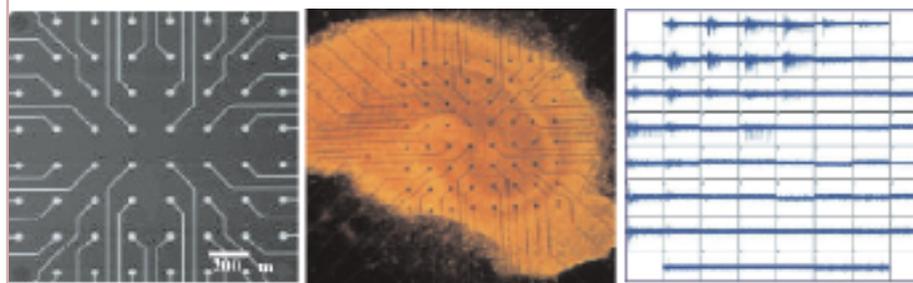


Fig. 1 - Struttura di un MEA e sua applicazione per registrazioni su fettine di cervello

La superficie del chip è composta da ossido di silicio cresciuto termicamente (verde) e ricoperta da poly-L-lisina per facilitare l'adesione e la sopravvivenza del neurone. I gates di metallo del dispositivo lineare di FETs appaiono come quadrati scuri nel centro. I drains e le linee di SiO₂ sono dirette verso l'alto mentre il source comune è visibile in basso. Il neurone (blu) è mantenuto in coltura in un terreno senza siero per quattro giorni in una soluzione salina fisiologica. La foto è ottenuta con un microscopio elettronico a scansione (SEM). La barra orizzontale in alto è 10 μm

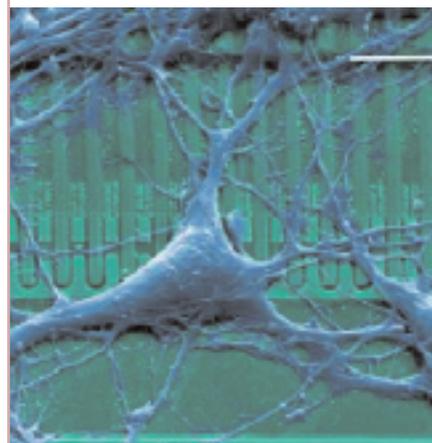


Fig. 2 - Microfotografia di un neurone ippocampale di ratto adeso ad un FET di silicio [3]

ni intracellulari, pur avendo il vantaggio di non essere invasive (si possono ripetere più volte senza danneggiare la cellula) e di poter essere acquisite da molti neuroni simultaneamente, fornendo informazioni cruciali sulla funzionalità topologica della rete nervosa [1]. Di grande interesse è anche l'utilizzo dei MEAs per lo studio dell'attività neuronale in fettine di cervelletto (E. D'Angelo, Pavia), dalle quali è possibile ottenere informazioni dalle diverse aree della struttura cerebellare e di correlarle con segnali ottici associati a flussi di calcio intracellulare (Fig. 1, dx).

Un approccio assai diverso allo studio dei segnali neuronali prevede l'utilizzo di neurochips ad ossido di silicio (Fig. 2) (S. Vassanelli, Padova), che sfruttano le proprie-

Il neurone adeso allo strato di SiO_2 è in uno stato depolarizzato (l'interno è più positivo rispetto alla soluzione esterna). La carica negativa all'esterno del neurone induce, per effetto capacitivo, la dislocazione di cariche positive nel canale n-Si tra source e drain attraverso il quale fluisce una corrente di elettroni (I_{SD}) imposta dal generatore esterno. L'ampiezza del potenziale di membrana determina la profondità della zona di lacune p con carica positiva (area bianca a bassa conducibilità) e la conduttanza del canale n-Si. La corrente I_{SD} sarà quindi proporzionale all'ampiezza del potenziale d'azione

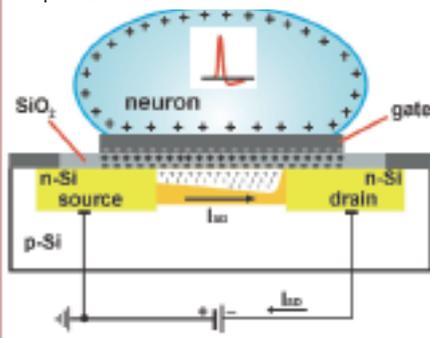


Fig. 3 - Basi funzionali di un neurochip a FET di silicio

tà fisiche dei transistor ad effetto di campo (FETs) per convertire il potenziale elettrico generato dal neurone in contatto con il gate del FET in una corrente di elettroni che fluisce tra il drain e source del substrato di silicio-p (Fig. 3). Le registrazioni attraverso FETs di silicio hanno il vantaggio di monitorare potenziali d'azione con rapporto segnale-rumore maggiore oltre che fornire informazioni sulla struttura e dinamica dell'interfaccia cellula-semiconduttore e permettere di costruire reti neuroelettroniche per applicazioni in impianti protesici, nella biosensoristica e nella neurocomputazione [3].

L'utilizzo del silicio e dell'ossido di silicio come substrato per la nanofabbricazione di MEAs o FETs è al momento in forte discussione a causa della sua scarsa biocompatibilità e stabilità quando viene in contatto con soluzioni saline fisiologiche. Attualmente l'attenzione è focalizzata su composti derivati del silicio: SiC e SiN (C. Ricciardi, Politecnico di Torino; L. Businaro, TASC-Trieste) e silicio poroso (A. Rossi, IEN-Torino), con i quali è possibile costruire

MEAs ad alta conduttività e ridotte dimensioni, oltre che sviluppare una nuova classe di biosensori a FETs.

Dato l'alto grado di biocompatibilità dei substrati nanostrutturati a base di diamante (P. Ariano, NIS-Torino) [4], è attualmente argomento di studio la possibilità di utilizzare superfici di diamante depositato per condensazione o cristallino, rese conduttive (idrogenate) o isolanti (ossidate) in micro o nanoaree attraverso tecniche litografiche, come materiale di base per fabbricare MEAs di forme e dimensioni diverse (E. Vittone, NIS-Torino), oppure sviluppare "lab-on-chips" funzionalizzati per la misura simultanea di correnti ioniche, rilevazione di molecole e cambi di pH [5] (A. Pasquarelli, F. Lehmann-Horn, Ulm). La Figura 4 mostra un prototipo di "lab-on-chip" con il quale è possibile stimolare o registrare segnali neuronali grazie all'alta conducibilità delle zone di diamante idrogenato (grigie) preparato secondo trattamenti di idrogenazione classici.

Utilizzando la tecnica della dip-pen nanolitografia, è ora possibile bio-funzionalizzare la superficie di diamante disegnando con precisione nanometrica piste di biomolecole che favoriscano l'adesione e la crescita neuronale. Sono allo studio molecole di diversa

La superficie di diamante è depositata per condensazione di vapore (CVD), ed è funzionalizzata per essere isolante (ossigenata) nella zona gialla a forma di croce, oppure conduttiva (idrogenata) nelle quattro aree grigie su cui sono adesi i neuroni 1-4. Attraverso contatti metallici non visibili in figura, la superficie di diamante idrogenato è utilizzata sia per stimolare (neurone 4) che per registrare potenziali d'azione extracellulari dai neuroni 1-3 in contatto sinaptico con il neurone 4

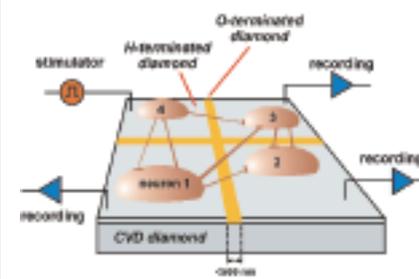


Fig. 4 - Lab-on-chip a base di diamante per la registrazione di neuroni in coltura

struttura e con particolari proprietà chimico-fisiche associate a sonde fluorescenti appartenenti alla famiglia delle cianine (C. Barolo, NIS-Torino), che permettano la visualizzazione delle piste e la possibilità di effettuare misure ottiche sulle diverse interazioni tra substrato, biomolecole e neurone. Un ulteriore aspetto di grande interesse per le moderne nanobioteχνologie applicate al campo della rilevazione di biomolecole è la possibilità di sviluppare biochips di metallo, silicio o diamante dopato con boro capaci di

I granuli secretori, contenenti adrenalina (A) e noradrenalina (NA), si fondono alla membrana citoplasmatica e rilasciano il loro contenuto a seguito di brevi depolarizzazioni indotte dalla pipetta da patch-clamp, che induce l'apertura dei canali del Ca^{2+} e l'ingresso di Ca^{2+} nella cellula. La microfibra di carbonio è polarizzata a +800 mV ed è quasi in contatto con la cellula. La fibra rileva transienti di corrente di ossido-riduzione (20-500 pA) associati alle molecole di A e NA rilasciate durante l'esocitosi di un singolo granulo. Sulla destra è riportata un'immagine al microscopio dei vari elementi

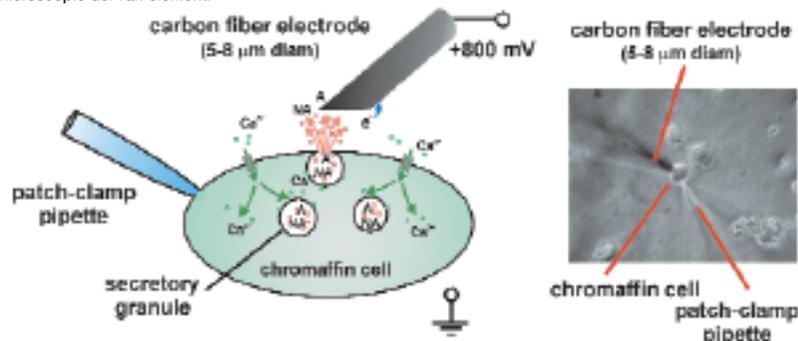


Fig. 5 - Dispositivo per misure amperometriche di singoli eventi secretori con microfibre di carbonio

Il Centro di Ricerca NIS (Nanostructured Interfaces and Surfaces) Università di Torino

Direttore: Adriano Zecchina

<http://www.nis.unito.it>

Il Centro di Eccellenza "Superfici ed Interfasi Nanostrutturate" del MIUR è stato costituito alla fine del 2003 con decreto ministeriale e nasce per iniziativa congiunta di alcuni gruppi di ricerca di area Chimica, Fisica e Biologica dell'Università di Torino e dell'Università del Piemonte Orientale, legati da tempo da una rete di collaborazioni interdisciplinari e dalla comune partecipazione a progetti scientifici nel campo delle nanotecnologie e nanobiotecnologie.

Le nanotecnologie permettono la realizzazione di diverse classi di oggetti e di materiali con particolari qualità meccaniche, chimiche, ottiche, elettriche e magnetiche. In molte classi di materiali, le proprietà più rilevanti dipendono dalla struttura delle superfici e delle interfasi tra i componenti. I fenomeni fisici e chimici all'interfaccia tra i materiali, la materia vivente e l'ambiente giocano un ruolo fondamentale nella determinazione delle proprietà finali, in una varietà di applicazioni.

Il Centro NIS nasce con la duplice missione di svolgere ricerca di base e servizi di ricerca applicata e si pone l'obiettivo di rendere disponibili ad utenti esterni, ed in particolare alle aziende, le competenze e le strumentazioni dei gruppi di ricerca affiliati. Il Centro fornisce un laboratorio multidisciplinare, dotato delle principali tecniche di indagine microscopica e spettroscopica, e offre un servizio di consulenza che permette di indirizzare gli utenti verso le collaborazioni più appropriate con i laboratori accademici. Di questi servizi possono beneficiarne sia i laboratori di ricerca delle grandi aziende, con i quali sono già avviate numerose collaborazioni e sinergie, sia le piccole e medie imprese che non possiedono laboratori propri.

Di seguito sono elencate le principali linee di ricerca del Centro NIS:

- **Applicazioni meccaniche:** studio e realizzazione di leghe nanocristalline, nanocompositi a matrice metallica, ceramica o polimerica e film sottili protettivi; studi di adesione e abrasione. Modulazione delle proprietà meccaniche di nanostrutture per produrre materiali con proprietà tecnologiche superiori. Trasformazione delle proprietà superficiali dei materiali attraverso funzionalizzazione su scala nanometrica.
- **Applicazioni per biomateriali:** studio e realizzazione di biovetri, membrane e sistemi micellari nanostrutturati, con attenzione ai fenomeni di adesione cellula-materiale. Tossicità di particolati solidi e biocompatibilità di materiali. Nuovi dispositivi a substrato di diamante, silicio e ossido di silicio interfacciati a neuroni centrali o cellule neurosecretorie. Materiali polimerici, metallici e carboniosi per applicazioni protesiche.
- **Catalisi e fotocatalisi:** studio e realizzazione di catalizzatori nanostrutturati, materiali micro- e mesoporosi funzionalizzati, nanoparticelle metalliche supportate, film fotoattivi e fotocatalizzatori nanostrutturati.
- **Sintesi e autoassemblaggio di materiali nanostrutturati:** studio e realizzazione di nuovi materiali porosi, film polimerici, nuovi sistemi micellari. Studio e realizzazione di materiali porosi per separazione e stoccaggio di idrogeno e altri gas. Leghe e composti intermetallici per assorbimento di idrogeno.
- **Studio e conservazione dei beni culturali:** caratterizzazione di pigmenti, leganti, materiali lapidei e metalli ai fini del restauro e della conservazione. Caratterizzazione gemmologica. Film protettivi polimerici e materiali per il consolidamento.

rivelare correnti di ossido-riduzione attraverso fibre di carbonio di dimensioni micrometriche. La Figura 5 illustra un tipico dispositivo utilizzato per misurare correnti amperometriche associate a quanti di molecole di catecolamine (adrenalina e noradrenalina) rilasciate da cellule cromaffini della midollare surrenale, durante brevi o lunghe depolarizzazioni applicate attraverso una pipetta di vetro da patch-clamp (V. Carabelli, NIS-Torino). Con tecniche nanolitografiche è ora possibile depositare 4-8 elettrodi planari di

platino su vetro, oppure creare patterns su superfici di diamante dopato con boro, capaci di rilevare simultaneamente quanti di catecolamine da diverse zone secretorie di una cellula neurosecretoria. In tal caso, la cellula è appoggiata sui microelettrodi planari e la misura simultanea degli eventi secretori fornisce preziose informazioni sulla topologia dell'esocitosi vescicolare [6], altrimenti irrisolvibile con comuni fibre di carbonio.

Il futuro obiettivo di questa metodologia è rivolto allo sviluppo di nanoelettrodi planari

sensibili alle molecole di neurotrasmettitore rilasciate da neuroni centrali (glutammato, GABA, serotonina, dopamina). Ciò permetterebbe di studiare in maggior dettaglio la topologia e la dinamica della trasmissione sinaptica in reti neuronali complesse e di poter quindi analizzare alcuni degli aspetti più interessanti delle neuroscienze, in particolare le basi della plasticità sinaptica e l'origine di alcune malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer, l'epilessia, il parkinsonismo e la depressione.

Bibliografia

- [1] U. Egerl *et al.*, *Brain Research Protocols*, 1998, **2**, 229.
- [2] A. Stett *et al.*, *Anal Bioanal Chem.*, 2003, **377**, 486.
- [3] P. Fromherz, *Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells and Brain*, in *Nanoelectronics and Information Technology*, R. Waser (Ed.), Wiley-VCH, Berlin, 2003, p. 781.
- [4] P. Ariano *et al.*, *Diamond & Related Materials*, 2005, **14**, 669.
- [5] J. Kusterer *et al.*, *A diamond-on-silicon patch-clamp-system*. *Diamond and Related Materials*, 2005, in press, available online.
- [6] A.F. Dias *et al.*, *Nanotechnology*, 2002, **13**, 285