

# 뉴런온칩 기술: 미세전극칩시스템과 신경세포 패터닝 기술

남윤기

KAIST 바이오및뇌공학과

## Neuron-on-a-Chip technology: Microelectrode Array System and Neuronal Patterning

Yoonkey Nam

Department of Bio and Brain Engineering KAIST

(Received April 17, 2009. Accepted April 20, 2009)

### Abstract

Neuron-on-a-Chip technology is based on advanced neuronal culture technique, surface micropatterning, microelectrode array technology, and multi-dimensional data analysis techniques. The combination of these techniques allowed us to design and analyze live biological neural networks *in vitro* using real neurons. In this review article, two underlying technologies are reviewed: Microelectrode array technology and Neuronal patterning technology. There are new opportunities in the fusion of these technologies to apply them in neurobiology, neuroscience, neural prostheses, and cell-based biosensor areas.

**Key words :** Neuron-on-a-Chip, microelectrode array, surface micropatterning, cell culture, neural engineering

### I. 서론

우 리 뇌는 약 1000억 개의 신경세포들로 이루어져 있으며, 서로 간 시냅스를 통하여 네트워크를 형성하고 있다. 이러한 뇌의 기능과 구조를 체외 시험관조건(*in vitro*)에서 연구하기 위해서 지난 한 세기동안 수많은 신경생물학자들이 다양한 신경세포배양기술을 개발하였고 이를 통하여 뇌에 대한 새로운 발견과 이해가 지속적으로 이루어지고 있다. 비록 시험관 조건이 체내 조건(*in vivo*)과 일치하기는 어렵지만, 체내에서는 직접 시도할 수 없는 다양한 과학적 실험을 할 수 있다는 큰 장점을 갖고 있다. 체외에서 배양되는 신경세포들은 체내에서 성장한 신경세포들과 비슷한 생리학적 특성을 나타내어, 신경세포의 가장 중요한 생리적 기능인 활동전위(action potential) 발생을 위한 일련의 이온채널들이 발현되고, 중요 신경전달물질을 분비하고 다른 신경세포들과 네트워크를 형성하여 신호를 주고 받을 수 있다[1]. 또, 학습과 기억의 기능을 위한 중요 생리학적 기전인 장기시냅스강화를 유도할 수 있다. 최근 줄기세포를 이용한 조직공학 연구에도 신경세포배양기술은 주요한 기술로 자리잡아 가고 있다.

뉴런온칩기술은 반도체공정기술, 세포배양기술, 마이크로패터닝기술, 그리고 디지털 신호처리기술을 접목하여 시험관조건에서 살아있는 신경세포로 신경네트워크를 설계하고 분석하는 기술이다. 이는 잠재적으로 신경과학연구를 위한 최소의 기능성 모델(minimal but functional model), 신약개발에 필요한 고감도 세포기반 바이오센서(cell-based biosensor), 그리고, 신경보철을 위한 조직 모델(tissue model)로서의 응용이 가능하다[2]. 뉴런온칩기술이 신경세포배양기술과 반도체공정기술의 접목을 통한 새로운 형태의 접근방식이라 관점에서 보면, 이 기술은 이미 1970년대 소장과 학자들에 의해 처음 연구되었고, 1990년대 미세가공기술이 대학 및 연구소에 보급되어 사용할 수 있게 되면서, 여러 연구자들에 의해 신경네트워크를 뇌 밖에서 공학적으로 설계하고 이를 분석하기 위한 연구로 이어져 오늘날까지 지속되고 있다.

본 논문에서는 체외에서 배양된 신경네트워크를 연구하기 위하여 연구되는 대표적인 두 가지 뉴런온칩 기술인 미세전극칩기술과 신경세포 패터닝기술의 최근 연구현황에 대하여 고찰해 보겠다.

### II. 미세전극칩기술

#### A. 미세전극칩 (Micro-Electrode Array)

미세전극칩(MEA)은 세포배양기판 위에 단일세포 크기의 미세

Corresponding Author : 남윤기

대전광역시 유성구 과학로 335 한국과학기술원

Tel : +82-42-350-4322 / Fax : +82-42-350-4310

E-mail : ynam@kaist.ac.kr

본 연구는 학술진흥재단 기초연구과제지원사업 (KRF-2008-313-D00614)

의 지원에 의하여 이루어진 것임.

전극들이 일정한 배열로 표면에 박혀있는 칩이다(그림 1(a)). 이 칩은 세포를 배양하면서 그 세포들의 전기적 신호를 미세전극들을 통하여 외부 전자장치로 연결시켜 주는 역할을 한다.

미세전극칩은 1972년 하버드대학 생물화학과 연구팀이 발표한 ‘배양된 세포의 생체전기활성을 모니터링하기 위한 소형화된 미세전극어레이’ 라는 논문에서 처음 소개되었다[3]. 이 논문에서 저자들은 전기신호를 발생하는 세포들이 형성하는 네트워크를 비침습적이면서 여러 지점에서 동시다발적으로 측정할 수 있는 편리한 도구로서 미세전극칩을 소개하였다. 이 칩은 사진공정(photolithography)를 이용하여 세포배양기판 위에 금속선을 패터닝하고 절연하여 30개의 독립된 미세전극이 집적되어있었다. 전기적 신호를 얻기 위해 심근세포를 배양하여 수백  $\mu V$  크기의 세포의 활동전위(extracellular action potential)를 측정하는데 성공하였다. 이후 70년대 후반 서로 다른 두 연구자(텍사스대학 Guenter Gross, 칼텍 Jerome Pine)에 의해 각각 독립적으로 신경세포의 신호를 측정하고 전기자극에 의한 세포응답을 측정하는데 성공하였다[4,5].

미세전극칩은 마이크로미터 크기의 전극들을 표면에 균일하게 배열하기 위해 반도체공정기술을 이용해 제작된다. 칩의 구성요소는 기판, 도선, 절연체, 그리고 전극으로 나눌 수 있다. 기판은 딱딱한 재질(유리, 실리콘 웨이퍼)과 유연한 재질(폴리이미드 필름)이 모두 쓰이며, 배양된 세포를 관찰할 때 광학적 투명성이 좋은 기판이 생물학자들에게 선호된다. 도선은 미약한 신호를 전달하기 위해 높은 전도성을 갖는 금속이 주로 사용되며, 기판 위에 사진공정

과 습식식각(wet etching)을 통하여 패턴을 만드는데, 칩의 중앙에는 전극을 형성하기 위하여 선폭을 작게 하며, 기판의 가장자리에는 외부 증폭기와의 접속을 위한ミリ미터 이상의 크기를 갖는 접촉패드가 위치한다. 금속선이 패터닝된 기판을 절연물질로 코팅하고, 전극을 만들기 위하여 도선의 끝 부분에 미세한 구멍(via hole, 직경10-50  $\mu m$ )을 만든다. 이와 같이 미세전극을 만들기 위해서는 코팅된 절연물질에 따라 그에 맞는 미세공정이 필요한데, 습식식각[3,6], 건식 식각(dry-etching) [7,8], 또는 레이저 절제(ablation) [4] 등이 사용되었다. 이후 필요에 따라 전극의 계면임피던스를 줄이기 위한 전기도금 등의 공정이 추가되기도 한다. 칩의 전극 수는 흔히 데이터 획득 시스템의 수용 용량이나 기판 평면에 집적할 수 있는 접촉 패드의 수에 따라 제한된다. 유리 기판 위에서는 최대 519개의 전극을 갖는 고밀도 미세전극칩이 보고된 바 있으며[9], 일부 회사들에서 판매되고 있는 고가의 세포배양용 미세전극칩들은 대부분 60채널칩이다. 표 1은 미세전극칩을 개발하여 보고한 주요 논문들에서 칩의 사양을 요약해 놓았다.

미세전극칩을 디자인함에 있어, 몇 가지 고려되어야 할 요소들이 존재한다.

첫째, 제작에 사용되는 모든 물질이 생체 적합성을 보장하는지 확인되어야 한다. 미세전극칩의 어떤 부분이라도 잠재적으로 살아있는 세포에 노출될 가능성이 존재한다는 것을 감안하면 세포에 대한 독성이 없어야 하며, 특히 절연부와 전극의 끝 부분은 더욱 무독성이 요구된다. 미세공정기술에서 사용되는 다양한 절연체 물질

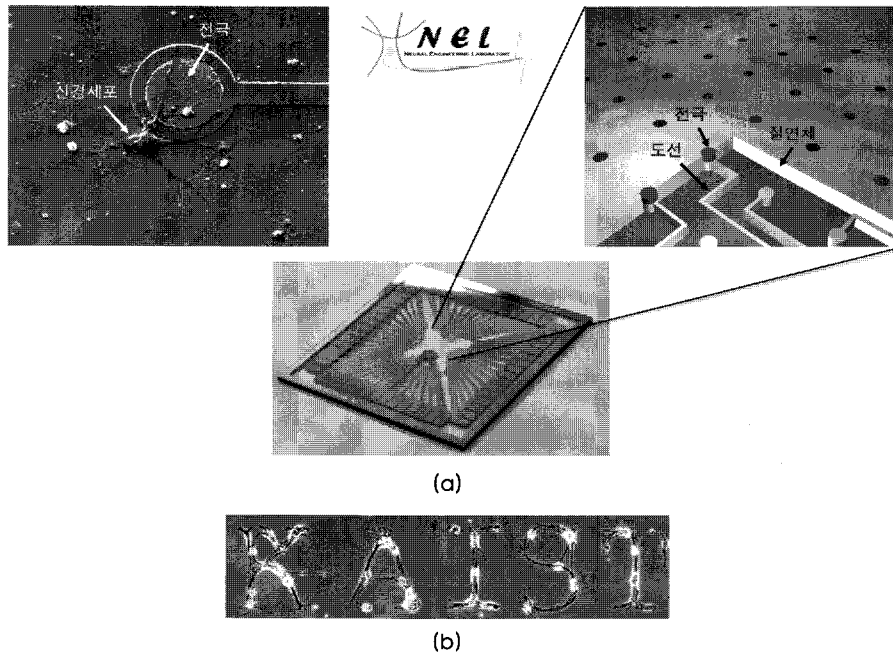


그림 1. (a) 뉴런온칩 기술의 핵심인 미세전극칩은 신경세포 배양이 가능하며 전극과 도선을 통하여 세포와 전기적 인터페이스를 형성한다. (b) 미세표면패터닝 기술을 이용하여 신경세포로 만든 'KAIST'(제공: 카이스트 신경공학연구소)

Fig. 1. (a) Live neurons are cultured on an microelectrode array and it forms an electrical interface with neurons through embedded microelectrodes. (b) A pattern of 'KAIST' is formed using real neurons using surface micropatterning (Source: Neural Engineering Laboratory (NEL), KAIST)

중 이산화규소(SiO<sub>2</sub>)나 질화규소(Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)와 같은 무기물, 그리고 폴리아미드(polyimide)나 SU-8(에폭시 수지) 같은 중합체는 세포에 대한 생체적합성이 어느 정도 검증되어 사용되고 있다. 전극의 경우, 금, 백금과 같은 비활성 귀금속 물질이 주로 사용되며, 투과현미경을 통하여 세포를 관찰해야 하는 경우가 많아 투명도체로서 인듐주석산화물(indium-tin oxide, ITO)이 상용화된 미세전극칩에서 주로 사용된다.

둘째, 완성된 칩은 장기간 안정성과 내구성이 보장되어야 한다. 신경네트워크의 성장에 따른 기능 연구는 짧게는 수 주에서 길게는 수 개월 정도 실험이 지속되는 경우도 보고되고 있다 [17]. 이러한 경우, 코팅된 절연막이 세포배지액과 같은 이온성 전해질에서 기능이 저하되면 측정된 신호에 감쇄 혹은 왜곡이 생길 수 있고, 경우에 따라서는 신호 측정이 안되는 경우도 발생한다. 그러므로, 절연체의 막질은 실제 실험조건과 동일한 환경 하에서 정밀하게 시험되어야 한다 [4].

셋째, 미세전극과 전해질 용액의 계면임피던스는 가능한 한 작아야 한다 [18]. 전극의 계면임피던스는 신호증폭 측면에서는 소스임피던스로 작용하기 때문에, 이 임피던스가 큰 경우, 측정신호의 배경잡음에 직접적인 영향을 미치게 된다. 또한, 전극 임피던스가 낮은 경우, 절연막이 상하여 신호가 감쇄되는 것을 어느 정도까지는 보상할 수 있다. 절연체에 형성하는 구멍의 크기에 의해 결정되는 전극계면임피던스보다 더 낮은 값을 얻기 위해서는 전극의 실질표면적을 넓혀야 하며, 이를 위하여 백금흑(platinum black) [3,5,6], 금 콜로이드 [4], 혹은 TiN(titanium nitride) [8] 등의 전도성 물질을 전극 위에 코팅한다.

### B. 칩표면의 생체분자 코팅

앞서 나열한 미세전극칩의 절연체의 표면은 신경세포의 흡착 및 성장을 유지시킬 수 없기 때문에, 세포의 배양을 위해서는 세포의 흡착을 촉진하는 다양한 생체분자를 칩표면에 코팅하여야 한다. 세포 흡착성 생체분자는 유리나 플라스틱 배양기판에 신경세포를 배양하기 위해 사용하는 것과 동일한 것들로, 콜라겐[5], 폴리라이신(polylysine) [19], 라미닌(laminin), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine) [20], 혹은 폴리오르니틴(polyornithine) 등이 사용되었다. 경우에 따라서는 두 가지 이상의 분자를 조합하여 세포 흡착을 증진하는데, 폴리라이신과 라미닌 [21], 폴리에틸렌이민과 라미닌 [22,23], 혹은 폴리오르니틴과 매트릭젤(matrigel) [24]의 조합 등이 연구자들에 의해 이용되었다. 이러한, 생체분자들은 장시간 칩 위에 액상으로 코팅을 시키는데, 물리적 흡착(physorption)에 의해 표면에 흡착하게 된다. 이러한 경우, 절연체 표면의 화학적 특성에 따라 친수성(hydrophilic)이 아닌 경우 이를 친수성으로 전환해 주는 표면처리과정이 필요하며, 좀더 공고하고 확실한 코팅을 위해서 화학적 공유결합을 유도하여 분자를 고정시키는 표면조절기술이 개발되기도 하였다 [25,26].

### C. 미세전극칩에 적용된 신경세포배양기술

미세전극칩을 이용해 배양된 신경네트워크를 연구하기 위해서는 동물의 특정 뇌부위에서 적출한 조직을 박리해서 배양하는 박리배양(dissociated culture)이 사용되고, 이러한 신경세포는 초대배양(primary culture)를 통해서만 얻어진다. 사용된 뇌 부위를 살펴보면, 해마, 대뇌피질, 척수, 시교차상핵(SCN) 및 망막 등이 이용되었다. 달팽이 신경절세포나 심근세포(신경세포는 아님)와 같이 생리학적 특성이 비교적 잘 알려진 세포들은 연구초기 미세전극칩의 성능을 검증하기 위한 모델로서 사용되었고, 90년대 이후에는 쥐의 중추신경계(해마, 대뇌피질, 시교차상핵(SCN))의 신경세포들을 이용하여 생물학적 연구에 활용하기도 하였다.

대부분의 박리세포배양은 동물의 태어나 새끼에서 분리된 조직으로부터 세포를 추출한다. 조직을 얻어내는 시기별로 보면, 임신 18일째(E18)의 쥐의 태아(fetus)에서 추출한 해마 [27-29], 임신 14-15일째 쥐의 태아에서 추출한 척수 및 대뇌피질 [21,30], 임신 17-18일째 쥐의 태아에서 추출한 대뇌피질[20,22,31,32], 생후 3일째 쥐(P3)에서 추출한 대뇌피질 [33,34], 그리고 생후 3일째 쥐에서 추출한 해마 [24] 등이 이용되었다.

신경세포의 성장을 위한 혈청 사용 유무를 보면, 대부분 혈청이 포함된 배지 환경에서 배양밀도(단위면적당 세포의수) 1000 (cells/mm<sup>2</sup>) 이상으로 칩 위에 세포가 뿌려지며, 이러한 혈청배지액 환경에서는 교세포, 특히 성상교세포(astrocyte)의 증식이 동시에 유도되어 신경세포의 성장을 위한 피더레이어(feeder layer) 역할을 하여 장기간 배양이 가능하도록 한다. 혈청이 포함된 배지액 대신에, 별도의 교세포배양접시에서 배지액만을 추출하여 사용하는 방식과 처음부터 무혈청배지액만을 사용하여 배양하는 방식도 사용되고 있다[19,20,29,35,36]. 세포배양법에 따라 칩 위에서 얻어내는 네트워크의 특징이나 세포의 구성에 차이가 있을 수 있는 만큼, 연구목적에 부합되는 배양법을 선택하는 것이 중요하다.

### D. 데이터 수집 시스템

데이터 수집 시스템은 아날로그 신호처리(증폭기 및 필터)와 아날로그-디지털변환기(ADC) 및 데이터 저장부로 이루어져 있다. 미세 전극들을 통해 측정된 미세한 세포의 신호는 ADC를 거치기 전에 여과되고 증폭된다. 측정된 신호의 크기는 10에서 1000 마이크로볼트( $\mu$ V) 범위로 매우 미약하며, 이를 ADC의 입력 범위인 500 mV ~ 5 V 에 맞추기 위해 보통은 1000에서 10,000정도의 증폭이 필요하다. 이러한 고이득으로 인해 전체 시스템은 항상 전원 노이즈, 미약한 기계적 진동, 주요부품간 접촉불량 및 DC 오프셋과 같은 외부 환경적 노이즈에 대해 극단적으로 민감하게 된다. 이러한 간섭 노이즈를 최소화하기 위해 패러데이 상자(Faraday cage)가 일반적으로 사용된다. 또, 수백에서 수천 mV의 전기자극 펄스를 전극에 인가하였을 때 채널간 혼선(cross-talk)으로 인해 고이득 증폭기 출력단에서 일시적인 증폭기 포화(amplifier saturation) 현상이 일어나고 그로 인해 자극 직후의 자극유발응답

측정이 어렵거나 불가능한 경우가 빈번하게 발생하여, 이를 해결하기 위한 신경 자극-응답 시스템이 연구되고 있다 [37,38].

신경신호는 최대 5 - 10 kHz 정도의 대역폭을 갖고 있다. 신경세포가 발화하는 순간의 빠른 스파이크(spike)를 추출하기 위해서는 300 ~ 10000 Hz 대역에 대해서만 선택적 필터링을 한다. 아날로그 데이터는 보통 높은 해상도의 spike 파형을 얻기 위해 25 ~ 50 kHz 로 오버샘플링된다. 다채널의 데이터를 높은 샘플링주파수로 저장하는 경우 데이터 파일의 크기가 분당 수백 MB (60 채널 × 60 초 × 초당 40, 000 샘플 × 샘플당 12 bits = 216 MB)가 발생하게 되어 장기간 실험을 기록할 경우 저장용량에 대한 고려가 필요하다. 많은 경우, 실제 신호분석은 검출된 스파이크만을 사용하게 되어, 검출된 스파이크의 파형 (2 ~ 3 ms) 만을 저장하는 방법이 사용된다. 최근의 연구자들은 CMOS 집적회로설계를 통해 증폭기, 필터, ADC를 하나의 칩에 집적한 시스템을 개발하였다 [39-42]. 이러한 집적 시스템은 장치의 소형화와 전체 시스템 구성의 단순

화를 장점으로 하며, 수백 개의 기록 채널을 가지는 휴대형 소형 시스템의 구현으로 이어질 것으로 예상된다.

**E. 신경신호 분석**

데이터 분석 절차는 신경신호 검출(spike detection), 신경신호 파형 분류(spike sorting), 그리고 신경신호 계열분석(spike-train analysis)의 세 단계로 나누어진다. 신경신호 검출에 가장 많이 쓰여지는 방법은 역치(threshold)법으로, 배경잡음의 분포를 정규분포로 보고 배경잡음의 표준편차보다 5배에서 7배 정도 큰 신호를 신경신호로 간주하고 이를 검출한다. 이외에도 웨이브렛 변환(wavelet transformation) [43,44] 이나 에너지연산자(energy operators) [45] 를 이용한 검출법 등이 연구되었다.

한 개의 전극을 통해 서로 다른 신호원에서 발생한 스파이크들이 측정된다면, 이는 서로 다른 파형의 모양으로 나타나고, 검출된 신호의 파형의 특징을 이용하여 이를 분리해 내는 과정을 신경신

표 1. 주요 연구에 쓰인 미세전극칩의 사양  
Table 1. Specification of microelectrode arrays in literature

연도	전극 재료 (크기: μ m)	임피던스 (1 kHz)	도선	절연체(두께: μ m)	기판	Ref.
1972	Pt black (□ : 7×7)	400 kΩ	Au	Photoresist (AZ-111)	Coverslip	[3]
1979	Au (Φ : 10)	1.5-2.0 MΩ	Au	Polysiloxane (2-4)	Glass	[4]
1980	Pt black (□ : 8×10)	0.1-1.0 MΩ	Au	SiO <sub>2</sub> (0.5)	Coverslip	[5]
1985	Au colloid (Φ : 20)	2.0 MΩ	ITO	Polysiloxane (2-4)	Glass	[10]
1986	Pt black (Φ : 20)	10 kΩ	Au	Polyimide	Glass	[11]
1992	Pt black (Φ : 13-15)	5.1-17.8kΩ	Au	Polyimide	Polyimide	[7]
1997	Pt black / Ir (Φ : 10)	16 kΩ	Au	PECVD Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (1.0)	Oxidized Si wafer	[12]
1998	Pt black (□ : 50×50)	100 kΩ	ITO	Photoresist	Quartz	[13]
1998	TiN (Φ : 10)	250 kΩ	Au	PECVD Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (0.5)	Glass	[8]
1999	Pt black (□ : 50×50)	6 kΩ	ITO	Polyimide (1.4)	Glass	[14]
2002	Pt black (Φ : 5 or 10)	200-500kΩ	Au	PECVD SiO <sub>2</sub> /Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> (0.1/0.4/0.1)	Glass	[15]
2002	Pt, 3D tip (□ : 40×40×40)	250kΩ	Pt	SU-8 (5)	Glass	[16]

Φ : 원형 전극, □ : 사각형 전극

호파형분류라고 한다. 파형의 특징으로 가장 흔하게 사용되는 것은 크기와 폭이며, 보다 정교한 분리를 위해서는 템플릿매칭, PC (principal component) 등을 활용하기도 한다 [46].

신경신호계열분석은 신경네트워크의 동역학적 특성을 연구하기 위해서 신경채널 간의 상관관계를 시계열분석기법을 이용하여 정량적으로 다룬다. 배양된 신경네트워크의 경우, 현재까지 연구된 바에 의하면 대부분의 경우 자발적인 발작적 활성(bursting activity)이 나타나고, 이러한 활성은 네트워크의 성숙도, 시냅스의 종류 및 분포 등에 따라 다르게 나타난다 [47]. 대부분의 미세전극칩 데이터 분석은 이 발작적 활성 분석을 포함하는데, 그 목적은 네트워크 활성도를 계량화하여 약물의 작용 [48], 전기 자극 [49], 세포 네트워크의 성장 [20]에 의한 네트워크의 변화를 측정하는 데에 있다. Gross 교수팀은 상태-공간도(state-space plot)를 사용하여 단일 전극의 활성상태를 나타내었다 [48]. 평균 발작율과 그것의 정규화된 표준편차를 상태-공간도에 산포도로 나타내고, 그 채널의 네트워크의 상태를 대표하는 점으로 산포도의 무게중심점을 이용하였다. 네덜란드의 Van Pelt 연구팀은 네트워크의 발작 구간을 검출하기 위해 발화율과 발화채널의 곱을 지표로 이용하였다 [20]. 전극의 위치정보가 포함된 신호분석을 위하여 최근 조지아공대 Potter 교수팀은 다차원 벡터 표현법(multidimensional vector representation)으로 네트워크의 발작적 활성의 시공간적 패턴을 코딩하였다. 이렇게 구축된 데이터를 군집화 알고리즘(clustering algorithm)을 통해 분류해 네트워크 활성도의 패턴을 밝혀내고 새로운 활성패턴이 발생도 검출할 수 있었다. 이스라엘 텔라비브대학 연구팀은 상관행렬을 이용하여 발작적 활성 발생시에 네트워크 내의 숨은 연결성을 교차상관행렬과 계통수 군집화 방법 (dendrogram clustering method)을 이용하여 연구하였다 [50]. 다른 연구자들은 교차-상관관계나 자극후 히스토그램(peristimulus histogram)과 같은 통계적 분석법을 이용하여 전기자극의 효과를 추정하였다 [31,34,51,52]. 대부분의 분석기술은 전체 칩의 평균 발화율을 이

용해서 이루어지는 경우가 많고, 시간에 따라 달라지는 2차원의 공간적 활성패턴은 특정 시각의 공간 프레임을 이용하여 나타내고 있다 [31,37].

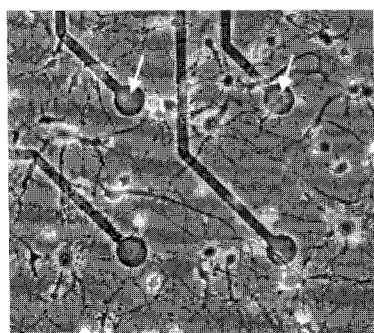
### III. 신경세포 패턴링 기술

1975년 스탠포드대학 생물학과에서 발표한 ‘세포-표면간 흡착성과 신경세포 축색돌기(axon)의 발달’이라는 논문에서는 성장점(growth cone) 주변에 주어지는 세포-표면 흡착도가 신경세포 성장에 중요한 영향을 미친다는 가설을 검증하기 위해 미세표면패턴링을 활용하였다[53]. 당시 미세가공기술에 의해 대량으로 생산되던 전자현미경용 그리드의 최소 선폭이 27 μm 임을 착안하여 세포흡착성물질인 폴리오리니틴 과 팔라듐(Palladium, Pd)으로 구성된 미세격자 표면패턴을 세포배양판 위에 프린트하고, 그 위에 신경세포를 배양하여 축색돌기의 성장을 실시간 관찰하는 실험을 하였다. 이러한 신경세포 패턴링은 80년대 후반 벨연구소의 Kleinfeld 박사팀이 실란(silane)기반의 자기조립단층과 반도체 공정을 이용하여 선폭 10 μm 이하의 표면패턴 위에서 신경세포의 선택적 흡착과 성장을 유도하는데 성공하면서 많은 연구자들의 주목을 받았다[54].

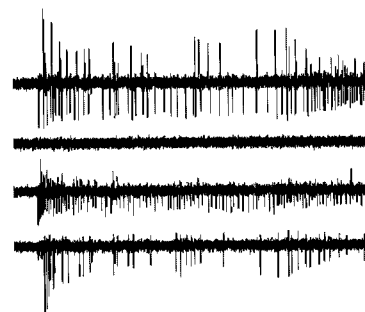
#### A. 생체분자 표면 미세프린팅

신경세포를 배양기판 위에서 생장시키기 위해서는 앞서 논의한 대로 표면에 세포친화성 코팅이 필요하다. 신경세포의 성장을 표면의 특정한 부분에만 제한하기 위해서는 이러한 흡착성코팅이 이루어지는 영역을 제한하는 표면패턴링기술이 사용된다. 일반적으로 미세접촉 프린팅(microcontact printing), 리프트-오프 패턴링 (lift-off patterning), 미세유체 패턴링(microfluidic patterning) 등의 3가지 방법이 주로 이용되었다.

미세접촉 프린팅은 미세가공된 주형틀(mold)을 이용하여 마이



(a)



(b)

**그림 2.** (a) 미세전극칩 위에 2주간 배양된 신경네트워크 (화살표: 10 μm 전극) (b) 신경세포에서 동시다발적으로 측정된 신경네트워크의 전기신호 (제공: 카이스트 신경공학 연구실)

**Fig. 2.** (a) Cultured neuronal networks on a microelectrode array (arrows: 10 μm microelectrode). (b) Multichannel neural recordings from cultured neurons grown on a microelectrode array (Source: NEL, KAIST)

크로미터 크기의 패턴 또는 무늬를 갖는 실리콘 고무(PDMS) 도장을 주조(casting)하여 제작후 단백질을 기관 위에 프린팅한다. 이 기술은 최초로 하바드 화학과에서 유기물질인 알켄티올(alkenethiol)을 물혀 금표면에 마이크로미터 크기의 패턴을 만들기 위해 개발되었는데 [55], 곧 생체 분자를 프린팅하여 바이오칩을 제작하는 기술로 활용되기 시작하였다 [56-61]. 도장은 단백질을 녹인 완충용액에 담그어 도장 표면에 단백질을 묻히고, 원하는 기관(유리판, 미세전극)위에서 도장을 찍으면 도장의 무늬를 따르는 단백질 패턴이 표면에 프린팅 된다. 이 방법은 반도체공정을 통해 주형틀을 얻은 후에는 쉽게 미세도장을 복제해 낼 수 있어, 일반 생물학 실험실 환경에서도 용이하게 이용할 수 있는 공정상의 잇점이 있고 다양한 종류의 단백질 패턴을 여러 도장을 이용하여 한 기관 위에 찍을 수 있다[62].

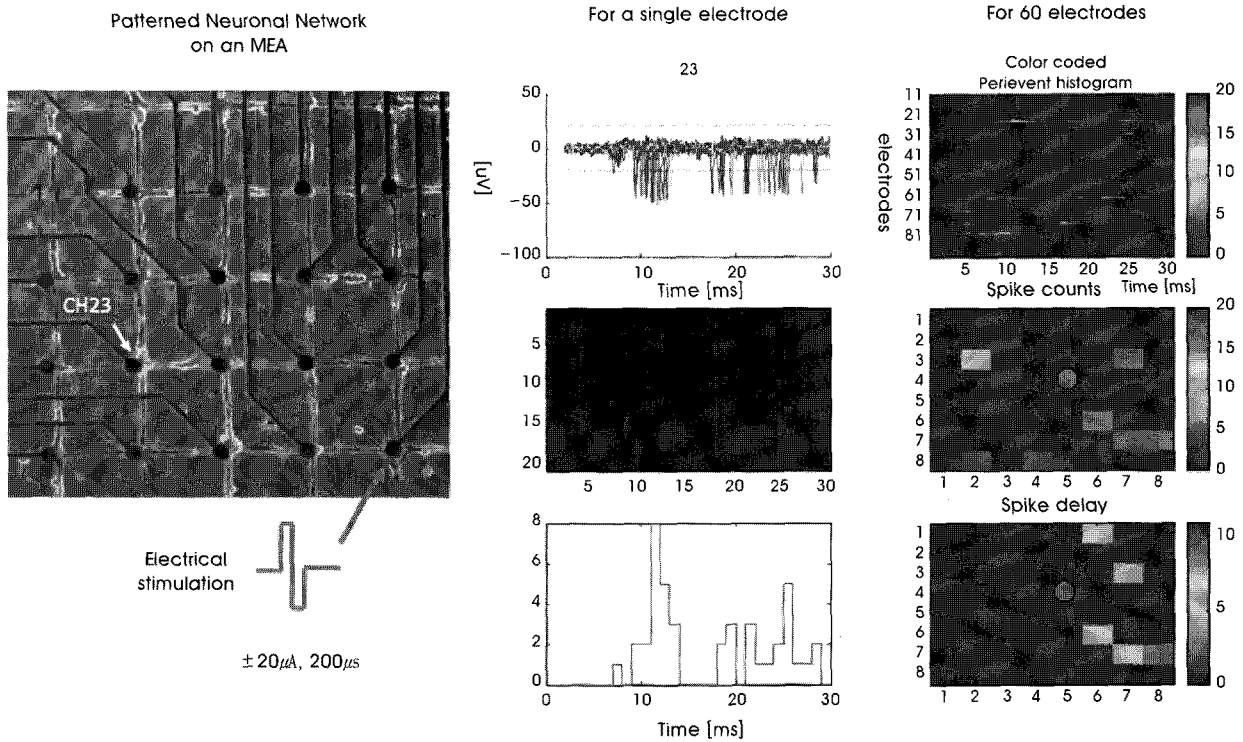
리프트-오프(lift-off) 기술은 반도체공정에서 금속 패턴을 만들 때 많이 이용하는 개념으로, 패턴을 원하지 않는 부분에 물리적인 마스크(photoresist [19], dry-resist (Parylene) [63], PDMS 스텐실 [64]) 로 가리고 표면 단백질을 용액에 담그면 노출된 부분에만 선택적으로 프린팅이 가능하다. 사진공정(photolithography)

를 사용하면 광원이 허용하는 최고 해상도의 패턴을 얻어낼 수 있어, 수 마이크로미터 크기의 신경돌기의 흡착을 정밀하게 조정해 보는 연구에서 사용되고 있다[19,62,65]. PDMS 스텐실을 마스크로 사용하는 경우 프린트 할 수 있는 패턴의 종류에 제한이 따른다.

미세유체 패턴닝은 PDMS 미세유체채널을 이용하여 표면에 액체를 선택적으로 전달하는 기법으로, 신경생물학 분야에서는 1990년 독일의 막스플랑크 연구소 연구팀에 의해 표면의 세포친화도에 따른 축색돌기의 성장을 시험하는 줄무늬 어세이에서 이용되었다 [66]. 미세유체칩은 유체의 입구와 출구가 있어야 하고, 이에 따라 고립된 임의의 패턴을 만드는 데는 제약이 있는 반면, 다채널 유체의 유속을 조절하여 다양한 농도의 단백질 표면이나, 농도 경사를 쉽게 조절할 수 있어, 이를 이용한 실험에 활용이 가능하다 [67]. 최근에는 축색만을 선택적으로 뽑아낼 수 있는 유체칩이 보고된 바 있다 [68].

**B. 신경세포 패턴닝을 위한 저밀도 세포배양방법**

신경세포들을 이용하여 시험관 조건에서 패턴된 네트워크 형성되는 과정을 연구하는데, 네트워크를 이루는 신경세포의 수를 최소



**그림 3.** (좌)미세전극칩 위에 미세접촉프린팅을 이용하여 격자모양의 신경네트워크를 만들고, 미세전류펄스를 전기자극으로 인가하여 네트워크의 반응을 측정 한 실험의 예.(중앙) CH23에서 측정된 전기자극에 따른 반응을 30 ms 간 기록하고 스파이크를 검출하여 자극후히스토그램(PSTH)을 만들. (우) 칩 전체의 PSTH를 색깔도표로 나타내고, 각 채널의 반응정도(spike count)와 반응지연시간(spike delay)를 측정된 전극의 위치에 맞게 표시한 도표.(제공: 카이스트 신경공학연구소)

**Fig. 3.** (Left) A grid pattern network is grown on a microelectrode array and network responses to electrical pulses are measured. (Center) An example of the evoked neural responses from CH 23 and the construction of PSTH. (Right) Array-wide network responses represented by color-coded PSTH and spatial plot of maximum spike counts and spike delays (Source: NEL, KAIST)

화하기 위하여 종종 저밀도의 신경세포배양법이 이용된다. 그러나, 세포의 수가 필요이상으로 적어지는 경우, 세포가 건강하지 않을 수 있어 이를 위해 개발된 특별한 기술들이 필요하다.

지난 15년간 신경세포 패터닝에 사용된 세포배양방법을 살펴보면, 대부분의 경우 무혈청 조건에서 교세포(astrocyte)의 성장을 억제하는 방법을 사용하여 왔다. 교세포는 혈청이 첨가된 배지액에서 성장 및 증식을 잘하게 되는데, 이러한 교세포가 주변에 많은 경우 뉴런(신경세포)들은 표면에 프린팅된 흡착성 물질 보다 교세포를 선호하여 이 세포들이 있는 쪽으로 이동하게 된다. 따라서, 표면의 생체분자 패터닝에 의해 뉴런을 성장시키려면 특히 초기에는 교세포가 같은 기관에서 성장하지 않도록 환경을 만들어 주어야 한다. 교세포의 성장을 초기에 억제하고 무혈청 조건에서도 신경세포의 성장과 건강을 유지시켜주기 위해 무혈청 배지액이 사용된다 [69]. 패터닝에 사용된 조직의 종류와 조직 추출 시기를 알아보면, 쥐(rat) 태아기 18-19 (E18-19)의 해마 [35,57,65,70-76] 가 가장 많았고, 같은 시기의 대뇌피질[77] 나 생후 1 - 7일 짜 쥐 (P1-P7)[78]도 사용되었다.

이러한 배양방법으로 패터닝된 기관 위에서 장기간 신경네트워크를 형성하는데 성공한 경우가 보고 되고 있으며, 최소 2주에서 길게는 5주까지도 최초의 패턴을 유지하면서 신경세포들을 배양하였다 [26,57,65]. 최근의 연구에서는 무혈청 배지액을 사용할 경우에도 장기간 배양을 하게되면, 성장교세포들이 2주 이후부터 생기게 되나, 처음부터 교세포가 있어 패터닝이 안되는 경우와 달리, 이 성장교세포들은 패터닝된 신경세포들 주변에서 성장하여 4주 이상 원하는 네트워크의 패턴이 유지됨을 보고하였다[79].

### C. 패터닝된 신경세포의 전기생리학적 특징

패터닝된 기관 위에서 배양된 신경세포들은 보통의 배양기관에서 키운 신경세포들과 비슷한 휴지전압(resting potential)와 입력저항을 갖고, 주변의 신경세포들과 화학적 시냅스를 형성한다 [73,76,80]. 패터닝된 신경망 안에 형성된 시냅스의 특성을 면역염색법과 이중홀셀패치클램프 방법으로 관찰한 결과 배양을 시작한 지 7일을 기점으로 시냅스의 수가 급격하게 증가하였고, 미세 선형 패턴과 같이 제한된 표면에서 자란 신경 세포들이 기능성 시냅스를 형성할 확률이 높으며, 단위 넓이 당 시냅스의 수도 더 많다고 보고하였다[73]. 또한, 자발적 후시냅스 전류 (Spontaneous Postsynaptic Currents)는 4일째에 처음으로 측정되었으며, 출현 빈도와 강도가 이후로 점차 증가하였다. Ravenscroft 등은 7~8일째에 자발적인 시냅스 전류를 선형패턴에서 측정하였고, 전기자극에 의한 유발 시냅스전류는 12일째에야 측정가능하다고 보고하였다. 또한, 이러한 유발 시냅스 전류는 배양초기 모두 GABA성임을 전기생리학적으로 알아내었다[74]. Wyart 등은 해마 신경세포를 여러가지 형태의 패턴으로 5주 간 유지하는데 성공하였으며, 이들은 이 패턴들에 이중패치클램프와 칼슘이미징을 이용하여 신경망의 선택적 연결성에 관해 연구하고 신경네트워크의 패턴 또는 구조가

그 네트워크의 시냅스 형성에 영향을 미칠 수 있다는 것을 실험적으로 보였다[65].

### D. 미세전극칩과 신경세포 패터닝

신경세포패터닝을 미세전극칩에 적용하기 위한 방법으로 표면의 생체분자 패터닝을 통한 네트워크 패터닝 방법이 용이하게 사용되었다. 생체분자 패터닝을 미세전극칩 위에 적용하는 연구는 일리노이대학 윌리교수팀에 의해 처음 보고되었으며, 이들은 리프트 오프 방식을 이용하여 세포흡착성 폴리라이신을 폴리이미드로 된 전극칩 표면에 선형으로 패터닝하고, 해마 신경세포를 한 달간 배양하며 선풍이 다른 네트워크들의 전기적 활성을 분석하였다 [19]. 이후, 미세접촉프린팅방식으로 세포친화성 분자를 패터닝하고 이외의 영역에 세포흡착억제성 분자를 코팅하여 성능이 우수한 배양된 네트워크를 형성하는 기술들이 보고되었다 [26,35,36,81]. 이렇게 패터닝된 신경네트워크의 활성과 특정 패턴이 없이 배양된 네트워크들과 비교했을 때, 보다 많은 전극들에서 신경신호가 측정되었고, 보다 높은 자발적 발화율이 관찰되었다. 또, 이러한 현상들이 네트워크 내의 성장교세포의 성장과 연관성이 있다는 연구도 보고되었다 [82].

미세전극칩 위에 생체분자 프린팅이 안정적으로 이루어지게 하기 위해 물리적 흡착이 아닌 화학적 공유결합을 이용하고, 이를 통해 좀더 장기간 안정적으로 신경네트워크를 배양하는 연구도 진행되었다. Nam 등은 비교적 안정적으로 단백질을 고정시킬 수 있는 금-티올(gold-thiol) 화학반응을 미세전극칩 위에 도입하기 위해 폴리이미드로 만든 칩 표면 위에 얇은 금 박막을 입힌 미세전극칩을 제작하고, 그 위에서 칩 표면을 카르복실기로 전환하여 폴리라이신을 공유결합을 통해 패터닝하였다[25]. 그리고, 패턴 이외의 부분에 세포들이 자라나가는 것을 억제하기 위해 폴리에틸렌글라이콜(PEG-NH<sub>2</sub>)을 고정시켰다. 이렇게 설계된 칩 위에서 해마 신경세포들은 약 2주간 성공적으로 패턴을 유지하며 성장하였으며, 자발적 반응도 측정되었다. 최근에는 금박막을 입히는 번거로움을 제거하고자, 기존에 사용되는 다양한 미세전극칩의 유기 및 무기물 절연체에 잘 반응하는 에폭시 기반 실란(3-GPS)를 이용하여 패터닝된 네트워크를 배양하고 신호 측정 및 자극실험을 하여 보고하였다 [26].

## IV. 결론

지금까지 우리는 패터닝된 신경네트워크를 설계하고 분석하기 위한 뉴런온칩 기술로서 마이크로미터 수준의 신경세포들의 성장에 필요한 표면패터닝과 세포들의 전기생리학적 특성을 연구하기 위한 전기적 인터페이스인 미세전극칩시스템에 대하여 알아보았다.

패터닝을 통하여 구현된 신경네트워크를 이용한 연구가 우리의 뇌에 대한 이해에 직접적인 연관성을 갖기 위해서는 아직도 풀어야 할 과제들이 많이 있다. 뉴런온칩 기술의 근간이 되는 신경세포배

양은 시험관 조건이라는 제약 때문에 연구의 목적에 따라 그 의미 부여가 달라질 수 있어 배양시스템의 장단점을 정확히 이해하는 것이 공학적으로 접근하는데 중요하다. 미세전극칩의 경우, 최근 나노기술을 이용한 초미세전극칩 개발에 많은 연구자들의 관심이 집중되어 있으며, 이를 통하여 새로운 뉴런온칩 플랫폼의 등장이 기대되는 바이다.

### 참고문헌

- [1] C. W. Cotman, D. H. Cribbs, and K. H. Kahler, "Toward Establishing Neural Networks in Culture," in *Enabling Technologies for Cultured Neural Networks*, D. A. Stenger and T. M. McKenna, Eds. San Diego, USA: Academic Press, 1994, pp. 3-22.
- [2] M. Taketani and M. Baudry, *Advances in Network Electrophysiology: Using Multi-Electrode Array*. New York, USA: Springer, 2006.
- [3] C. A. J. Thomas, P. A. Springer, G. E. Loeb, Y. Berwald-Netter, and L. M. Okun, "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 74, pp. 61-66, 1972.
- [4] G. W. Gross, "Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 26, pp. 273-279, May 1979.
- [5] J. Pine, "Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes," *J. Neurosci. Methods*, vol. 2, pp. 19-31, 1980/2 1980.
- [6] J. L. Novak and B. C. Wheeler, "Recording from the Aplysia abdominal ganglion with a planar microelectrode array," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 33, pp. 196-202, February 1986.
- [7] S. A. Boppart, B. C. Wheeler, and C. S. Wallace, "A flexible perforated microelectrode array for extended neural recordings," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 39, pp. 37-42, 1992.
- [8] U. Egert, B. Schlosshauer, S. Fennrich, W. Nisch, M. Fejtl, T. Knott, T. Müller, and H. Hämmerle, "A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode array," *Brain Research Protocols*, vol. 2, pp. 229-242, 1998.
- [9] K. Mathieson, W. Cunningham, J. Marchal, J. Melone, M. Horn, V. O'Shea, K. M. Smith, A. Litke, E. J. Chichilnisky, and M. Rahman, "Fabricating high-density microarrays for retinal recording," *Microelectron. Eng.*, vol. 67-68, pp. 520-527, 2003/6 2003.
- [10] G. W. Gross, W. Y. Wen, and J. W. Lin, "Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures," *J. Neurosci. Methods*, vol. 15, pp. 243-252, 1985/0 1985.
- [11] B. C. Wheeler and J. L. Novak, "Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 33, pp. 1204-1212, December 1986.
- [12] D. A. Borkholder, J. Bao, N. I. Maluf, E. R. Perl, and G. T. Kovacs, "Microelectrode arrays for stimulation of neural slice preparations," *J. Neurosci. Methods*, vol. 77, pp. 61-6, Nov 7 1997.
- [13] Y. Jimbo, H. P. C. Ronbinson, and A. Kawana, "Strengthening of synchronized activity by tetanic stimulation in cortical cultures: Application of planar electrode arrays," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 45, pp. 1297-1304, November 11 1998.
- [14] H. Oka, K. Shimono, R. Ogawa, H. Sugihara, and M. Taketani, "A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice," *J. Neurosci. Methods*, vol. 93, pp. 61-67, 1999/10/30 1999.
- [15] J. R. Buitengeweg, W. L. Rutten, E. Marani, S. K. Polman, and J. Ursum, "Extracellular detection of active membrane currents in the neuron-electrode interface," *J. Neurosci. Methods*, vol. 115, pp. 211-221, Apr 15 2002.
- [16] M. O. Heuschkel, M. Fejtl, M. Raggenbass, D. Bertrand, and P. Renaud, "A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices," *J. Neurosci. Methods*, vol. 114, pp. 135-148, 2002/3/15 2002.
- [17] T. B. DeMarse, D. A. Wagenaar, A. W. Blau, and S. M. Potter, "The Neurally Controlled Animat: Biological Brains Acting with Simulated Bodies," *Autonomous Robots*, vol. 11, pp. 305-310, 2001.
- [18] G. T. A. Kovac, "Introduction to the theory, design, and modeling of thin film microelectrodes for neural interfaces," in *Enabling Technologies for Cultured Neural Networks*, D. A. Stenger and T. M. McKenna, Eds. San Diego, CA: Academic Press, 1994, pp. 121-165.
- [19] J. C. Chang, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler, "Microelectrode array recordings of patterned hippocampal neurons for four weeks," *Biomed. Microdevices*, vol. 2, pp. 245-253, 2000.
- [20] J. van Pelt, P. S. Wolters, M. A. Corner, W. L. Rutten, and G. J. Ramakers, "Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, pp. 2051-62, Nov 2004.
- [21] S. I. Morefield, E. W. Keefer, K. D. Chapman, and G. W. Gross, "Drug evaluations using neuronal networks cultured on microelectrode arrays," *Biosensors Bioelectron.*, vol. 15, pp. 383-396, 2000/10 2000.
- [22] S. M. Potter and T. B. DeMarse, "A new approach to neural cell culture for long-term studies," *J. Neurosci. Methods*, vol. 110, pp. 17-24, 2001/9/30 2001.
- [23] D. A. Wagenaar, J. Pine, and S. M. Potter, "Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays," *J. Neurosci. Methods*, vol. 138, pp. 27-37, 2004/9/30 2004.
- [24] M. E. Ruaro, P. Bonifazi, and V. Torre, "Toward the neurocomputer: image processing and pattern recognition with neuronal cultures," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 52, pp. 371-83, Mar 2005.
- [25] Y. Nam, J. C. Chang, B. C. Wheeler, and G. J. Brewer, "Gold-coated microelectrode array with thiol linked self-assembled monolayers for engineering neuronal cultures," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, pp. 158-165, 2004.
- [26] Y. Nam, D. W. Branch, and B. C. Wheeler, "Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, pp. 589-97, Dec 15 2006.
- [27] H. Golan, K. Mikenberg, V. Greenberger, and M. Segal, "GABA



- withdrawal modifies network activity in cultured hippocampal neurons,” *Neural Plas.*, vol. 7, pp. 31-42, 2000.
- [28] D. M. Sokal, R. Mason, and T. L. Parker, “Multi-neuronal recordings reveal a differential effect of thapsigargin on bicuculline- or gabazine-induced epileptiform excitability in rat hippocampal neuronal networks,” *Neuropharmacology*, vol. 39, pp. 2408-17, Sep 2000.
- [29] I. Suzuki, Y. Sugio, Y. Jimbo, and K. Yasuda, “Stepwise pattern modification of neuronal network in photo-thermally-etched agarose architecture on multi-electrode array chip for individual-cell-based electrophysiological measurement,” *Lab on a Chip*, vol. 5, pp. 241-7, Mar 2005.
- [30] J. V. Selinger, J. J. Pancrazio, and G. W. Gross, “Measuring synchronization in neuronal networks for biosensor applications,” *Biosensors Bioelectron.*, vol. 19, pp. 675-683, 2004/2/15 2004.
- [31] Y. Jimbo, A. Kawana, P. Parodi, and V. Torre, “The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats,” *Biol. Cybern.*, vol. 83, pp. 1-20, 2000.
- [32] D. A. Wagenaar, R. Madhavan, J. Pine, and S. M. Potter, “Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 25, pp. 680-8, Jan 19 2005.
- [33] R. Segev, Y. Shapira, M. Benveniste, and E. Ben-Jacob, “Observation and modeling of synchronized bursting in two-dimensional neural network,” *Physical Review E*, vol. 64, 2001.
- [34] G. Shahaf and S. Marom, “Learning in networks of cortical neurons,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 21, pp. 8782-8788, November 15 2001.
- [35] C. D. James, A. J. Spence, N. M. Dowell-Mesfin, R. J. Hussain, K. L. Smith, H. G. Craighead, M. S. Isaacson, W. Shain, and J. N. Turner, “Extracellular recordings from patterned neuronal networks using planar microelectrode arrays,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, pp. 1640-1648, 2004.
- [36] Y. Nam and B. C. Wheeler, “Multichannel recording and stimulation of neuronal cultures grown on microstamped poly-D-lysine,” in *the 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering In Medicine And Biology Society*, San Francisco, CA, 2004.
- [37] Y. Jimbo, N. Kasai, K. Torimitsu, T. Tateno, and H. Robinson, “A System for MEA-Based Multisite Stimulation,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 50, pp. 241-248, 2004.
- [38] Y. Nam, E. A. Brown, J. D. Ross, R. A. Blum, B. C. Wheeler, and S. P. DeWeerth, “A retrofitted neural recording system with a novel stimulation IC to monitor early neural responses from a stimulating electrode,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 178, pp. 99-102, Mar 30 2009.
- [39] B. Eversmann, M. Jenkner, F. Hofmann, C. Paulus, R. Brederlow, B. Holzapfl, P. Fromherz, M. Merz, M. Brenner, M. Schreiter, R. Gabl, K. Plehnert, M. Steinhauser, G. Eckstein, D. Schmitt-Landsiedel, and R. Thewes, “A 128 CMOS Biosensor Array for Extracellular Recording of Neural Activity,” *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, vol. 38, pp. 2306-2317, 2003.
- [40] W. Dabrowski, P. Grybos, and A. M. Litke, “A low noise multichannel integrated circuit for recording neuronal signals using microelectrode arrays,” *Biosensors Bioelectron.*, vol. 19, pp. 749-761, 2004/2/15 2004.
- [41] F. Heer, W. Franks, A. Blau, S. Taschini, C. Ziegler, A. Hierlemann, and H. Baltes, “CMOS microelectrode array for the monitoring of electrogenic cells,” *Biosensors Bioelectron.*, vol. 20, pp. 358-366, 2004/9/15 2004.
- [42] L. Berdondini, P. D. van der Wal, O. Guenat, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, P. Seitz, R. Kaufmann, P. Metzler, N. Blanc, and S. Rohr, “High-density electrode array for imaging in vitro electrophysiological activity,” *Biosensors Bioelectron.*, vol. 21, pp. 167-174, 2005/7/15 2005.
- [43] E. Hulata, R. Segev, and E. Ben-Jacob, “A method for spike sorting and detection based on wavelet packets and Shannon's mutual information,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 117, pp. 1-12, 2002/5/30 2002.
- [44] K. H. Kim and S. J. Kim, “A wavelet-based method for action potential detection from extracellular neural signal recording with low signal-to-noise ratio,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 50, pp. 999-1011, Aug 2003.
- [45] K. H. Kim and S. J. Kim, “Neural spike sorting under nearly 0-dB signal-to-noise ratio using nonlinear energy operator and artificial neural-network classifier,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 47, pp. 1406-11, Oct 2000.
- [46] B. C. Wheeler, “Automatic Discrimination of Single Units,” in *Methods for Neural Ensemble Recordings*, M. A. L. Nicolelis, Ed. New York: CRC, 1999, pp. 61-78.
- [47] S. Marom and G. Shahaf, “Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy,” *Q. Rev. Biophys.*, vol. 35, pp. 63-87, Feb 2002.
- [48] G. W. Gross, B. K. Rhoades, H. M. Azzazy, and M. C. Wu, “The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors,” *Biosensors Bioelectron.*, vol. 10, pp. 553-67, Summer 1995.
- [49] R. Madhavan, Z. C. Chao, and S. M. Potter, “Spontaneous bursts are better indicators of tetanus-induced plasticity than responses to probe stimuli,” in *the 2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, Arlington, Virginia, 2005.
- [50] R. Segev, I. Baruchi, E. Hulata, and E. Ben-Jacob, “Hidden neuronal correlations in cultured networks,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 92, p. 118102, Mar 19 2004.
- [51] Y. Jimbo, T. Tateno, and H. Robinson, “Simultaneous Induction of Pathway-Specific Potentiation and Depression in Networks of Cortical Neurons,” *Biophys. J.*, vol. 76, pp. 670-678, Feb. 1999 1999.
- [52] D. Eytan, N. Brenner, and S. Marom, “Selective adaptation in networks of cortical neurons,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 23, pp. 9349-56, Oct 15 2003.
- [53] P. C. Letourneau, “Cell-to-Substratum Adhesion and Guidance of Axonal Elongation,” *Dev. Biol.*, vol. 44, pp. 92-101, 1975.
- [54] D. Kleinfeld, K. H. Kahler, and P. E. Hockberger, “Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 8, pp. 4098-4120, 1988.
- [55] A. Kumar and G. M. Whitesides, “Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching,” *Appl. Phys.*

- Lett.*, vol. 63, pp. 2002-2004, 1993/10/04/ 1993.
- [56] A. Bernard, E. Delamarche, S. Heinz, M. Bruno, H. R. Bosshard, and H. Biebuyck, "Printing Patterns of Proteins," *Langmuir*, vol. 14, pp. 2225-2229, 1998.
- [57] D. W. Branch, B. C. Wheeler, G. J. Brewer, and D. E. Leckband, "Long-term maintenance of patterns of hippocampal pyramidal cells on substrates of polyethylene glycol and microstamped polylysine," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 47, pp. 290-300, March 2000.
- [58] J. C. Chang, "Technologies for and electrophysiological studies of structured, living, neuronal networks on microelectrode array," in *Elect. and Comp. Eng* Urbana, IL: University of Illinois, 2002.
- [59] C. D. James, R. C. Davis, L. Kam, H. G. Craighead, M. Isaacson, J. N. Turner, and W. Shain, "Patterned Protein Layers on Solid Substrates by Thin Stamp Microcontact Printing," *Langmuir*, vol. 14, pp. 741-744, 1998.
- [60] M. Scholl, C. Sprössler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll, and A. Offenhäusser, "Ordered networks for rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces," *J. Neurosci. Methods*, vol. 104, pp. 65-75, 2000.
- [61] J. L. Tan, J. Tien, and C. S. Chen, "Microcontact printing of proteins on mixed self-assembled monolayers," *Langmuir*, vol. 18, pp. 519-523, 2002.
- [62] D. W. Branch, J. M. Corey, J. A. Weyhenmeyer, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler, "Microstamp patterns of biomolecules for high-resolution neuronal networks," *Med Biol Eng Comput*, vol. 36, pp. 135-141, Jan 1998.
- [63] B. Ilic and H. Craighead, "Topographical patterning of chemically sensitive biological materials using a polymer-based dry lift off," *Biomed. Microdevices*, vol. 2, pp. 371-322, 2000.
- [64] A. Folch, B. H. Jo, O. Hurtado, D. J. Beebe, and M. Toner, "Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, pp. 346-53, Nov 2000.
- [65] C. Wyart, C. Ybert, L. Bourdieu, C. Herr, C. Prinz, and D. Chatenay, "Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces," *J. Neurosci. Methods*, vol. 117, pp. 123-131, 2002/6/30 2002.
- [66] J. Vielmetter, B. Stolze, F. Bonhoeffer, and C. Stuermer, "In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells," *Exp. Brain Res.*, vol. 81, pp. 283-287, 1990.
- [67] N. Li Jeon, H. Baskaran, S. K. Dertinger, G. M. Whitesides, L. Van de Water, and M. Toner, "Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device," *Nat. Biotechnol.*, vol. 20, pp. 826-30, Aug 2002.
- [68] A. M. Taylor, M. Blurton-Jones, S. W. Rhee, D. H. Cribbs, C. W. Cotman, and N. L. Jeon, "A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport," *Nat Methods*, vol. 2, pp. 599-605, Aug 2005.
- [69] G. J. Brewer, J. R. Torricelli, E. K. Evege, and P. J. Price, "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination," *J. Neurosci. Res.*, vol. 35, pp. 567-576, Aug 1 1993.
- [70] A. A. Oliva, C. D. James, C. E. Kingman, H. G. Craighead, and G. A. Banker, "Patterning Axonal Guidance Molecules Using a Novel Strategy for Microcontact Printing," *Neurochem. Res.*, vol. 28, pp. 1639-1648, 2003/11// 2003.
- [71] J. M. Corey, B. C. Wheeler, and G. J. Brewer, "Micrometer resolution silane-based patterning of hippocampal neurons: Critical variables in photoresist and laser ablation processes for substrate fabrication," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 43, pp. 944-955, September 1996.
- [72] J. M. Corey, B. C. Wheeler, and G. J. Brewer, "Compliance of hippocampal neurons to patterned substrate networks," *J. Neurosci. Res.*, vol. 30, pp. 300-307, 1991.
- [73] W. Ma, Q.-Y. Liu, D. R. Jung, P. Manos, J. J. Pancrazio, A. E. Schaffner, J. L. Barker, and D. A. Stenger, "Central neuronal synapse formation on micropatterned surfaces," *Dev. Brain Res.*, vol. 111, pp. 231-243, 1998.
- [74] M. S. Ravenscroft, K. E. Bateman, K. M. Schffer, H. M. Schessler, D. R. Jung, T. W. Schneider, C. B. Montgomery, T. L. Custer, A. E. Schaffner, Q.-Y. Liu, Y. X. Li, J. L. Barker, and J. J. Hickman, "Developmental neurobiology implications from fabrication and analysis of hippocampal neuronal networks on patterned silane-modified surfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, pp. 12169-12177, 1998.
- [75] M. Amiji and K. Park, "Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers," *Biomaterials*, vol. 13, pp. 682-690, 1992.
- [76] M. Matsuzawa, T. Tabata, W. Knoll, and M. Kano, "Formation of hippocampal synapses on patterned substrates of a laminin-derived synthetic peptide," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 12, pp. 903-910, 2000.
- [77] A. K. Vogt, F. D. Stefani, A. Best, G. Nelles, A. Yasuda, W. Knoll, and A. Offenhausser, "Impact of micropatterned surfaces on neuronal polarity," *J. Neurosci. Methods*, vol. 134, pp. 191-198, 2004/4/30 2004.
- [78] D. A. Heller, V. Garga, K. J. Kelleher, T. C. Lee, S. Mahubani, L. A. Sigworth, T. R. Lee, and M. A. Rea, "Patterned networks of mouse hippocampal neurons on peptide-coated gold surfaces," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 883-9, Mar 2005.
- [79] Y. Nam, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler, "Development of astroglial cells in patterned neuronal cultures," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 18, pp. 1091-100, 2007.
- [80] Q.-Y. Liu, M. Coulombe, J. Dumm, K. M. Shaffer, A. E. Schaffner, J. L. Barker, J. J. Pancrazio, D. A. Stenger, and W. Ma, "Synaptic connectivity in hippocampal neuronal networks cultured on micropatterned surfaces," *Dev. Brain Res.*, vol. 12, pp. 223-231, 2000.
- [81] J. C. Chang, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler, "Modulation of neural network activity by patterning," *Biosensors Bioelectron.*, vol. 16, pp. 527-533, 2001.
- [82] J. C. Chang, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler, "Neuronal network structuring induces greater neuronal activity through enhanced astroglial development," *J Neural Eng*, vol. 3, pp. 217-26, Sep 2006.