

**Univerzita Karlova**  
**3. lékařská fakulta**

**Disertační práce**

Praha, 2022

**Ing. Marek Novák**

**Univerzita Karlova**  
**3. lékařská fakulta**

## Disertační práce

Vývoj endoskopicky implantovatelného neurostimulátoru s pH senzorem pro léčbu gastroezofageálního refluxu a návrh zpětnovazebného řízení neurostimulace na základě změny pH v jícnu.

Development of an endoscopically implantable neurostimulator with pH sensor for treatment of gastroesophageal reflux disease and design of feedback-controlled neurostimulation based on pH changes in the esophagus.

Školitel: prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 8.4.2022

Ing. Marek Novák

Identifikační záznam:

NOVÁK, Marek. *Vývoj endoskopicky implantovatelného neurostimulátoru s pH senzorem pro léčbu gastroezofageálního refluxu a návrh zpětnovazebného řízení neurostimulace na základě změny pH v jícnu. [Development of an endoscopically implantable neurostimulator with pH sensor for treatment of gastroesophageal reflux disease and design of feedback-controlled neurostimulation based on pH changes in the esophagus]*. Praha, 2022, 142 stran, 9 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav lékařské biofyziky a lékařské informatiky 3. LF UK 2022. Školitel: prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA.

**Klíčová slova:** endoskopie, submukoza, implantát, neurostimulátor, pH senzor, jícen, refluxní choroba jícnu, zpětná vazba, řízení

**Keywords:** endoscopy, submucosa, implantable device, neurostimulator, pH sensor, esophagus, gastroesophageal reflux disease, feedback, control

## **Poděkování**

Tímto bych rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Jozefu Rosinovi, Ph.D., MBA za odborné vedení za celou dobu studia a cenné rady a připomínky, které vedly k úspěšnému dokončení této práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. MUDr. Janu Hajerovi, Ph.D. za možnost spolupráce na tomto projektu, a za to, že mě společně s doc. MUDr. Janem Polákem, Ph.D., MBA, kterému tímto také děkuji, uvedli do lékařských věd. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a přátelům za podporu a trpělivost při přípravě této práce.

Tato práce vznikla za podpory projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy, identifikační číslo GAUK 176119.

## Abstrakt

Refluxní choroba jícnu je častým onemocněním zažívacího traktu v západním světě s prevalencí dosahující 20 %. Dnešní možnosti léčby méně závažných průběhů onemocnění zahrnují dietní a režimová opatření a podávání antacid. U vážnějších a/nebo prolongovaných průběhů, kdy popsaná léčba nepomáhá, se nasazuje léčba inhibitory protonové pumpy. Nezanedbatelné procento pacientů ovšem na tuto léčbu nereaguje. V dnešní době je pro tuto skupinu pacientů prakticky jedinou možností léčby fundoplikace, která je ovšem díky nejednoznačným závěrům o její účinnosti terčem kontroverze. Velkým problémem u refluxní choroby jícnu jsou kromě výrazné snížení kvality života komplikace, které zahrnují ezofagitidu, způsobující zúžení jícnu spojené s obtížným polykáním, a následně vznik Barretova jícnu, který je prekancerózou. Následný adenokarcinom jícnu se pak vyznačuje vysokou mortalitou. Až v posledních letech se začala rozvíjet metoda léčby spočívající v neurostimulaci dolního jícnového svěrače za účelem zvýšení jeho tlaku, což vede ke snížení závažnosti či eliminaci refluxních příhod. Dnes je v klinické praxi k dispozici jediné řešení, které cílí na neurostimulaci jícnu, a to se vyznačuje složitou metodou implantace – nutnost kombinace laparoskopické / robotické implantace elektrod a subkutánní implantace zařízení. Cílem práce bylo proto vytvořit řešení sestávající z neurostimulátoru a pH senzoru, které by bylo implantovatelné endoskopicky v rámci jednoho výkonu a umožnilo by zpětnovazební řízení neurostimulace na základě aktuální hodnoty pH v jícnu. Tohoto cíle bylo dosaženo konstrukcí vlastního hardware a vytvoření software včetně vlastního bezdrátového komunikačního protokolu. Vzniklo několik prototypů výsledného řešení, které demonstrovaly možnost implantace pomocí metody endoskopického submukozního tunnellingu, možnost bezdrátového dobíjení implantátu a možnost bezdrátové komunikace. V neposlední řadě byla vyvinuta nová metoda enkapsulace implantovatelného zařízení pomocí epoxidu s následným nanesením biokompatibilního polymeru. Finální experiment potvrdil funkci zpětnovazebního řízení, kdy neurostimulátor korektně reagoval na informace z pH senzoru, které přijímal a autonomně zpracovával bez nutnosti řízení dalším zařízením či uživatelem.

**Klíčová slova:** endoskopie, submukoza, implantát, neurostimulátor, pH senzor, jícen, refluxní choroba jícnu, zpětná vazba, řízení

## **Abstract**

Gastroesophageal reflux disease is a common gastrointestinal disease in the western world with a prevalence of 20%. Today's treatment options for the less severe course of the disease include dietary and regimen measures and the administration of antacids. For more severe and/or prolonged courses, where current treatment is not helpful, treatment with proton pump inhibitors is used. However, a substantial percentage of patients is not responding to this treatment. For this group of patients, fundoplication is practically the only treatment option, but it is a controversial one due to ambiguous conclusions about its efficacy. A major problem with reflux esophageal disease, apart from the significant reduction in quality of life, is the complications, which include esophagitis causing narrowing of the esophagus associated with difficulty in swallowing, and the subsequent development of Barrett's esophagus, which is a precancerous condition. Subsequent adenocarcinoma of the esophagus is then characterised by a high mortality rate. It is only in recent years that a method of treatment consisting of neurostimulation of the lower esophageal sphincter to increase its pressure has been developed, leading to a reduction or elimination of reflux episodes. Today, the only solution available in clinical practice that targets esophageal neurostimulation is characterized by a complex implantation method - requiring a combination of laparoscopic/robotic electrode implantation and subcutaneous device implantation. The aim of this work was to develop a solution consisting of a neurostimulator and a pH sensor that could be implanted endoscopically in a single procedure and would allow feedback control of neurostimulation based on actual esophageal pH data. This goal was achieved by designing custom hardware and creating software, including a custom wireless communication protocol, and several prototypes of the resulting solution were created to demonstrate the possibility of implantation using the endoscopic submucosal tunnelling method, the possibility of wireless implant recharging, and the possibility of wireless communication. Finally, a new method of encapsulating implantable devices using epoxy followed by the application of a biocompatible polymer was developed. The final experiment confirmed the feedback control function, where the neurostimulator correctly responded to the information from the pH sensor, which it received and processed autonomously without the need for control by another device or user.

**Keywords:** endoscopy, submucosa, implantable device, neurostimulator, pH sensor, esophagus, gastroesophageal reflux disease, feedback, control

## Seznam zkratek

ACK	Potvrzení příjmu dat odesláním potvrzovací zprávy (z anglického Acknowledge)
AD	Analogově-digitální
AIMD	Aktivní implantabilní zdravotnický prostředek (z anglického Active Implantable Medical Device)
CVD	Chemická depozice z plynné fáze (z anglického Chemical Vapour Deposition)
DA	Digitálně-analogový
DBS	Deep brain stimulation
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESB	Enhanced ShockBurst (název komunikačního protokolu Nordic Semiconductor)
ESD	Endoskopická submukozní disekce
ESP	Endoskopický submukozní pocketing
GERD	Refluxní choroba jícnu (z anglického GastroEsophageal Reflux Disease)
ISFET	Iontově selektivní tranzistor řízený elektrickým polem (z anglického Ion Sensitive Field Effect Transistor)
ISM	Iontově selektivní membrána
LC	Induktor-kondenzátor
LF RFID	Rádiofrekvenční identifikace využívající nízkou frekvenci (z anglického Low Frequency RadioFrequency IDentification)
MII-pH	Kombinace multikanálového impedančního a pH měření (z anglického Multichannel Intraluminal Impedance and pH monitoring)
MOSFET	Polem řízený tranzistor s řídicí elektrodou odizolovanou vrstvou oxidu (z anglického Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor)
OOK	On-off klíčování
P3HT	poly(3-hexylthiofen-2,5-diyl)
PEDOT	poly(3,4-ethylendioxythiofen)
PLL	Fázový závěs (z anglického Phase Locked Loop)
POEM	Perorální endoskopická myotomie
PPI	Inhibitor protonové pumpy (z anglického Proton Pump Inhibitor)
PRX	Režim příjmu dat nebo zařízení v režimu příjmu dat (z anglického Packet Receipt)
PSS	Polystyrensulfonát
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTX	Režim odesílání dat nebo zařízení v režimu odesílání dat (z anglického Packet Transmission)



PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWM	Pulzně šířková modulace (z anglického Pulse Width Modulation)
RC	Rezistor – kondenzátor (z anglického Resistor – Capacitor)
RF	Rádiofrekvenční
RSSI	Ukazatel síly signálu (z anglického Received Signal Strength Indicator)
RTG	Rentgen
RX	Přijímací režim
SDS	Dodecylsírán sodný (z anglického Sodium Dodecyl Sulfate)
TX	Odesílací režim
UART	Univerzální asynchronní sběrnice (z anglického Universal Asynchronous Receiver-Transmitter)
USB	Univerzální sériová sběrnice (z anglického Universal Serial Bus)

# Obsah

1	Úvod, aktuální stav techniky .....	10
1.1	Historie aktivních implantabilních zdravotnických prostředků .....	10
1.2	Diagnostika a léčba refluxní choroby jícnu s využitím implantabilních zdravotnických prostředků.....	10
1.3	Teorie neurostimulace dolního jícnového svěrače a měření pH .....	13
1.4	Endoskopická submukozní disekce a její možnosti .....	14
2	Cíle práce .....	15
2.1	Vývoj implantační metody včetně zjištění omezení pro implantát.....	15
2.2	Vývoj systému bezdrátového přenosu energie.....	15
2.3	Vývoj endoskopicky implantovatelného neurostimulátoru.....	15
2.4	Vývoj endoskopicky implantovatelného pH senzoru.....	16
2.5	Vývoj nových metod a materiálů pro enkapsulaci implantátů.....	16
2.6	Vývoj bezdrátového rozhraní pro komunikaci.....	16
2.7	Vývoj zpětnovazebního systému pro léčbu refluxní choroby jícnu.....	17
3	Shrnutí použité metodiky a experimentálních metod .....	18
4	Výsledky .....	20
4.1	Charakterizace systémů pro bezdrátový přenos energie v pásmu do 4 GHz .....	20
4.2	Vývoj komunikačního protokolu pro implantabilní zařízení .....	34
4.3	První úspěšná endoskopická implantace neurostimulátoru.....	38
4.4	Neurostimulátor s bezdrátovým dobíjením baterie .....	48
4.5	Bezbatiový neurostimulátor .....	65
4.6	Design a konstrukce finálního neurostimulátoru .....	74
4.7	Vývoj pH senzoru na bázi biokompatibilních polymerů .....	77
4.8	Implantabilní jícnový pH senzor včetně přijímače .....	81
4.9	Návrh miniaturního analogového obvodu pro polovodičové pH senzory .....	112
4.10	Design a konstrukce finálního implantabilního pH senzoru .....	115

4.11	Externí stanice a ovládací software .....	118
4.12	Metoda enkapsulace zařízení pomocí epoxidu a P3HT polymeru .....	121
4.13	Nezávislé posouzení biokompatibility zkonstruovaných zařízení .....	124
4.14	Ověření funkčnosti zpětnovazebního systému řízení neurostimulace .....	127
5	Diskuze .....	131
5.1	Srovnání s komerčně dostupnými řešeními .....	131
5.2	Zhodnocení výsledků in-vitro experimentu .....	131
5.3	Zhodnocení výsledků nezávislého posouzení biokompatibility.....	131
5.4	Limitace řešení, spolehlivost.....	132
5.5	Budoucí práce.....	133
6	Závěr .....	134
7	Seznam literatury .....	135
8	Seznam obrázků .....	140
9	Seznam tabulek .....	141
10	Seznam grafů .....	141
11	Seznam příloh .....	142

# 1 Úvod, aktuální stav techniky

## 1.1 *Historie aktivních implantabilních zdravotnických prostředků*

Obor aktivních implantabilních zdravotnických prostředků (AIMD) je úzce spjat s vynálezem tranzistoru v prosinci 1947 (1). Ten umožnil významnou miniaturizaci elektronických zařízení a snížení jejich elektrické spotřeby do takové míry, že bylo možno vyrobit jednoduchá nositelná, a později i implantovatelná zařízení. AIMD lze rozdělit na dva základní typy – aktuátory a senzory.

Příkladem aktuátoru je např. kardiostimulátor, jeho vynález se datuje do roku 1956 v nositelné podobě, v roce 1958 pak v plně implantovatelné podobě.

V oblasti senzorů byl v roce 1959 publikován popis implantovatelného senzoru pro měření teploty těla s rádiovým vysílačem (2).

Hlavní charakteristikou prvních implantabilních zařízení byla jejich z dnešního pohledu primitivní konstrukce, často využívající zapojení nízkých jednotek tranzistorů první generace. Od samotného počátku šel další vývoj v oblasti AIMD ruku v ruce s pokrokem v oblasti polovodičové a telekomunikační techniky. V dnešní době není oblast aktuátorů omezena čistě na kardiostimulátory, ale neurostimulační terapie se používá pro léčbu širokého spektra chorob, např. deep-brain stimulation (DBS) při léčbě Parkinsonovy nemoci (3), stimulaci míchy nebo periferních nervů při léčbě chronických bolestí (4), a v neposlední řadě i k léčbě dysmotilit gastrointestinálního traktu, např. gastroparézy (5, 6). Jednou z nejnovějších aplikací neurostimulace je i námi studovaná možnost léčby refluxní choroby jícnu, která spočívá ve stimulaci svaloviny dolního jícnového svěrače, což vede ke zvýšení tlaku svěrače a tím snížení pravděpodobnosti vzniku refluxu (7, 8).

## 1.2 *Diagnostika a léčba refluxní choroby jícnu s využitím implantabilních zdravotnických prostředků*

Refluxní choroba jícnu (GERD) je v západním světě častým onemocněním zažívacího traktu (9). Jedná se o jednu z poruch motilit jícnu, způsobenou insuficiencí dolního jícnového svěrače. V důsledku jeho nedostatečné funkce dochází k částečnému návratu obsahu žaludku do jícnu. Vzhledem k obsahu kyseliny chlorovodíkové a obsahu trávicích enzymů dochází při neléčeném refluxu ke chronickému dráždění vnitřní stěny jícnu, které s postupem času přechází v erozi.

Hlavním subjektivním příznakem refluxní choroby jícnu je pálení žáhy, bolest za hrudní kostí, která se nápadně podobá bolestem při angině pectoris, ztížené polykání, v krajních případech až zvracení a potíže s dýcháním. K objevení a/nebo zhoršení těchto příznaků dochází zpravidla po jídle nebo při poloze vleže, kdy dolní jícnový svěrač nezabraňuje vniknutí žaludečního obsahu do jícnu (9).

Objektivní diagnostika refluxu se provádí dvěma základními metodami – pH metrií a gastrokopií. Při gastrokopii pozorujeme zejména poškození stěny jícnu nad dolním jícnovým svěračem, přičemž katetrová nebo kapslová pH metrie slouží ke objektivnímu posouzení, zda je v jícnu přítomen refluxát, po jakou dobu a v jaké denní době (9).

Při neléčení refluxu dochází postupem času k rozvinutí zánětu – refluxní ezofagitidy – dochází ke zjizvení drážděné části jícnu, což vede ke vzniku zúžení, které může způsobit potíže s polykáním potravy. Zúžení jícnu lze řešit endoskopicky zavedením stentu, který zajistí dilataci jícnu ve zúženém místě a usnadní postup potravy (10). V některých případech může dlouhodobý zánět vést až ke vzniku jícnových vředů (varixů). Nejzávažnější komplikací refluxní choroby jícnu je vznik Barrettova jícnu, kdy v důsledku dlouhodobého poškození výstelky jícnu dojde k metaplazii a původní dlaždicový epitel je nahrazen cylindrickým epitelem, který se podobá epitelu střevnímu (11). Tento typ epitelu je odolnější než dlaždicový epitel, ale jedná se o prekancerózu, která v nezanedbatelném počtu případů přechází v adenokarcinom jícnu, který má vysokou mortalitu a pětileté přežití je pod 50 % (12), některé zdroje uvádí jen kolem 20 % (13).

Dietní a režimová opatření, spočívající v eliminaci potravin, které jsou dráždivé a přispívají ke vzniku refluxu (např. káva, slazené a sycené nápoje, silně kořeněná jídla) a v úpravě příjmu potravy (menší porce, eliminace jídla před spánkem) jsou účinná hlavně v nejméně závažných případech onemocnění (14). Další nefarmakologickou a neintervenční možností léčby je zvýšení polohy hlavy ve spánku, což vede ke snížení tlaku žaludečního obsahu na dolní jícnový svěrač. Mezi základní farmakologickou léčbu patří nasazení antacid a posléze inhibitorů protonové pumpy (PPI), jejichž cílem je zvýšení pH žaludečního obsahu za účelem snížení dráždivého a destruktivního účinku na mukozální stěnu jícnu. V případě antacid je mechanismus účinku přímá neutralizace kyseliny chlorovodíkové, zatímco v případě PPI omezení tvorby kyseliny chlorovodíkové buňkami žaludečního epitelu (9).

Chirurgická léčba refluxní choroby jícnu – fundoplikace – spočívá v obtočení jícnu horní částí žaludku, čímž dojde k mechanickému zvýšení tlaku na dolní jícnový svěrač. Používání této metody v klinické praxi je často terčem kontroverze, protože dostupné zdroje uvádí, že u pacientů, kteří nereagují na PPI léčbu, je její přínos minimální a jedná se o invazivní laparoskopický zákrok. Použití u pacientů, kteří reagují na PPI léčbu, je pak logicky zbytečné, protože je u nich možné reflux řešit farmakologicky (15–17).

Poslední možností léčby u pacientů, kteří nereagují na PPI ani fundoplikaci, je neurostimulační léčba, která spočívá v aplikaci bipolárních neurostimulačních pulzů do svaloviny dolního jícnového svěrače, čímž dojde ke zvýšení jeho tlaku (18). Do klinické praxe byl zatím uveden jeden produkt, který nabízí neurostimulační možnost léčby refluxní choroby jícnu – EndoStim (19). Hlavní nevýhodou komerčně dostupného neurostimulátoru EndoStim je nutnost implantace v plné anestezii, sestávající z laparoskopické implantace intramuskulárních elektrod za asistence endoskopisty a subkutánní implantace neurostimulátoru. Výsledky nejnovější klinické studie na 37 pacientech také poukázaly na nutnost explantace v 16 % případů, primárně z důvodu selhání elektrod (20). Externě implantované elektrody do stěny jícnu dále sdílí možné nežádoucí účinky s podobnými systémy, např. se systémem Medtronic Enterra pro léčbu gastroparézy, kde přichází v úvahu riziko perforace žaludku (21).

V oblasti kontinuálního pH monitoringu se využívají primárně pH katetry (často kombinované s multikanálovým měřením impedance – „MII-pH“), které se zavádí transnasálně. Pacient následně, při dlouhodobém sledování, nosí přístroj, který naměřené hodnoty zaznamenává. Výhodou těchto systémů je nízká cena a absence vážných nežádoucích účinků. Logickou nevýhodou je diskomfort pacienta, který může způsobit změny v běžném denním režimu (22). I z tohoto důvodu je kontinuální měření pH zpravidla omezeno na 24 hodin. Pokročilejší metodou je tzv. bezdrátové kapslové měření pH, které je založeno na dočasném uchycení jednorázové kapsle, která obsahuje pH senzor, zdroj energie, vyhodnocovací elektroniku a bezdrátový vysílač (23). Výhodou je absence transnasálního katetru, na základě dostupné literatury je ovšem tato metoda spojena s rizikem mnohých závažnějších nežádoucích příhod, jako dislokace kapsle nebo její aspirace při implantaci, která si vyžádala okamžitou intubaci a rigidní bronchoskopii (24). Dnes dostupné kapsle mají velikost kolem 30 x 7 x 7 mm, tvoří tedy mnohem větší překážku než MII-pH katetry, které dosahují průměru v řádu jednotek milimetrů (typický je průměr

kolem 2 mm (25)). Přímým důsledkem větších rozměrů, které jsou dány přítomností vyhodnocovací elektroniky a zdroje energie, je výskyt nežádoucích účinků, které jsou velmi podobné těm, se kterými se setkávají pacienti s transnasálním MII-pH katetrem (23).

### ***1.3 Teorie neurostimulace dolního jícnového svěrače a měření pH***

Existují dva základní mechanismy, které způsobují kontrakci svalu při přivedení externího elektrického stimulu – buďto přímá stimulace kontraktálního aparátu svalového vlákna (myofibrilu) nebo vyvolání akčního potenciálu v intramuskulárních axonech (26). Druhý ze zmíněných mechanismů se uplatňuje u neurostimulačních impulzů kratších než 1 ms, které jsou používány u elektrostimulační terapie dolního jícnového svěrače (7). Doplnkovým mechanismem, který udržuje zvýšený tlak dolního jícnového svěrače i po ukončení elektrického stimulu, může být uvolnění tachekyninů, které působí jako excitační neurotransmitter (26). Zvýšení tlaku dolního jícnového svěrače a s ním spojená efektivita léčby GERD také závisí na hodnotě proudu neurostimulačních impulzů, kdy příliš malý proud vede k malému nebo žádnému zvýšení tlaku svěrače, zatímco příliš vysoký proud vede k diskomfortu pacienta (27). Na základě publikovaných dat lze vyvodit závěr, že tlak dolního jícnového svěrače lze neurostimulací efektivně regulovat, a to jak v čase, tak v intenzitě, což umožňuje implementaci zpětnovazebního algoritmu pro řízení aktivity svěrače.

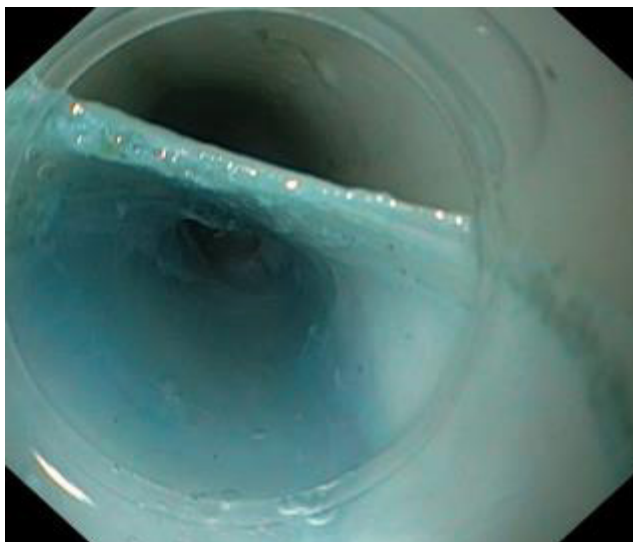
Potenciál vodíku („pH“) je bezrozměrné číslo, které udává kyselost nebo zásaditost (zpravidla) vodného roztoku. Z hlediska refluxní choroby jícnu se jedná o parametr, kterým lze jednoznačně definovat, zda se v jícnu objevil v důsledku insuficience dolního jícnového svěrače refluxát či nikoliv (9). Hodnota pH je definovaná jako logaritmus převrácené hodnoty koncentrace (aktivity) oxoniových kationtů (někdy zjednodušeně nahrazeno termínem „protonů“) v roztoku. Základní metodou měření pH je použití iontově selektivní membrány (ISM), která je (zpravidla) na vnitřní straně vystavena působení pufru o známém pH (referenční elektrolyt, typicky o hodnotě pH 7), zatímco venkovní strana je vystavena působení měřeného vzorku vodného roztoku. Tím vznikne elektroda, jejíž potenciál je závislý na rozdílu v koncentraci oxoniových kationtů. Následně je měřen elektrický potenciál měřící elektrody vůči referenční elektrodě, který je na základě Nernstovy rovnice úměrný pH měřeného roztoku (28).

Kromě klasických skleněných nebo antimonových elektrod lze pro měření pH použít iontově selektivní tranzistor řízený polem (ISFET). Výhodou je jednodušší mechanická konstrukce výsledného senzoru, možnost integrace pseudoreferenční elektrody (např. ze zlata) přímo na čip a miniaturní rozměry (29).

#### **1.4 Endoskopická submukozní disekce a její možnosti**

Endoskopická submukozní disekce (ESD) je technika, která se v klinické praxi používá pro odstranění povrchových lézí trávicí trubice. V první fázi se provede injekce do submukozy (často se používá obarvený fyziologický roztok z důvodu obarvení submukozy a tedy snazší orientace, případně další látky pro prodloužení doby, kdy je mukosa a svalová vrstva oddělena (30)) pod lézí za účelem jejího zvednutí a oddělení od vrstvy svalu (*muscularis propria*). Následně se léze řezem v submukoze snese a vyjme se (31). Oproti endoskopické mukozální resekcii se tato metoda vyznačuje vyšší úspěšností v dosažení tzv. „R0“ resekce, kdy karcinom nikde nedosahuje až k okraji resekatu, tedy je minimalizované riziko recidivy (32).

Další metodou, která se ESD podobá, je perorální endoskopická myotomie (POEM), která je chirurgickou léčbou achalázie (poruchy pohyblivosti) jícnu. Metoda spočívá ve vytvoření „submukozního tunelu“ v jícnu metodou analogickou k ESD – injekce do submukozy s následným řezem a vytvořením tunelu. Tato metoda byla v minulosti použita pro implantaci miniaturního gastroneurostimulátoru, přičemž byla nazvána endoskopický



Obr. 1: Metoda endoskopického submukozního pocketingu v jícnu

submukozní pocketing (ESP) viz obr. 1 (33). Výhodou užití pocketingu pro implantaci elektronického zařízení je minimální invazivnost metody a fakt, že při implantaci nejsou narušeny vnější vrstvy trávicí trubice (svalová vrstva a seróza), tím je zajištěno minimální riziko život ohrožující perforace orgánu, která je u dnešních neurostimulátorů známým nežádoucím účinkem (21).



## 2 Cíle práce

### 2.1 Vývoj implantační metody včetně zjištění omezení pro implantát

První zmínka o úspěšné endoskopické implantaci prototypu elektrického zařízení do submukozy gastrointestinálního traktu se objevila v roce 2012, konkrétně se jednalo o implantaci prototypu gastrického neurostimulátoru do submukozy žaludku (33). Primárním úkolem, který by umožnil splnění cílů celé práce, bylo na tuto metodu navázat, adaptovat ji na prostředí jícnu a vyvinout protokol pro implantaci jak do submukozy jícnu (pro neurostimulátor), tak do mukozy jícnu (pro pH senzor). Dalším dílčím cílem bylo určit maximální možnou velikost implantátu, kterou lze do jícnu zvoleného modelu (prase s hmotností 40 kg) vložit. Prvotní hypotéza byla taková, že limit pro velikost implantace v oblasti dolního jícnového svěrače bude primárně vztažen k šířce a tloušťce implantátu, kdy maximální možné rozměry byly určeny jako 10 mm resp. 6 mm. Délka nebyla přímo limitujícím faktorem z důvodu, že submukozní tunel lze vytvořit v různé délce.

### 2.2 Vývoj systému bezdrátového přenosu energie

Na základě omezení celkové velikosti implantátu bylo dalším cílem prozkoumat různé metody bezdrátového přenosu energie na větší vzdálenost (8–12 cm). Konkrétně byl již na začátku zvolen jako nejnadějnější induktivní přenos energie, který se v dnešní době pro tyto účely běžně používá. Pro návrh přijímače je zásadní vysokofrekvenční usměrňovač, který musí u implantabilního zařízení splnit požadavky na malou velikost a vysokou účinnost.

### 2.3 Vývoj endoskopicky implantovatelného neurostimulátoru

Ústředním prvkem celého zpětnovazebního systému je neurostimulátor. Ten musí splňovat základní parametry, mezi které patří vodotěsnost, maximální velikost omezena implantovatelností do submukozy jícnu, programovatelnost pomocí bezdrátového komunikačního rozhraní a schopnost provádět bipolární neurostimulaci svaloviny jícnu pomocí dvou planárních elektrod přiložených k *muscularis propria*. Parametry konfigurovatelných neurostimulačních průběhů stran proudu, frekvence, šířky pulzu a časování byly určeny jako ekvivalentní či přesahující rozsah nabízený komerčním neurostimulátorem Medtronic Enterra resp. EndoStim (7, 34). Neurostimulátor by měl být zkonstruován z biokompatibilního materiálu – hypotéza byla, že při použití nebiokompatibilního materiálu dojde k rejekci implantátu.

## **2.4 Vývoj endoskopicky implantovatelného pH senzoru**

Vzhledem k nežádoucím účinkům, které vyplývají z podoby dnešních bezdrátových systémů pro měření pH v jícnu, které byly diskutovány v úvodu, bylo hlavní motivací vývoje vlastního pH senzoru radikální zmenšení rozměrů výsledného zařízení při zachování funkčnosti, ekvivalentní k existujícím systémům. Za tímto účelem byly pro vývoj zvoleny dvě hlavní koncepce – první, jednodušší, s důrazem na minimální dosažitelné rozměry při použití komerčně dostupných součástek a druhá, založená na modulu ISP1302 (Insight SIP), která umožní integraci implantovatelného pH senzoru do zpětnovazebního systému s neurostimulátorem.

Důvodem pro rozdělení vývoje do dvou po sobě následujících větví byl fakt, že ISFET pH senzor, který byl pro konstrukci použit, nebyl nikdy vyzkoušen *in vivo* ani *ex vivo* modelu. Dávalo proto smysl se v první fázi zaměřit na nejjednodušší možnou verzi implantovatelného senzoru, tu vyzkoušet v neživém modelu, a až v druhé fázi se soustředit na vývoj složitějšího pH senzoru, který komunikuje se zbytkem systému.

## **2.5 Vývoj nových metod a materiálů pro enkapsulaci implantátů**

Lidské tělo je pro nechráněnou elektroniku z principu svého složení prostředím agresivním, libovolnou implantabilní elektroniku s výjimkou samotných senzorů je tak nutné chránit před okolními vlivy, mezi které patří primárně vlhkost a obklopení tělními tekutinami. Cílem tedy bylo vyvinout metodu enkapsulace (zaobalení) implantovatelné elektroniky, která poskytne dostatečnou ochranu a zároveň ji bude možné snadno a za nízkých nákladů aplikovat na libovolný typ implantovatelného zařízení. Součástí tohoto cíle je i kvalifikace materiálu a metody podle normy ISO10993 tak, aby mohl být daný systém používán při dlouhodobějších (v řádu týdnů až měsíců) experimentech na zvířatech s minimalizací možnosti rejekce implantátu, či nežádoucí reakce sliznice v blízkosti pH senzoru.

## **2.6 Vývoj bezdrátového rozhraní pro komunikaci**

Podstatou zpětnovazebního řízení je vzájemná komunikace mezi pH senzorem a neurostimulátorem, který musí zároveň komunikovat s externí stanicí. Ta disponuje uživatelským rozhraním, prostřednictvím kterého se neurostimulátor konfiguruje. Hlavním požadavkem na tento komunikační protokol je pak zajištění minimální elektrické spotřeby pH senzoru a neurostimulátoru na úkor externí stanice, zabezpečení dat a možnost

implementace v komerčně dostupných mikrokontrolerech s integrovaným rádiovým frekvenčním (RF) front-endem.

## **2.7 Vývoj zpětnovazebního systému pro léčbu refluxní choroby jícnu**

Posledním a finálním cílem vývoje systému je implementace zpětnovazebního řízení, které reaguje na změny pH v jícnu zahájením nebo úpravou neurostimulace. Ověření se dosáhlo *in vitro* na modelu s proměnným pH v okolí senzoru za simultánního sledování aktivity neurostimulátoru. Pro úspěšný výsledek musel stimulátor informace o pH uvnitř jícnu přijmout, vyhodnotit je a adekvátně reagovat (např. zapnutím nebo vypnutím neurostimulace).

### 3 Shrnutí použité metodiky a experimentálních metod

Vývoj a výzkum v této práci lze rozdělit do tří základních oblastí – vývoj hardware a software, vývoj v oblasti strojírenství a materiálových věd pro biokompatibilní enkapsulaci vyvinutého hardware, a *in vitro* + *in vivo* experimenty pro posouzení vyvinutého hardware a metod a potvrzení či vyvrácení stanovených hypotéz.

Vývoj hardware byl prováděn v pěti fázích. V první fázi byly podle cílů a hypotéz stanoveny požadavky na vyvinuté zařízení z hlediska požadované velikosti, funkcí, bezdrátové komunikace, napájení apod. Následovala rešerše vhodných technologií a komponent, která v sobě zahrnovala posouzení vyrobitelnosti, ceny, zkušenosti s prací s těmito komponentami a jejich dostupnosti. Poté bylo možné přistoupit k návrhu elektroniky, který sestával z blokového návrhu, vytvoření schématu zapojení a návrhu plošného spoje. Po kontrole následovala výroba plošných spojů, objednání komponent a jejich osazení. Poslední částí vývoje hardware bylo tzv. „oživení“, které spočívalo v připojení osazených plošných spojů ke zdroji napájení a kontrole, zda jsou všechny navržené obvody funkční a jejich chování odpovídá stanoveným požadavkům.

Pro vývoj software byla použita vývojová prostředí MPLAB X (pro mikrokontrolery výrobce Microchip), Segger Embedded Studio (pro mikrokontrolery výrobce Nordic Semiconductor) a Microsoft Visual Studio (pro návrh ovládací aplikaci externí stanice). Souběžně s návrhem hardware byl vypracován soupis požadavků na software včetně vhodných testů, které měly za cíl podrobně otestovat veškeré funkce a odhalit potenciální chyby. Po vytvoření zdrojového kódu byla provedena jeho validace na vyvinutém hardware.

Pro výrobu obalů pro implantovatelná zařízení bylo použito několik rozdílných metod v závislosti na konkrétních požadavcích pro každé zařízení – v úvodních fázích výzkumu byla elektronika přímo enkapsulována pomocí tekutého dvousložkového epoxidu s postupným nanesením několika vrstev. Poté bylo přistoupeno k výrobě obalu frézováním na tříosém obráběcím centru, případně vyrobením dvou nebo vícedílné formy z materiálu o nízké povrchové energii, do kterého se vložila elektronika, a do formy byl vstříknuta tekutá epoxidová pryskyřice, která vyplnila dutinu ve formě.

Vývoj metody nanesení biokompatibilního polymeru na enkapsulované zařízení začal rešerší vhodných polymerních materiálů, na kterou navázalo experimentální otestování různých metod nanesení z hlediska časové náročnosti, adheze k epoxidu a souvislosti

nanesené vrstvy. Posouzení biokompatibility takto vyvinutých a otestovaných materiálů a metod bylo provedeno nezávislou akreditovanou institucí.

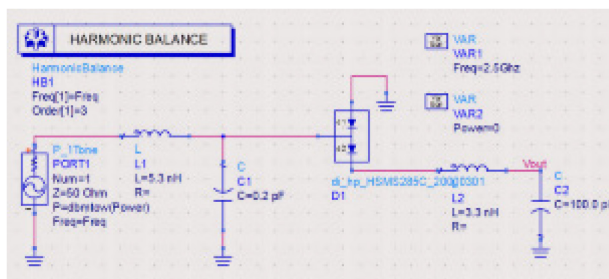
*In vivo* experimenty byly prováděny na základě platného plánu pokusů, který byl schválen etickou komisí, případně byly provedeny akreditovanou institucí, která v rámci své výzkumné a komerční činnosti platným plánem pokusů se schválením etické komise pro provádění těchto úkonů disponuje. Tyto experimenty měly za cíl ověřit funkčnost vyvinutých zařízení a metod s následným ověřením či vyvrácením hypotéz, které byly stanoveny na začátku každého výzkumného úkolu. V *in vitro* experimentech byla stanovena vhodná velikost souboru dat a statistických metod pro jejich zpracování, po které následoval sběr dat a jejich vyhodnocení.

## 4 Výsledky

### 4.1 Charakterizace systémů pro bezdrátový přenos energie v pásmu do 4 GHz

Každý systém pro bezdrátový přenos elektrické energie sestává ze dvou částí – vysílače a přijímače. Protože je pro napájení polovodičových elektronických komponent využíván výhradně stejnosměrný proud, zatímco bezdrátový přenos energie se realizuje vytvořením střídavého magnetického pole či ve formě elektromagnetických vln, je nutné převést střídavý proud, který je výstupem přijímací cívky / antény na proud stejnosměrný. K tomu slouží usměrňovač, jehož konstrukce je prakticky totožná jak v případě nízkofrekvenčního signálu v případě induktivního dobíjení, tak vysokofrekvenčního signálu v případě rádiových vln.

V první řadě byla provedena teoretická řešení vhodných topologií (zapojení) usměrňovačů včetně výběru vhodných diod. Následoval vývoj vlastního RF syntezátoru, jehož funkcí je generovat sinusový výstupní signál o dané



Obr. 2: Zapojení diodového zdvojovače střídavého signálu

frekvenci a amplitudě. Poté byly provedeny simulace diodového usměrňovače zapojeného jako zdvojovač, viz obr. 2. Na základě simulací byly voleny hodnoty pasivních součástek (kondenzátorů a induktorů) a na základě simulací byly zkonstruovány usměrňovače, na kterých bylo provedena měření. Bylo prokázáno, že popsaná metodika návrhu umožňuje konstruovat vysokofrekvenční usměrňovače o vysoké účinnosti konverze střídavého proudu na stejnosměrný (až 55 % při 868 MHz a 10 mW vstupním výkonu).

Topologie návrhu usměrňovačů, které byly zkoumány v tomto konferenčním příspěvku, se včetně metody jejich návrhu staly základem pro návrh systémů přenosu energie v implantabilních neurostimulátorech prezentovaných v této disertační práci.

#### Konferenční příspěvek

M. NOVÁK: Characterization of RF to DC converters for L-band and S-band power transmission; Proceedings of the International Astronautical Congress, IAC 2016, Guadalajara, Mexico

## Characterization of RF to DC converters for L-band and S-band power transmission

Bc. Marek Novák <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Electrical Engineering, Czech Technical University in Prague, Technická 1902/2, 16627 Praha 6, Czech Republic, [marek.novak@xglu.cz](mailto:marek.novak@xglu.cz)

### Abstract

In this paper, a method for testing and characterization of RF to DC converters for wireless power transmission is presented. The application field for RF to DC converters is continuously growing. The energy harvesting from electromagnetic waves is one of the basic elements of space-based solar power stations. Schottky barrier diode based rectifier architectures were considered and tested. A custom automated test bench for characterization was designed and manufactured. With the proposed hardware, measurements can be done from 0.1 to 4 GHz at RF output power up to +10 dBm. A low spur RF PLL synthesizer was used with a wideband RF amplifier and attenuator with 0.5 dB step. Voltage-current characteristics were obtained using a calibrated precision programmable load. A complete characterization of basic types of RF to DC converters was done. The resulting graphs show that both incident power and frequency can affect the conversion efficiency. Efficiency over 50 % was achieved with Avago HSMS285 diodes. The results clearly show that the RF to DC converters exhibit higher efficiency when subjected to medium input power levels than very low and low input power levels. This confirms that when talking about low power energy transmission, the energy transmission in short but high energy pulses would more efficient than transmitting the power using lower power and continuous wave. A simplified model for operation of a universal maximum power point tracking system is presented. The results of this work can be used in design of maximum power point tracking systems for wideband and/or wide input power range RF rectifiers as well as in novel RF to DC converter structures and increasing its efficiency.

**Keywords:** High frequency rectifier, rectenna, RF synthesizer, Schottky barrier diode, space based solar power station

### Nomenclature

Voltage – V  
Current – I  
Power - P

An apostrophe (') or "norm" subscript at the symbol means that the value does not indicate an absolute value but a value which was normalized with respect to the maximum value in the particular measured dataset (if not stated differently). For example, if the maximum measured voltage in the particular voltage-current characteristics is  $V_{max} = 3000\text{ mV}$  and the voltage before normalization is  $V_1 = 1500\text{ mV}$ , then  $V_{1norm} = V_1' = 0.5$

### Acronyms/Abbreviations

Space-based solar power (SBSP)  
Radio frequency identification (RFID)  
Surface mount technology (SMT)  
Harmonic balance (HB)  
Large signal S parameters (LSSP)  
Vector network analyzer (VNA)  
Radio Frequency Identification (RFID)  
Parts per million (ppm)  
Continuous wave (CW)  
Electromagnetic (EM)

### 1. Introduction

The energy harvesting is a process of getting and storing energy from alternative sources such as wind or sun. One of the perspective ways of energy harvesting is RF energy harvesting. In space sector, the RF field harvesting is a key to SBSP. Instead of placing the solar panels on ground where the sunlight is attenuated by atmosphere and weather, the solar panels would be placed in orbit [1]. Another advantage is non-stop light irradiation of solar panels. Except for SBSP, the RF harvesting is today extensively used in RFID applications where passive RFID tags are powered by harvesting the incident EM field from the reader.

One of the first pioneers of wireless electricity transfer was Nikola Tesla who performed experiments with it and projected power plants which would be able to transmit electrical energy which could be collected at many places [2]. In 1966, researchers at Raytheon were able to power a model helicopter with 230 W of rectified DC output power harvested from a microwave source working at 2450 MHz [3]. A variety of papers cover the process of development of RF rectifiers, from application-specific antenna development to RF rectifier matching, diode choice and final measurement and evaluation of the performance compared to the

simulations. Different rectifier topologies are used in available literature, but the most favourite topologies include single diode topology [4], [5], Greinacher doubler [4], [6]–[8] and bridge rectifier [9]. All published papers which were reviewed prior to this research describe a solution which comprises of a RF signal source (which is an antenna or RF synthesizer), matching circuitry, diode rectifier, optional filter and storage capacitor. Some papers describe integration of certain elements, like antenna and diode rectifier on a single substrate [10].

The characterization and measurements of RF to DC converters usually requires high frequency testing instruments, most commonly signal generators and spectrum analysers operating in GHz range. This makes the process of development of RF harvesting powered instruments very expensive and not available to all researchers and developers. Thus, a particular emphasis is given to design of a single board microwave test bench which would be low-cost and yielded good match with professional instruments after calibration. The proposed low-cost instrument could be used in initial phases of design of RF to DC rectifier solutions.

This paper is divided into several sections. The first section summarizes the theoretical principles of Schottky barrier diode based RF to DC rectifiers. Next, to develop a device for characterization of actual performance of RF rectifiers, LSSP and HB simulations of manufactured types of rectifiers were performed to get basic overview of how the converters behave under different power levels and resistive loads across its output. After that, the design of single board microwave test bench for characterization of RF rectifiers is described together with calibration process. Next, two different RF to DC converters matched by discrete SMT components are characterized using the proposed hardware. Finally, a simplified model suitable for direct hardware implementation of maximum power point tracking is developed and verified.

## 2. Microwave test bench design

The microwave test bench can be divided into two main parts – a wideband high dynamic range frequency synthesizer and programmable load. The synthesizer can be calibrated using either RF power meter or spectrum analyser. The voltage and current flowing through the programmable load is measured using benchtop or hand-held voltmeter and ammeter.

### 2.1. Frequency synthesizer

The overall performance of a PLL-based frequency synthesizer is significantly affected by a reference clock. To provide sufficiently low jitter and temperature stable clock, FOX924B [11] temperature compensated crystal oscillator was used. The nominal frequency of the

crystal oscillator is 10 MHz. To isolate the oscillator from the next part of the circuit which has relatively low impedance (in range of hundreds of ohms), a 74LVC1G125DBV [12] logic buffer was implemented. To filter-out any high frequency harmonics and retain only the main 10 MHz tone, the output of the logic buffer is connected to a cascaded LC filter. The output of the filter is AC coupled with 1 nF NP0 ceramic capacitor and fed into the reference clock input of the frequency synthesizer part of the circuitry.

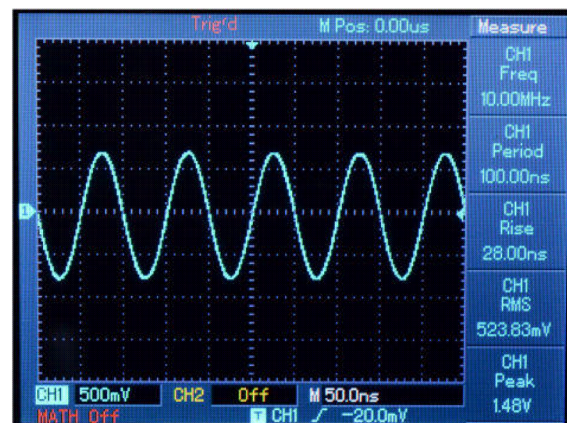


Fig. 1: Reference clock for the PLL synthesizer

For frequency synthesis, a single chip Maxim Integrated MAX2870 [13] wide frequency fractional PLL with on-chip VCOs was used. The chip features 23.5 MHz to 6 GHz frequency range with ability to provide -4 dBm to +5 dBm output RF power. The fundamental frequency of VCOs is 3 GHz to 6 GHz. 4 dedicated VCOs with 16 sub-bands each are used to cover this frequency range. To cover lower frequency ranges, an internal frequency divider is used.

Two identical RF outputs of the MAX2870 chip are utilized. The first one is guided into an output SMA port on the board directly. This output is used to check the performance of the frequency synthesizer, especially the frequency stability. The second output is AC coupled and fed to the input port of TriQuint AG604-86 DC to 6 GHz gain block [14]. The amplifier features 20.5 dB of gain and 19.4 dBm output P1dB at 900 MHz. The bias for the gain block is provided by an external 12 V DC power source. The amplified output is AC coupled with 1 nF SMT NP0 capacitor and fed into the TQP4M9071 [15] 31.5 dB digital step attenuator with low insertion loss and 0.5 dB step. The output of the step attenuator is connected to an output SMA connector.



### 2.2. Programmable load and control circuit

The purpose of the programmable load is to emulate DC resistance loads. On the designed hardware, its operating principle is to control the gate voltage on a MOSFET transistor by OPA227 operational amplifier [16]. The operational amplifier measures the voltage on a current shunt and regulates it to the voltage pre-set on its non-inverting input. The pre-set voltage is generated by MCP4726 digital-analog converter [17] with external LM4041 voltage reference [18]. The digital-analog converter is controlled by the microcontroller. The current drawn by the load is proportional to a voltage generated by digital-analog converter.

The whole circuitry is controlled from a computer via USB port. The on-board 8-bit microcontroller parses text strings typed by user into a serial port terminal on a computer and controls the frequency synthesizer and digital step attenuator, accordingly.

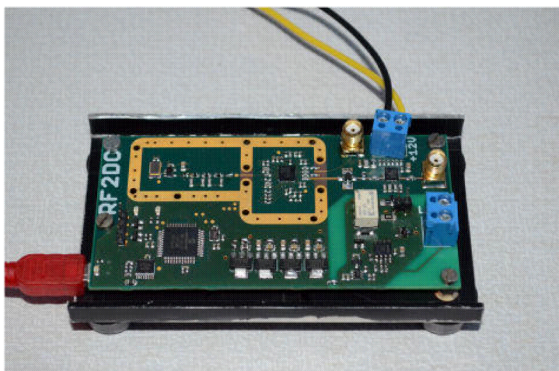


Fig. 2: The completed board for characterization of RF to DC converters

### 2.3. Testing and calibration

To ensure correct operation during RF to DC converters characterization, after manufacturing, the board was tested and calibrated using the Anritsu MS710F 100 kHz to 23 GHz spectrum analyzer. The measurement setup is on Fig. 3. The output of the manufactured board is connected directly to the spectrum analyzer via a Type-N to SMA cable adapter.

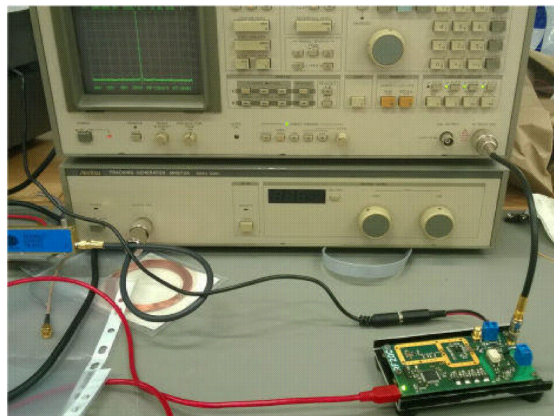


Fig. 3: Manufactured board during testing and calibration

The measured board was powered-up and settled for 30 minutes to heat up and stabilize the temperature of all components. The temperature in the room was 23.5 °C and the humidity was 60 %. Same conditions were achieved during characterization to ensure accuracy of measurements.

First parameter which was measured was the clock accuracy. The board was set to generate 1000 MHz tone. The centre frequency of the spectrum analyzer was set to 1000 MHz. Assuming the clock source of the spectrum analyzer as a reference standard, the frequency generated by the synthesizer board was 1000.003 MHz which corresponds to 3 ppm error. This is well within the specifications of the used temperature controlled crystal oscillator and is accurate enough.

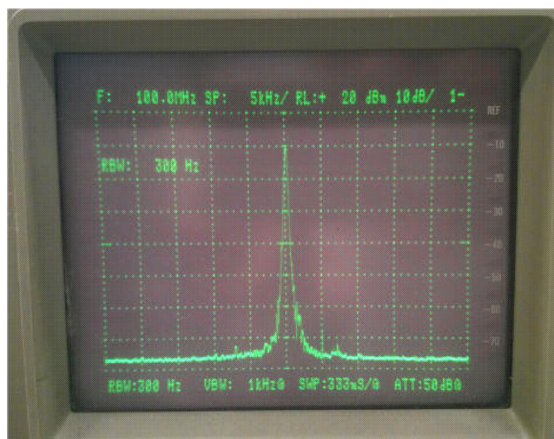


Fig. 4. Generated 100 MHz CW on spectrum analyser

All PLL, amplifier and attenuator generated intermodulation products, phase noise and jitter products are more than 40 dB under the main tone over the whole operating range. At normal conditions, all unwanted components of the generated tone are

separated more than 50 to 60 dB from the main tone. There are harmonics present in the output signal. However, they are about 10 to 15 dB lower than the main tone. Combined with the matching of the RF to DC converters which will be described in next chapter and is narrow-band, this is not a big issue and will not affect the measurements much.

### 3. RF to DC converter design

#### 3.1. Basic description

The RF to DC converter can be constructed as a rectifier which uses Schottky barrier diodes optimized for high frequency operation. In a passive circuit where no bias is available (which a passive powered sensor is), zero-bias Schottky barrier diodes are the only suitable choice [19]. For the testing of the proposed microwave test bench, simple topologies with Avago HSMS285 zero-bias Schottky diode were chosen and evaluated. This particular type of diode was chosen because of its superior parameters at low input powers [19].

The key thing in design of high-efficiency no bias RF to DC detector is to properly match the receiver antenna (in this case replaced by frequency synthesizer) impedance to the impedance of the diode circuit. In this case, the impedance of the output port is 50 Ohm. The voltage doublers offer lower input impedance to source, which makes the matching easier as opposed to single diode topologies [19].

From the Avago HSMS285 datasheet [20], it can be clearly seen that the reflection coefficient of the diode highly depends on the incident RF signal frequency. Thus, the input impedance of the whole rectifier is likely to change significantly with frequency. As a result, the RF to DC converter based on this topology cannot be matched over large frequency bandwidth. Instead of that, the rectifier will have to be matched for one specific narrow frequency bandwidth. Outside of this bandwidth, the efficiency of the converter will be severely affected by impedance mismatch between the matching circuit and rectifier. Significant portion of power will be reflected back to the RF source, instead of being rectified into usable energy.

#### 3.2. RF rectifier design

To enable fast prototyping of the RF rectifiers, the rectifier modules which are composed of an input SMA connector, matching circuitry, rectifying diodes and DC output connector, are manufactured on a regular 4-layer PCB. The top layer is used for component placement and microstrip traces. The second layer underneath it is the ground plane. Other layers are unused, except for bottom layer which includes pads to enhance mechanical rigidity of the SMA connector. The complete stack-up of the PCB is on Fig. 5.

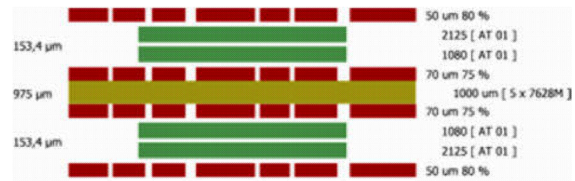


Fig. 5: Four layer PCB stack-up [21]

The components used for matching are SMT capacitors and inductors in EIA 0603 size. The selected size is a compromise between hand solderability and physical dimensions. The use of discrete components limits the maximum usable bandwidth of the converter. At high frequencies, lumped elements should be used because the effect of parasitic parameters of SMT components start to significantly contribute to the matching. The manufactured RF rectifier is on Fig. 6.

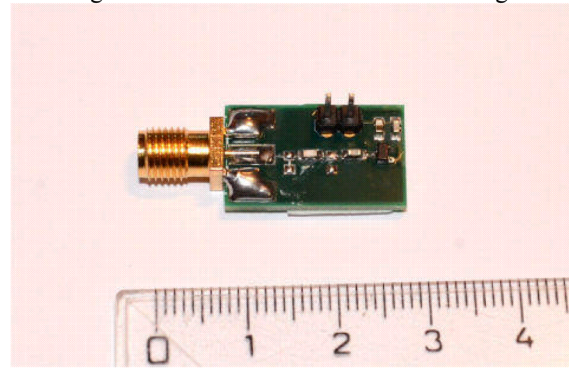


Fig. 6: An example of manufactured RF rectifier

LSSP and HB simulations were performed to view the behaviour of the RF harvester circuit. Non-linear diode models were utilized including the effect of the diode package [22]. Non-ideal discrete component models were used as well as the physical dimensions of microstrip waveguides and substrate parameters were taken into account. Based on those simulation results, two RF harvesters based on the Greinacher doubler circuit were manufactured. The first one was matched to 850 – 920 MHz band, while the second one to 2.4 GHz to 2.5 GHz band. Those specific frequency bands were chosen due to match with ISM license-free bands in EU and USA. The sub-GHz RF harvester was matched using a 15 nH high frequency series inductor with self-resonant frequency of 23 GHz. The 2.5 GHz band harvester was matched with a 0.8 pF shunt capacitor and 1.5 nH series inductor with self-resonant frequency of 23 GHz. Both harvesters were matched with 1 kohm load connected to the output.

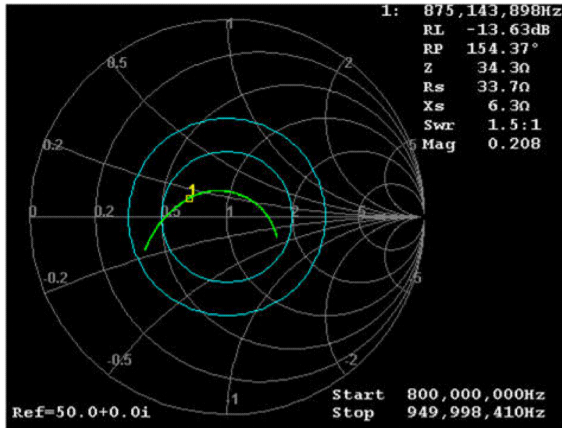


Fig. 7: Smith chart diagram of rectifier matched for operation in 868 MHz band

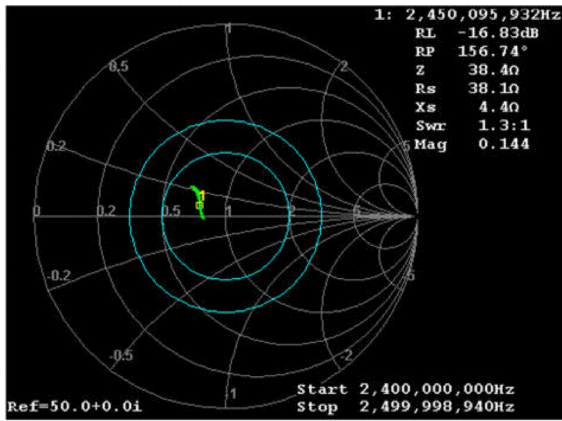


Fig. 8: Smith chart diagram of rectifier matched for operation in 2500 MHz band

The resulting Smith chart diagrams of manufactured RF rectifiers are on Fig. 7 and Fig. 8. Precise matching was not done because the input impedance of the rectifier changes with both varying input RF power and output load impedance. Discrete components also have tolerances and are offered only in certain values. But the proposed system can be used for full characterization or any RF to DC converters from 0.1 GHz to 4 GHz, providing input power up to +10 dBm over the whole operating frequency range.

The output parameters of RF harvester are dependent on incident RF power. The Friis transmission equation [23] gives the power received by one antenna based on the link parameters and transmitted power by second antenna:

$$P_r = P_t \left( \frac{\lambda}{4\pi R} \right)^2 G_{or} G_{ot}, \quad (1)$$

where  $P_r$  is the received power,  $P_t$  is the transmitted power,  $\lambda$  is the wavelength,  $R$  is the distance between

transmitter and receiver antenna and  $G_{ot}$  and  $G_{or}$  refer to transmitter and receiver antenna gain in direction towards the other antenna, respectively.

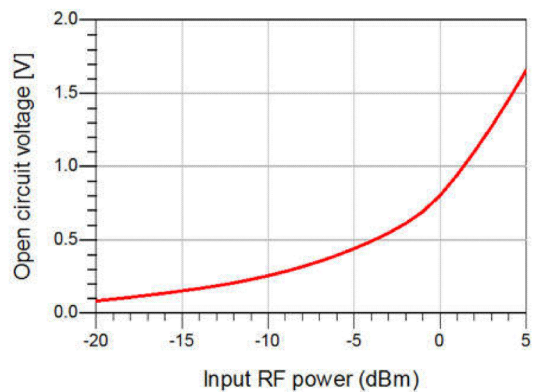
From this equation, it is clear that in real-life scenario, the RF power received by the antenna will be highly variable in time. It depends on the distance between the antennas and antenna gain which is, especially when it comes to high directivity antennas, dependent on angular position of the antennas relative to each other. The effect of obstacles between the antennas, causing mainly diffraction and reflection of electromagnetic waves, also affects the power received. To maximize the amount of received power, MPPT system should be implemented. This technique maximizes the power yield under all conditions. To correctly evaluate the behaviour of manufactured RF harvesters, I-V curves for different incident power levels will be measured using the proposed test bench.

#### 4. Ideal RF harvester model simulation

Before the actual measurements, the ideal circuit model of the RF harvester (not taking the microstrip traces, vias and material parameters into account) was simulated using HB simulations and LSSP simulations. The results of the simulations will be compared to the measurement results later on. The simulations were performed on a single rectifier matched to frequency of 2500 MHz.

##### 4.1. Open circuit voltage of the rectifier

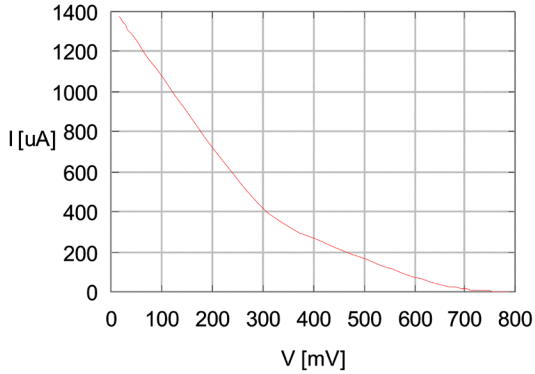
The schematic diagram and simulation settings for open circuit voltage simulations are on Fig. 9 (located at the end of paper). The input RF source is connected to the matching network and then to the HSMS285C component model. This component model includes the effects and parasitic parameters of the package [22]. The output of the Greinacher doubler is fed to a low-pass LC filter formed of a 3.3 nH inductor and 100 pF capacitor. A voltage probe is placed on the positive lead of the capacitor. The swept value was the input power in dBm.



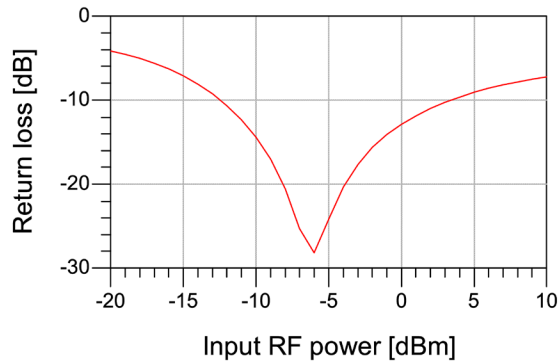
Plot 1: Simulated dependency of open circuit voltage on input RF power

#### 4.2. I/V curve of the rectifier

The I/V curve was also simulated using the HB simulations. In this case, the output of the rectifier was loaded with a resistor. The swept value was the resistance of this load resistor. The voltage on the resistor was sensed as well as the current flowing through the resistor. The circuit diagram is on Fig. 10 (located at the end of the paper). The input RF power was 0 dBm at 2500 MHz.



Plot 2: Simulated V/I curve of the rectifier



Plot 3: Dependency of return loss on input RF power

The V/I curve is non-linear; thus the circuit cannot be simply described as an ideal voltage source with series resistance. The data measured and visualized on Plot 1, 2 and 3 will serve as a reference for the measured data. If there will be significant differences in measured data, there is a possibility of short or component damage during assembly.

#### 5. Constant frequency characterization

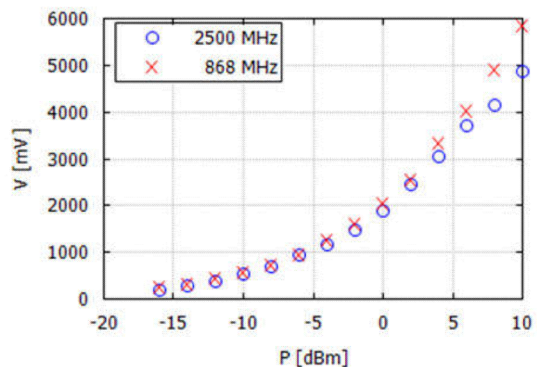
All converters were pre-matched with 1 kohm purely resistive load at -6 dBm (rated output power of the VNA) to its operating frequency. As described in previous section, total of two RF to DC converters were

matched to 868 MHz and 2.5 GHz, respectively. To minimize the cable and connection losses, the converters were connected to the output of the proposed instrument using a solid SMA male to male barrel adapter. The DC output connector was divided into two branches. The first one was directly connected to a high-impedance input (10 Mohm) calibrated voltmeter. The second one was connected to a programmable load. An ammeter was connected in series. This configuration assures that the measurements were not significantly affected by non-ideal input parameters of the measuring instruments. The current flowing through the voltmeter is negligible (10 nA at 100 mV). However, the relatively high internal resistance of the used microammeter could affect the accuracy. The energy delivered by the RF harvester is equal to the sum of Joule heating of programmable load, internal resistance of ammeter and input wires. The voltage is measured across all the elements through which the current was flowing. Thus, no corrections were required.

Both RF harvesters were characterized from -16 dBm to +10 dBm with step of 2 dBm. A group of samples were captured for each I/V characteristic. The actual power delivered by the RF harvester under certain load was calculated as a multiplication of voltage across the output of RF harvester and current flowing through the load (3). The efficiency is calculated as:

$$\eta = \frac{VI}{P_{input}}, \quad (2)$$

where  $\eta$  is the efficiency, V and I is the voltage and current delivered by the RF rectifier, respectively and  $P_{input}$  is the input power which was delivered to the input of RF rectifier. First, the open-circuit voltage of both converters was measured. The measured values are on Plot 4. Clear correlation between input power and open circuit voltage is visible. The input power was -2.5 dBm for 868 MHz and 0 dBm for 2500 MHz.



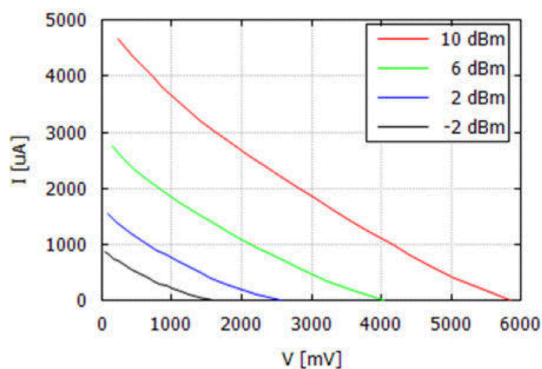
Plot 4: Dependency of open circuit voltage of RF to DC converters for different input power levels

The goal of this research is to perform a full characterization of RF to DC converters under constant frequency conditions to gather the V/I characteristics. From the V/I characteristics, the maximum power point is going to be determined by deriving an equivalent model of the RF harvester source. The result should be a model which will deliver sufficient precision independently on parameters which cannot be directly measured by the power management circuitry without adding external sensors. Ideally, the model should provide sufficient precision only from open circuit voltage, short circuit current and/or voltage under defined resistive load. The model should be compromise between complexity and accuracy. The simpler the model is, the simpler the implementation in hardware will be. On top of that, with simpler hardware implementation, lower quiescent power consumption can be expected so the efficiency of the system will be higher, especially under very low input power conditions.

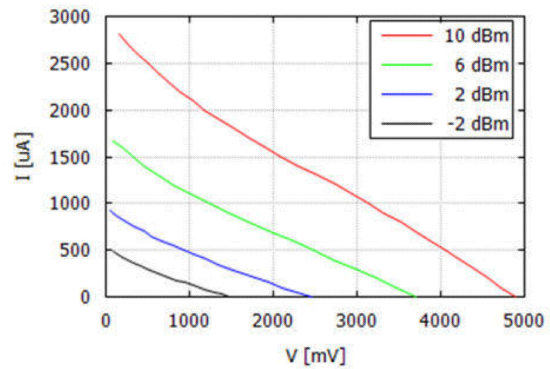
Both for 868 MHz and 2500 MHz rectifiers, the characteristics were measured in steps of 2 dBm. An example of few V/I characteristics for both frequencies are on Plot 5 and Plot 6. From these plots, the maximum power point can be calculated. Every point on the plot corresponds to certain voltage on load and current flowing through the load with the specified input RF power and frequency applied to the rectifier. The power delivered to the load (in this case transformed to Joule heat) can be described using the following formula:

$$P = VI, \quad (3)$$

where  $P$  is power,  $V$  is voltage across the load and  $I$  stands for current flowing through the load.

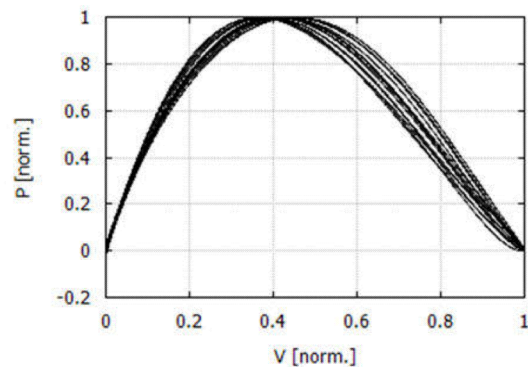


Plot 5: Measured I/V curves with different input RF power at 868 MHz

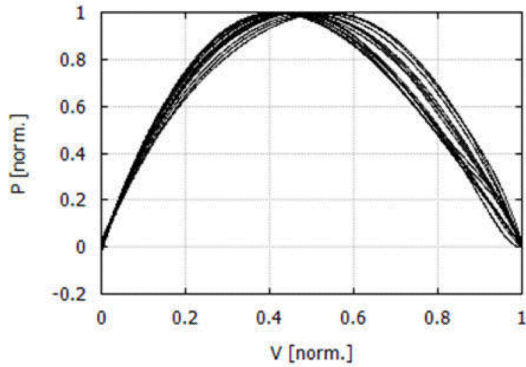


Plot 6: Measured I/V curves with different input RF power levels at 2500 MHz

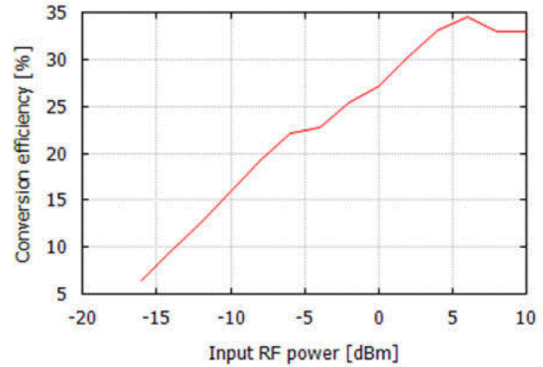
From the I/V characteristics, the P/V characteristics can be plotted as well, by applying the formula (3). Those characteristics will serve as an experimental confirmation of the maximum power point model described in section 7. To compare the model with measured data, all P/V characteristics were normalized. All characteristics were plotted to Plot 7 and Plot 8. The value of 1 on horizontal axis represents the open circuit voltage of the rectifier, while the value of 1 on vertical axis represents the maximum power delivered by the system under given input frequency and RF power. Over the whole rectifier operating range, the maximum power point is relatively consistent. The maximum power point lies on the point which is equal to around 40 % of the open circuit voltage of the rectifier for 868 MHz and 2500 MHz, respectively.



Plot 7: Normalized plot of power delivered by RF to DC converter at 868 MHz for all measured power levels



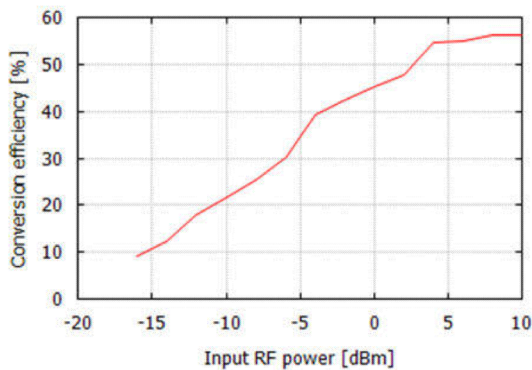
Plot 8: Normalized plot of power delivered by RF to DC converter at 2500 MHz for all measured power levels



Plot 10: Efficiency of the rectifier at 2500 MHz

### 6. Conversion efficiency of RF rectifiers

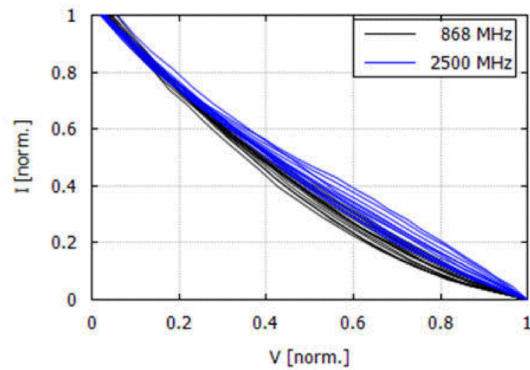
From the maximum power point of the rectifiers, it is easy to determine the maximum efficiency plot. Both for 868 MHz and 2500 MHz, the efficiency was plotted as a dependency of efficiency on input RF power. The absolute efficiency of the rectifier is given only for reference. Despite the spectrum analyzer was calibrated, its RF power measurement is declared to have accuracy of around 0.5 dBm. Thus, the presented absolute efficiency may be affected by an error. In future, this problem will be solved by using a precise RF power meter which was not available during current measurements. The efficiency plots are on Plot 9 and Plot 10. It is clear that the efficiency of the RF to DC conversion is rising with larger input RF power. The maximum achieved efficiency is 56.3 % and 34.6 % for 868 MHz and 2500 MHz, respectively.



Plot 9: Efficiency of the rectifier at 868 MHz

### 7. Derivation of a simplified model of RF rectifier

Complete simulations of microwave rectennas can be time consuming and require specialized software. For easier and more affordable MPPT system development, a simplified equivalent model is presented. The analytical model should return expected power output based on the voltage on the load.



Plot 11: Combined normalized plot of all measured V/I characteristics

Similarly, as normalized plots of delivered power (Plot 7 and Plot 8), the Plot 11 shows that the V/I characteristics do not change drastically and they are close together despite large changes in input power and input frequency (-16 to +10 dBm and 868 to 2500 MHz, respectively). Thanks to this, a single approximate model will be derived. Finally, the model will be compared to the measured values.

All V/I curves were fitted with a single second order polynomial. The fitting was performed with least squares method. Higher degree polynomials did not fit the model significantly better. Rather than that, they added rather unrealistic features like extremes at the beginning or end of the V/I curve. The resulting polynomial is shown below:

$$I'(V') = 0.52731 V'^2 - 1.55737 V' + 1.04000 \quad (4)$$

The delivered power predicted by the model can be calculated by using the function (2):

$$P'(V') = 0.52731 V'^3 - 1.55737 V'^2 + 1.04000V' \quad (5)$$

The function (4) is defined in closed interval  $V': 0 \leq V' \leq 1$ , where 1 represents the open circuit voltage of the RF to DC converter. By deriving this function in the provided interval, the extremes will be found. The derivation of the function (4) leads on quadratic function. Extremes can be obtained by calculating the roots of the quadratic function. There is one extreme of the function (4) in the specified closed interval and its numerical value is:

$$V'_{Pmax} = 0.425012 \quad (5)$$

By using second derivative, it is confirmed that this point corresponds to the maximum of the function (2). This representation means that the maximum power point of the RF rectifier is achieved when the load is set to the point where the voltage on the rectifier equals to

$$V_{Pmax} = V_{open}V'_{Pmax}, \quad (6)$$

where  $V_{open}$  is the open circuit voltage of the rectifier and  $V_{Pmax}$  is the voltage where the maximum power point is predicted by the model. The model's hypothesis is that if the operating point of the rectifier is set to this point, the harvested power from it is maximized.

## 8. Model verification

The model proposed in Chapter 7 was compared to the measured data and its accuracy including the calculation of hypothetical power loss caused by the error of the model. For this purposes, measured data were used, especially the data visualized in Plot 7 and Plot 8. The power loss will be defined by following formula:

$$P'_{loss} = \frac{P_{maxmeas} - P_{maxmodel}}{P_{maxmeas}}, \quad (7)$$

where  $P_{maxmeas}$  is maximum power obtained by placing the rectifier into optimum load conditions and  $P_{maxmodel}$  is the optimum load voltage predicted by the model. The higher the value is, the better the model fitted the true conditions. The maximum possible value is 1 which means that the maximum power point predicted by the model reflects the reality. In Table 1, this value is provided as  $P_{ploss}$  which resembles the percentage of potentially wasted power by error generated by the model.

Table 1 : Measured errors of the model in determining the maximum power point

$P_{in}$ [dBm]	$P_{ploss}$ at 868 MHz [%]	$P_{ploss}$ at 2500 MHz [%]	
10	0.323	4.501	
8	0.286	3.446	
6	0.085	2.287	
4	0.006	1.026	
2	0.003	0.771	
0	0.057	0.697	
-2	0.240	0.390	
-4	0.111	0.348	
-6	0.772	1.031	
-8	0.743	0.018	
-10	1.158	0.099	
-12	1.663	0.002	
-14	2.154	0.087	
-16	1.318	0.007	

The maximum hypothetical power loss caused by the RF to DC converter did not exceed 5 % over the whole operation envelope of the converters which were operated under frequency of 868 MHz and 2500 MHz with output power ranging from -16 dBm to +10 dBm which is a good result. In 68 % of the cases, the hypothetical power loss did not exceed 1 %.

## 9. Results and discussion

In this paper, a method for characterization of RF rectifiers was presented together with the practical results of characterization of a basic Greinacher doubler circuit. The presented custom hardware developed and manufactured specifically for this purpose stands as a low-cost and easy to operate way to characterize RF rectifiers. Two identical rectifiers matched to different input frequencies were successfully characterized. From the V/I characteristics, a model working for both rectifiers was developed. The result of a model is a single coefficient which represents the point in the operational characteristics of the rectifier where maximum power is predicted to be delivered. This coefficient can be used in design of maximum power point tracking system for DC/DC converters. The maximum achieved efficiency of the presented converters is estimated to be 56.3 % and 34.6 % for 868 MHz and 2500 MHz, respectively. However, for precise measurement, the system will have to be

calibrated with a RF power meter instead of spectrum analyzer.

The results also show that there is a strong dependency of efficiency on input RF power. The higher input RF power leads to larger efficiency. However, after approaching 5 dBm, the efficiency tended to stay constant, probably due to greater mismatch between the 50 Ohm source and the rectifier. The measured data also shows that the changes in incident input RF power and frequency affect the matching of the rectifier to the source load.

A model which can be used for development of MPPT system was derived. The model does not require any sensor data except for open circuit voltage on the sensor. The typical error in determining of the maximum power point is under 1 %, while the maximum error was 4.5 % for data which was measured at 868 MHz and 2500 MHz with output power varying from -16 dBm to +10 dBm.

The results of this work can be used in design of RF rectifiers as well as development of MPPT systems for use not only in experimental SBSP setups but also in other applications of wireless energy transfer, including low power battery-less medical implants and RFID applications.



**Appendix A (Circuit diagrams for simulations)**

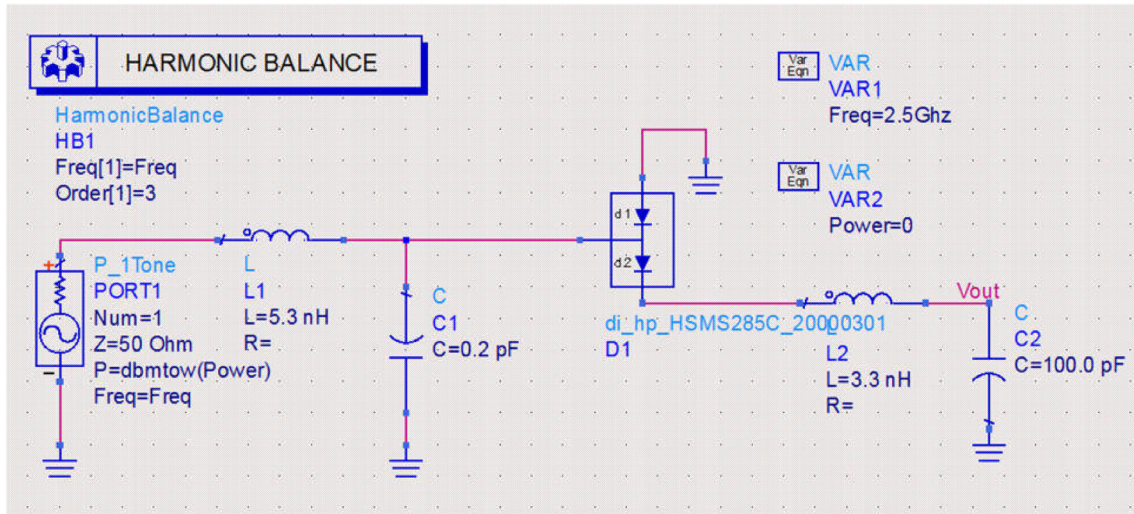


Fig. 9: Schematic diagram of RF rectifier for open-circuit voltage simulation

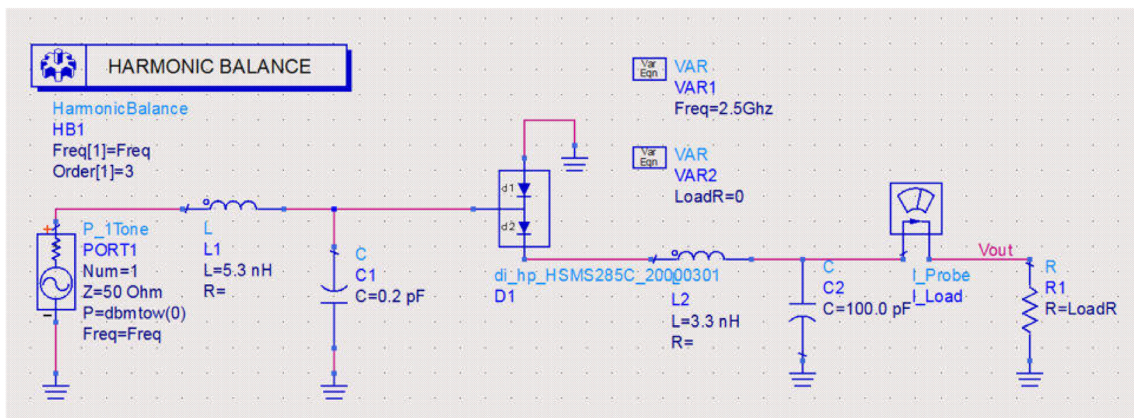


Fig. 10: Schematic diagram of RF rectifier for I/V curve simulation

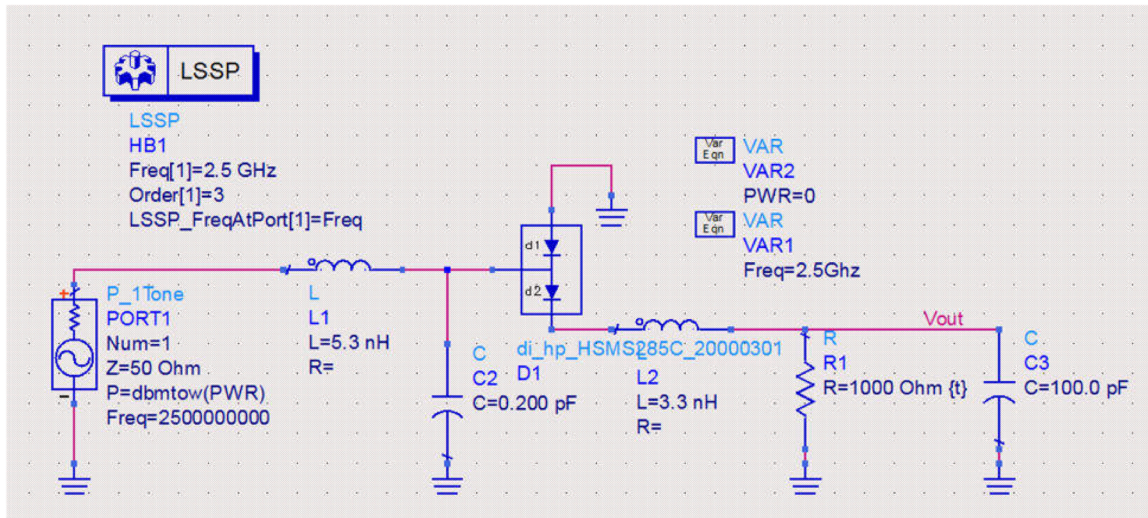


Fig. 11: Schematic diagram of RF rectifier for simulation of dependency of return loss on input RF power

#### References

- [1] R. Bidkar, "Space Based Solar Power (SBSP): An emerging technology," *2012 IEEE 5th India Int. Conf. Power Electron.*, pp. 1–4, 2012.
- [2] N. Tesla, "The transmission of electrical energy without wires as a means for furthering peace," *Electrical World and Engineer*, pp. 21–24, 07-Jan-1905.
- [3] W. C. Brown, "The microwave powered helicopter," *J. Microw. Power Electromagn. Energy*, vol. 1, pp. 1–21, 1966.
- [4] C. Song, Y. Huang, J. Zhou, J. Zhang, S. Yuan, and P. Carter, "A High-Efficiency Broadband Rectenna for Ambient Wireless Energy Harvesting," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 63, no. 8, pp. 3486–3495, 2015.
- [5] S. Ladan and K. Wu, "High efficiency low-power microwave rectifier for wireless energy harvesting," *IEEE MTT-S Int. Microw. Symp. Dig.*, pp. 1–4, 2013.
- [6] D. H. Chuc and B. G. Duong, "Investigation of Rectifier Circuit Configurations for Microwave Power Transmission System Operating at S Band," vol. 5, no. 5, pp. 967–974, 2015.
- [7] A. Nimo, T. Beckedahl, T. Ostertag, and L. Reindl, "Analysis of Passive RF-DC Power Rectification and Harvesting Wireless RF Energy for Micro-watt Sensors," *AIMS Energy*, vol. 3, no. 2, pp. 184–200, 2015.
- [8] E. Khansalee, K. Nuanyai, and Y. Zhao, "A Dual-Band Rectifier for RF Energy Harvesting," *Eng. J.*, vol. 19, no. 5, pp. 189–197, 2015.
- [9] M. K. Hosain, A. Z. Kouzani, M. F. Samad, and S. J. Tye, "A miniature energy harvesting rectenna for operating a head-mountable deep brain stimulation device," *IEEE Access*, vol. 3, pp. 223–234, 2015.
- [10] R. Wang, D. Ye, S. Dong, Z. Peng, Y. Salamin, F. Shen, J. Huangfu, C. Li, and L. Ran, "Optimal matched rectifying surface for space solar power satellite applications," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 62, no. 4, pp. 1080–1089, 2014.
- [11] FOXElectronics, "3.3V Ultra Miniature SMD HCMOS TCXO / VCTCXO Model: FOX924 SERIES," 2007. [Online]. Available: [www.foxonline.com/pdfs/fox924.pdf](http://www.foxonline.com/pdfs/fox924.pdf). [Accessed: 05-Jun-2016].
- [12] Texas Instruments, "SN74LVC1G125 Single Bus Buffer Gate With 3-State Output," 2014. [Online]. Available: <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/sn74lvc1g125.pdf>. [Accessed: 05-Jun-2016].
- [13] Maxim Integrated, "MAX2870: 23.5MHz to 6000MHz Fractional/ Integer-N Synthesizer / VCO," 2014. [Online]. Available: <https://datasheets.maximintegrated.com/en/ds/MAX2870.pdf>. [Accessed: 06-Jun-2016].
- [14] TriQuint Semiconductor, "AG604-86: InGaP HBT Gain Block," 2008. [Online]. Available: [www.triquint.com/products/d/DOC-A-00000313](http://www.triquint.com/products/d/DOC-A-00000313). [Accessed: 05-Jun-2016].
- [15] TriQuint Semiconductor, "TQP4M9071: High Linearity 6-Bit, 31.5 dB Digital Step Attenuator," 2014. [Online]. Available: [www.triquint.com/products/d/DOC-A-00000769](http://www.triquint.com/products/d/DOC-A-00000769). [Accessed: 05-Jun-2016].

- [16] Texas Instruments, "OPAx22x High Precision , Low Noise Operational Amplifiers," 2015. [Online]. Available: <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/opa227.pdf>. [Accessed: 05-Jan-2016].
- [17] Microchip Technology Inc., "MCP4706/MCP4716/MCP4726 - 8-/10-/12-Bit Voltage Output Digital-to-Analog Converter with EEPROM and I2C Interface," 2012. [Online]. Available: <http://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/22272C.pdf>. [Accessed: 05-Feb-2016].
- [18] Texas Instruments, "LM4041-N / LM4041-N-Q1 Precision Micropower Shunt Voltage Reference," 2013. [Online]. Available: <http://www.ti.com/lit/ds/snos641f/snos641f.pdf>. [Accessed: 05-Feb-2016].
- [19] Avago Technologies, "Designing Detectors for RF / ID Tags Application Note 1089," 2008. [Online]. Available: <http://docs.avagotech.com/docs/AV02-1577EN>. [Accessed: 06-Oct-2016].
- [20] Avago Technologies, "HSMS-285x Series: Surface Mount Zero Bias Schottky Detector Diodes," 2009. [Online]. Available: <http://docs.avagotech.com/docs/AV02-1377EN>. [Accessed: 16-Jun-2016].
- [21] Pragoboard s.r.o., "Design and basic construction." [Online]. Available: [http://www.pragoboard.cz/navrhy\\_konstrukce\\_rigid](http://www.pragoboard.cz/navrhy_konstrukce_rigid). [Accessed: 05-Jan-2016].
- [22] Avago Technologies, "Linear Models for Diode Surface Mount Packages; Application Note 1124," 2010. [Online]. Available: [https://ddd.uab.cat/pub/treecpro/2010/hdl\\_2072\\_151838/PFC\\_SergiCarreraColet\\_annex.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/treecpro/2010/hdl_2072_151838/PFC_SergiCarreraColet_annex.pdf). [Accessed: 17-Jun-2016].
- [23] J. A. Shaw, "Radiometry and the Friis transmission equation," *Am. J. Phys.*, vol. 81, no. 1, p. 33, 2013.

## 4.2 Vývoj komunikačního protokolu pro implantabilní zařízení

Základní požadavek na komunikační rozhraní je schopnost jednosměrného přenosu dat mezi implantovatelným pH senzorem (dále v této kapitole jen „senzor“) a implantovatelným neurostimulátorem (dále v této kapitole jen „stimulátor“), jednosměrného přenosu dat mezi senzorem a externí stanicí, a obousměrného přenosu mezi stimulátorem a externí stanicí. Vzhledem k použití mikrokontrolerů řady Nordic Semiconductor nRF52 ve finálních prototypch obou zařízení byl jako základ zvolen protokol Enhanced ShockBurst (ESB) (35), který je koncipován jako protokol topologie „hvězda“ – několik zařízení může odesílat zprávy (dále jen „PTX“), které jsou přijaty jedním přijímačem (dále jen „PRX“). Výhodou protokolu je jeho jednoduchost, nízký overhead (data, která jsou odeslána navíc kromě užitečných dat – oproti např. Bluetooth a Wi-Fi je v případě tohoto protokolu kromě užitečných dat odesílána pouze synchronizační sekvence, preambule, adresa a kontrolní součet pro zabezpečení přenosu) a nízká spotřeba energie na straně odesílatele. Nevýhodou je nízká odolnost proti úzkopásmovému rušení.

Tato topologie je pro uvedenou aplikaci sama o sobě samozřejmě nedostatečná, proto byla vyvinuta nadstavba tohoto protokolu, která bude v textu dále nazývána ESB-ID (ESB for Implantable Devices). Hlavním cílem nadstavby je implementace synchronizace mezi všemi prvky sestavy (stimulátorem, senzorem a externí stanicí) tak, aby byla na úkor spotřeby energie externí stanice minimalizována spotřeba energie obou implantabilních zařízení. Dále je komunikace mezi pH senzorem a stimulátorem aktivně synchronizována tak, aby byla minimalizována doba, po kterou je stimulátor v přijímacím (RX) režimu, který je nejnáročnější na spotřebu energie. Oproti tomu vysílací režim (TX) je na spotřebu relativně nenáročný, protože syntezátor s fázovým závěsem (PLL) a modulátor jsou aktivní pouze po dobu odeslání zprávy, která je ve stovkách mikrosekund.

ESB protokol umožňuje během jedné transakce (odeslání zprávy obsahující data – zprávu – z PTX do PRX) nejen odeslání užitečných dat z PTX do PRX, ale i zaslání užitečných dat z PRX do PTX v rámci ACK. ACK zpráva je taková zpráva, kterou PRX

potvrdí PTX korektní přijetí zprávy. Pokud ACK zpráva do určité stanovené doby nedorazí, PTX zaslání zopakuje. Toho je využito pro obousměrnou komunikaci mezi stimulátorem a externí stanicí.

Externí stanice může být trvale v PRX módu díky tomu, že je umístěna *ex vivo* a je připojena k externímu zdroji energie prostřednictvím USB. Mírně zvýšená spotřeba tedy u tohoto zařízení nehraje žádnou roli. Externí stanice čeká na příjem dat ze senzoru a neurostimulátoru. Pokud přijme zprávu z pH senzoru (struktura a identifikace viz níže), PRX mód není přerušen a dojde k prostému vyhodnocení přijatých dat. Pokud přijme zprávu z neurostimulátoru, PRX mód je zastaven, zařízení se konfiguruje jako PTX, odešle zprávu do neurostimulátoru a konfiguruje se opět jako PRX. Stavový automat pro externí stanici je znázorněn na obr. 3.

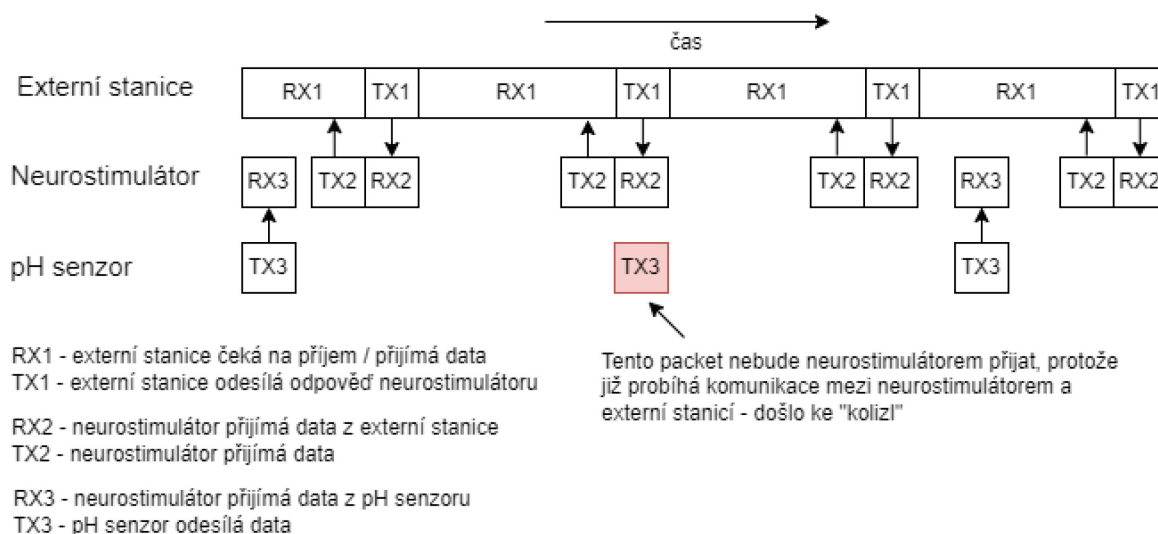
Senzor má z hlediska všech prvků systému nejjednodušší stavový automat, je trvale v PTX režimu a pouze periodicky odesílá data o naměřené

hodnotě pH a napájecím napětí s periodou 403 milisekund. Tento čas byl zvolen proto, že pH senzor z důvodu úspory energie nepřijímá žádná data. Senzor tedy nelze synchronizovat se zbytkem systému. V důsledku tolerance frekvence krystalových oscilátorů a jejich frekvenční nestability nelze garantovat přesnou časovou synchronizaci ani na hardwarové úrovni. Může tedy nastat situace, kdy se bude vysílání senzoru překrývat s neurostimulátorem a došlo by ke vzniku rušení. Perioda vzniku tohoto rušení je pak nejmenším společným násobkem period vysílání implantátu a senzoru. V případě periody vysílání pH senzoru 400 ms a stimulátoru 2000 ms by pH senzor rušil každé vysílání stimulátoru. Díky zvolenému času 403 ms se ovšem perioda vzniku rušení prodlužuje na 806 000 ms, tedy přes 13 minut, což je akceptovatelný kompromis, který nemá praktický



Obr. 3: Stavový automat externí stanice

vliv na funkci bezdrátového rozhraní a jedná se o řešení, které žádným způsobem nenavýšuje spotřebu na straně stimulatoru ani pH senzoru.



Obr. 4: Schéma bezdrátové komunikace v rámci systému

V mikrokontroleru neurostimulátoru běží nezávisle na sobě dvě vlákna, kdy jedno má na starosti vysílání telemetrických dat o svém stavu a příjem konfiguračních dat, zatímco druhé má na starosti příjem dat ze senzoru. Primárním vláknem je telemetrie, kdy stimulator pracuje v PTX režimu, kdy periodicky vysílá data o svém stavu – aktuální konfiguraci, napětí baterie a poslední přijaté hodnotě pH ze senzoru. V závislosti na zvoleném stavu (popsáno detailně v kapitole 4.3) tuto zprávu odesílá s periodou 2, 15 nebo 600 sekund. Po odeslání packetu čeká po dobu 5 milisekund v PRX režimu na příjem odpovědi z externí stanice, která obsahuje informaci o tom, zda má dojít k rekonfiguraci stimulatoru. Pokud do pěti milisekund packet neobdrží, přechází do PTX režimu, ve kterém čeká na další odeslání packetu dle stanovené periody. Schéma komunikace je znázorněno na obr. 4.

Pokud je stimulator v režimu, kdy vyžaduje data z pH senzoru (zpětnovazebný režim), inicializuje se do výchozího stavu, kdy není synchronizovaný s pH senzorem. Přejde na dobu 1230 milisekund (aby byla garantována tři časová okna, během kterých senzor odesílá data, plus 21 milisekund rezerva) do PRX režimu a očekává packet ze senzoru. Pokud po této době senzor nenalezne, přechází zpátky do PTX režimu. Pokud přijme packet ze senzoru, dekoduje přijatá data a naplánuje další PRX okno za 4030 milisekund (desetinásobek periody odesílání dat ze senzoru pokrácený o 10 ms rezervu). Doba je volena s ohledem na dobu odezvy ISFET pH senzoru a vzorkovací frekvenci, která je běžně používána v klinické praxi (15/min) (36). Samotné okno má délku 20 milisekund (očekávané přijetí packetu

$\pm 10$  ms jako rezerva). Pokud v tomto okně nejsou přijata data, je synchronizace zahájena znovu. Pokud jsou přijata data, zpracují se a naplňuje se další PRX okno. Pokud dojde ke kolizi s druhým komunikačním vláknem (viz následující odstavec), naplňuje se další PRX okno a k zahájení synchronizace nedojde, protože chyba není na straně příjmu dat ze senzoru.

Vzhledem k tomu, že příjem dat ze senzoru i komunikaci s externí stanicí zajišťuje stejný rádiový přijímač/vysílač, je nutné implementovat mutex (zjednodušeně lze přeložit jako „zámek“), podobně jako v dalších systémech, které sdílí jednu periférii. Pokud by mutex implementován nebyl, může dojít k situaci, kdy budou dvě programová vlákna požadovat přístup ke stejné periférii, čímž dojde k výjimce a selhání programu. Jednoduchý mutex je implementován pomocí proměnné, kterou programové vlákno, které požádá o přístup k periférii jako první, změní z hodnoty „0“ na hodnotu „1“ a tím dá druhému programovému vlákně vědět, že periférie se aktuálně používá a nelze ji využít. Druhé programové vlákno poté může buďto čekat, nebo (v případě ESB-ID) předčasně ukončí svou činnost a čeká na další příležitost. Po dokončení využití dané periférie první vlákno změní dotýčnou proměnnou zpět na nulu a tím dá vědět druhému vlákně, že je periférie volná.

Nadstavba ESB-ID se vyznačuje snadnou implementací a velmi nízkou spotřebou energie, což se odráží v dlouhé výdrži implantovatelných zařízení, která mezi sebou tímto protokolem komunikují. Řádově se jedná o jednotky dnů u neurostimulátoru a více než týden u pH senzoru při použití baterie o kapacitě o napětí kolem 3 V a kapacitě do 15 mAh. Požadavek na minimalizaci kapacity baterie je jedním z nejzásadnějších aspektů každého implantabilního zařízení, a to jak z hlediska minimalizace rozměrů výsledného zařízení, tak i bezpečnosti.

### 4.3 První úspěšná endoskopická implantace neurostimulátoru

První experimenty, které byly v souvislosti s vývojem zpětnovazebního systému implantabilních prostředků pro léčbu GERD provedeny, souvisely s vývojem metody implantace a zjištěním maximálních možných rozměrů implantátu. Pro tyto účely byl v souladu s principem 3R (*replacement, reduction and refinement*) použit model prasečího žaludku a jícnu, který byl v průběhu dalšího výzkumu použit při všech příležitostech, při kterých nebylo nutné pro experiment použít živé zvíře. Orgány pro experimenty byly zajištěny ze standardního chovu hospodářských zvířat.

Na začátku byly prováděny experimentální implantace elektroniky do submukozy žaludku, zejména kvůli relativní jednoduchosti. Byla přitom použita metoda ESP (33), která je podrobně popsána v úvodu této práce. Pro implantaci do submukozy byla otestována tři různá zařízení – LF RFID (nízkofrekvenční radiofrekvenční identifikace) tag, senzor teploty vlastní konstrukce a gastroneurostimulátor vlastní konstrukce. Implantace LF RFID tagu byla provedena primárně pro nácvik ESP metody, další dva experimenty měly za úkol otestovat způsob enkapsulace a spolehlivost bezdrátové komunikace. Ukázka první provedené implantace elektronického zařízení do submukozy je na obr. 5.

Maximální velikost implantovaného zařízení (neurostimulátor), která je pro danou technologii implantace schůdná, byla stanovena na 25 x 22 x 6 mm. Enkapsulace teplotního senzoru byla provedena pomocí teplem smrštitelné bužírky z polyolefinu, která byla na obou koncích zajištěna epoxidovou pryskyřicí. Na základě literární rešerše byl také stanoven přibližný útlum rádiového signálu



Obr. 5: Vložení implantátu do submukozní kapsy

při průchodu tkání (37) pro gastrický neurostimulátor. Ten je úměrný frekvenci a u zájmových pásem (433 MHz, 868 MHz a 2,4 GHz) se pohybuje mezi 17 a 28 dB.

Všechny tři implantace byly úspěšné a byla prokázána funkčnost elektroniky v submukoze i jednoduchá metoda enkapsulace implantátů s použitím komerčně dostupných materiálů. Nevýhodou je nízká biokompatibilita výsledného řešení, která se stala předmětem dalšího výzkumu.



### **Článek s IF**

HAJER, J. a NOVÁK, M., Development of an Autonomous Endoscopically Implantable Submucosal Microdevice Capable of Neurostimulation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology Research and Practice* [online]. 2017, 2017, 1–8. ISSN 1687-6121. Dostupné z: [doi:10.1155/2017/8098067](https://doi.org/10.1155/2017/8098067)

## Research Article

# Development of an Autonomous Endoscopically Implantable Submucosal Microdevice Capable of Neurostimulation in the Gastrointestinal Tract

J. Hajer<sup>1</sup> and M. Novák<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Third Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Královské Vinohrady, 2nd Department of Internal Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Faculty of Electrical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague, Czech Republic

Correspondence should be addressed to J. Hajer; [jan.hajer@fnkv.cz](mailto:jan.hajer@fnkv.cz)

Received 31 January 2017; Accepted 24 April 2017; Published 21 June 2017

Academic Editor: Per Hellström

Copyright © 2017 J. Hajer and M. Novák. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Gastric dysmotility can be a sign of common diseases such as longstanding diabetes mellitus. It is known that the application of high-frequency low-energetic stimulation can help to effectively moderate and alleviate the symptoms of gastric dysmotility. The goal of our research was the development of a miniature, endoscopically implantable device to a submucosal pocket. The implantable device is a fully customized electronics package which was specifically designed for the purpose of experiments in the submucosa. The device was endoscopically inserted into the submucosal pocket of a pig stomach and partially severed pig side in order to adequately simulate a live animal model. The experiment confirmed that the designed device can be implanted into the submucosa and is capable of the measurement of sensor data and the transmission of this data wirelessly in real time to a computer outside of the body. After proving that the device can be implanted submucosally and transmit data, further experiments can now be performed, primarily with an electrogastrography (EGG) instrument and implantable device with tissue stimulation capability.

## 1. Introduction

Gastric dysmotility can be a sign of several relatively common diseases such as gastroparesis, which is usually characterized by chronic progression and imposes rather severe consequences on the social, work-related, and physical status of the patient. Most cases of gastroparesis are usually diabetic or idiopathic in origin and are often resistant to available medication [1]. Patients afflicted with this condition most commonly present with nausea and repeated vomiting. Based on previous research, it is known that the application of high-frequency low-energetic stimulation can help to effectively moderate and alleviate the symptoms of gastric dysmotility [2].

Based on meta-analysis, the substantial and significant improvement of symptoms and gastric emptying was observed, indicating that high-frequency gastric electrical

stimulation is an effective and safe method for treating refractory gastroparesis [3]. It has also been shown that lower esophageal sphincter neurostimulator therapy is safe and effective for the treatment of GERD. There is a significant and sustained improvement in GERD symptoms, reduction in esophageal acid exposure with elimination of daily PPI usage, and no stimulation-related adverse effects [4]. However, currently, there is only one gastric-stimulation device available in the market, the Enterra II (Medtronic), which needs to be surgically implanted with the patient undergoing general anaesthesia and having a rather bulky device fitted, using intramuscular catheters which allow for stimulation of the gastric muscle tissue. This is why the option of using a wirelessly communicating device implanted into the gastric submucosal layer would represent a definite advantage and improvement in patient comfort. This would allow for a much less risky surgical procedure (in terms of general

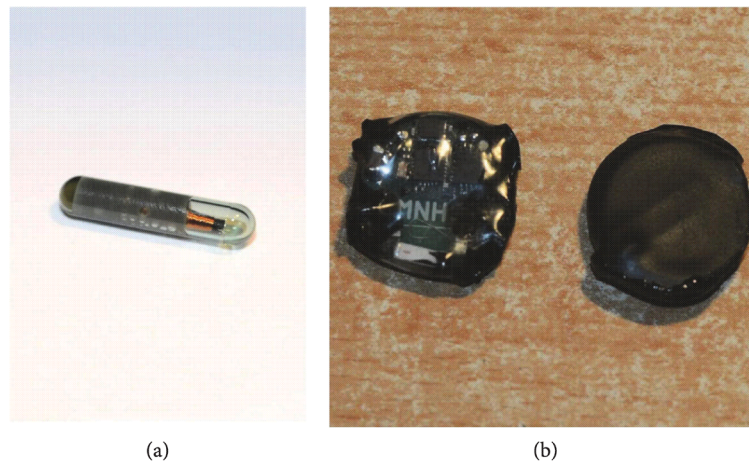


FIGURE 1: (a) 134.2 kHz LF RFID tag. (b) Encapsulated devices with sensor-only capability.

anaesthesia requirement and possible complications of both anaesthesia and surgical procedure) with a relatively simple and safe endoscopic implantation.

The goal of our research was the development of a miniature, endoscopically implantable device and its successful deployment to submucosa. This paper describes a proof of concept study which confirms that it is possible to implant a device into the submucosa which is capable to send sensor data to the receiver device outside of the body for longer periods of time. For this particular experiment, a device with a thermometer sensor, communicating using the 868 MHz industrial, scientific, and medical (ISM) license-free band, was developed and successfully tested.

This research heads towards the development of a device which could be implanted into submucosa for long periods of time (at least 5 years) and would serve as a gastric neurostimulator which could be externally programmed using a hand-held device. The purpose of the development of this novel type neurostimulator is to replace the current systems which use intramuscular leads (e.g., Medtronic Enterra II). These devices are relatively large, having a nonrechargeable battery which is placed into a subcutaneous pocket and intramuscular leads. The disadvantages of such devices are obvious—higher invasiveness (requires classical surgery with general anaesthesia) and patient discomfort. The proposed solution will not require general anaesthesia, is less invasive, and thus enhances patient's comfort.

## 2. Material and Methods

**2.1. Implantable Device Construction.** The implantable device is a fully customized electronics package which was specifically designed for the purpose of experiments in the submucosa. The device is powered by a primary Lithium Coin Cell Battery and is capable of temperature measurement and surrounding tissue stimulation using constant time and constant voltage pulses. The minimum battery life is specified to be at least 6 months. This was verified by testing the device after 6 months from new battery insertion.

**2.2. Development of Technology for Submucosal Endoscopically Implanted Gastroneurostimulator.** Multiple experiments were performed to determine technological aspects and construction of the device. The first experiments were done with a 134.2 kHz low-frequency radio-frequency identification (LF RFID) tag (Figure 1(a)). The tag was in the shape of a glass capsule. Inside the capsule, there is a coil with a silicon chip. The purpose of the first experiment was to confirm that a wirelessly powered object which transmits data can be endoscopically implanted into the submucosa. After implantation, the RFID tag was read using a custom-manufactured LF RFID reader with ID-innovations ID-3LA module. During the first experiment, we were able to read the RFID tag. However, due to a not ideal angular position of the implant with respect to the receiver coil (the resulting magnetic flux through the receiving coil, if the position of both coils is perpendicular to each other, is zero), we had problems with the reading of the RFID tag. We have decided to not use this design topology in future embodiments of the device and position the coil differently.

The second experiment was comprised of a battery-powered sensor which is capable of temperature measurement inside submucosa. The construction of the sensor is practically identical to the construction of the recent hardware revision. The only difference is that it does not contain conductive pads for muscle stimulation and is equipped with a different software. Polyvinylchloride and polyolefine heat-shrinkable tubes were used together with Star brite Liquid Electrical Tape to seal the implant. The completed prototypes are in Figure 1(b). The biocompatibility of the implants was not considered in this project.

### 2.3. Final Prototype Construction

**2.3.1. Power Management.** The device is powered by a single CR2016 Energizer lithium primary cell. Its nominal voltage is 3.0 V, while the cut-off voltage is 2.0 V. The cell is cylindrical in shape and has a diameter of 20 mm and thickness of 1.6 mm. Its nominal capacity is 90 mAh under a 30 kohm

load and at 21°C. The specified operating temperature range is  $-30^{\circ}\text{C}$  to  $+60^{\circ}\text{C}$  which is sufficient for this task where a  $30^{\circ}\text{C}$  to  $40^{\circ}\text{C}$  operating temperature is expected (implantation into ventriculus model or inside the abdominal organs of a living pig).

The  $\text{LiMnO}_4$  battery has a high input resistance (with respect to electronics design which draws electrical current up to 10 mA for short periods of time during transmission bursts) which changes during discharge. The value of the internal resistance varies between 15 and 100 ohms during the lifetime of the battery. The minimum required voltage for the continuous operation of the electronics without undervoltage lockout is 1.8 V. The designed circuitry involves 10 mA peak current draws which last for no more than 10 ms. Given the worst case scenario (100-ohm internal resistance), this would lead to a voltage drop of 1.0 V which would lead to an undervoltage condition. To prevent this, a  $220\ \mu\text{F}$  ceramic capacitor is installed in parallel to the battery. It serves as an energy bank with low internal resistance to cover the energy needs connected with high current spikes.

The chips (microcontroller, RF transceiver, and temperature sensor) used do not require a stable voltage, the microcontroller and RF transmitter are capable of operation with a voltage of between 1.8 V and 3.6 V [5, 6], and the temperature sensor operates from 2.4 volts to 5.5 V [7].

Given the 90 mAh estimated capacity of the battery, a 6-month battery life requirement, and a cut-off voltage of 2.4 volts (due to the temperature sensor used), the maximum allowable current consumption of the device is 19 microamperes.

**2.3.2. Microprocessor Unit.** The microprocessor unit handles the communication, the reading of the sensor data, and the sending of pulses for tissue stimulation. It was created using the Microchip PIC16LF1704, an 8-bit low-power microcontroller [6]. This particular microcontroller features oscillator architecture optimized for low-power devices and digital and analogue peripherals. A bit-banging SPI (Serial Peripheral Interface) bus is used for managing the communication with the radio transceiver. The analogue output from the temperature sensor is connected to a microcontroller input, configured as an analogue input. The stimulation pad outputs are configured as digital outputs. Thus, the device is capable of stimulating the muscle tissue by providing different voltage levels across the stimulation pads. The amplitude of the simulation pulse can be controlled using PWM (pulse width modulation) module inside the microcontroller. An output capacitor connected to the output of stimulation can filter out the high-frequency signal components and leave only the DC (direct-current) component of the signal. The period and duration of the stimulation pulses can be controlled using another PWM Module or Timer Module embedded in the used microcontroller. The maximum stimulation voltage and current deliverable to the tissue were, in this case, limited by the battery voltage.

**2.3.3. Radio Transceiver.** Two options were considered for the communication circuitry. The first was inductive (also known as “near-field” communication) [8]. This method of

communication is characterized by an inductive or capacitive coupling between the transmitting and receiving coils. This is particularly beneficial for power transfer. However, the particular implant presented in this paper carries a source of energy; therefore, far-field transmission was chosen. The body tissues like muscles and fat contain water which is a lossy transmission medium. The choice of operating frequency is a compromise between the attenuation of electromagnetic waves and the size of antenna. The particular material is characterized by permittivity, permeability, and conductivity.

The complex propagation constant is usually used to evaluate the effect of particular media on propagation of the electromagnetic wave [9].

$$\gamma = \sqrt{j\omega\mu(\sigma + j\omega\epsilon)} = \alpha + j\beta, \quad (1)$$

where  $\gamma$  is complex propagation constant,  $\omega$  is the angular frequency of the incident electromagnetic wave,  $\mu$  is the permeability of the media,  $\epsilon$  is the permittivity of the media,  $\alpha$  is the attenuation constant, and  $\beta$  is the phase constant.

Using this formula, it is possible to derive the attenuation of the wave propagating through the media. For a five-layer tissue and organ model consisting of the gastrointestinal tract, visceral fat, abdomen muscle, subcutaneous fat, and skin, for three different thicknesses of the tissue from 73.1 mm to 108.6 mm, the expected loss is 17.0 to 19.2 dB for 403.5 MHz, 17.4 to 20.2 dB for 916.5 MHz, and 22.8 to 28.0 dB for 2450 MHz [9].

From this published data, the frequency in the higher sub-GHz band was chosen. The loss induced by the tissue is negligible. The link budget of the radio used exceeds 100 dB [5]. There is still a large margin for low antenna gain because of the surrounding lossy medium around it once it has been implanted. Due to radio spectrum access regulation in the European Union, a frequency of 868.0 MHz was chosen. As stated in ETSI EN 300 220-1 [10], this frequency band is dedicated to nonspecific use applications, with a maximum radiated power of 25 mW and spectrum access and mitigation of 1% or LBT+AFA (Listen Before Talk + Adaptive Frequency Agility).

The radio chipset in the device is a Texas Instruments CC110L [5]. It is a complete transceiver for ultra-low-power wireless applications. It integrates a radio baseband, modem, and simple packet engine. The clock for the transceiver is obtained by a miniature 26 MHz crystal. The differential RF port of the transceiver is connected to a Johanson Technology 0896BM15A0001 Balun [11] which matches it to a single-ended 50-ohm impedance port. A short microstrip trace leads the signal path to the matching network of the Abracon ACAJ-110-T Chip Antenna [12]. The antenna was specifically matched to operate in an area surrounded by tissue. This was done with a vector network analyzer. The ceramic chip antenna was preferred instead of a PCB (printed circuit board) antenna because the ceramic chip antennas are usually less affected by the surrounding material [13].

**2.3.4. Mechanical Construction and Encapsulation.** All of the electronics are manufactured on a single double-layer PCB.

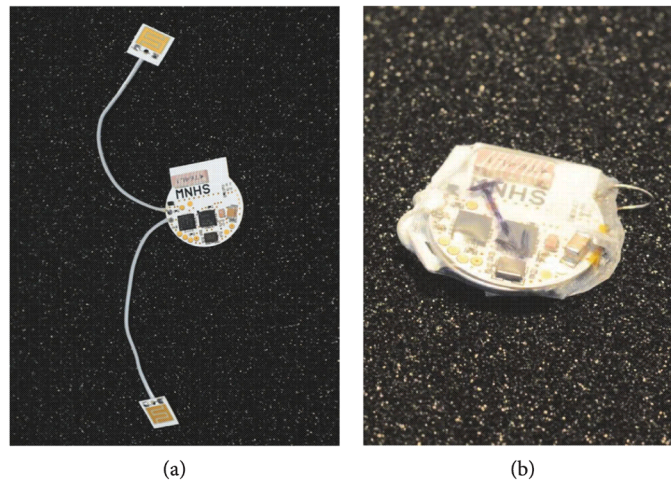


FIGURE 2: (a) Gastroneurostimulator before encapsulation. (b) Encapsulated gastroneurostimulator.

The thickness of the PCB is 0.3 mm and the material of the dielectrics is FR-4. All components are of SMT (surface-mount technology) and were assembled using lead-free solder paste and hot air under controlled conditions. The controlled conditions assured that the components and PCB did not go through excessive thermal stress and the maximum allowed temperature of components was not exceeded. All components are mounted on the single side except for the battery which is mounted on the reverse side. The contact wires for the electric stimulator functionality were soldered to the solder pads on the PCB. The other side of the wires is soldered to gold-plated contact plates manufactured using the same technology as the main PCB. The complete sensor before encapsulation is in Figure 2(a).

To ensure sufficient hermeticity for the purpose of the initial experiments with the device, the printed circuit board was coated with a conformal coating. Then, the device is encapsulated into either a polyvinylchloride or polyolefin heat-shrinkable tube. To seal the edges, the procedure differs based on the type of shrinkable tube. For a PET tube, one of the ends is sealed with heat while the other, which has the leads to stimulating plates, is filled with a waterproof and elastic silicone adhesive and sealant. For a polyolefin heat-shrinkable tube, the silicone sealant is used for both sides. The biocompatibility of the implants was not considered in this project. After curing, all devices were tested by placing them into a 50 cm high column of saturated salt solution with water. This test has proven that the devices are sufficiently waterproof and that they do not suffer from any major leaks. Any major water leak into the device would increase the current draw from the battery which would be easily detectable by the electronics as a sudden drop of the battery voltage. The encapsulated device is in Figure 2(b).

**2.3.5. Receiver Hardware and Software.** The receiver side is supported by a Texas Instruments TrxEB evaluation and development board for radio transceivers. The board was used together with SmartRF Studio 7 software for PC and

was connected to a PC via a USB interface. A module with CC110L transceiver was inserted into the development board. The module features an SMA connector. A quarter monopole antenna tuned for 868 MHz operation is used.

The device transmitted a 9-byte payload approximately every 22 seconds. A simple protection against burst interference by sending two packets immediately one after another was implemented. The first 2 characters of the payload represent the analogue temperature reading, followed by the battery voltage and serial number (which was chosen randomly). The packets were decoded using a script programmed in Python (Figure 3).

One device was implanted into the stomach (device 1) while the other (device 2) was placed on the table.

**2.4. Animal Models.** We used an animal model for endoscopy (using a fresh, flushed-out pig stomach with the adherent oesophagus and duodenum). The model used is a standard endoscopic one commonly used for the training of techniques such as ESD (endoscopic submucosal dissection), tunnelisation, and POEM (peroral endoscopic myotomy). In order to visualize the contact of the device with the external reader, the model stomach with the device implanted was isolated with the use of a pig's side in order to simulate a live experimental animal model as closely as possible.

**2.5. Endoscopic Insertion and Attachment of Device.** In order to perform the implantation and visualization, we used an animal-model-dedicated endoscope (Olympus GIF-Q 160), which was inserted in the standard way into the animal model consisting of a pig stomach and side pork in order to adequately simulate a live animal model. The device was grasped externally with a mesh (Twister Plus, Boston Scientific) and then inserted into the stomach, where it was released. The endoscope was then extracted, equipped with a dissection cap (15.5 mm FujiFilm lens Hood), and then inserted into the stomach again. In order to implant the device into the submucosal layer in the pyloric antrum, a

```

Before decoding:
15:26:41:957|0801|02 c9 4d 4e 48 53 31|-50
15:26:41:969|0801|02 c9 4d 4e 48 53 31|-49
15:26:53:535|0795|02 c4 4d 4e 48 53 30|-49
15:26:53:547|0795|02 c4 4d 4e 48 53 30|-49

After decoding:
Timestamp 15:26:41:957, temperature 22.61°C, battery voltage 2941 mV, device ID 0x4D4E485331, RSSI -50 dBm
Timestamp 15:26:41:969, temperature 22.61°C, battery voltage 2941 mV, device ID 0x4D4E485331, RSSI -50 dBm
-----
Timestamp 15:26:53:535, temperature 23.64°C, battery voltage 2962 mV, device ID 0x4D4E485330, RSSI -49 dBm
Timestamp 15:26:53:547, temperature 23.64°C, battery voltage 2962 mV, device ID 0x4D4E485330, RSSI -49 dBm

```

FIGURE 3: Raw data received from the implant before and after decoding; device 1 has ID 0x4D4E485330, while device 2 has ID 0x4D4E485331.

technique first described by Deb et al., called an endoscopic submucosal pocket (ESP), was used [14]. Following the application of a saline solution combined with methylene blue into the submucosal layer using an injection therapy needle catheter (Boston Scientific, 25G), a horizontal incision was made in order to create an opening in the submucosa using a Dual Knife (Olympus; electro-surgical knife with knob-shaped tip). Using the affixed cap (15.5 mm FujiFilm lens Hood), we inserted the cap into the newly created space, and with the use of a Dual Knife, we continued disrupting, dilating, and dissecting the submucosal layer, creating a sufficiently large-enough pocket to implant the stimulation device. The device, lying freely inside the stomach, was grasped by the insertion and extraction loops and, using a grasper (Olympus Alligator Jaw grasping forceps), navigated into the submucosal pocket, placed in close proximity of the muscularis propria. Haemostatic clips (Instinct endoscopic hemoclip, Boston Scientific) were used to secure the device in place inside the submucosal pocket and prevent any mispositioning or dislodging (Figure 4).

### 3. Results

An endoscopic placement of the gastric neurostimulator was successfully performed in all device dimensions (12 mm × 3 mm, 25 × 22 × 5 mm, and 25 × 22 × 6 mm). The weight of the second development prototype with sensor-only functionality is 3.8 grams. The final prototype with stimulation capability was further mechanically optimized; its weight is 3.1 grams. In order to implant the device into the submucosal layer, we used a technique first described by Deb et al., called an endoscopic submucosal pocket (ESP). We attached the stimulator near the muscular layer (muscularis propria) where it is theoretically the optimal stimulation depth. Creating the submucosal pocket and implanting of the gastric neurostimulator endoscopically took 20–30 minutes. During this procedure, there is no intra-procedural complication such as perforation. As our study was performed on an animal model, the risk of bleeding, infection, or device migration associated with this method is unknown. Based on experience with endoscopic submucosal dissection, endoscopic tunnel dissection, and endoscopic suturing, these potential risks are expected to be minimal.

The battery life of the device exceeds 6 months. This was tested using a prototype which was not implanted. After 6 months from insertion of battery, the capability of the device

to transmit data was tested using the TrxEB board. There was no degradation in performance in terms of link stability and received signal strength. The voltage was measured both remotely by decoding the sensor data and destructively by opening the sealed sensor and measuring the voltage directly to confirm. The battery voltage was 2.55 volts, which means that there was still some battery capacity left.

The one-directional communication link from the device to receiver was successfully tested. The results show that the performance of 868 MHz link was not affected by the presence of the tissue. Two identical devices were used in the experiment. The distance from both devices to the antenna receiver was about 50 cm. The received signal strength from both devices is very similar. The fact that the received signal strength from the device covered by tissue is so similar to the received strength of the device placed on the table can be explained by the fact that the chip antenna was matched to its characteristic impedance in the presence of tissue to achieve the best performance. The antenna surrounded only by air is then mismatched, which results in lower radiated energy.

The device is capable of neurostimulation. The maximum voltage of the stimulation is limited by the battery voltage of the current prototype. In determining the shape of stimulation pulses (on-time, off-time frequency of stimulation pulses and length of pulses), we have reviewed the datasheet of Medtronic Enterra II gastric neurostimulator [15]. The pulse length is 60 to 450 microseconds, on time and off time is 0.1 seconds to 24 hours, and pulse frequency ranges from 2 Hz to 130 Hz. The prototype device is capable of reproducing the parameters mentioned above, except for the maximum stimulation voltage.

### 4. Discussion

If the lumen was historically the first space and the peritoneal cavity was the second, then the intramural space has come to represent the “third space.” Unlike the others, this space remains virtual and has to be created by dissecting and expanding the tissue layer between the mucosa and the muscularis propria, allowing the endoscope to gain access [16]. Currently, submucosal techniques represent a new challenge for therapeutic endoscopists. Considering our past experiences with these techniques, we decided to implant the stimulation device directly into the submucosa, using the endoscopic submucosal pocket technique [14]. This particular

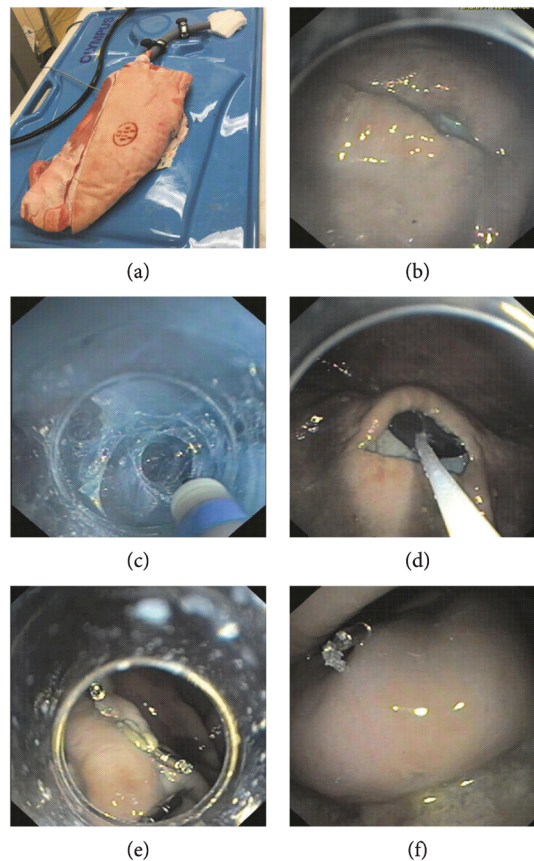


FIGURE 4: View of device implantation and endoscopic technique. (a) Animal model Olympus. (b) Submucosal incision (an entrance for the submucosal pocket formation). (c) Tunnelisation of the submucosal pocket using the Dual Knife. (d) Device implantation. (e) Closing the entry with haemostatic clips. (f) The implanted device inside the submucosal pocket, located in close proximity to the antral muscle.

method is proven to be relatively safe, simple, and minimally invasive. The average procedure time was 25 minutes, which we consider to be the minimum amount of time needed in order to correctly place the device into the submucosa and position it so that it remains in close contact with the gastric muscles. However, for the following experiments on live animal models, it will probably be necessary to modify our approach and avoid using haemostatic clips, which only close the mucosal opening and could later lead to implant rejection. In this case, it would be advantageous to use over the scope (OVESCO) clips instead, seeing as these would allow us to close the entry across all three of the stomach layers, including the muscle layer. Confirming these methods and techniques will require follow-up experiments on live animal survival models, which will also confirm the safety of a long-term submucosal implantation of the stimulation device.

From a technical point of view, the limiting parameter of the implantable solutions to the submucosa is the overall size. For its simplicity, a battery-only solution was developed. However, the battery makes up a great portion of the device, limiting the functionality and/or constraining the size of the

device. The design of the wireless communication part, on the other hand, was relatively straightforward due to the nature of the radio receivers which feature extremely high sensitivity (beyond  $-100$  dBm) and channel selectivity [5]. From a broader perspective, the research and development is heading toward two other sensor topologies—a battery-less variant powered from outside of the body and a rechargeable battery which is capable of holding its charge for between a few days to a few weeks with the ability to be wirelessly recharged. This would make the device capable of autonomous operation which is beneficial mainly in terms of exposure of human tissue to electromagnetic field (which is linked to specific absorption rate (SAR)) where battery-less solutions require continuous energy transmission while battery-powered solutions do not.

The major technological challenges in the realization of a fully compliant gastric neurostimulator can be divided into four main groups—encapsulation, communication, power transfer, and securing the implant in place. The device is expected to stay in the submucosa for very long periods of time, typically months to years. There are several parts of

the implantable device which have to be taken into account—the main package, inputs and outputs, and lead connections [17]. Given the very small size of the submucosal implantable device, all of these aspects have to be carefully taken into account to avoid any sealing failure. The current hardware revision of the neurostimulator which features nonrechargeable battery could benefit from a metallic enclosure which usually offers better hermetic sealing than polymer, glass, or ceramic materials [18]. A combination of metal material for encapsulation of critical subsystems (electronic components) and glass/ceramic material for the whole device would be a good trade-off between the influencing of wireless energy transfer or communication and the hermeticity of the device. Two-way communication between the implant and a device outside the body can be realized via a UHF wireless link, preferably in MEDS frequency band (402–405 MHz) intended for use with implantable medical devices. The high sensitivity of today's radio frequency receivers can compensate for the increased path loss in then lossy medium (the tissue). The battery life of the current prototypes is limited to several months. Changing the neurostimulator several times a year would be very impractical. Wireless charging could solve this issue. Inductive power transfer is a well-studied subject with commercially available applications (e.g., wireless charging of smartphones) [19]. Wireless power transmission is an intensively studied subject. Papers show that wireless transfer of small amounts of power to a medical implant is feasible even over distances of around 20 cm [20]. Two approaches for securing the implant are proposed. These approaches should secure the implant for long periods of time and avoid unwanted travel inside submucosa. The first is to use a biocompatible synthetic scaffold as a coating for the device. The surrounding tissue should grow into the scaffold, securing it in place. The second possible solution is more radical and involves securing the implant in place using an OVESCO clip. The implant could be attached to the OVESCO clip used to close the submucosal pocket after implanting, which would limit possible implant travel in the tissue. Both approaches should also limit any rotation of the implant. The feasibility of both approaches is a subject of further research. The synthetic scaffold could also solve the problem with implant rejection which is likely to happen if the enclosure for the implant is not manufactured from biocompatible material.

## 5. Conclusions

The final experiment confirmed that a device which is endoscopically implantable can be used for the stimulation of muscle tissue in the gastrointestinal tract. Despite being tricky and not very straightforward to implement due to a very lossy propagation of radio waves through tissue, bidirectional communication using the 868 MHz ISM band was successfully established. In the future, further experiments will be performed, primarily with an EGG instrument and an implantable device with tissue stimulation capability. The maximum stimulation voltage is planned to be 12 V. This will be achieved by using a step-up DC-DC converter which will generate the required voltage during stimulation.

For communication, MedRadio (Medical Device Radiocommunications Service) band will be used to evaluate the feasibility of realization of the device which would be fully compliant to legislation in terms of the frequency used, allowed output power, and mitigation. The development of a reliable and ultra-low-power bidirectional communication link is the key to the realization of a system which could be controlled and checked from outside of the body by the user using a standard personal device (smartphone, tablet, computer, etc.).

The research is heading towards a smaller solution which will be powered externally, will be capable of staying in the submucosa for years without the need for maintenance, and will be able to receive external commands with information of how to stimulate the tissue. The goal of this paper was to show a way of implementing and implanting a gastric neurostimulator into the submucosa. Submucosal implants appear to be an interesting form of treatment of a broad spectrum of gastrointestinal diseases such as gastroesophageal reflux, incontinence, and sphincter dysfunctions.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Acknowledgments

This work was supported by the Research Project PROGRES-Q36, awarded by Charles University in Prague.

## References

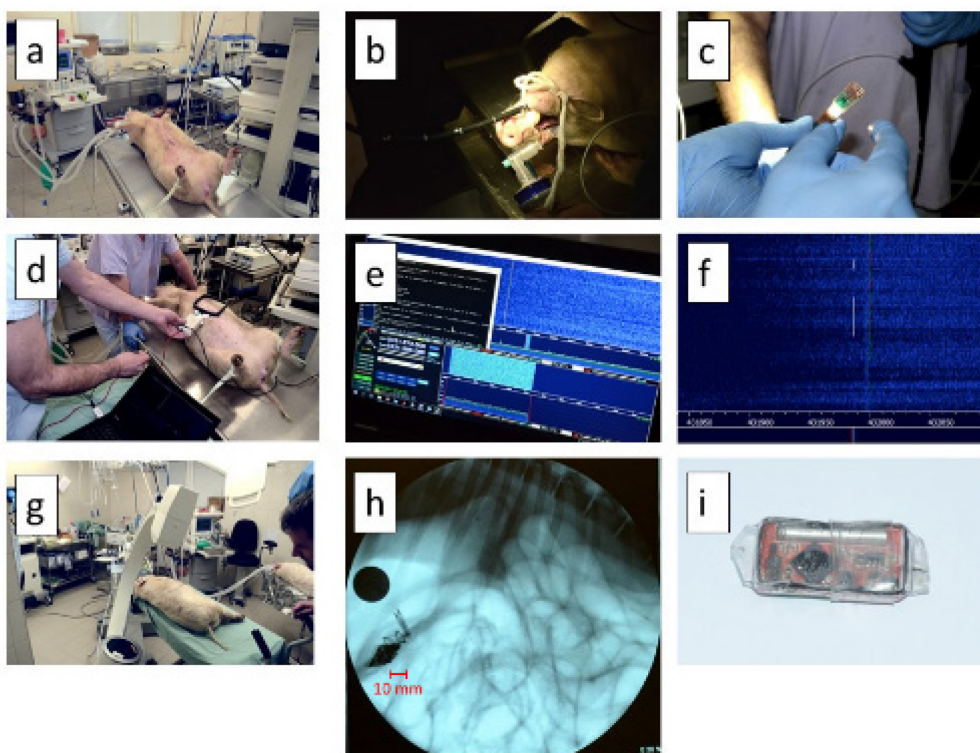
- [1] T. Abell, R. McCallum, M. Hocking et al., "Gastric electrical stimulation for medically refractory gastroparesis," *Gastroenterology*, vol. 125, no. 2, pp. 421–428, 2003.
- [2] G. O'Grady, J. U. Egbuji, P. Du, L. K. Cheng, A. J. Pullan, and J. A. Windsor, "High-frequency gastric electrical stimulation for the treatment of gastroparesis: a meta-analysis," *World Journal of Surgery*, vol. 33, no. 8, pp. 1693–1701, 2009.
- [3] H. Chu, Z. Lin, L. Zhong, R. W. McCallum, and X. Hou, "Treatment of high-frequency gastric electrical stimulation for gastroparesis," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 27, no. 6, pp. 1017–1026, 2012.
- [4] L. Rodríguez, P. Rodríguez, B. Gómez et al., "Electrical stimulation therapy of the lower esophageal sphincter is successful in treating GERD: final results of open-label prospective trial," *Surgical Endoscopy*, vol. 27, no. 4, pp. 1083–1092, 2013.
- [5] Texas Instruments, "CC110L value line transceiver," March 2016, <http://www.ti.com/lit/ds/swrs109b/swrs109b.pdf>. Published 2014.
- [6] Microchip Technology Inc., "PIC16(L)F1704/8 data sheet," May 2016, <http://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/40001715D.pdf>. Published 2015.
- [7] STMicroelectronics, "STLM20 - ultra-low current 2.4 V precision analogue temperature sensor. Data sheet," May 2016, [http://www.st.com/internet/com/TECHNICAL\\_RESOURCES/TECHNICAL\\_LITERATURE/DATASHEET/CD00119601.pdf](http://www.st.com/internet/com/TECHNICAL_RESOURCES/TECHNICAL_LITERATURE/DATASHEET/CD00119601.pdf). Published 2010.



- [8] C. A. Balanis, "Antenna theory: analysis and design, 3rd edition," December 2016, [http://cds.cern.ch/record/1416310/files/047166782X\\_TOC.pdf](http://cds.cern.ch/record/1416310/files/047166782X_TOC.pdf).
- [9] I. Dove and Mathematics & Computer Science, "Analysis of radio propagation inside the human body for in-body localization purposes," 2014, [http://essay.utwente.nl/66071/1/Dove\\_MA\\_TE.pdf](http://essay.utwente.nl/66071/1/Dove_MA_TE.pdf).
- [10] ETSI, "Electromagnetic compatibility and Radio spectrum Matters (ERM); Short Range Devices (SRD); radio equipment to be used in the 25 Mhz to 1000 Mhz frequency range with power levels ranging up to 500 mW; Part 1: Technical characteristics and test methods," May 2016, [http://www.etsi.org/deliver/etsi\\_en/300200\\_300299/30022001/02.04.01\\_40/en\\_30022001v020401o.pdf](http://www.etsi.org/deliver/etsi_en/300200_300299/30022001/02.04.01_40/en_30022001v020401o.pdf). Published 2012.
- [11] Johanson Technology, "0896BM15A0001 868/915 MHz impedance Matched/Balun/LPF integrated component," May 2016, <http://www.johansontechnology.com/datasheets/chip-set-specific/0896BM15A0001.pdf>. Published 2014.
- [12] Abracon, "RFID chip antenna ACAJ-110-T," May 2016, <http://www.abracon.com/ACA/ACAJ-110-T.pdf>. Published 2015.
- [13] J. Liflander, "Ceramic chip antennas vs. PCB trace antennas: a comparison," May 2016, <http://www.pulseelectronics.com/download/3721/g041/pdf>. Published 2010.
- [14] S. Deb, S. J. Tang, T. L. Abell et al., "Development of innovative techniques for the endoscopic implantation and securing of a novel, wireless, miniature gastrostimulator (with videos)," *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 76, no. 1, pp. 179–184, 2012.
- [15] Medtronic Inc., "Enterra® Therapy 3116 - Gastric Electrical Stimulation System," December 2016, [http://manuals.medtronic.com/wcm/groups/mdtcom\\_sg/@emanuals/@era/@neuro/documents/documents/contrib\\_147120.pdf](http://manuals.medtronic.com/wcm/groups/mdtcom_sg/@emanuals/@era/@neuro/documents/documents/contrib_147120.pdf).
- [16] M. A. Khashab and P. J. Pasricha, "Conquering the third space: challenges and opportunities for diagnostic and therapeutic endoscopy," *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 77, no. 1, pp. 146–148, 2013.
- [17] J. G. Webster, *Medical Instrumentation Application and Design*, Houghton Mifflin, Boston, 1978.
- [18] G. Jiang and D. D. Zhou, "Technology advances and challenges in hermetic packaging for implantable medical devices," April 2017, <https://pdfs.semanticscholar.org/ecc7/9b613e4bb71c6a04f442908ebf9695c10e8f.pdf>.
- [19] Nitz engineering GmbH, "Qi enabled phones 2017," April 2017, <http://www.qinside.biz/en/support/qi-enabled-phones-2017>.
- [20] S. Koulouridis, S. Bakogianni, A. Diet, Y. Le Bihan, and L. Pichon, "Investigation of efficient wireless charging for deep implanted medical devices," in *2016 IEEE International Symposium on Antennas and Propagation (APSURSI)*, pp. 1045–1046, Fajardo, June 2016.

#### 4.4 Neurostimulátor s bezdrátovým dobíjením baterie

Na úspěšné otestování implantační metody a funkčnosti elektroniky bylo navázáno prvním experimentem na živém experimentálním praseti (*Sus scrofa*, 40 kg). Jednalo se o tzv. „*survival*“ experiment, po kterém zvíře dva týdny žilo pro pozorování efektu implantovaného zařízení. Cílem práce bylo rovněž otestovat schopnost implantátů bezdrátově dobíjet po implantaci do těla zvířete. Pro implantaci byla zvolena oblast *antrum pyloricum*, kde bylo možno minimalizovat vzdálenost mezi implantátem a vysílačem energie. Neurostimulátor byl implantován do oblasti *muscularis propria*, kde byl zajištěn optimální kontakt se svalovinou žaludku. Na obr. 6 je znázorněn postup implantace včetně rentgenového (RTG) snímku.



Obr. 6: Endoskopická implantace neurostimulátoru a ověření funkčnosti. a) In-vivo model. b) Zavedení endoskopu. c) Prototyp neurostimulátoru ve smyčce. d) Navázání bezdrátové komunikace s neurostimulátorem. e) HSDR software pro příjem dat. f) Detail OOK modulovaných dat vysílaných neurostimulátorem. g) Pozice modelu při pořízení RTG snímku. h) RTG snímek neurostimulátoru. i) Fotografie neurostimulátoru.

Schéma zapojení je na obr. 7. To lze rozdělit do 5 samostatných celků. Napájecí část je tvořena baterií Panasonic CG-320 (válcovitý tvar, o délce 20 mm a průměru 3 mm, kapacita 15 mAh) s odporovým děličem pro měření napětí a vysokofrekvenčním usměrňovačem, ke kterému je připojena přijímací cívka. Maximální napětí na výstupu je

omezeno Zenerovou diodou, aby nedošlo k přebití baterie nad 4,3 V. Následuje napěťový stabilizátor, jehož výstup napájí mikrokontroler a rádiový vysílač.

Druhou částí napájecího systému je spínaný zdroj typu „step-up“ („zvyšovací“) napájený přímo z baterie. Ten slouží pro vytvoření napětí 12 V, které je použito pro generování stimulačních pulzů.

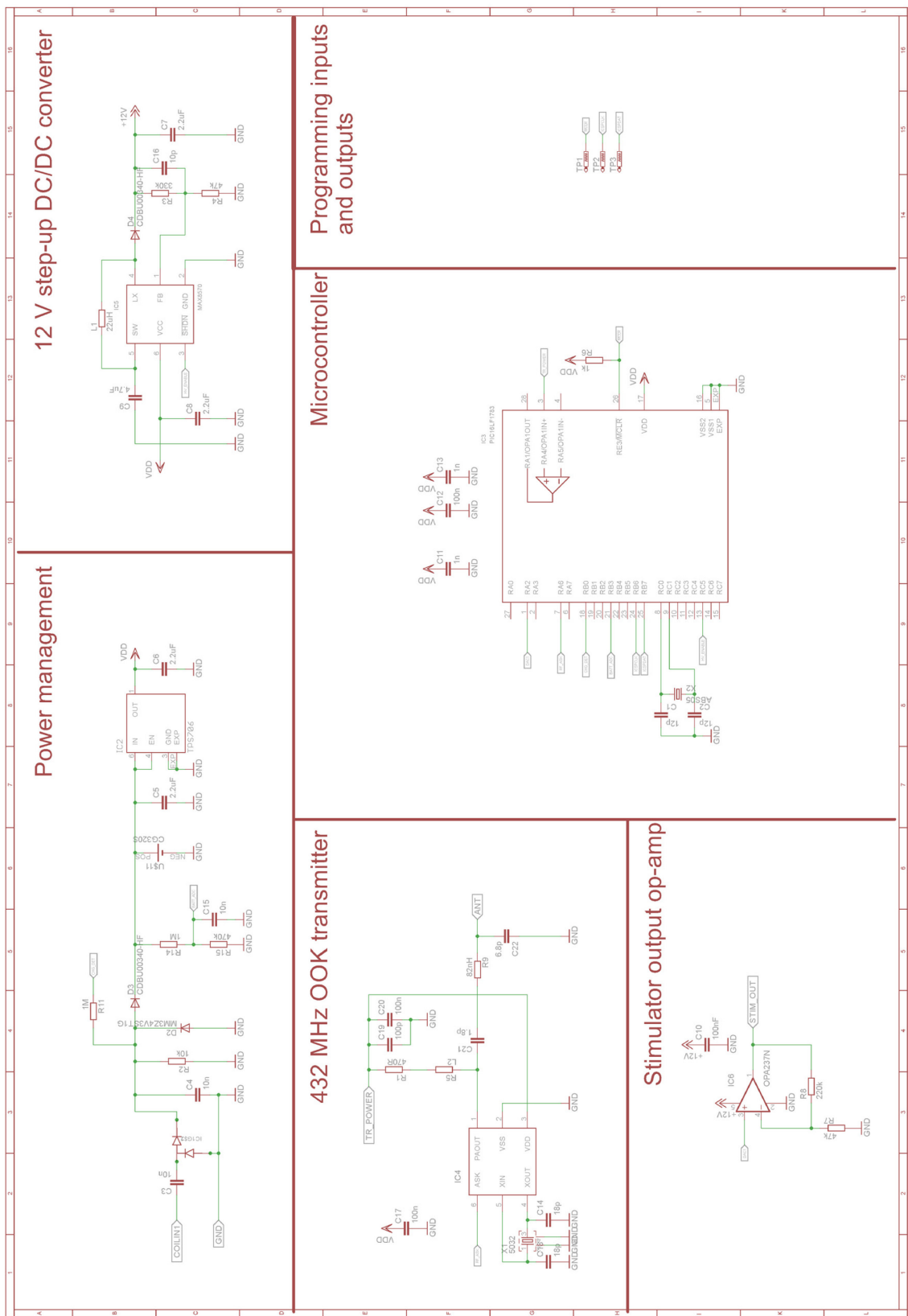
Ovládání rádiového vysílače a generování nízkonapěťových stimulačních pulzů v napěťovém rozsahu do 3 V je zajištěno mikrokontrolerem PIC16LF1789. Nízkonapěťové stimulační pulzy jsou dále napěťově a proudově zesíleny operačním zesilovačem v neinvertujícím zapojení (viz schéma na obr. 7), který poskytuje čtyřnásobné napěťové zesílení a proudové zesílení na max. 20 mA.

Rádiový vysílač je tvořen obvodem Microchip MICRF113. Jedná se vysílač s modulací on-off klíčováním (OOK) pracující v pásmu 433 MHz. Data jsou modulována na nosnou vlnu pomocí změny její amplitudy. Komunikace probíhá ve formě přesně časově definovaných pulzů – dvou synchronizačních pulzů, které značí začátek komunikace, a třetího pulzu, přičemž pauza mezi druhým a třetím pulzem je přímo úměrná napětí baterie neurostimulátoru.

Výsledkem experimentu bylo prokázat implantovatelnost neurostimulátoru do submukozy žaludku včetně schopnosti implantátu v submukoze setrvat po kratší dobu. Vzhledem k nebiokompatibilní metodě enkapsulace došlo zhruba po týdnu k rejekci implantátu, jeho odhojení do žaludku a jeho vyloučení. Tato událost nicméně nevedla ke smrti zvířete, rána se začala zhojovat. Poté bylo zvíře utraceno v souladu s protokolem. Na základě vzorku sestávajícího z jednoho experimentu lze konstatovat, že případná rejekce implantátu nemusí být fatální a vzhledem k tomu, že při implantaci není porušena *tunica serosa*, nehrozí při rejekci perforace orgánu.

### **Článek s IF**

HAJER, J. a NOVÁK, M.. Autonomous and Rechargeable Microneurostimulator Endoscopically Implantable into the Submucosa. Journal of Visualized Experiments [online]. 2018, (139). ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/57268



Obr. 7: Schéma zapojení neurostimulátoru

## Video Article

# Autonomous and Rechargeable Microneurostimulator Endoscopically Implantable into the Submucosa

Jan Hajer<sup>1,2</sup>, Marek Novák<sup>3</sup><sup>1</sup>2nd Department of Internal Medicine, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic<sup>2</sup>2nd Department of Internal Medicine, University Hospital Královské Vinohrady, Prague, Czech Republic<sup>3</sup>Czech Technical University in Prague, Czech Republic

\*These authors contributed equally

Correspondence to: Jan Hajer at [jan.hajer@fnkv.cz](mailto:jan.hajer@fnkv.cz)URL: <https://www.jove.com/video/57268>DOI: [doi:10.3791/57268](https://doi.org/10.3791/57268)Keywords: Neuroscience, Issue 139, Submucosa, microneurostimulator, wirelessly rechargeable, endoscopic submucosal pocket, endoscopy, *in vivo* pig model

Date Published: 9/27/2018

Citation: Hajer, J., Novák, M. Autonomous and Rechargeable Microneurostimulator Endoscopically Implantable into the Submucosa. *J. Vis. Exp.* (139), e57268, doi:10.3791/57268 (2018).

## Abstract

Gastric dysmotility can be a sign of common diseases such as longstanding diabetes mellitus. It is known that the application of high-frequency low-energetic stimulation can help to effectively moderate and alleviate the symptoms of gastric dysmotility. The goal of the research was the development of a miniature, endoscopically implantable device to a submucosal pocket. The implantable device is a fully customized electronic package which was specifically designed for the purpose of experiments in the submucosa. The device is equipped with a lithium-ion battery which can be recharged wirelessly by receiving an incident magnetic field from the charging/transmitting coil. The uplink communication is achieved in a MedRadio band at 432 MHz. The device was endoscopically inserted into the submucosal pocket of a live domestic pig used as an *in vivo* model, specifically in the stomach antrum. The experiment confirmed that the designed device can be implanted into the submucosa and is capable of bidirectional communication. The device can perform bipolar stimulation of muscle tissue.

## Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/57268/>

## Introduction

Gastric dysmotility can be a sign of several relatively common diseases such as gastroparesis, which is usually characterized by a chronic progression and imposes rather severe consequences on the social, work-related, and physical status of the patient. Most cases of gastroparesis are usually diabetic or idiopathic in origin and are often resistant to available medication<sup>1</sup>. Patients afflicted with this condition most commonly present with nausea and repeated vomiting. Based on previous research, it is known that the application of high-frequency low-energetic electrical stimulation can help to effectively moderate and alleviate the symptoms of gastric dysmotility<sup>1,2</sup>.

Based on previous studies, it is proven that high-frequency gastric electrical stimulation can significantly improve the symptoms and gastric emptying<sup>3</sup>. It has also been shown that lower esophageal sphincter neurostimulator therapy is safe and effective for the treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD), reducing the acid exposure and eliminating daily proton-pump inhibitor (PPI) usage without stimulation related adverse effects<sup>4</sup>. Before human trials, first studies were performed in animal models (canine models<sup>5</sup>). Based on these studies, electrical stimulation of the lower esophageal sphincter (LES, 20 Hz, pulse width of 3 ms) caused a prolonged contraction of the LES<sup>5</sup>. Similar effects of high (20 Hz, pulse width of 200  $\mu$ s) and low (6 cycles/min, pulse width of 375 ms) frequency electrical stimulation on LES in GERD patients were investigated. Both high and low frequency stimulation were effective<sup>6</sup>. However, currently, there are only two neurostimulation devices for gastric or esophageal stimulation available on the market<sup>7,8</sup>. In those devices, the electrodes can be implanted surgically, laparoscopically or robotically. The device itself is implanted subcutaneously. This requires general anaesthesia and have a bulky device fitted, using intramuscular catheters which allow for the stimulation of the gastric or esophageal muscle tissue. So, the option of using a wirelessly communicating device implanted into the gastric submucosal layer would represent a definite advantage and improvement in patient comfort. As stated in the previous research<sup>9,10</sup>, it was proven that an implantation of a miniature neurostimulator into submucosa is possible. For the endoscopic submucosal implantation, we use a technique called endoscopic submucosal pocketing (ESP), based on endoscopic submucosal tunnel dissection<sup>10</sup>. The goal of this research is to further improve this concept of an implantable neurostimulator, primarily in the scope of power management (specifically the wireless recharging capability), conformity with respective laws and regulations for wireless communication links in medical implantable devices and possibility of bipolar neurostimulation. Next, the presented microneurostimulator is capable of bidirectional communication and the stimulation parameters can be changed in real-time, even while the device is implanted.

This technique is suitable for teams with a therapeutic endoscopist experienced in endoscopic pocketing or tunnel dissections. Next, a hardware and embedded software designer with experience in building hardware prototypes with microcontrollers and radio frequency circuits using

surface mount technology is needed. For building the hardware prototypes, a lab equipped with a reflow soldering station and basic equipment for electrical measurements (at least a digital multimeter, an oscilloscope, a spectrum analyzer and PICkit3 programmer) is required.

## Protocol

All endoscopic procedures including animal subjects have been approved at the Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Science Czech Republic (Biomedical Center PIGMOD), Libečov, Czech Republic (project Experiments in implantation of battery-less and battery devices into submucosa of the esophagus and stomach — experimental study). All experiments are done in compliance with Czech law 246/1992 Sb. "On the protection of animals against maltreatment, as amended". Transmitter device is not required to be sterilized, because it is an external device that is not in direct contact with the animal.

### 1. Implantable Device Design

1. Prepare the PCB using a third-party PCB manufacturing service. The complete printed circuit board design is provided in the supplementary file "gerber\_implant.7z". The schematic diagram is provided in **Figure 1**.
2. Place the PCBs on a flat surface (**Figure 2a**). Use a solder paste dispenser with 0.6 mm needle and 60 psi pressure to manually dispense the soldering paste onto every metallic pad on the PCB. Begin with the top side of the PCB (**Figure 2b**). The total amount of soldering paste for both sides of the PCB should not exceed 15  $\mu$ L.
3. With a pair of antistatic tweezers, place all components on the top layer of the PCB (**Figure 2e**). Use **Figure 3** for component position and supplementary file "bom\_implantabledevice.csv" for the assignment of components to their numbers.
4. Use a PCB hot air gun station at 260 °C to solder all components (**Figure 4a**). Wait until all the solder paste melts, then put away the hot air gun and allow the board cool to room temperature.
5. Turn the PCB over and dispense solder paste on the other side. Use the same needle and pressure as stated in 1.2 (**Figure 2d**).
6. As in step 1.3., place all components of the bottom layer of the PCB. Refer to **Figure 3** for component position and the supplementary file "bom\_implantabledevice.csv" for the assignment of components to their numbers.
7. Repeat the heating of the PCB with a hot air gun to solder all components on the bottom side. Use the same process as in step 1.4.
8. Check the PCB for any short circuits visually. If any short circuit is found, remove it with a soldering iron.
9. Manufacture the wireless charging/communication coil. Use 17 turns of AWG42 wire. The size of the coil is 26 x 13.5 mm<sup>2</sup> (**Figure 4d**). Twist the two output wires.
10. Design and manufacture the electrode. The electrode design is provided in the supplementary file "gerber\_electrodes.7z". Use the same manufacturing process as in step 1.1. This PCB is fully completed after manufacturing, and no components are required to be soldered onto it. Solder two AWG42 wires to the small rectangular contacts (**Figure 4f**).
11. Prepare the antenna by using 7 cm of enameled wire and scraping off 3 mm of the enamel from one end (**Figure 4e**).
12. **Connect the PICkit 3 programmer to the PCB (Figure 4b-c)**
  1. Connect pads 6 and 7, according to **Figure 5**, to pins 2 and 3 of the PICkit programmer, respectively.
  2. Connect pads TP1, TP2 and TP3 (refer to **Figure 3**) to pins 1, 5 and 4 of the PICkit programmer, respectively
13. Plug in the PICkit 3 programmer into the USB port of a computer with MPLAB IPE software installed.
14. **Run the MPLAB IPE software and program the firmware into the microcontroller.**
  1. Run the MPLAB IPE v3.61. Select "Settings | Advanced Mode"
  2. Into the Password field, enter the default password which is 'microchip'. Click "Log on". A tab with different panels on the left will appear.
  3. On the top left, click "Operate", then in top middle part of the screen, click "Device field" and type in "PIC16LF1783". Click "Apply".
  4. Select panel "Power" on the left (**Figure 6**).
  5. Change the VDD voltage value to 2.55. This step is critical.  
Caution: Setting this value above 2.8 V will damage the board (**Figure 7**).
  6. Click the checkbox "Power Target Circuit" from "Tool" (**Figure 7**).
  7. Click the "Operate" tab on the left (**Figure 6**).
  8. Click "Connect".
  9. Download the supplementary file "IMPLANTABLE\_V2.X.production.hex" and note its location on the hard drive. In the IPE software, find the Source line and click the "Browse" button near it (**Figure 8**).
  10. Click Program. Wait till the software says that the software has been successfully downloaded to the microcontroller (**Figure 9**).
15. Desolder the wires soldered to pads TP1, TP2 and TP3 (**Figure 3**) as well as wires soldered to pads 6 and 7 (**Figure 5**).
16. Connect the PCB to all other electrical components except for the battery (**Figure 10a**).
  1. Solder the wireless charging/communication coil to pads 2 and 3 according to **Figure 8**. The polarity is not important.
  2. Connect the antenna to pad 1 according to **Figure 5**. Connect the PCB electrodes to pads number 4 and 5 according to **Figure 5**. The polarity is not important.
17. Solder the CG-320 battery to pads 6 and 7 (**Figure 5**). The negative terminal of the battery must be soldered onto pad 7. Be careful while performing the next steps. The device is now powered and is sensitive to short circuits and contact with metallic objects.
18. To test the functionality of the wireless charging circuitry, all steps in part 2 need to be completed. After that, place the wireless charger/transmitter in close proximity of the device. Use a multimeter to measure the voltage of the battery. If the battery voltage is slowly rising (several mV per min), the charging function is working.
19. Wind the antenna around the device in a spiral (**Figure 10b**)
20. Cut a 32 mm long piece of a heat-shrinkable tubing with an internal diameter of 9.5 mm.
21. Place the coil on the PCB. Refer to **Figure 7b** for the correct placement.
22. Put the heat-shrinkable tubing over the device, coil and antenna. Only the electrodes should protrude from the tubing. Refer to **Figure 7c** for correct placement.

23. Heat the tubing with a hot air gun to 150 °C to shrink and then allow it to cool (**Figure 10d**).
24. Apply epoxy glue to the left end to seal one side of the tubing (**Figure 10e**).
25. Glue the electrode to the back side of the PCB with tubing. Also glue the other end of the tubing. Refer to **Figure 10f** for correct placement.
26. Wait for at least 24 h for the glue to harden and fully cure.
27. After the completion of the wireless charger/transmitter device, test the implantable device for water leaks by placing it into a 30 cm high column of saturated saline solution for 1 h. Any major leak can be spotted as a sudden drop of the battery voltage or the malfunction of the device caused by the saline solution shorting the electronics. After the test, the device is fully prepared to be implanted.
28. Test the stimulation function of the implant using an oscilloscope. Connect two measurement electrodes of the oscilloscope to the tin metal plated contact pads of the electrode on the implantable device. Observe the stimulation pattern on the oscilloscope screen. The correct stimulation pattern is given in **Figure 11**.

## 2. Wireless Charger/Transmitter Design

1. The PCB design is provided in the supplementary file "gerber\_transmitter.7z". Use the same manufacturing process as for the implantable device. The schematic diagram is provided in **Figure 12**.
2. Place the PCBs on a flat surface. Use a solder paste dispenser with 0.6 mm needle and 60 psi pressure to manually dispense the soldering paste onto every metallic pad on the PCB. The total amount of solder paste dispensed on the PCB should not exceed 50  $\mu$ L.
3. With a pair of antistatic tweezers, place all components on the top layer of the PCB. Consult **Figure 13** for the component position and the supplementary file "bom\_transmitterdevice.csv" for the assignment of components to their numbers.
4. Use a PCB hot air gun station preset to 260 °C to solder all components. Wait until all the solder paste melts, put away the hot air gun and allow the board to cool to room temperature.
5. Repeat the steps 2.3–2.4 for the bottom side of the device. Follow a similar procedure as during the manufacturing of the implantable device.
6. Create a coil with 3 turns of AWG18 enameled wire (**Figure 14c**) and connect it to pads COIL1 and COIL2 (**Figure 13**).
7. Make an aluminum heatsink for the power transistors (**Figure 13**, Q1 and Q2). The exact shape of the heatsink is not critical. One of the possible embodiments is shown in **Figure 9d**. In this case, the heatsink also forms an enclosure for the device.
8. Connect the PICkit 3 programmer to the assembled PCB. Connect pads TP1 to TP5 (**Figure 13**) with pins 1 to 5 of the PICkit programmer, respectively.
9. Plug in the PICkit 3 programmer into the USB port of a computer with MPLAB IPE software installed.
10. **Run the MPLAB IPE software and program the firmware into the microcontroller. The process is the same as for the implantable device, except for the VDD voltage and file uploaded.**
  1. Run the MPLAB IPE v3.61. Select "Settings | Advanced Mode".
  2. Into password box, enter the default password which is 'microchip'. Click "Log on". A tab with different panels on the left will appear.
  3. On the top left, click "Operate", then in the top middle part of the screen, click the "Device" and type in "PIC16LF1783". Click "Apply".
  4. Select panel "Power" on the left
  5. Change the VDD voltage value to 3.3.
  6. Click the checkbox "Power Target Circuit" from "Tool".
  7. Click the "Operate" tab on the left.
  8. Click "Connect".
  9. Download the supplementary file "IMPLANTABLE\_V2\_TRANSMITTER.X.production.hex" and note its location on the hard drive. In the IPE software, find the Source line and click the "Browse" button near to it.
  10. Click "Program". Wait till the software says that the software was downloaded to the microcontroller successfully.
11. Desolder the wires soldered to pads TP1 to TP5
12. Connect a 12 V power supply to the V- and V+ pads (**Figure 5**). The negative terminal has to be connected to the V- pad.
13. Plug in a mini-USB to USB-A cable to the X1 connector (**Figure 5**) and connect to a computer with PuTTY software pre-installed.
14. **Open the PuTTY software and set it up (Figure 15).**
  1. Open the PuTTY software. Select "Serial" as connection type.
  2. Enter COMx as a Serial line, where x is the number of the COM port of the device. If no other COM port device was installed, this number will be 1.
  3. Enter "38400" as Speed. Click "Open". The charger/transmitter device is now ready to be used. Press H key for help.

## 3. Endoscopic Implantation

1. **Use a live mini pig as an *in vivo* model, adult (8-36 months), 20-30 kg weight.**
  1. Let the pig fast for 24 h prior to the procedure.
  2. Allow clear liquids *ad libitum*.
  3. Administer intramuscular tiletamine (2 mg/kg), zolazepam (2 mg/kg) and ketamine (11 mg/kg) as a premedication.
  4. Apply intravenous thiopental *ad effectum* (5% solution) and inhalation anesthesia with isoflurane, N<sub>2</sub>O and propofol injection. Proper anesthesia is confirmed by reflexes and muscle tone, eye position, palpebral reflex and pupillary reflex. Circulation, oxygenation, ventilation and body temperature are continuously monitored.
2. In order to perform the implantation and visualization, use an animal model dedicated endoscope. Insert it using the standard way into the *in vivo* model.
3. Grasp the device externally with a snare. After that, insert it into the stomach, then release it.
4. Extract the endoscope, equip it with a dissection cap (15.5 mm), and then re-insert it to the stomach.
5. In order to implant the device to submucosa, apply saline solution mixed with methylene blue into the submucosal layer using an injection therapy needle catheter (25 G).
6. Make a horizontal incision to create an opening in the submucosa using an electrosurgical knife with a knob-shaped tip.

7. Using the affixed cap, insert the cap into the newly created space, and with the use of an electro-surgical knife, continue disrupting, dilating, and dissecting the submucosal layer, creating a sufficiently large-enough pocket to insert the stimulation device.
8. Grasp the device which is lying freely inside the stomach with insertion and extraction loops and, using grasping forceps, navigate it into the submucosal pocket. Place the stimulation electrodes in contact with the muscularis propria using grasp forceps.
9. Use an over the scope clip to secure the device in place inside the submucosal pocket and prevent any migration or dislodging.

#### 4. Experiment — After Implantation

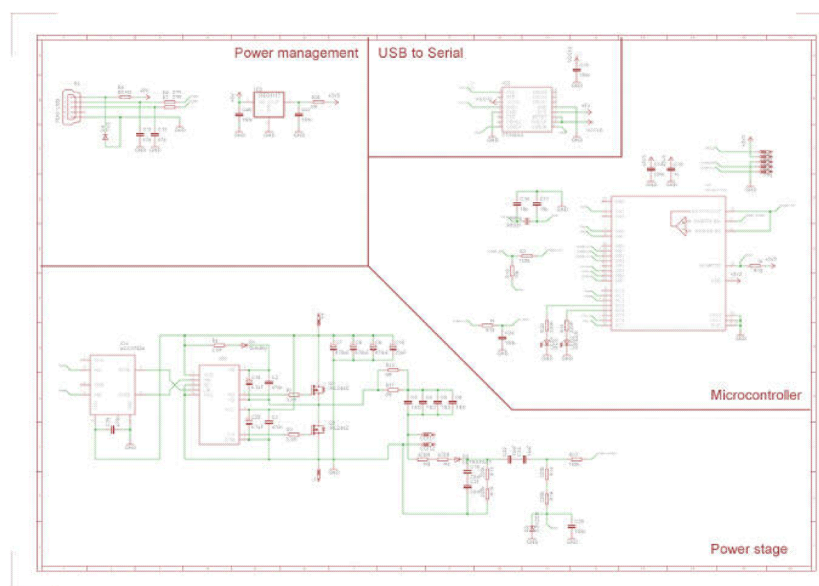
1. After successful implantation, place the charger/transmitter coil in proximity of the implanted device.
2. Plug in the RTL2832 dongle in the PC.
3. **Run the HSDR software and set the center frequency to 432 MHz.**
  1. Open the HSDR software (**Figure 15**) for correct settings and PuTTY software (**Figure 16**). In the HSDR software, click "Options | Select Input | ExtIO".
  2. Select Bandwidth — "960000". Select the LO frequency to 431.95 MHz. Select the Tune frequency to 432.00 MHz.
4. Transmit a Manchester coded sequence from the charger/transmitter by pressing the R key in the PuTTY terminal and receive the OOK modulated reply from the implant by observation of the main HSDR window ( **Figure 17e-f**).

#### 5. Euthanasia after the Experiment

1. Use an anesthetic overdose for euthanasia (lethal dose of thiopental and KCl).

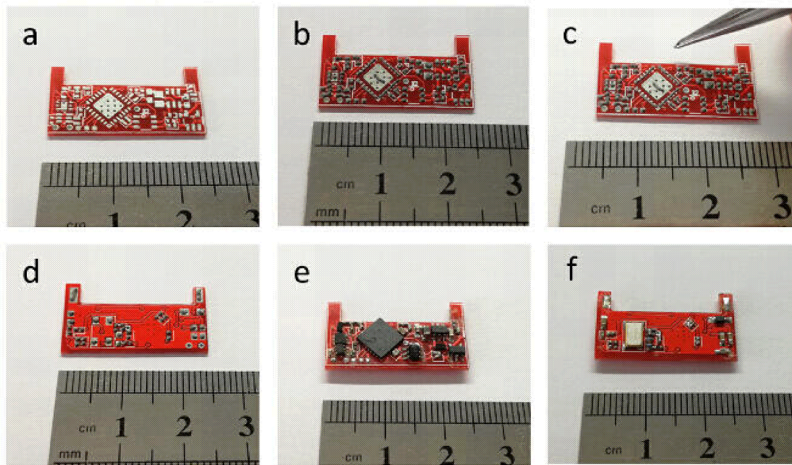
### Representative Results

**Figure 17** shows that an endoscopic placement of the gastric neurostimulator into a pocket in submucosa as well as proper placement of the electrodes to the muscular layer was successful. The dimensions of the device (**Figure 10**) are 35 x 15 x 5 mm<sup>3</sup> while the weight is 2.15 g. **Figure 17** shows the circuit diagram of the device showing that the device comprises of 6 different modules which are connected together. **Figure 3** shows the PCB layout and component placement in the device. **Figure 18** shows that in order to implant the device into the submucosal layer, a technique called an endoscopic submucosal pocket<sup>9,10</sup> (ESP) was used. The stimulator was attached near the muscular layer (muscularis propria) where it is theoretically the optimal stimulation depth. Creating the submucosal pocket and implanting of the gastric neurostimulator endoscopically took 20–30 min. During this procedure, there is no intraprocedural complication such as perforation or severe bleeding. Migration of the device in the stomach could not be determined because the experiment was non-survival. After the implantation, bidirectional communication link with the implantable device was established with an external device shown in **Figure 14**. The approximate distance between the charger/programmer coil and the implant was 10 cm. The achieved signal-to-noise (SNR) ratio with RTL2832 based software-defined-radio (SDR) receiver was over 40 dB.

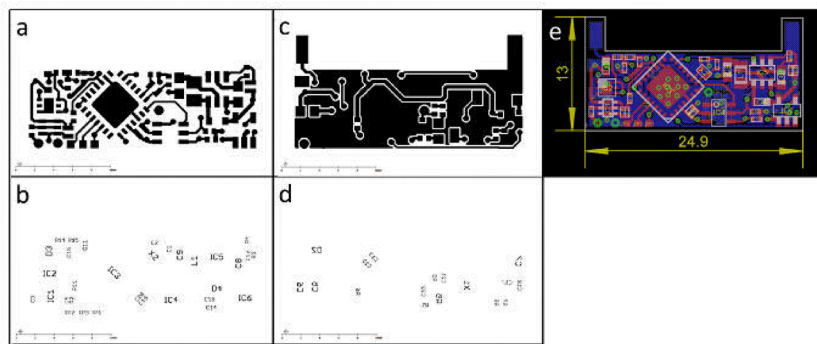


**Figure 1: Schematic diagram of the implantable device.** The Figure shows how different components and circuit parts are connected in the implantable device. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

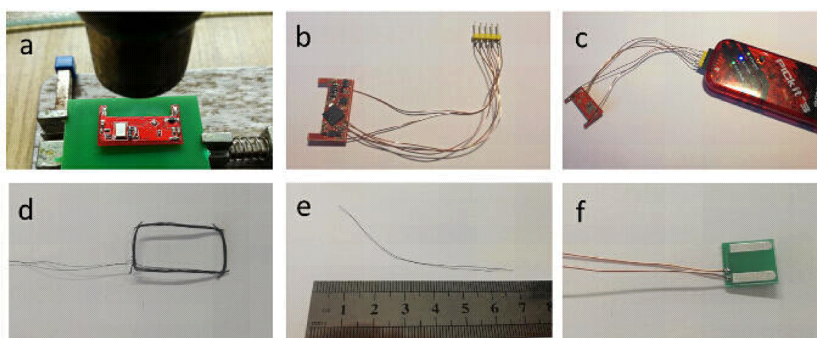




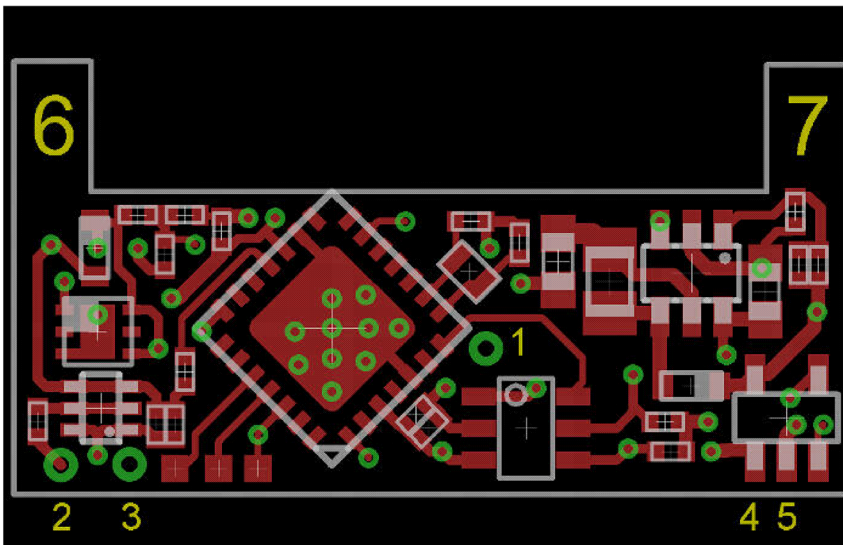
**Figure 2: Fabrication of the implantable device - PCB assembly.** (a) PCB, top view. (b) Solder paste applied to top layer. (c) An example of hand placement of 0402 capacitor. (d) Solder paste applied to bottom layer. (e) Fully populated top side of the PCB. (f) Fully populated bottom side of the PCB [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



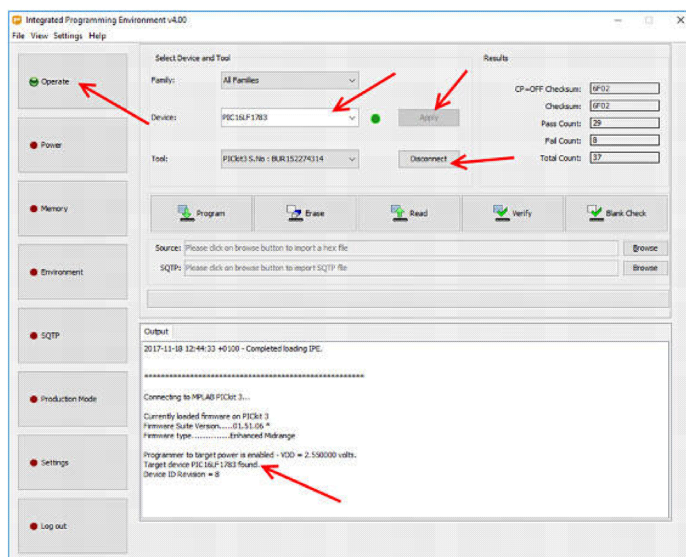
**Figure 3: Design of the implantable device.** (a) Top copper layer of the PCB. (b) Component names on the top layer. (c) Bottom copper layer of the PCB. (d) Component names on the bottom layer. (e) Composite picture of all PCB layers [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



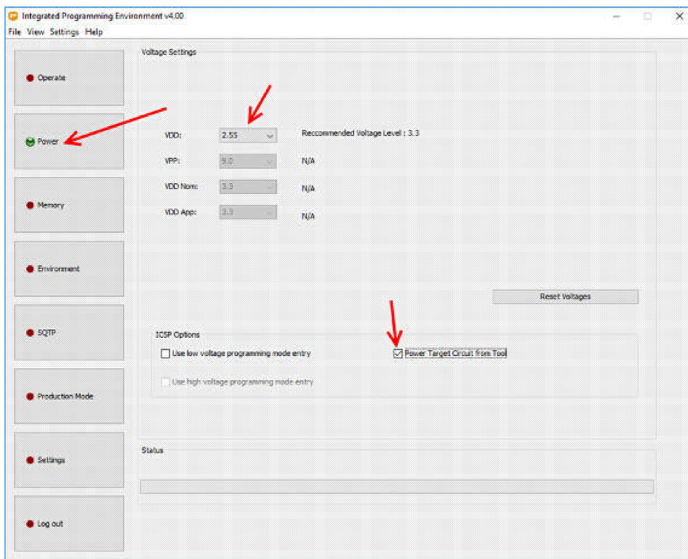
**Figure 4: Fabrication of the implantable device — preparation of other parts.** (a) Hot air flow of the bottom side of the PCB. (b) Programming wires soldered to the PCB. (c) PCB connected to the programmer. (d) Wireless charging coil. (e) 432 MHz antenna. (f) Stimulation electrodes with two wires attached [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



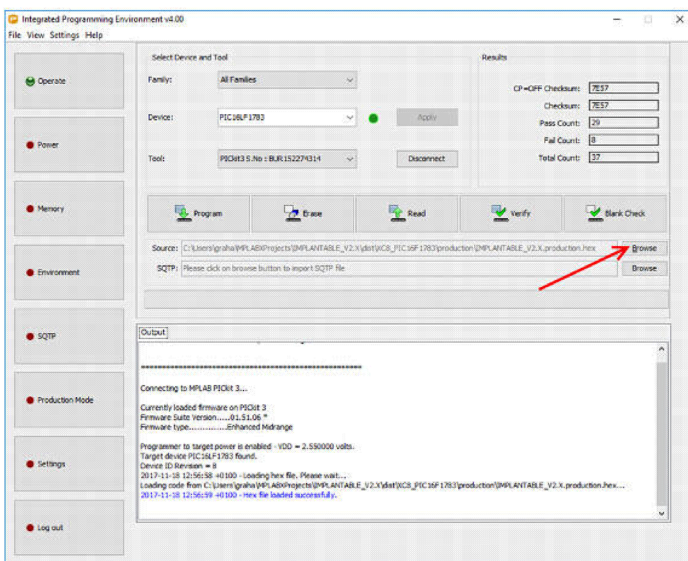
**Figure 5: Recommended solder joint placement for the external components of the implantable device.** The picture shows where the coil, antenna, battery and electrodes should be soldered. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



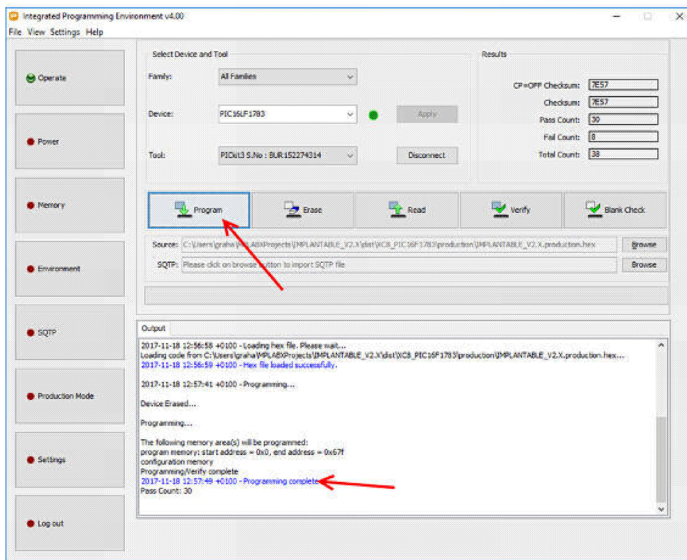
**Figure 6: Establishing a connection with the implantable device — important settings mentioned in the text are marked with red arrows.** This picture is from the MPLAB IPE software, a screen which shows how to determine that the microcontroller inside the implantable device is correctly communicating with the PICKIT programmer is provided. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



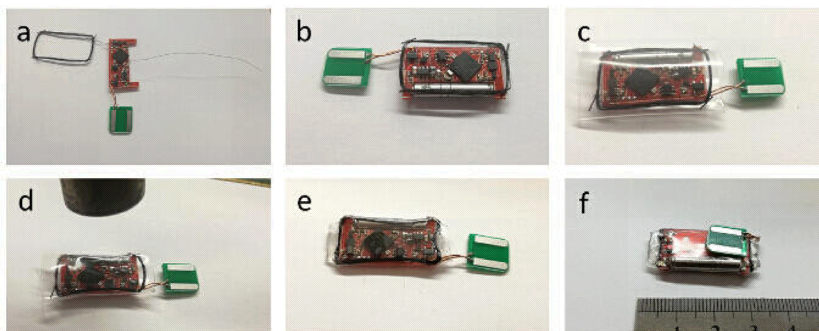
**Figure 7: Power settings of the software used for programming — important settings mentioned in the text are marked with red arrows.** This is picture from the MPLAB IPE software. It shows how to properly power the implantable device for programming [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



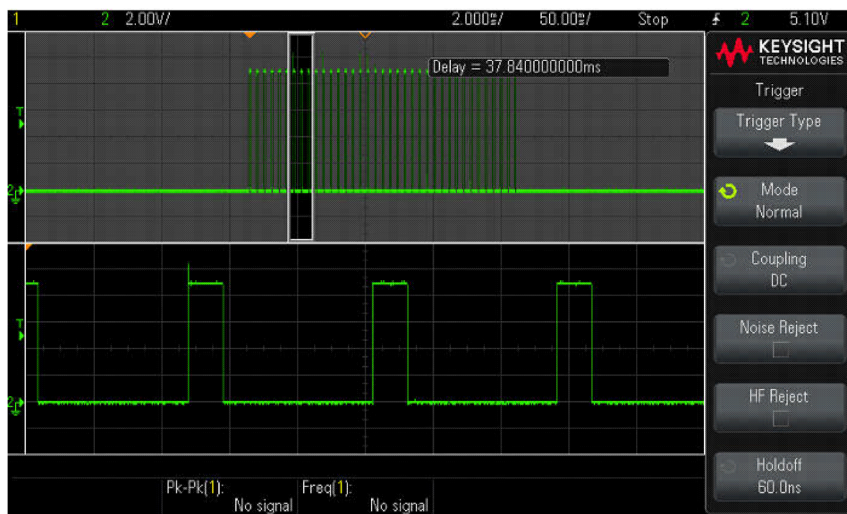
**Figure 8: Choosing a correct programming file for the implantable device.** The picture shows which button to click in order to load the supplementary .hex file correctly. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



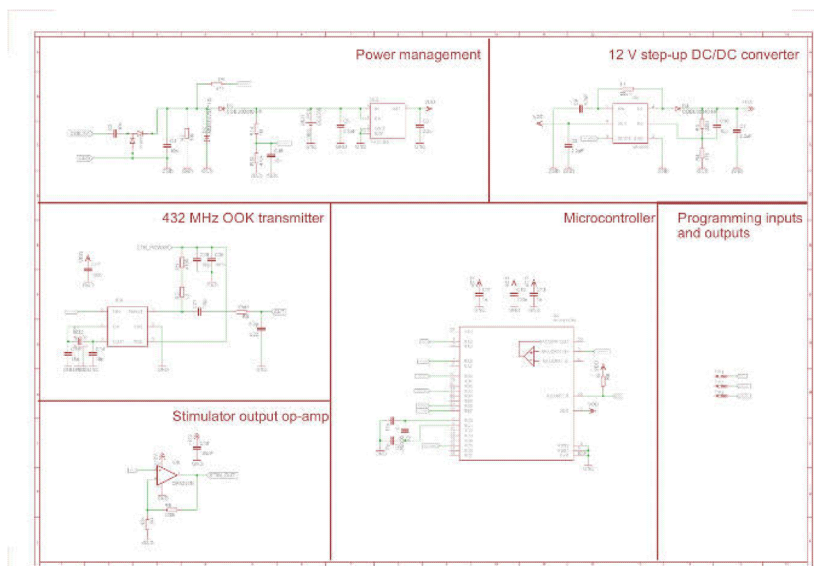
**Figure 9: Process of programming the firmware into the implantable device.** The picture shows which button to press to program the software into the implantable device. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



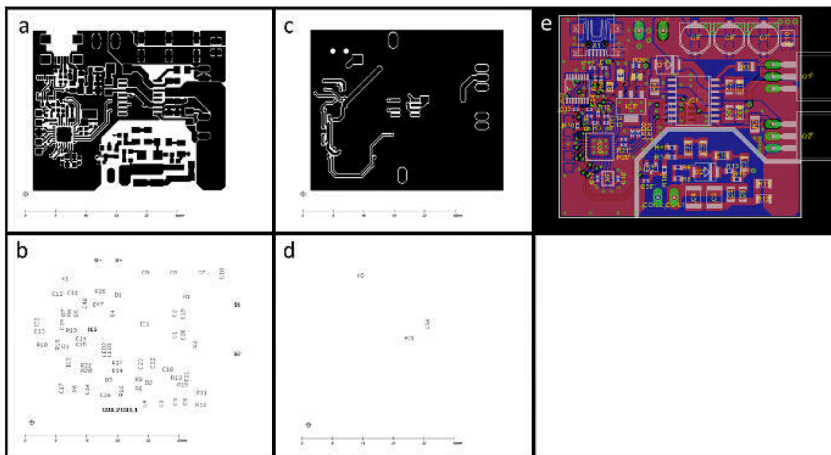
**Figure 10: Fabrication of the implantable device — final assembly.** (a) Wireless charging coil, stimulation electrodes and antenna soldered to the PCB, together with battery. (b) Stacked implant. (c) Transparent heat shrinkable tubing put over the PCB. (d) Shrinking of the tubing with hot air. (e) Tubing fully shrunk and ends glued. (f) Finalized implantable device [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



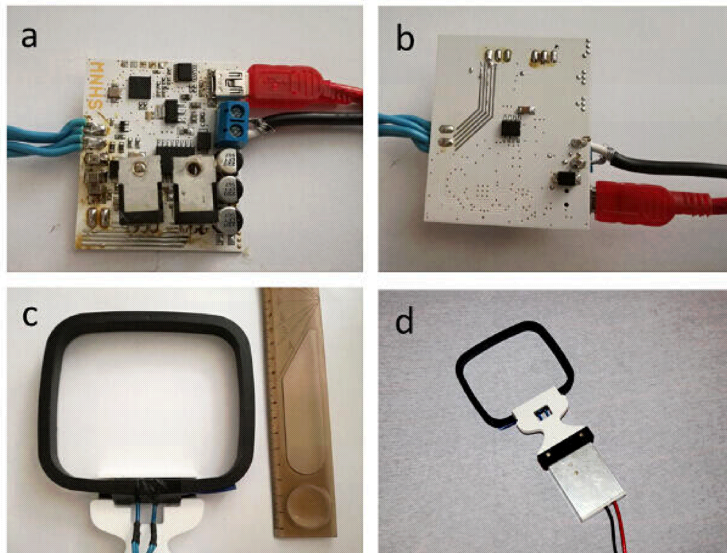
**Figure 11: Typical output stimulation pattern of the device as displayed on the DSOX1102G oscilloscope.** After programming of the implantable device, soldering of the electrodes and the battery, output stimulation pattern similar to the one displayed in the figure should appear at the electrodes. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



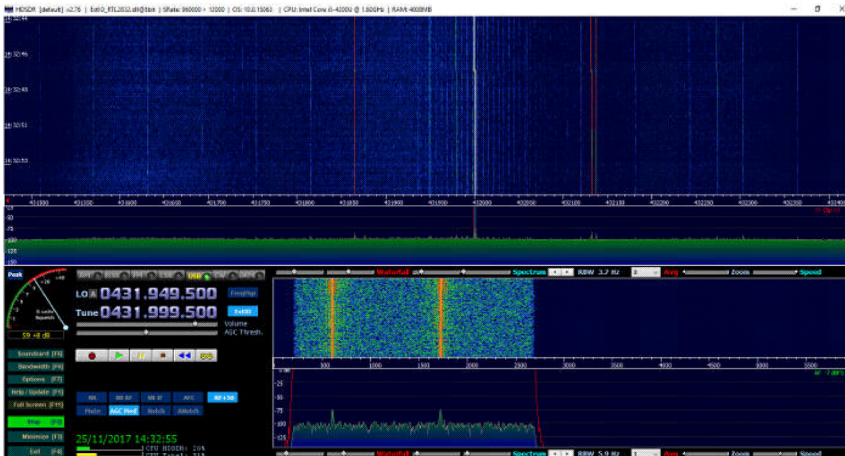
**Figure 12: Schematic diagram of the wireless charger/transmitter device.** The figure is analogical to Figure 1. Shown here is the internal workings of the wireless charger/transmitter device [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



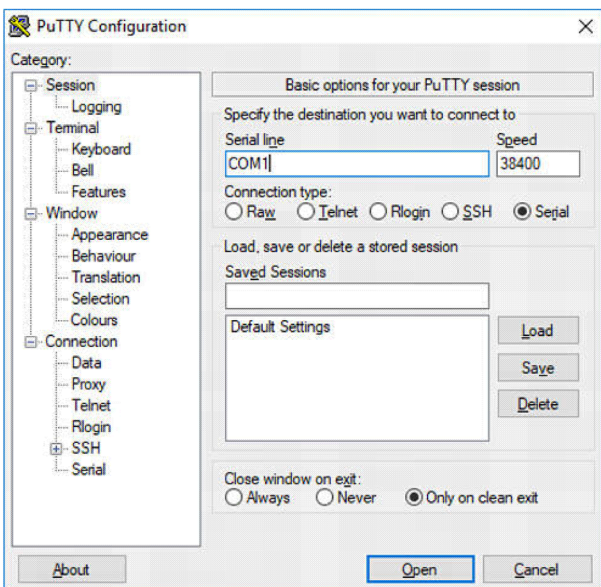
**Figure 13: Design of the charger/transmitter device.** (a) Top copper layer of the PCB. (b) Component names on the top layer. (c) Bottom copper layer of the PCB. (d) Component names on the bottom layer. (e) Composite picture of all PCB layers [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



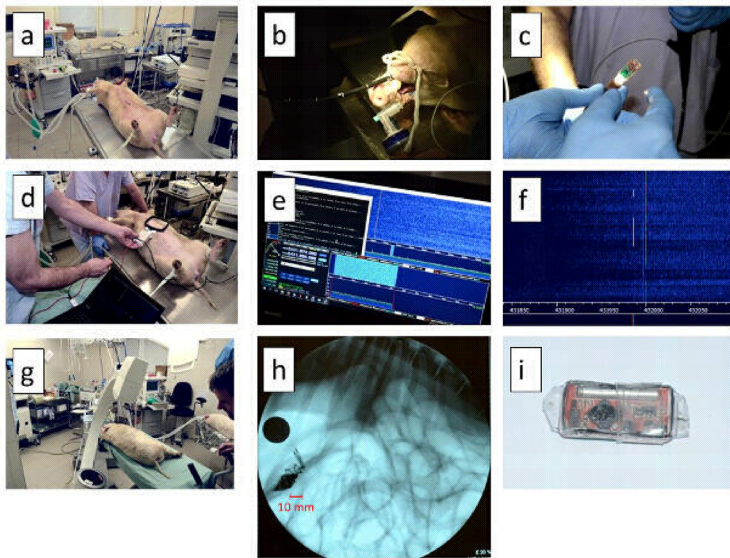
**Figure 14: Fabrication of the wireless charger/transmitter device.** (a) Completed PCB, top side (b) Completed bottom side of the PCB (c) Mechanical design of the wireless transmitter/charger coil (d) One possible embodiment of the finalized charger/transmitter device [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



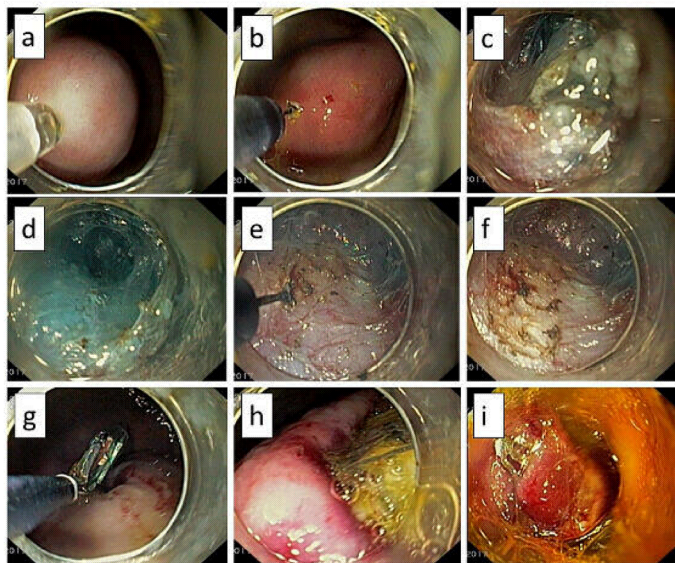
**Figure 15: Correct settings of the HSDR software.** The HSDR software is used together with the RTL2832U based USB receiving dongle as a spectrum analyzer to display the radio spectrum. In this case, it is used to receive the answer from the implant transmitted at approximately 432 MHz. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 16: Correct settings of the PuTTY software.** The PuTTY software is used for communication with the charger/transmitter device. It must be correctly configured in order to display correct data to the user. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 17: Endoscopic implantation of the implantable device and checking if it is working.** (a) *In vivo* model in animal endoscopic unit. (b) Insertion of the endoscope by the standard way into the *in vivo* model. (c) Implantable device prototype grasped with a snare. (d) Process of establishing bidirectional wireless link with the implantable device. (e) HSDSR software. (f) Detail of OOK modulated data transmitted by the implant. (g) X-ray — device position check. (h) X-ray scan of the implant area, the device as well as over the scope clip is clearly visible. (i) Detailed device view. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 18: View of device implantation and endoscopic technique.** (a) Submucosal injection with methylene blue. (b) Submucosal incision (an entrance for the submucosal pocket formation). (c) Tunnelisation of the submucosal pocket. (d-f) Disrupting, dilating, and dissecting the submucosal layer. (g, h) Device implantation. (i) Closing the entry with over the scope clip. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

**Supplementary File 1: gerber\_implant.7z.** Zip archive with files required to manufacture the printed circuit board of the implantable device. [Please click here to download this file](#)

**Supplementary File 2: gerber\_transmitter.7z.** Zip archive with files required to manufacture the printed circuit board of the charger/transmitter device. [Please click here to download this file](#)

**Supplementary File 3: gerber\_electrodes.7z.** Zip archive with files required to manufacture the electrodes. [Please click here to download this file](#)

**Supplementary File 4: IMPLANTABLE\_V2.X.production.hex.** Firmware for the implantable device. [Please click here to download this file](#)



**Supplementary File 5: IMPLANTABLE\_V2\_TRANSMITTER.X.production.hex.** Firmware for the charger/transmitter device. [Please click here to download this file](#)

**Supplementary File 6: bom\_implantabledevice.csv.** Bill of material (BOM) file describing the assignment of component values to specific components on the PCB of the implantable device. [Please click here to download this file](#)

**Supplementary File 7: bom\_transmitterdevice.csv.** BOM file describing the assignment of component values to specific components on the PCB of the charger/transmitter device. [Please click here to download this file](#)

## Discussion

The design of the implantable device should primarily focus on the overall size of the device, achievable stimulation profiles (maximum voltage, maximum deliverable current, length of pulses and pulse frequency). Main limitation from the hardware perspective is the size and availability of suitable components. To minimize the overall size, surface mount components are preferred because of their compact packaging. The best solution would be to integrate bare chip dies on the substrate. However, this is limited by both the availability of bare die packaging option for components and the accessibility of the wire bonding technology. Second important parameter is the battery. Lithium batteries are preferred because of its high energy density. Also, the nominal voltage of 3.7 V is beneficial. The major benefit of the presented hardware topology is its small size and minimum invasiveness. Compared to the current solutions<sup>7,8</sup>, the presented solution is a magnitude smaller and can be implanted directly to the submucosa, without need for external leads and subcutaneous implantation of the neurostimulator.

Except for the hardware itself, in future, additional attention needs to be given to the device enclosure. The first point is the biocompatibility and hermeticity<sup>11</sup> to avoid possible rejection of the implant. The other is the fixation of the device in the submucosa to avoid unwanted migration of the implant.

The most critical steps during endoscopic implantation is the capturing of the device and its placement into the submucosal pocket. The limitation is the size of the pocket, which must be, from the observations, approximately at least twice as large as the device to be implanted. Next issue is the correct orientation of the implant inside the pocket. With the respect to the technical difficulty of the endoscopic procedure, this method is dedicated to experts with experience with tunnel dissection or peroral endoscopic myotomy (POEM).

The next problematic part is the closure of the pocket which is relatively difficult using the over the scope clip. However, the use of this type of clip prevents the migration and rejection of the device. Limitations of this technique from hardware point of view include the hardware development equipment to solder with required accuracy. The device is designed to withstand during the surgery and a short time afterwards. Thus, with current enclosure, it is not designed to stay for prolonged periods of time inside the body. Also, the material of the enclosure is not biocompatible which represents a high risk of rejection of the implant in case of a survival experiment. This technique can be further developed, especially in terms of the development of biocompatible and hermetic enclosure which is essential for survival model experiments. Next, the functionality of multiple integrated circuits can be concentrated into a single application specific integrated circuit. Similarly, smaller surface mount components can be used to make the device more compact. The next possible direction of this research may lead to development of novel endoscopic methods for the treatment of other gastrointestinal diseases such as GERD, incontinence or sphincter dysfunctions<sup>12</sup>.

## Disclosures

This work was supported by the Research Project PROGRES-Q28, and awarded by Charles University in Prague. The authors thank to Ass. Prof. Jan Martínek, Ph.D. and PIGMOD centre.

## Acknowledgements

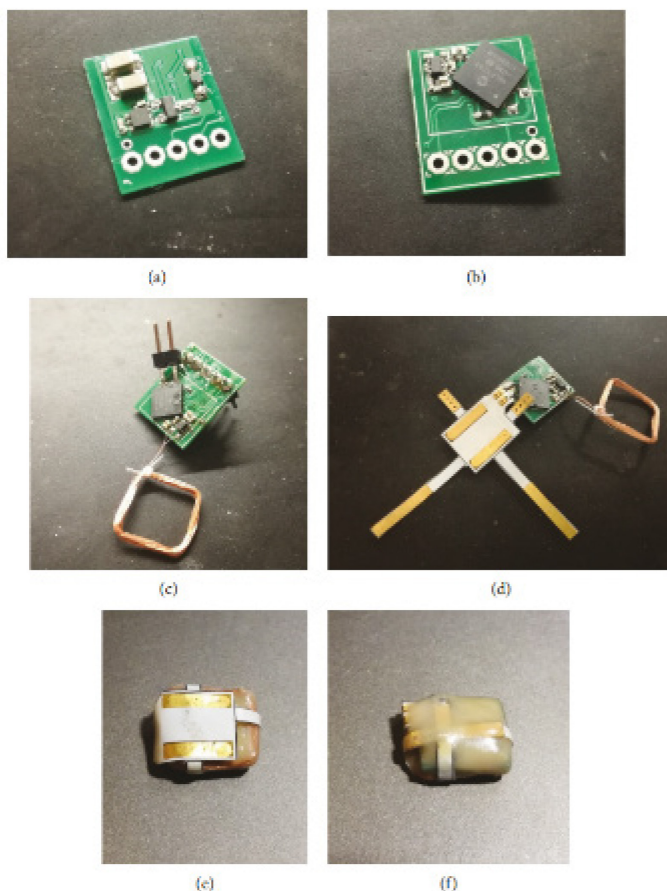
The authors declare that they have no competing financial interests.

## References

1. Abell, T., et al. Gastric electrical stimulation for medically refractory gastroparesis, *Gastroenterology*. **125** (2), 421-428 (2003).
2. O'Grady, G., Egbuji, J., U., Du, P., Cheng, L., K., Pullan, A., J., Windsor J., A. High-frequency gastric electrical stimulation for the treatment of gastroparesis: a meta-analysis. *World J Surg*. **33** (8), 1693-1701 (2009).
3. Chu, H., Lin, Y., Zhong, L., McCallum, R.W., Hou, X. Treatment of high-frequency gastric electrical stimulation for gastroparesis. *J Gastroenterol Hepatol*. **27** (6), 1017-1026 (2012).
4. Rodríguez, L., et al. Electrical stimulation therapy of the lower esophageal sphincter is successful in treating GERD: final results of open-label prospective trial. *Surg Endosc*. **27** (4), 1083-1092 (2013).
5. Ellis, F., Berne, T.V., Settevig, K. The prevention of experimentally induced reflux by electrical stimulation of the distal esophagus. *Am J Surg*. **115**, 482-487,(1968).
6. Rinsma, N.F., Bouvy, N.D., Masclee, A.A.M., & Conchillo, J.M. Electrical Stimulation Therapy for Gastroesophageal Reflux Disease. *J Neurogastroenterol*. **20**(3), 287-293 (2014).
7. Medtronic Inc. *Enterra Therapy 3116 - Gastric Electrical Stimulation System*. <http://www.medtronic.com/content/dam/medtronic-com-m/mdt/neuro/documents/ges-ent3116-ptmanl.pdf>. December (2016).
8. Rodríguez, L. et al. Two-year results of intermittent electrical stimulation of the lower esophageal sphincter treatment of gastroesophageal reflux disease. *Surgery*. **157** (3), 556-567 (2015).
9. Hajer, J., Novák, M. Development of an Autonomous Endoscopically Implantable Submucosal Microdevice Capable of Neurostimulation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroent Res Pract*. **2017** 8098067 (2017).

10. Deb, S., *et al.* Development of innovative techniques for the endoscopic implantation and securing of a novel, wireless, miniature gastrostimulator (with videos). *Gastrointest. Endosc.* **76** (1), 179-184 (2012).
11. Jiang, G., and Zhou, D.D. *Technology advances and challenges in hermetic packaging for implantable medical devices.* (2017).
12. Vonthein, R., Heimerl, T., Schwandner, T., Ziegler, A. Electrical stimulation and biofeedback for the treatment of fecal incontinence: a systematic review. *Int J Colorectal Dis.* **28**(11), 1567-1577. (2013).

## 4.5 Bezbatériový neurostimulátor

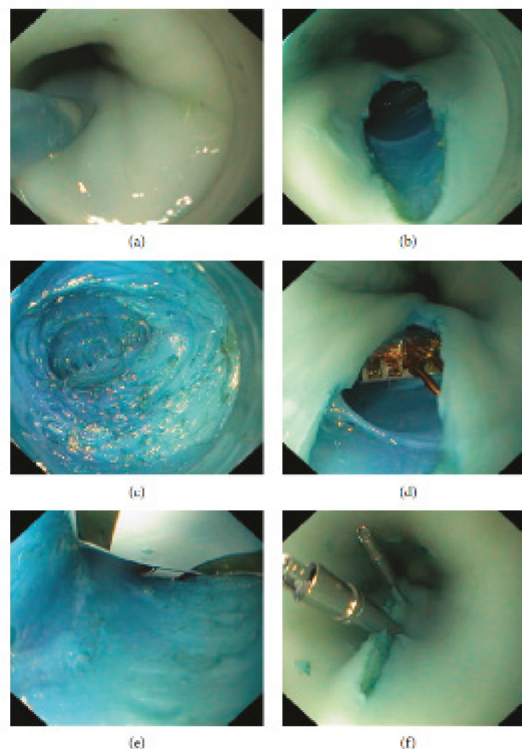


Obr. 8: Konstrukce bezbatériového neurostimulátoru. a) Plošný spoj (zadní strana). b) Plošný spoj (přední strana). c) Připojení přijímací cívky. d) Připojení stimulačních elektrod. e) Enkapsulované zařízení (přední strana). f) Enkapsulované zařízení (zadní strana).

Největším omezením malých implantabilních zařízení je jejich závislost na lokálním zdroji energie, prakticky ve všech případech v podobě chemické baterie. Logickým krokem proto bylo prozkoumat návrh neurostimulátoru s co možná nejúspornější konstrukcí, která by umožnila zbavit se chemické baterie jakožto primárního zdroje energie a pro napájení neurostimulátoru použít zdroj nacházející se mimo tělo a energii skladovat pouze v kondenzátoru, který vykryje příkonové špičky.

Konstrukce neurostimulátoru spočívá v laděném induktor-kondenzátor (LC) obvodu sestávajícím z přijímací cívky o ploše  $1\text{ cm}^2$  a kondenzátoru v paralelním zapojení, za které je zařazen usměrňovač v zapojení násobiče s diodami Schottkyho typu Avago HSMS282P. Tento obvod napájí mikrokontroler, který generuje bipolární neurostimulační impulzy, jejichž parametry lze upravit v software. Stimulační elektrody jsou vyrobeny jako flexibilní plošný spoj na folii z Kaptonu (polyimid), která je opatřena měděnými elektrodami, které jsou zlaceny kvůli zachování inertnosti. Tento flexibilní plošný spoj je přiletován k plošnému spoji se zbytkem elektroniky a společně s cívkou obalen vrstvou epoxidu, která nezakrývá elektrody (obr. 8).

Vysílač tvoří obdélníková cívka o ploše  $50\text{ cm}^2$ , která je napájena z vysokofrekvenčního zdroje proudu o frekvenci 1 MHz. Bylo provedeno několik měření, při kterých byl model implantátu umístěn ve vzdálenosti 12 cm od vysílací cívky, bylo měřeno napětí na  $1\text{ k}\Omega$  rezistoru paralelně k přijímacímu LC obvodu. Na základě těchto dat byl spočítán výkon, který byl bezdrátově přenesen. Posléze byl mezi vysílač a přijímač vložen model tkáně (svalovina) o tloušťce 6 cm. Naměřené hodnoty odpovídají teorii, naměřený pokles byl v řádu jednotek procent. Tato technologie přenosu energie je tedy vhodná pro použití v implantabilních zdravotnických prostředcích. I na vzdálenost 12 cm byl mikrokontroler napájen a generoval neurostimulační pulzy. Následně bylo zařízení



*Obr. 9: Postup endoskopické implantace neurostimulátoru. a) Aplikace metylenové modři pro zvýraznění submukozy. b) Vytvoření submukozní kapsy. c) Prostor uvnitř submukozní kapsy. d) Vložení neurostimulátoru do submukozní kapsy. e) Pohled na elektrody přiložené k muscularis propria. f) Uzavření kapsy hemostatickými klipy.*

endoskopicky implantováno do oblasti dolního jícnového svěrače (obr. 9). Jednalo se o první úspěšnou implantaci do této oblasti. Implantace byla úspěšná, bylo prokázáno, že elektronické zařízení lze implantovat do submukozy v oblasti dolního jícnového svěrače.

### Článek s IF

HAJER, J., M. NOVÁK a J. ROSINA. Wirelessly Powered Endoscopically Implantable Devices into the Submucosa as the Possible Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology Research and Practice* [online]. 2019, 2019, 1–7. ISSN 1687-6121. Dostupné z: doi:10.1155/2019/7459457

## Research Article

# Wirelessly Powered Endoscopically Implantable Devices into the Submucosa as the Possible Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease

J. Hajer <sup>1</sup>, M. Novák <sup>2</sup>, and J. Rosina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>2nd Department of Internal Medicine, Charles University, Third Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Medical Biophysics and Medical Informatics, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Correspondence should be addressed to J. Hajer; [jan.hajer@fnkv.cz](mailto:jan.hajer@fnkv.cz)

Received 12 December 2018; Revised 4 March 2019; Accepted 11 March 2019; Published 7 April 2019

Guest Editor: Renata N. Moura

Copyright © 2019 J. Hajer et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is a rather common disease with a prevalence reaching up to 10 or 20% in the western world. The most specific symptoms which point to the diagnosis of GERD are feelings of heartburn and the regurgitation of acidic stomach contents into the esophagus. However, a certain number of patients do not respond to standard therapy, and in these cases, it is necessary to resort to other treatment methods, such as laparoscopic fundoplication or electrostimulation of the lower esophageal sphincter. The aim of our work was to design and manufacture a miniature, battery-less stimulator to provide electric stimulation of the lower esophageal sphincter, which could be implanted deep into the submucosa of the distal esophagus. The main goal was to provide a battery-less system as opposed to traditional battery neurostimulators to reduce the size and weight of the device. An electronic prototype of a wirelessly powered implantable device was developed. We used animal models for the experiments. The device is designed to treat GERD via electrical stimulation of the muscularis propria. It is implanted into the submucosal pocket by the lower esophageal sphincter with an endoscope. This method of implantation is superior to esophageal stimulators used today because of very low invasiveness of the surgery. Bipolar neurostimulation via two gold-plated leads is provided. The device does not have any source of energy; it is powered wirelessly which reduces the risk of potential battery leakage and reduces the overall dimensions.

## 1. Introduction

The gastrointestinal tract (GIT) nervous system is a complex, independent network of neurons and glial cells which is responsible for controlling the functions of the gastrointestinal tract, including its motility, secretory function, and its role in immunoregulation. This network is made up of small ganglia and neurons interconnected by bundles of nerve fibers, which run along the entire gastrointestinal tract. Interstitial Cajal cells, as well as neurons, are also an important part of the enteric neural system. These are nonglial cells which can be found inside the entire gastrointestinal tract. They function much like a cardiostimulator and produce electrical activity, which leads to a peristaltic motion of the intestine in the form of slow waves [1]. The lower esophageal sphincter is made up of smooth muscles and keeps its

contraction due to neurological and myogenic factors. Recent studies [2–4] suggest that electric stimulation of the gastrointestinal nervous system may represent a significant benefit for patients suffering from disorders such as gastroparesis (being effective for more than 10 years [5]), GERD, and constipation, or those who are not responding to therapy [6]. GERD and/or dysphagia is prevented by a correctly functioning lower esophageal sphincter. The LES is controlled by paracrine, hormonal, and neural factors, and it as well as the diaphragmatic sphincter works to stop gastric contents being refluxed into the esophagus [7].

Although electrostimulation therapy of the lower esophageal sphincter is a relatively new concept for the treatment of patients who are resistant to medication and also, the therapy is safe and effective in short-term and long-term studies in humans [3, 4, 6, 8], there have been no negative side effects

to this form of the treatment and it has been proven to provide both significant and sustained relief from the symptoms of GERD while at the same time eliminating the need for PPI medication and reducing esophageal acid exposure. Canine models were first used to study the effects of electrostimulation of the LES in the treatment of GERD [9, 10]. Reports have stated that electric stimulation (20 Hz, pulse width of 3 ms) with 2 pairs of electrodes causing a contraction and increase of the pressure of the sphincter complex was effective in preventing gastroesophageal reflux. The effects of electrostimulation of the LES in patients with GERD using both high (20 Hz, pulse width of 200  $\mu$ s) and low (6 cycles per minute, pulse width of 375 ms) frequencies have also been examined. Both high- and low-frequency electrostimulation increased LES pressure but did not affect LES relaxation or residual pressure when swallowing [2]. It has been shown that high-frequency stimulation is preferable as it requires less energy and therefore extends the life of the battery. There are only two GIT stimulators currently in use, the Enterra II [11] and EndoStim [12], which use intramuscular catheters to stimulate gastric muscle tissue. Both of these require surgical implantation under general anesthesia and have a large unwieldy unit attached. As such, the option of a device implanted into the gastric submucosal layer which communicates wirelessly would be a large step forward in patient comfort. Neurostimulation of LES using endoscopically implanted leads exteriorized transnasally was also assessed and was successful, resulting in significant increase in LES pressure with no complaints of dysphagia [4]. Research has already proven that it is possible to implant a miniature neurostimulator into the submucosa [13, 14]. This research provides a scope for further improvements regarding power management (especially the option of wireless power device without battery), conforming to the rules and regulations for medical implants and wireless communication and the possibility of bipolar neuroelectrostimulation.

## 2. Material and Methods

**2.1. Implantable Device Prototype Construction.** The device which was constructed to assess the technology consists of 4 main components—printed circuit board (PCB) with electrical components, wireless power receiving coil, liquid-resistant enclosure, and stimulation electrodes.

The main PCB is manufactured on a FR4 material and the thickness is 0.8 mm. The electronics comprises of two main parts—control and power management.

The control part is integrated into a single microcontroller—PIC16LF1783—which is used to generate the electrical stimulation impulses. Two timer modules are used to generate stimulation pulses—the first timer sets the frequency of pulses and the second timer is used to turn on and off the stimulation at predefined times. The pulses generated by the logic part of the microcontroller is then amplified by on-chip operational amplifier and outputted to the stimulation electrodes.

The power management circuitry contains 3 main parts—voltage doubler with Avago HSMS282P zero-bias Schottky diodes, parallel LC resonant circuit with receiving

coil, and low-drop regulator. A 5.1 V Zener diode is placed across the rectified voltage to protect the capacitor bank against damage due to overvoltage. The rectified voltage is converted to a stable 2.5 V DC power rail with a TPS70625 low-drop voltage regulator. This power rail is used to power the microcontroller. TLV803 voltage supervisor is utilized to avoid undervoltage lockout condition.

The main PCB is protected from the surrounding space using a technique which is today used in implantable medical devices like breast implants—by coating with functional biopolymers. In this case, multiple dip-coating of skin-colored 3Dresyn-MF UV-cured monomer-free resin for 3D printing was used. Between each coating, a curing schedule of 1 minute of 500 mW/cm<sup>2</sup> UV light with a wavelength of 405 nm from each side was performed. A total of 4 coatings were required to fully cover the device.

On the outside, the stimulation electrodes are connected. To reduce the thickness, the electrodes are manufactured on a polyimide substrate as a flexible printed circuit board. The electrodes are gold plated to limit corrosion and enhance biocompatibility. The electrodes are glued to the encapsulated electronics with the coil, and two straps are wound around the electronics and soldered on the other side, securing the electrodes against separation which occurred during first experiments. The completed device is depicted in Figure 1.

**2.2. The Wireless Powering Device.** The powering device was energised by an alternating magnetic field with a frequency of 1 MHz. This magnetic field was created by a custom-developed device intended for this task. This device comprised of a printed circuit board, a heatsink, and a rectangular coil composed of 3 turns. The coil was connected in series with a capacitor bank and tuned to a resonance frequency of 1 MHz. This was done to maximize the current flowing through the coil. The magnetic field strength in a constant distance from a wire is proportional to the current flowing through the wire.

$$B = \frac{\mu_0 I}{2\pi r}. \quad (1)$$

By measuring the impedance of the coil at target frequency, the resonance capacitor value was determined. The alternating current at predefined resonance frequency is then generated by an H bridge formed by four N-MOSFET transistors. The control signals for the MOSFET transistors are generated by a dedicated microcontroller.

**2.3. Energy Propagation through Tissue.** One of the major concerns in wireless power transfer is the influence of surrounding materials, especially materials in between a receiving and transmitting device. In this case, the energy is transferred via air coupling of a transmitting and receiving coil. This is commonly referred to as “near-field” communication. The second type of energy transfer is far-field which uses electromagnetic waves to transmit energy. The antenna size is then proportional to the wavelength. For 1 GHz, the wavelength in vacuum is around 30 cm. However, electromagnetic waves are significantly attenuated at these

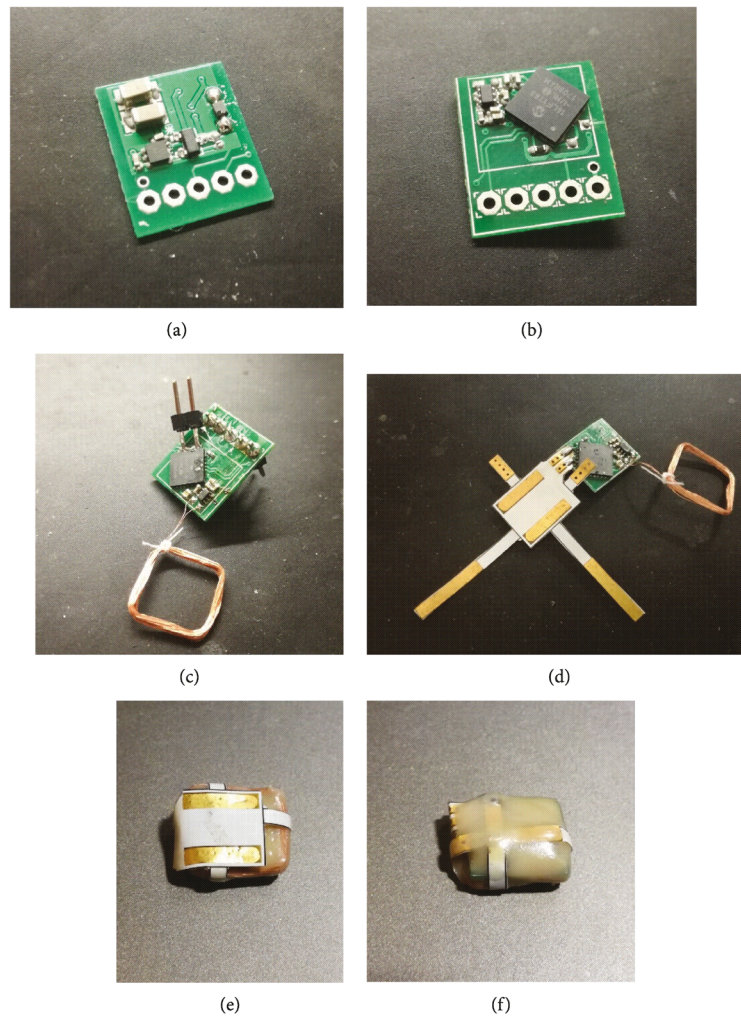


FIGURE 1: Composite picture of the implantable device prior to implantation: (a) back side of the PCB, (b) front side of the PCB, (c) PCB prepared for programming and testing, (d) trimmed PCB with stimulation electrodes ready for encapsulation, (e) encapsulated PCB—front side, and (f) encapsulated PCB—back side.

frequencies. The requirement of using high frequencies to achieve good antenna gain, attenuation by tissue, and regulatory requirements renders far-field energy transfer to wireless implant impractical.

The near-field wireless power transfer in this frequency range can be significantly affected only by materials with high conductivity by creating eddy currents in them (metals) or materials with high magnetic permeability (e.g., mu-metal or permalloy). To support this statement, an experiment was conducted (Figure 2). We have secured a wireless receiver coil with a parallel resonant capacitor and wireless transmitter 11 cm apart each other. The first measurement was done with no object placed between the coils. A 1 kOhm resistor was placed across the receiving coil resonant circuit to simulate an electric load. The voltage across the resistor with energy transfer active was measured, and received

power was calculated using Ohm's law. After that, the experiment was repeated but in between transmitting and receiving coil, an 8 cm thick porcine tissue was placed. The average power (averaged over 10 seconds) received with and without animal tissue in between was 0.560 mW and 0.588 mW, respectively. This is in accordance with the theory that the effect of tissue on this type of wireless power transfer is minimal (4.7% decrease). One of the possible explanations of the decrease is detuning of the transmitting LC circuit. This may be compensated for during development, and the effect of the tissue presence will be further minimized (at the same distance and angular position of the coils, the power transferred will be smaller without the presence of the tissue).

**2.4. Animal Model.** A porcine model made of the stomach and a long segment of the esophagus was used. It is a

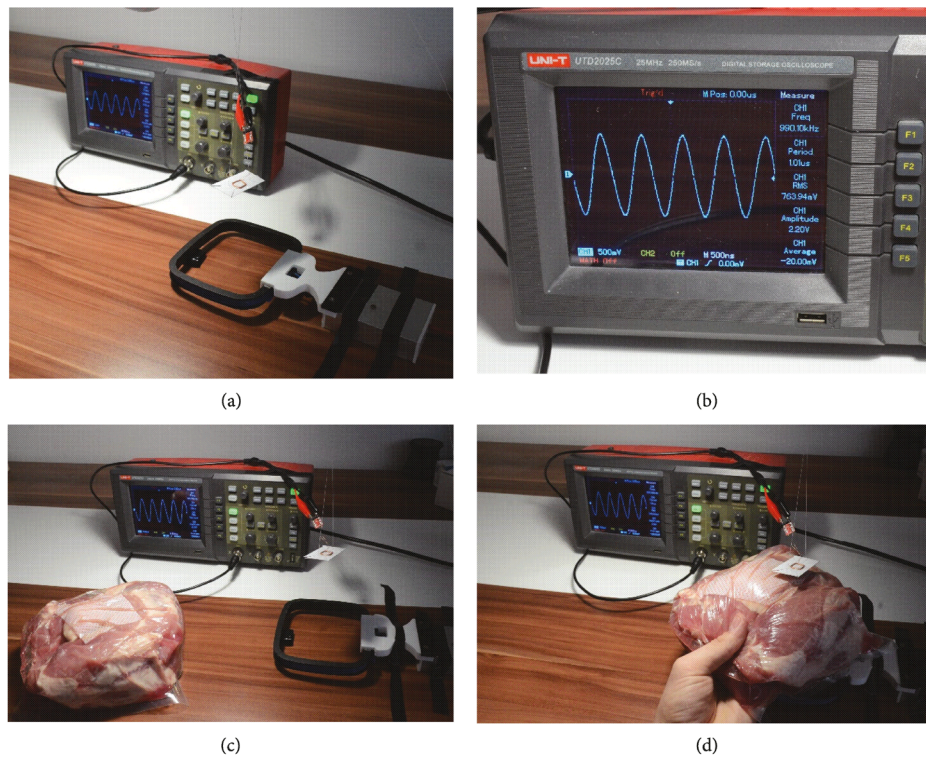


FIGURE 2: Composite picture of the experiment which evaluates effectivity of wireless power transfer through tissue: (a) measurement setup (receiving coil hovers 11 cm above transmitter coil), (b) detail of oscilloscope screen, (c) testing without the presence of porcine tissue, and (d) testing with the presence of porcine tissue.

commonly used model for training of techniques such as ESD (endoscopic submucosal dissection), tunnelling, and POEM (peroral endoscopic myotomy). The overall view of the model with the implanted device and inserted endoscope is provided in Figure 3.

**2.5. Endoscopic Implantation of the Device.** Using the same endoscopic submucosal tunnelling method usually used for POEM, first described by Inoue et al. [15], the device was implanted into the submucosa. This procedure is documented in Figure 4. A combination of methylene blue and saline solution is first injected about 5 cm above the LES into the submucosal layer with a therapy needle catheter (25G). An electro-surgical knife is used to make an opening into the submucosa. This submucosal pocket is then dilated and disrupted, thus creating a 5 cm long tunnel large enough for the implantation of the device. Using a grasper, the device is moved into the area of the pocket and released. Grasping forceps then move the device into the submucosal tunnel. The opening made by the initial incision is then closed with haemostatic clips.

After implantation, a transmitter coil, which produces an alternating magnetic field of 1 MHz frequency, is powering the implantable device (Figure 5).

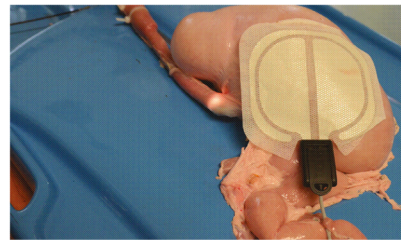


FIGURE 3: Animal model with the highlighted place of the implantation of the device near the lower esophageal sphincter.

### 3. Results

The prototype of the esophageal neurostimulator was successfully endoscopically implanted in a pig model. We used the tunnelling method. The prototype was attached in the vicinity of the muscular layer of the LES. The entire procedure took approximately 30 minutes in total and was without any perforation or other complications. The device and its functions were tested with an oscilloscope ex vivo.

The wireless energy transfer device was successfully able to power the implant from approx. 12 cm. This means that



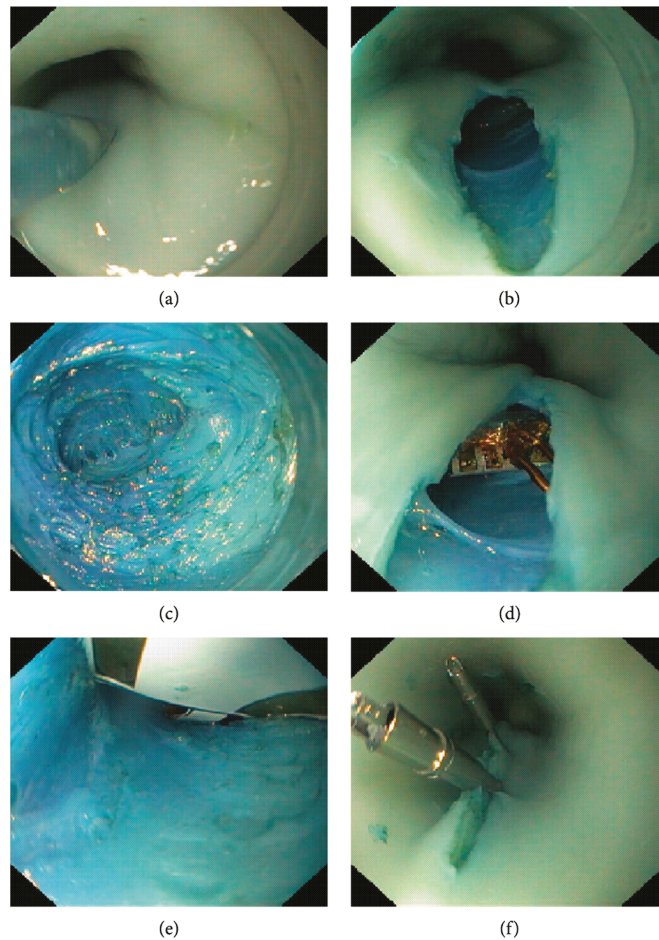


FIGURE 4: The process of implanting the device as shown in a composite picture: (a) submucosal injection; (b) vertical opening; (c) view of submucosal tunnel; (d) device inside the tunnel; (e) final implant positioning; (f) opening closure.



FIGURE 5: Powering the implant using wireless inductive power transfer.

the microcontroller in the device was able to power up correctly and start generating stimulation patterns (Figure 6).

Next, the presented design of electrodes does not separate from the device which was one of the main issues during previous experiments. The electrodes are also constructed from intrinsically biocompatible materials (polyimide and gold, respectively).

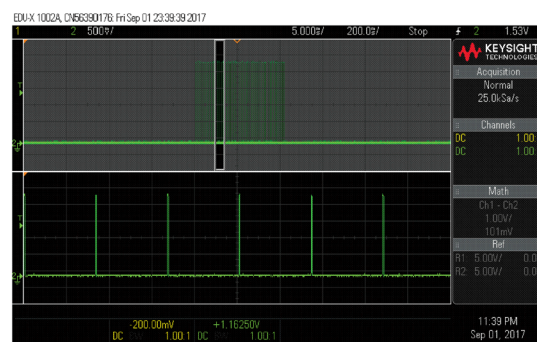


FIGURE 6: Stimulation pattern waveform generated by the implantable neurostimulator.

A novel method of dip-coating of the device in biocompatible monomer-free resin was used which is a major improvement over previous research which did not use biocompatible coatings for device prototypes.

The weight of the neurostimulator is 1.22 grams (60% decrease over the previous experiment), and the volume is 0.74 cm<sup>3</sup> (40% decrease over the previous experiment).

#### 4. Discussion

This test proves that a tiny implantable device without a battery may be used for LES neurostimulation. This innovative neurostimulator could provide patients with a reliable and comfortable solution to currently used surgical methods. The device has very low power requirements in standby, in terms of tens of microwatts, because it has no wireless communication. Through power cycling of the energising coil externally, the rate of neurostimulation can be controlled.

Endoscopically implanted battery-less devices which control neurostimulation have potential uses not only in the general population but also in problems caused by other sphincter dysfunctions. Although endoscopically implanted electrodes are proven to be effective [8], the determination of the efficacy of the neurostimulator on live animals will require further experimentation to be confirmed. Based on previous experiments with implantation of a device to the stomach and esophagus, we have found a size limit of the device. This was the primary motivation for the development of battery-less version of the device. The battery and charging electronics form a significant portion of the volume of the device. Also, any battery always represents a hazard, when any explosion or leakage in this specific area could result in serious injury or death. Thus, putting the energy source outside of the implant was a logical step to reduce the size and increase safety. In this experiment, we have confirmed that this topology of an implantable neurostimulator is feasible.

The new method of creating a biocompatible housing around the device is suitable for short-term experiments. When performing longer experiments (i.e., weeks), there is a possibility that moisture could leak into the implant via the interface between the PCB and outside of the implant where the stimulation electrodes are located. In that case, a layer of conformal coating of the PCB before coating the PCB with biocompatible 3D printing resin could add sufficient protection. In the case of a not biocompatible material, there is a significant risk of implant rejection. Also, the implant could be prone to migration, requiring additional solution for fixation.

#### 5. Conclusions

This research has proven that the lower esophageal sphincter can receive controlled neurostimulation from a miniature implantable device without a battery. The neurostimulation can be provided by our solution which makes a relatively simple and, most importantly, reliable device. Its wireless nature means that it has very low power needs, only tens of microwatts. By power cycling the energy coil externally, we can regulate the power and rate of neurostimulation.

This technology presents a promising option for use in the general public with such problems as GERD. In both cases, the size of the device, its ease of implantation, its longevity, and its safety offer a leap forward when compared

with contemporary neurostimulation solutions. On the other hand, the endoscopic implantation is quite a challenging procedure comparable to POEM. Our opinion is that the implantation procedure is easier because it does not require myotomy. But in almost every country, a high-volume centre for POEM is present. Thus, the accessibility of the treatment should be high. Periprocedural complications like bleeding and perforation can occur. On the other hand, data which supports high safety of POEM procedure is available [16]. On the other hand, fundoplication which was examined as a possible solution for GERD has worse track record according to literature [17].

Based on these results, we plan to confirm the effect of the stimulation of the device on a living pig with an esophageal manometry. For these experiments, it is planned to make a special enclosure for biocompatible materials as the device is expected to stay in the submucosa for extended durations of time (at least several weeks). The enclosure will be either machined from biocompatible polymer (i.e., PEEK) or made using additive manufacturing from medical-grade resins. The position of the neurostimulator close to the lower esophageal sphincter creates an opportunity to place a pH sensor outside of the submucosa. A feedback-controlled neurostimulator which would use real-time data from a pH sensor to control the neurostimulation could offer significant power savings as the stimulation would be active only when a reflux episode occurs.

#### Data Availability

The detailed description of the hardware as well as the implantation technique used is described in the article. The images which demonstrate successful implantation of the device into the submucosa and ex-vivo test of the implantable device (which are the results of the research) are also included within the article.

#### Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Charles University research program PROGRES Q 28 (Oncology).

#### References

- [1] J. B. Furness, B. P. Callaghan, L. R. Rivera, and H.-J. Cho, "The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control," in *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*, pp. 39–71, Springer, 2014.
- [2] L. Rodríguez, P. Rodríguez, M. G. Neto et al., "Short-term electrical stimulation of the lower esophageal sphincter increases sphincter pressure in patients with gastroesophageal reflux disease," *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 24, no. 5, pp. 446–450, 2012.
- [3] L. Rodríguez, P. Rodríguez, B. Gómez et al., "Two-year results of intermittent electrical stimulation of the lower esophageal

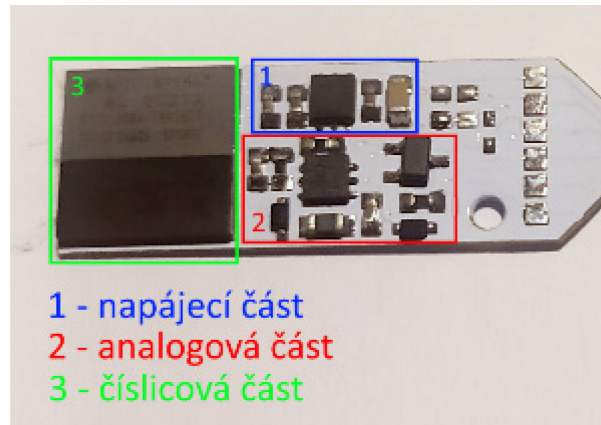
- sphincter treatment of gastroesophageal reflux disease,” *Surgery*, vol. 157, no. 3, pp. 556–567, 2015.
- [4] R. Banerjee, N. Pratap, R. Kalpala, and D. N. Reddy, “Effect of electrical stimulation of the lower esophageal sphincter using endoscopically implanted temporary stimulation leads in patients with reflux disease,” *Surgical Endoscopy*, vol. 28, no. 3, pp. 1003–1009, 2014.
- [5] R. W. McCallum, Z. Lin, J. Forster, K. Roeser, Q. Hou, and I. Sarosiek, “Gastric electrical stimulation improves outcomes of patients with gastroparesis for up to 10 years,” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 9, no. 4, pp. 314–319.e1, 2011.
- [6] L. Rodríguez, P. Rodríguez, B. Gómez et al., “Electrical stimulation therapy of the lower esophageal sphincter is successful in treating GERD: final results of open-label prospective trial,” *Surgical Endoscopy*, vol. 27, no. 4, pp. 1083–1092, 2013.
- [7] R. Mittal, “Motor function of the pharynx, esophagus, and its sphincters,” *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, vol. 3, no. 3, pp. 1–84, 2011.
- [8] E. Soffer and S. Kim, “Electrical stimulation for gastroesophageal reflux disease: current state of the art,” *Clinical and Experimental Gastroenterology*, vol. 9, pp. 11–19, 2016.
- [9] N. F. Rinsma, N. D. Bouvy, A. A. M. Masclee, and J. M. Conchillo, “Electrical stimulation therapy for gastroesophageal reflux disease,” *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, vol. 20, no. 3, pp. 287–293, 2014.
- [10] C. P. Sanmiguel, M. Hagiike, M. P. Mintchev et al., “Effect of electrical stimulation of the LES on LES pressure in a canine model,” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 295, no. 2, pp. G389–G394, 2008.
- [11] R. Patel and P. Kulkarni, “The Enterra device and the future of gastric electrical pacing,” *Journal of Gastric Disorders and Therapy*, vol. 2, no. 4, pp. 2–5, 2016.
- [12] P. D. Siersema, A. J. Bredenoord, J. M. Conchillo et al., “1085 electrical stimulation therapy (EST) of the lower esophageal sphincter (LES) for refractory GERD - one year results of an international multicenter trial,” *Gastroenterology*, vol. 150, no. 4, article S216, 2016.
- [13] J. Hajer and M. Novák, “Development of an autonomous endoscopically implantable submucosal microdevice capable of neurostimulation in the gastrointestinal tract,” *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2017, Article ID 8098067, 8 pages, 2017.
- [14] J. Hajer and M. Novák, “Autonomous and rechargeable micro-neurostimulator endoscopically implantable into the submucosa,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 139, article e57268, 2018.
- [15] H. Inoue, H. Minami, Y. Kobayashi et al., “Peroral endoscopic myotomy (POEM) for esophageal achalasia,” *Endoscopy*, vol. 42, no. 4, pp. 265–271, 2010.
- [16] S. G. Worrell, E. T. Alicuben, J. Boys, and S. R. DeMeester, “Peroral endoscopic myotomy for achalasia in a thoracic surgical practice,” *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 101, no. 1, pp. 218–225, 2016.
- [17] J. E. Richter, “Gastroesophageal reflux disease treatment: side effects and complications of fundoplication,” *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 11, no. 5, pp. 465–471, 2013.

#### 4.6 Design a konstrukce finálního neurostimulátoru

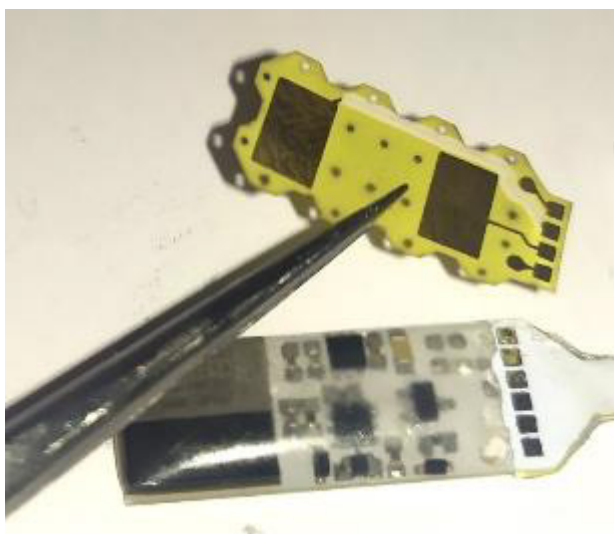
Schéma zapojení je na obr. 13. Zařízení je založeno na modulu ISP1507-AL, který je použit u finálního pH senzoru (kapitola 4.10). Sestává ze třech primárních bloků – napájecí části, analogové části a číslicové části.

Napájecí část bylo nutno přizpůsobit lithium-iontové baterii, která je v zapojení použita. Je použita baterie Panasonic CG-320. Napájecí subsystém sestává ze stabilizátoru TPS78230, který napájí mikrokontroler. Stimulační napětí o hodnotě 12 V je generováno spínaným zdrojem, který je tvořen obvodem

TPS61040. Vzhledem k relativně velké spotřebě obvodu je napětí 12 V generováno pouze při vysokonapěťové neurostimulaci. Zapnutí a vypnutí tohoto obvodu řídí mikrokontroler. Bipolární neurostimulační pulzy jsou generovány mikrokontrolerem ve formě pulzně šířkově modulovaného (PWM) signálu a následně napěťově a proudově zesíleny N kanálovým polem řízeným tranzistorem (MOSFET). Vzhledem k tomu, že je obvod mezi napájecím napětím baterie a 12 V napěťovým výstupem tvořen cívkou a diodou v propustném směru, jsou na výběr dvě napětí pro tvorbu neurostimulačních pulzů – nízké napětí odpovídající napětí baterie a napětí o hodnotě 12 V.



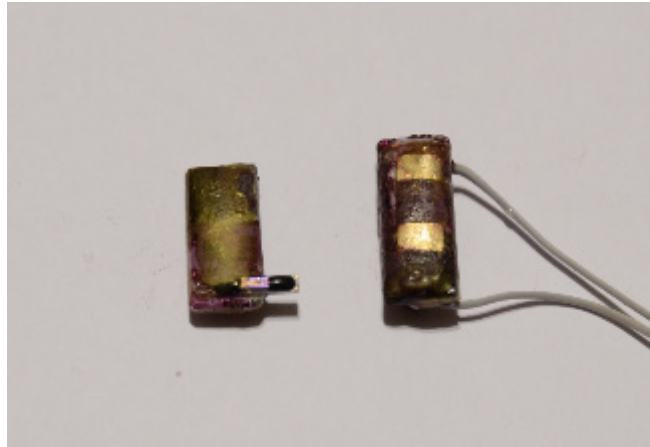
Obr. 10: Rozmístění komponent neurostimulátoru



Obr. 11: Pohled na bipolární pozlacené elektrody

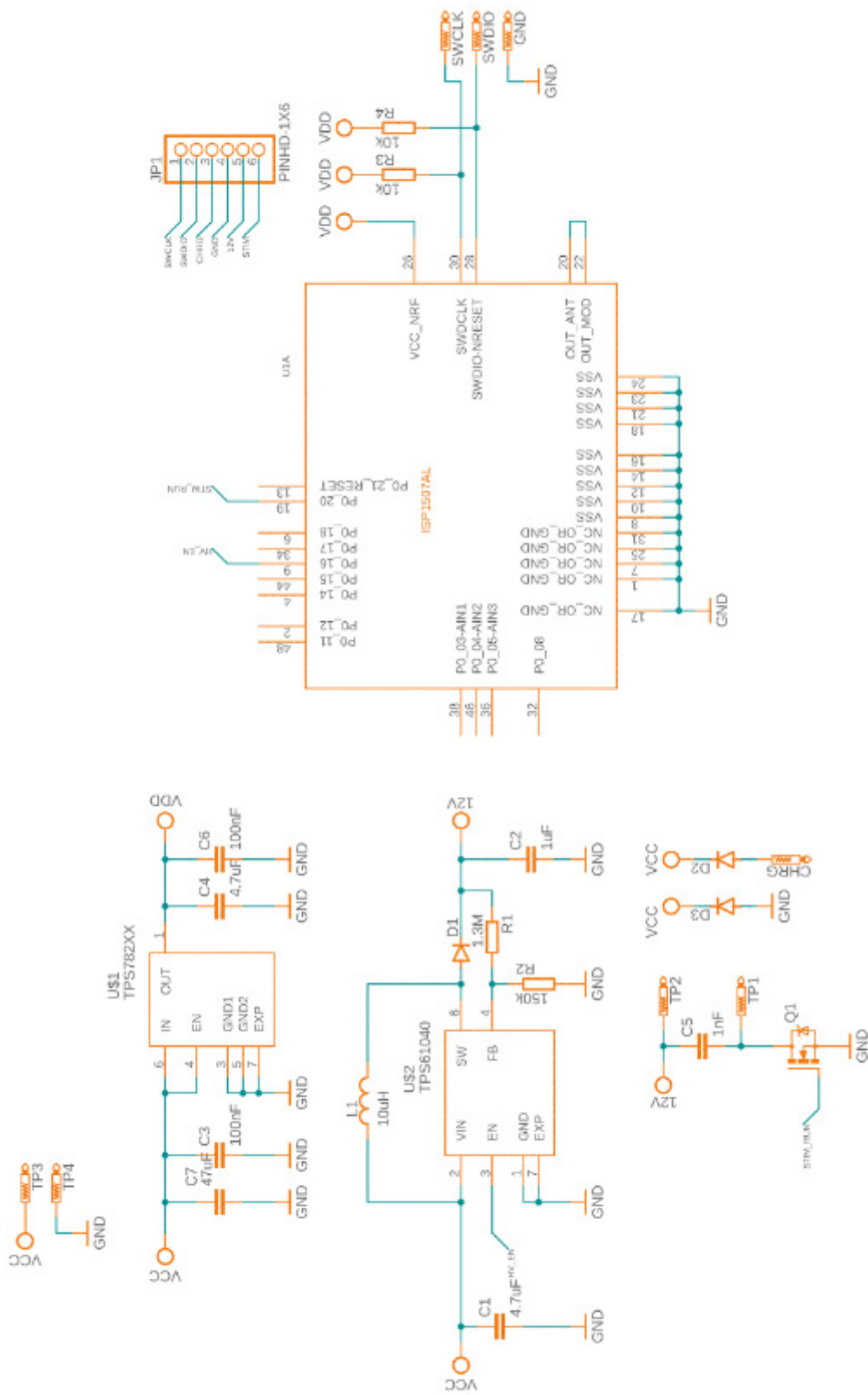
Všechny komponenty s výjimkou baterie jsou umístěny na jedné straně plošného spoje, viz obr. 10. Baterie je umístěna na zadní straně. Po enkapsulaci strany s elektronikou jsou naletovány pozlacené elektrody (obr. 11) a jsou přilepeny na epoxidovou vrstvu biokompatibilním kyanoakrylátovým lepidlem. Poté je na zadní stranu naletována baterie a po testu funkčnosti je zadní strana enkapsulována.

Celkový pohled na obě implantovatelná zařízení po enkapsulaci a pokrytí poly(3-hexylthiofen-2,5-diyl) neboli P3HT polymerem je na obr. 12. Zlaté elektrody jsou po pokrytí P3HT polymerem očištěny chloroformem, aby byl zachován vodivý kontakt. Na fotografii jsou u neurostimulátoru zachovány přírodní vodiče pro



*Obr. 12: Pohled na obě enkapsulovaná zařízení; pH senzor vlevo, k neurostimulátoru jsou připojeny vodiče pro dobíjení*

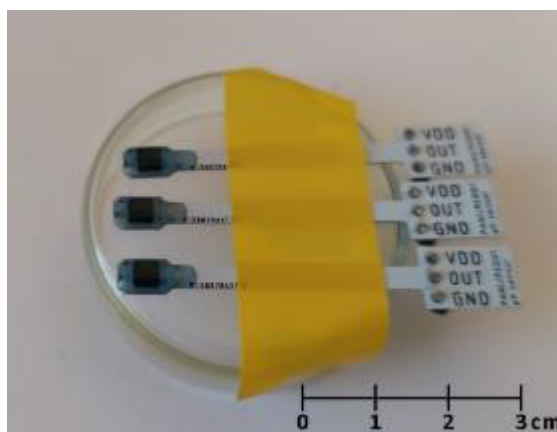
kontrolu napětí baterie a případně její kontaktní dobítí. Ty jsou před implantací nebo experimenty odstraněny a případné odhalené části vodičů nebo baterie jsou dodatečně překryty vrstvou biokompatibilního kyanoakrylátového lepidla. Neurostimulátor je po dokončení výroby otestován podobným způsobem jako pH senzor, konkrétně ponořením do fyziologického roztoku po dobu jedné až dvou hodin pro ověření vodotěsnosti.



Obr. 13: Schéma zapojení neurostimulátoru

#### 4.7 Vývoj pH senzoru na bázi biokompatibilních polymerů

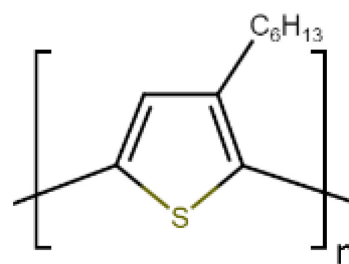
Souběžně s testováním biokompatibility různých polymerů (kapitola 4.13) byl proveden výzkum použitelnosti různých  $\pi$ -konjugovaných polymerů jako pH senzorů. Polymery nazývané jako  $\pi$ -konjugované se vyznačují tím, že se v jejich struktuře objevuje střídání jednoduché a dvojně vazby mezi uhlíkovými atomy, což vede k překryvu  $\pi$ -orbitalů (38). To vede ke



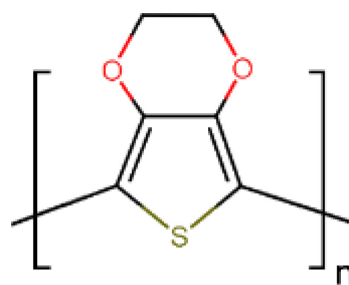
Obr. 14: pH senzory

vzniku pásové struktury, která je důvodem jejich vodivosti. Na základě literární rešerše bylo zjištěno, že např. PEDOT:PSS (poly(3,4-ethylendioxythiofen):polystyrenulfonát), který patří do stejné skupiny polymerů jako P3HT, u něhož byla posouzena biokompatibilita (viz kapitola 4.13), je pH senzitivní (39) a biokompatibilní (40). Na základě tohoto zjištění byla vyvinuta koncepce pH senzoru s extrémně nízkým příkonem ( $1,8 \mu\text{W}$  při napájecím napětí  $1,6 \text{ V}$ ), který sestává z plošného spoje, na který jsou nanесeny dvě chemické funkční vrstvy – Ag/AgCl referenční elektroda, jejíž elektrochemický potenciál je stabilní a vrstva polymeru, jejíž elektrochemický potenciál závisí na pH prostředí. Z hlediska stability potenciálů elektrod hodnot a minimalizace jejich degradace musí být elektrický proud při měření rozdílu napětí mezi elektrodami minimální (ideálně nulový), aby nedocházelo k jednosměrným elektrochemickým reakcím na elektrodách. Analogový obvod má proto velmi vysoký vstupní odpor a proudově zesiluje napětí mezi elektrodami, které je úměrné pH prostředí, ve kterém se senzor nachází. Senzory jsou na obr. 14, elektronika je enkapsulována analogicky ke všem předchozím zařízením vrstvou epoxidu.

Existují dva mechanismy, které vysvětlují citlivost  $\pi$ -konjugovaných polymerů na změny v pH. První spočívá ve změně potenciálu na povrchu polymerní vrstvy (bez redox reakcí v polymeru) nebo v důsledku redox reakcí v polymeru z důvodu rozdílných koncentrací iontů v polymerní struktuře oproti roztoku. Druhý mechanismus spočívá v polarizaci polymerní vrstvy, která se podobá polarizaci vzácných kovů. První z vyjmenovaných efektů lze velmi názorně demonstrovat na příkladu polyanilinu, kde je zdrojem pH senzitivity iminová skupina. Na základě změny pH dochází k protonaci (při nízkém pH) resp. deprotonaci (při vysokém pH), která má za následek přechod polyanilinu z emeraldinové báze na emeraldinovou sůl při protonaci a naopak. Použití polyanilinu pro aplikace vyžadující biokompatibilitu je ovšem omezené, protože byla zjištěna cytotoxicita obou jeho hlavních forem – emeraldinové báze i soli (41).



poly(3-hexylthiophen-2,5-diyl)  
(P3HT)



poly(3,4-ethylenedioxythiophen)  
(PEDOT)

Obr. 15: Struktura P3HT a PEDOT

Bylo provedeno testování dvou  $\pi$ -konjugovaných polymerů – P3HT a PEDOT:PSS (obr. 15). Ačkoliv je u PEDOT:PSS známo, že je biokompatibilní a citlivý na pH, není rozpustný v žádném polárním či nepolárním rozpouštědle (42). Nanesení souvislé vrstvy je tak možné pouze elektropolymerizací z monomeru, což je na přípravu i časově náročná metoda, která je obtížně škálovatelná do masové výroby. Druhou možností je vytvoření koloidní disperze s následným odpařením disperzního média (nejčastěji nízkomolekulární glykol, voda, dimethylsulfoxid – DMSO nebo jejich směs). Problémem je nízká adheze k povrchu, zvláště v případě, kdy má povrch velmi nízkou hrubost (např. leštěný kov). Oproti tomu u P3HT (obr. 16) byla zjištěna dobrá rozpustnost v chloroformu a bromobenzenu (za pokojové teploty lze na základě vlastních experimentů vytvořit 1% resp. 3%

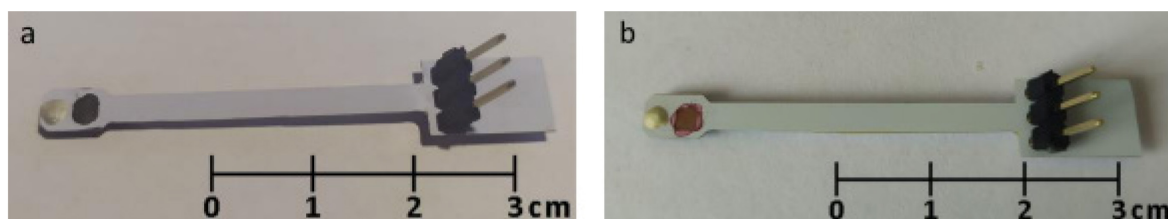


Obr. 16: Polymer P3HT

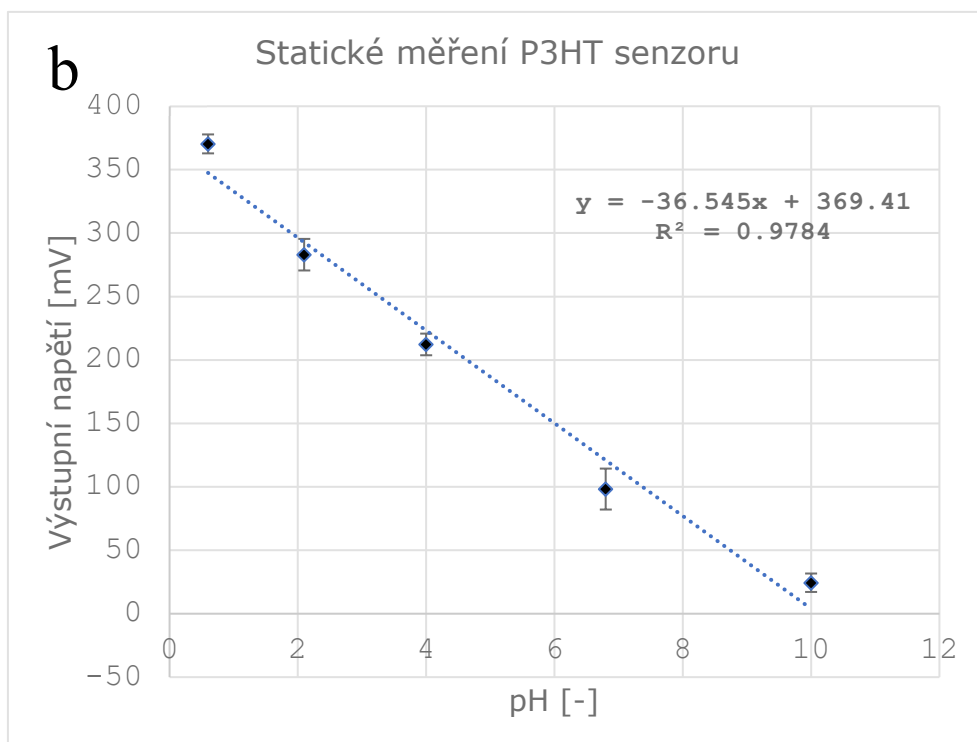
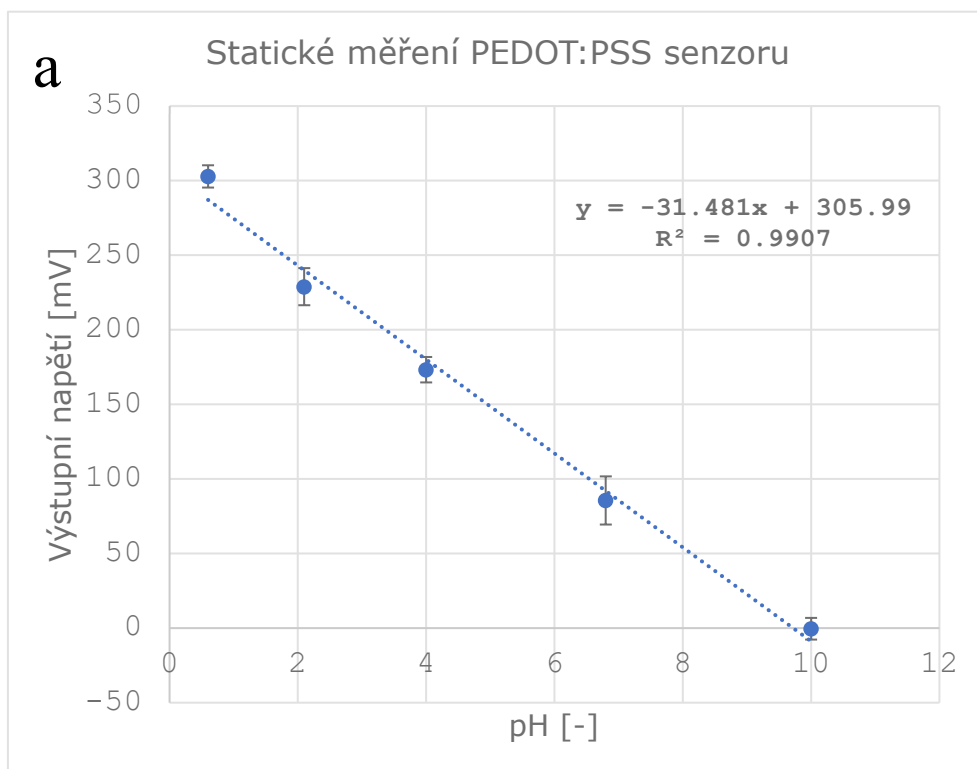


roztok). Vrstva vytvořená ze samostatných molekul polymeru (nikoliv koloidních částic) má na základě experimentálních pozorování mnohem lepší adhezi k povrchu a rovnoměrnost. Z důvodu mnohem vyšší těkavosti byl zvolen chloroform (bod varu při normálním atmosférickém tlaku je  $61,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (43)), který lze z povrchu dokonale odpařit za kratší dobu a při nižší teplotě než bromobenzen (bod varu při normálním atmosférickém tlaku  $156\text{ }^{\circ}\text{C}$  (44)). Bod varu by bylo možné snížit snížením tlaku, ale to s sebou přináší nutnost použití specializovaného vybavení (vakuová pec).

Polymer PEDOT:PSS resp. P3HT byl nanesen na jednu z elektrod prototypu pH senzoru, zatímco na druhou elektrodu byl nanesen Ag/AgCl inkoust pro sítotisk (Sigma-Aldrich), který tvoří pseudoreferenční elektrodu. V případě PEDOT:PSS byl na zlatou elektrodu nanesen grafitový vodivý inkoust za účelem zvýšení adheze PEDOT:PSS disperze na elektrodu. Senzory s nanesenými funkčními vrstvami jsou na obr. 17. Primární testování obou senzorů bylo provedeno jejich vložením do roztoků o různých hodnotách pH, jmenovitě 0,6; 2,1; 4,0; 6,8 a 10,0. Výsledky statického měření jsou na grafu 1. Toto měření bylo provedeno na vzorku 8 senzorů (čtyři PEDOT:PSS a čtyři P3HT), přičemž každé s každým senzorem bylo provedeno celkem 15 měření (3x pro každou hodnotu pH) Byla prokázána linearita obou typů senzorů, sklon závislosti výstupního napětí na pH je  $-31,5\text{ mV/pH}$  a  $-36,5\text{ mV/pH}$  pro PEDOT:PSS resp. P3HT senzor.



Obr. 17: Nanesené funkční vrstvy na pH senzor a) PEDOT:PSS b) P3HT

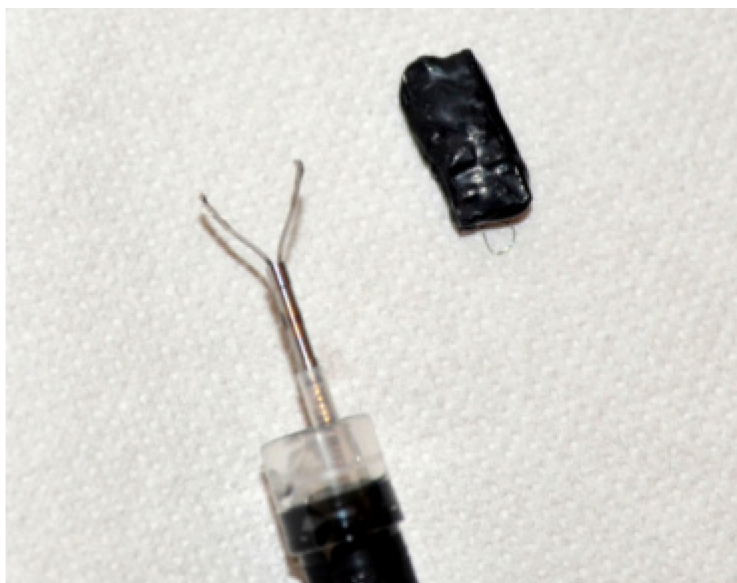


Graf 1: Výsledky statického měření polymerního pH senzoru na bázi a) PEDOT:PSS; b) P3HT

#### 4.8 Implantabilní jícnový pH senzor včetně přijímače

Po úspěšném vývoji několika iterací neurostimulátoru byl zahájen vývoj implantabilního pH senzoru. Ten má být určený pro implantaci do mukozální stěny jícnu pomocí hemostatického klipu podobně, jak je tomu u dnes dostupného kapslového pH senzoru Medtronic Bravo.

Senzor byl zkonstruován podobnou technologií, jako neurostimulátory – byl navržen obvod na plošném spoji, sestávající z mikrokontroleru typu PIC16LF, rádiového vysílače a ISFET pH senzoru. Výsledný obvod byl enkapsulován v epoxidu, u kterého byla posouzena biokompatibilita, viz. kapitola 4.13. Nakonec byl senzor



Obr. 18: Fotografie pH senzoru vedle endoskopu s grasperem

opatřen titanovým háčkem, který sloužil k upevnění do stěny jícnu pomocí hemostatického klipu. Výsledné zařízení před a po implantaci je na obr. 18. Pro validaci funkčnosti výsledného senzoru byl použit model sestávající z prasečího žaludku a jícnu. Do jícnu poté byly vstříkovány roztoky o různém pH (konkrétně 0,6; 4; 7 a 10) a bylo měřeno napětí referenční elektrody ISFET senzoru, které je nepřímo úměrné pH. Celkem bylo provedeno 9 měření, mezi kterými byla do jícnu vstříknuta deionizovaná voda pro zamezení mísení pufřů, které by mohlo mít za následek zkreslení naměřených hodnot vlivem změny pH pufru v jícnu. Po měření byly naměřené hodnoty porovnány s referenčními a bylo provedeno statistické zpracování výsledků.

Tabulka 1: Hodnoty naměřené při testování pH senzoru

Hodnota pH - kalibr. měřidlo [-]	Napětí pseudoref. elektrody [mV]	Hodnota pH - senzor [-]	Chyba [pH]	Chyba (%)
0,62	1010	0,28	-0,34	-54%
3,98	1200	3,98	0,00	0%
10,01	1490	9,62	-0,39	-4%
0,62	1020	0,48	-0,14	-23%
7,01	1350	6,90	-0,11	-2%
3,98	1220	4,37	0,39	10%
10,01	1480	9,43	-0,58	-6%
3,98	1210	4,17	0,19	5%
7,01	1350	6,90	-0,11	-2%

**Směrodatná odchylka [-] 0,30**

Naměřená data jsou uvedena v tabulce 1. Výsledná směrodatná odchylka je 0,30 pH. Senzor je tak bez problému schopen rozlišit mezi neutrálním a kyselým pH v jícnu a tuto informaci může periodicky odesílat prostřednictvím bezdrátového rozhraní. Zkonstruované zařízení má o 60 % menší objem než existující bezdrátový jícnový pH senzor Medtronic Bravo. Výsledná velikost vyvinutého zařízení je 18 mm x 8,5 mm x 4,5 mm.

### Článek s IF

NOVÁK, Marek, Jozef ROSINA, Robert GÜRLICH, Ivana CIBULKOVÁ a Jan HAJER. Construction of a Wireless-Enabled Endoscopically Implantable Sensor for pH Monitoring with Zero-Bias Schottky Diode-based Receiver. Journal of Visualized Experiments [online]. 2021, (174). ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/62864

# Construction of a Wireless-Enabled Endoscopically Implantable Sensor for pH Monitoring with Zero-Bias Schottky Diode-based Receiver

Marek Novák<sup>1</sup>, Jozef Rosina<sup>1</sup>, Robert Gürlich<sup>2</sup>, Ivana Cibulková<sup>3</sup>, Jan Hajer<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Biophysics and Medical Informatics, Third Faculty of Medicine, Charles University <sup>2</sup> Department of General Surgery, Third Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Královské Vinohrady <sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Third Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Královské Vinohrady

## Corresponding Author

Marek Novák  
marek.novak@if3.cuni.cz

## Citation

Novák, M., Rosina, J., Gürlich, R., Cibulková, I., Hajer, J. Construction of a Wireless-Enabled Endoscopically Implantable Sensor for pH Monitoring with Zero-Bias Schottky Diode-based Receiver. *J. Vis. Exp.* (174), e62864, doi:10.3791/62864 (2021).

## Date Published

August 27, 2021

## DOI

10.3791/62864

## URL

jove.com/video/62864

## Abstract

Ambulatory pH monitoring of pathological reflux is an opportunity to observe the relationship between symptoms and exposure of the esophagus to acidic or non-acidic refluxate. This paper describes a method for the development, manufacturing, and implantation of a miniature wireless-enabled pH sensor. The sensor is designed to be implanted endoscopically with a single hemostatic clip. A fully passive rectenna-based receiver based on a zero-bias Schottky diode is also constructed and tested. To construct the device, a two-layer printed circuit board and off-the-shelf components were used. A miniature microcontroller with integrated analog peripherals is used as an analog front end for the ion-sensitive field-effect transistor (ISFET) sensor and to generate a digital signal which is transmitted with an amplitude shift keying transmitter chip. The device is powered by two primary alkaline cells. The implantable device has a total volume of 0.6 cm<sup>3</sup> and a weight of 1.2 grams, and its performance was verified in an *ex vivo* model (porcine esophagus and stomach). Next, a small footprint passive rectenna-based receiver which can be easily integrated either into an external receiver or the implantable neurostimulator, was constructed and proven to receive the RF signal from the implant when in proximity (20 cm) to it. The small size of the sensor provides continuous pH monitoring with minimal obstruction of the esophagus. The sensor could be used in routine clinical practice for 24/96 h esophageal pH monitoring without the need to insert a nasal catheter. The "zero-power" nature of the receiver also enables the use of the sensor for automatic *in-vivo* calibration of miniature lower esophageal sphincter neurostimulation devices. An active sensor-based control enables the development of advanced algorithms to minimize the used energy to achieve a desirable clinical outcome. One of the examples of such an algorithm would

be a closed-loop system for on-demand neurostimulation therapy of gastroesophageal reflux disease (GERD).

## Introduction

The Montreal Consensus defines gastroesophageal reflux disease (GERD) as "a condition that develops when refluxing the contents of the stomach causes unpleasant symptoms and/or complications". It may be associated with other specific complications such as esophageal strictures, Barrett's esophagus, or esophageal adenocarcinoma. GERD affects approximately 20% of the adult population, mainly in countries with high economic status<sup>1</sup>.

Ambulatory pH monitoring of pathological reflux (acid exposure time of more than 6%) allows us to distinguish the relationship between symptoms and acidic or non-acidic gastroesophageal reflux<sup>2,3</sup>. In patients unresponsive to PPI (proton pump inhibitor) therapy, pH monitoring can answer whether it is pathological gastroesophageal reflux and why the patient does not respond to standard PPI therapy. Various pH and impedance monitoring options are currently offered. One of the newer possibilities is wireless monitoring using implantable devices<sup>4,5</sup>.

GERD is associated with lower esophageal sphincter (LES) disorder, where the contractions shown during esophageal manometry are not pathological but have a reduced amplitude in long-term GERD. LES consists of smooth muscle and maintains tonic contractions due to myogenic and neurogenic factors. It relaxes due to vagal-mediated inhibition involving nitric oxide as a neurotransmitter<sup>6</sup>.

Electrical stimulation with two pairs of electrodes was proven to increase the contraction time of the LES in a canine reflux model<sup>7</sup>. The relaxation of the LES including the residual

pressure during swallowing was not affected by both low and high frequency stimulation. High-frequency stimulation is an obvious choice because it requires less power and extends the battery life.

Although electrostimulation treatment (ET) of the lower esophageal sphincter is a relatively new concept in the treatment of patients with GERD, this therapy was shown to be safe and effective. This form of treatment has been shown to provide significant and lasting relief from the symptoms of GERD while eliminating the need for PPI treatment and reducing esophageal acid exposure<sup>8,9,10</sup>.

The current state-of-the-art pH sensor for diagnostics of GERD is the Bravo device<sup>11,12</sup>. At an estimated volume of 1.7 cm<sup>3</sup>, it can be implanted directly into the esophagus with or without visual endoscopic feedback and provides 24 h+ monitoring of pH in the esophagus.

Considering that electrostimulation therapy is one of the most promising alternatives for treating GERD not responding to standard therapy<sup>8,13</sup>, it makes sense to provide the data from the pH sensor to the neurostimulator. The recent research shows a clear path to future development in this field which will lead to rigid all-in-one implantable devices which will reside at the site of neurostimulation<sup>14,15</sup>. For this purpose, the ISFET (ion-sensitive field-effect transistor) is one of the best types of sensors because of its miniature nature, the possibility of on-chip integration of a reference electrode (gold in this case), and sufficiently high sensitivity. On silicon, the ISFET resembles the structure of a standard MOSFET (Metal

Oxide Semiconductor Field Effect Transistor). However, the gate, normally connected to an electrical terminal, is replaced by a layer of active material in direct contact with the surrounding environment. In the case of pH-sensitive ISFETs, this layer is formed by silicon nitride ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )<sup>16</sup>.

The main disadvantage of endoscopically implantable devices is the inherent limitation of the battery size, which may lead to a reduced lifetime of these devices or motivate the manufacturers to develop advanced algorithms that will deliver the required effect at a lower energy cost. One of the examples of such an algorithm would be a closed-loop system for on-demand neurostimulation therapy of GERD. Similar to continuous glucose meters (CGM) + insulin pump systems<sup>17</sup>, such a system would employ an esophageal pH sensor or another sensor to detect the current pressure of the lower esophageal sphincter together with a neurostimulation unit.

The response to the neurostimulation therapy and the requirements for neurostimulation patterns can be individual<sup>13</sup>. Thus, it is important to develop independent sensors that could be used either for diagnosis and characterization of the dysfunction or to actively participate in calibrating the neurostimulation system according to the individual requirements of the patients<sup>18</sup>. These sensors should be as small as possible to not affect the normal functionality of the organ.

This manuscript describes a method of design and fabrication of an ISFET based pH sensor with amplitude-shift keying (ASK) transmitter and a small footprint passive rectenna-based receiver. Based on the simple architecture of the solution, the pH data can be received by an external receiver or even the implantable neurostimulator without any significant volume or power penalty. The ASK modulation is chosen because of the nature of the passive receiver,

which is only capable of detection of received RF signal power (often called "received signal strength"). The schematic diagram, which is embedded as Supplementary material, shows the construction of the device. It is powered directly from two AG1 alkaline batteries, which provide a voltage between 2.0-3.0 V (based on the state of charge). The batteries power the internal microcontroller, which utilizes its ADC (analog-to-digital converter), DAC (digital-to-analog converter), internal operation amplifier, and FVR (fixed-voltage reference) peripherals to bias the ISFET pH sensor. The resulting "gate" voltage (the gold reference electrode) is proportional to the pH of the surrounding environment. A stable  $I_{DS}$  current is provided by a low-side R2 sensing resistor. The source of the ISFET sensor is connected to the non-inverting input of the operational amplifier, while the inverting input is connected to the output voltage of the DAC module set to 960 mV. The output of the operational amplifier is connected to the drain pin of the ISFET. This operational amplifier regulates the drain voltage so that the voltage difference on the R2 resistor is always 960 mV; thus, a constant bias current of 29  $\mu\text{A}$  flows through the ISFET (when in normal operation). The gate voltage is then measured with an ADC. The microcontroller then powers on the RF transmitter via one of the GPIO (general purpose input/output) pins and transmits the sequence. The RF transmitter circuit involves a crystal and matching network which matches the output to 50  $\Omega$  impedance.

For the experiments demonstrated here, we used a pig stomach with a long section of the esophagus mounted in a standardized plastic model. This is a commonly used model for practicing endoscopic techniques such as ESD (endoscopic submucosal dissection), POEM (oral endoscopic myotomy), endoscopic mucosal resection (EMR), hemostasis, etc. Concerning the closest possible anatomical

parameters approaching human organs, we used the stomach and esophagus of pigs weighing 40-50 kg.

## Protocol

No living animals were involved in this study. The experiment was performed on an *ex vivo* model consisting of a porcine esophagus and stomach. The stomach and esophagus were purchased from a local butchery as their standard product. This procedure is in accordance with Czech laws, and we prefer it because of the "3R" principle (Replacement, Reduction, and Refinement).

### 1. Fabrication of the pH sensor assembly

**NOTE:** Observe precautions for handling electrostatic discharge (ESD) sensitive components throughout the fabrication of the pH sensor assembly. Be careful when working with the soldering iron.

1. Place the ISFET pH sensor mounted on a printed circuit board (PCB) on a flat surface. Locate the solderable contacts.
2. Trim the solderable contacts, so their length is no longer than 3 mm.
3. Solder a 15 mm section of fluorinated ethylene propylene (FEP) coated cable to the solderable electrodes of the pH sensor. Do not mechanically or chemically clean the bare die assembly. Try to avoid contamination of the die and PCB with flux during soldering.
4. Inspect the pH sensor-cable assembly under a microscope for open circuits and shorts. Then, check the shorts with an open-short tester. A correctly prepared assembly at this stage is shown in **Figure 1**.
5. Clean the pH sensor assembly in an ultrasonic cleaner for 5 min at 70 °C in a 5% solution of flux remover in water. The optimum range of ultrasound power is 50-100 W/l. Do not exceed 100 W/l.
6. Rinse the pH sensor assembly in technical grade isopropyl alcohol for at least 3 min and let it dry in an oven at 80 °C for 15 min.
7. Place all pH sensors on a flat surface (in case multiple are prepared simultaneously) before proceeding to the next step.
8. Mix an appropriate amount of two-part epoxy for encapsulation of the soldered electrodes. Use a minimum of 2 mL to allow thorough mixing. Use black opaque epoxy to allow for inspection later- parts of the sensor exposed to the environment will be seen easier as they will not have opaque epoxy on them
9. Transfer the mixed epoxy to a 1 mL syringe with a 0.5 mm flat end needle.
10. Coat the soldering area of pH sensors with epoxy. Make sure to coat the whole area of PCB electrodes and the exposed wire.
11. Let the epoxy cure either at room or elevated temperature (80 °C max), for this study 50 °C was used with the epoxy listed in the **Table of Materials**.
12. Inspect the coated area under a microscope. If any uncoated metal parts (either PCB electrode or wire) are exposed, repeat steps 1.8-1.11 until there are no visual signs of uncoated metal.
13. Trim the wires to the length and angle shown in **Figure 2**. Coat the ends with solder to avoid fraying.



## 2. Fabrication of the electronic assembly

**NOTE:** Observe precautions for handling ESD-sensitive components throughout the fabrication of the electronics. Be careful when working with the soldering iron and hot-air gun.

1. Place the PCB (manufactured based on the supplementary files "pcb1.zip" and schematic diagram "schematic.png") on a flat surface, components side up.
2. Apply solder paste to all the exposed gold-plated pads.
3. Place all passive and active components using tweezers according to **Figure 3** and the **Table of Materials**.
4. Heat the PCB with the hot air gun to solder the components. Heat the PCB gradually to 150 °C for 2 min to expel residual water from the packages and activate the flux in the solder paste. Then, heat the PCB to 260 °C to solder the components. Let the PCB cool to room temperature, do not move it during the whole soldering process.
5. After soldering and cooling down to room temperature, inspect the PCB under a microscope to verify the correct placement of all the components and shorts. If no shorts or incorrect component placement is observed, skip step 2.6.
6. Repair any shorts or incorrect component placement with a soldering gun or hot air gun. Go to step 2.5.
7. Solder 5 wires to the components (power and programming leads) as shown in **Figure 4**.
8. To connect the PCB to the programmer, connect the wires soldered in step 2.7. to the connector of the programmer.
9. Program firmware (see **Representative Results** for a detailed explanation of which file to use) to the microcontroller. Use the previously described procedure to set up the programming software<sup>19</sup>. Set the programmer to power the device with a voltage of approximately 2.5 V. De-solder the 5 wires after programming.
10. Place the PCB on a flat surface, component side up. Solder the AWG38 copper antenna wire (length of 3 cm) as shown in **Figure 5** and wrap it around the edge of the PCB. Fix the antenna wire to the edge of the PCB with a cyanoacrylate adhesive. Solder the other two wire jumpers with SWG38 copper wire as shown in **Figure 5**. Avoid electrical contact with other components.
11. Put the PCB on a flat surface, component side down.
12. Solder two battery holders to the opposite part of PCB, as shown in **Figure 6**.
13. Solder the pH sensor assembly to the terminals on the PCB, as shown in **Figure 7**.
14. Insert two AG1 batteries into the battery holders.
 

**NOTE:** Do not proceed with this step and next steps in this section earlier than 24 h before testing and endoscopic implantation of the sensor.
15. Prepare an appropriate amount of epoxy as described in step 1.8. for encapsulation of the device.
16. Encapsulate the device with the epoxy using the same procedure described in step 1.9 (syringe with a needle). Let the epoxy cure at room temperature or slightly elevated temperature (do not exceed 50 °C because of the presence of batteries). See **Figure 8** for the correct encapsulation results.
17. Create a titanium wire hook according to **Figure 9**.
 

**NOTE:** Titanium (Grade II) was chosen because of its biocompatibility and track record of use in implantable

medical devices. Stainless steel may be used, too. However, the type and heat treatment must be chosen carefully as some stainless steel types are very brittle.

18. Attach the wire hook to the device with a drop of fast-curing epoxy (see **Figure 10**) and let it cure at room temperature or slightly elevated temperature (50 °C maximum). The pH sensor is located on the bottom left side of the implantable device.
19. The sensor becomes activated 24 h after the insertion of the batteries. Meanwhile, proceed with step 3.

**NOTE:** Pause the protocol now if completion of step 3 within 24 h after insertion of the batteries is possible.

### 3. Fabrication of passive rectenna receiver

1. Place the PCB (manufactured based on the supplementary file "pcb2.zip") for the rectenna on a flat surface.
2. Solder the components using the solder paste method described in steps 2.2-2.6 or use a soldering gun according to **Figure 11A**.

**NOTE:** If the experimenter decides to manufacture the rectenna receiver again (it was previously manufactured and matched) or does not want to proceed with receiver matching, use the values of the components previously determined by the experimenter or provided in **Figure 11B** and skip steps 3.5-3.7.

3. Solder the SMA connector to the PCB.
4. Inspect the PCB under a microscope. If any shorts or incorrect component placement is observed, fix the issues.
5. Attach a vector network analyzer input to the SMA connector.

6. Record the S11 Smith chart of the rectenna from 300-500 MHz with 1 kHz resolution bandwidth. Observe the response and record the impedance at 431.7 MHz. Use an impedance matching calculator software to determine the values of matching components. The sample Smith chart is shown in **Figure 12A**.
7. Solder the impedance matching components and inspect under a microscope for short circuits and component placement.
8. Measure with spectrum analyzer again and confirm that the voltage standing wave ratio (VSWR) is under 3 between 300-500 MHz (inside the outer cyan circle shown in **Figure 12B**). If not, either repeat with different matching components or continue with the reduced performance of the rectenna in mind.
9. Connect the 433 MHz band antenna to the SMA connector. Connect an oscilloscope to the rectenna output.
10. Set the oscilloscope to single-channel operation, rolling time base, DC mode, 500 ms/div time base, and 5 mV/div voltage scale.

### 4. Testing of the device

**NOTE:** The following steps require the use of chemicals. Study the material safety data sheets of the chemicals beforehand and use proper protective equipment and common lab practices when manipulating them.

1. Inspect the output of the sensor by observing the signal shown on the oscilloscope. The sample output is shown in **Figure 13,14**. The device will be active after 24 h past the insertion of the batteries. The period of transmitting the output of the pH sensor varies depending on the

file which was programmed to the microcontroller (see **Representative Results** for a detailed explanation).

2. Prepare 2% hydrochloric acid solution (use caution when handling hydrochloric acid). Prepare 100 mM buffer solutions of pH 4 (potassium hydrogen phthalate/hydrochloric acid), pH 7 (potassium dihydrogen phosphate/sodium hydroxide), and pH 10 (sodium carbonate/sodium hydrogen carbonate) using standard laboratory procedures and mark the beakers.
3. Verify the pH of all four beakers using a calibrated pH meter. Adjust if needed.
4. Submerge the capsule in every beaker and record at least 3 samples. Measure the period between the second and third pulse and fill it in the provided spreadsheet (**Supplemental File 1**). Determine the calibration coefficients for the pH sensor using the spreadsheet.
5. After calibration, measure the time between the second and the third pulse and input it into the spreadsheet to determine the pH of the solution to which the pH sensor is exposed.

## 5. Endoscopic implantation of the sensor

1. Prepare an *ex vivo* endoscopic porcine model made up of the stomach and a long segment of the esophagus.
2. Grasp the sensor externally with a hemostatic clip, as shown in **Figure 15** and **Figure 16**.
3. Insert the endoscope with the sensor in the clip in the standard way into the model.
4. Position the clip with the sensor close to the lower esophageal sphincter.

5. Rotate the endoscope against the esophageal wall, open the clip and then push toward the esophageal wall. Close the clip and release the clip. The sensor will remain attached to the esophageal wall at the desired location, as shown in **Figure 17D** and **Figure 17E**.
6. Extract the endoscope.

## 6. Experiment after implantation

**NOTE:** The following steps require the use of chemicals. Study the material safety data sheets of the chemicals beforehand and use proper protective equipment and common lab practices when manipulating them.

1. Place the receiver within 10 cm (maximum) of the implanted sensor.
2. Inject 50 mL of the solutions with various pH values into the esophagus, as shown in **Figure 18**, and observe the changes in the sensor's response. Retract the endoscope after every injection and read the value no earlier than 30 s after injection. Wash the esophagus with 100 mL of deionized water between injecting solutions with different pH.
3. Use the spreadsheet (**Supplemental File 1**) to calculate the pH measured by the sensor.

## Representative Results

A device capable of autonomous pH sensing and wireless transmitting of the pH value was successfully constructed, as shown in **Figure 8**. The constructed device is a miniature model; it weighs 1.2 g and has a volume of 0.6 cm<sup>3</sup>. The approximate dimensions are 18 mm x 8.5 mm x 4.5 mm. As shown in **Figure 15**, **Figure 16**, and **Figure 17**, it can be implanted to the proximity of the lower esophageal sphincter with a single hemostatic clip; no special accessories are

needed. A detailed view of a dissected esophagus with the sensor implanted is shown in **Figure 19**.

The passive rectenna receiver has an overall footprint of only 22 mm<sup>2</sup> even though it is optimized for hand-soldering. When the passive rectenna receiver is put into proximity of the pH sensing device (10 cm) when in an active state (24 h after insertion of batteries until full discharge of the batteries), clear voltage spikes can be observed when the device is transmitting. This is shown in **Figure 13**. The first two short (75 ms) pulses are synchronization pulses. The distance between the end of the second pulse and the beginning of the third pulse is proportional to the  $V_{GS}$  voltage of the ISFET subtracted by 800 mV (100 ms = 900 mV, 200 ms = 1000 mV, etc.). This voltage linearly translates to the pH of the environment that the sensor is subjected to.

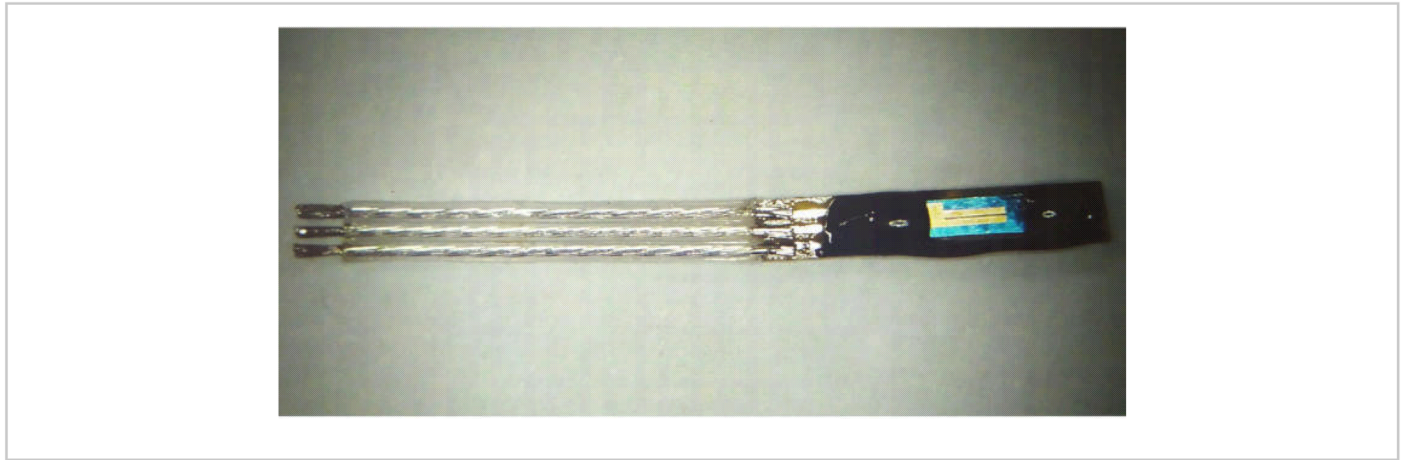
Based on a simple two-point calibration with pH buffers of pH 4 and pH 10 (**Table 1**), the sensor can return stable and repeatable pH value readings (**Table 2**). A total of four different solutions with known pH were used—pH 0.6 (160 mM solution of hydrochloric acid in the water, mimicking the stomach acid<sup>20</sup>) and calibration buffers with pH 4, pH 7, and pH 10. The mean error pH values of the sensor were 0.25 and 0.31 when tested in solutions in beakers and an *ex vivo* model, respectively. The standard deviations of the errors were 0.30 and 0.36, respectively.

When in the proximity of the transmitter (10 cm), the passive rectenna produces a signal with an amplitude of at least tens of millivolts which can be easily detected by a simple comparator or amplified with an ultra-low-power quiescent current operational amplifier. The effect of a mobile phone antenna with an active GSM call has only a minor negative effect on receiving the data from the sensor, as demonstrated

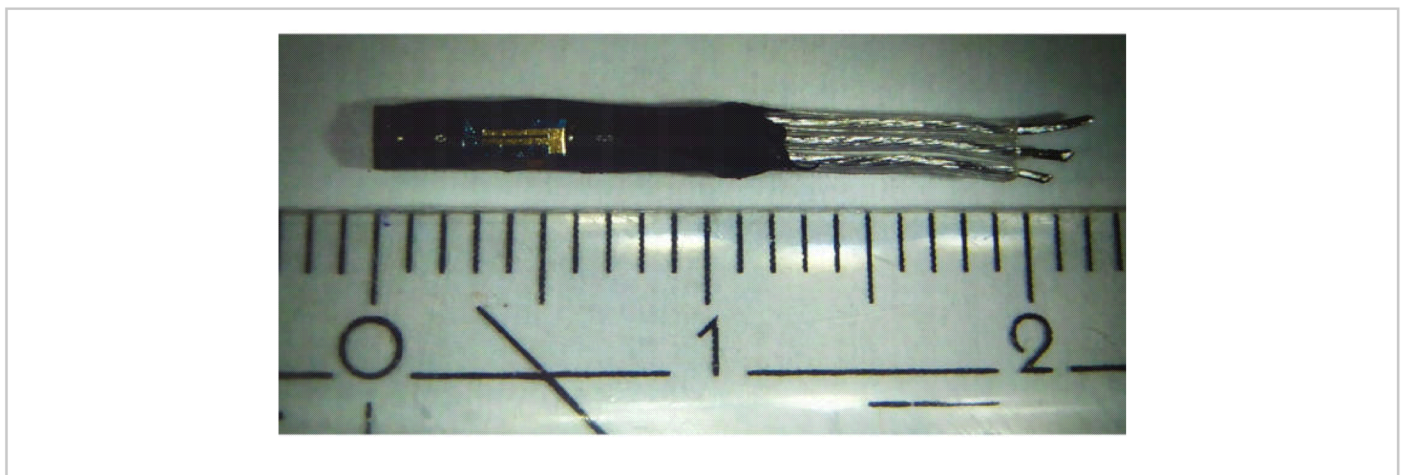
in **Figure 14**. The mobile phone transmission peaks can be filtered by a simple passive RC/LC (resistor-capacitor/inductor-capacitor) filter as they form a high-frequency part of the signal (their frequency is generally above 500 Hz).

In one of the devices, a short circuit between all three of the ISFET electrodes was intentionally made to show how the device's behavior changes when the device is incorrectly assembled. In this case, no voltage-pH response is observed, and the gate voltage is equal to the drain voltage, which is the battery pack voltage (2-3.2 V). The AD converter, which is referenced to an internal 2.048 V reference, then returns the highest possible value, which translates to 2048 mV. Noise may cause slight fluctuations in the ADC output.

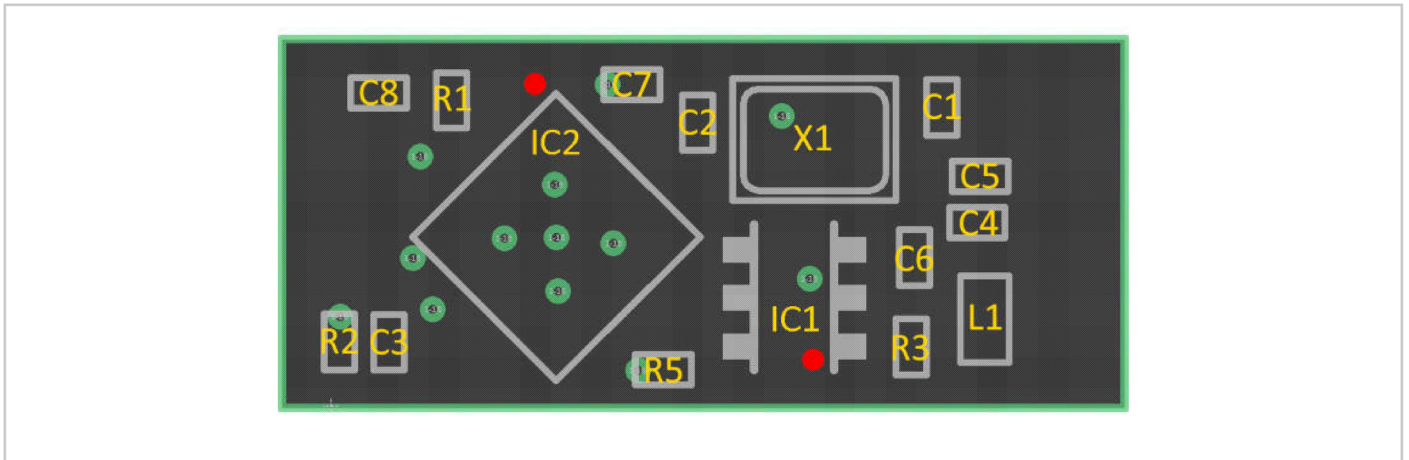
Two variants of firmware that can be programmed to the device were developed and tested. The first one (firmware\_10s.zip) is intended for short-term experiments where the pH value is transmitted every 10 s. This provides more data points for the cost of reduced battery life, which is limited to around 24-30 h. The other one (firmware\_1min.zip) is intended for long-term experiments. The pH value is transmitted once per min. The lifetime of the sensor with a lower sampling frequency is around 5-6 days. There is also a version of the firmware (firmware-test.zip), which does not include the 24 h delay. This file can be used for testing the correct functionality of the electronics before encapsulation. Alternatively, the delay can be modified by changing the code and recompiling the project. The delay was implemented to allow for a full cure of the epoxy or a possibility when the device is manufactured at a different site than the endoscopic surgery room. With the introduced delay, the useful operating life of the device is maximized.



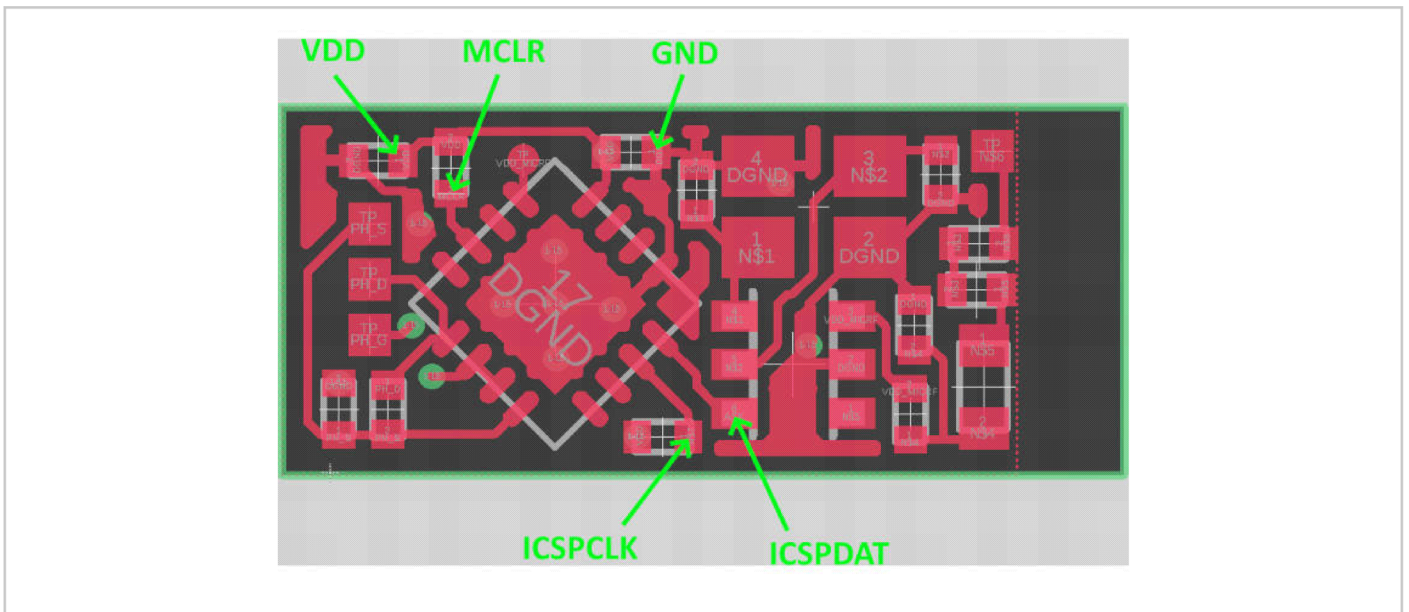
**Figure 1: pH sensor assembly before final trimming** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



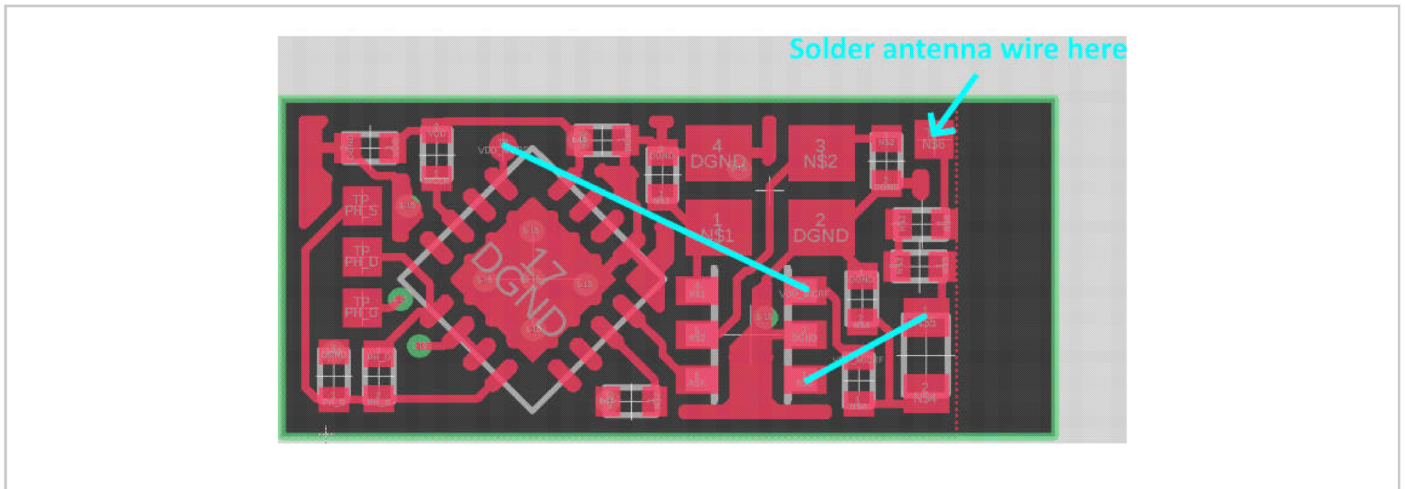
**Figure 2: pH sensor assembly after final trimming** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



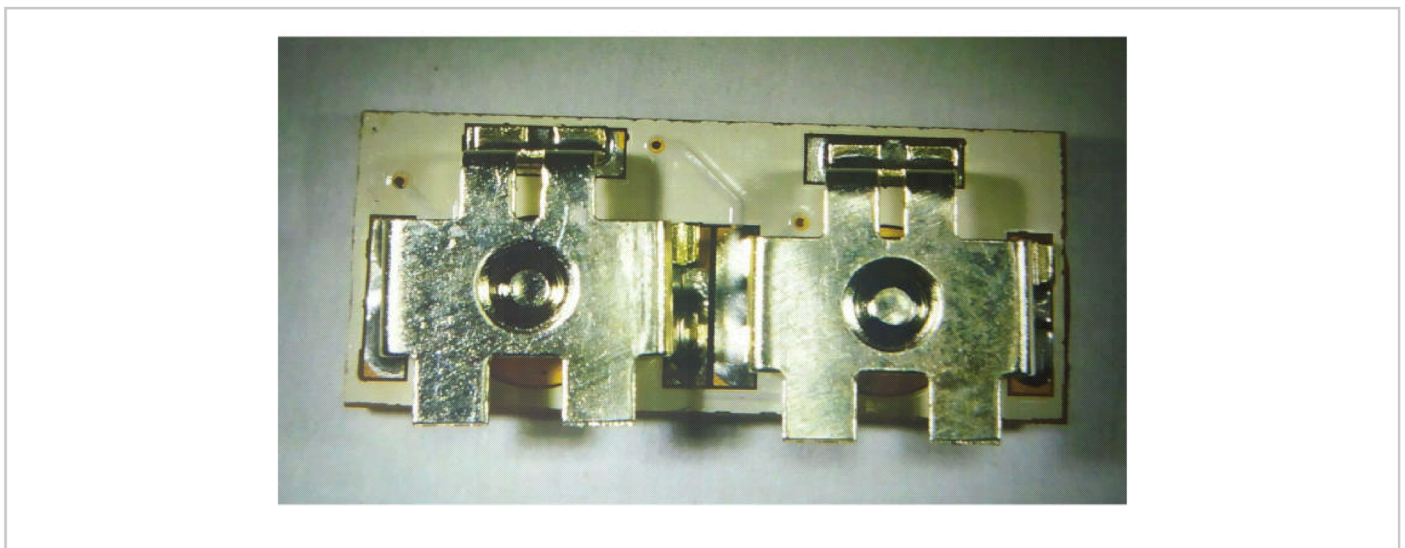
**Figure 3: Placement diagram for the implantable sensor** (see **Table of Materials** for component values). Pin 1 is marked as a red dot. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



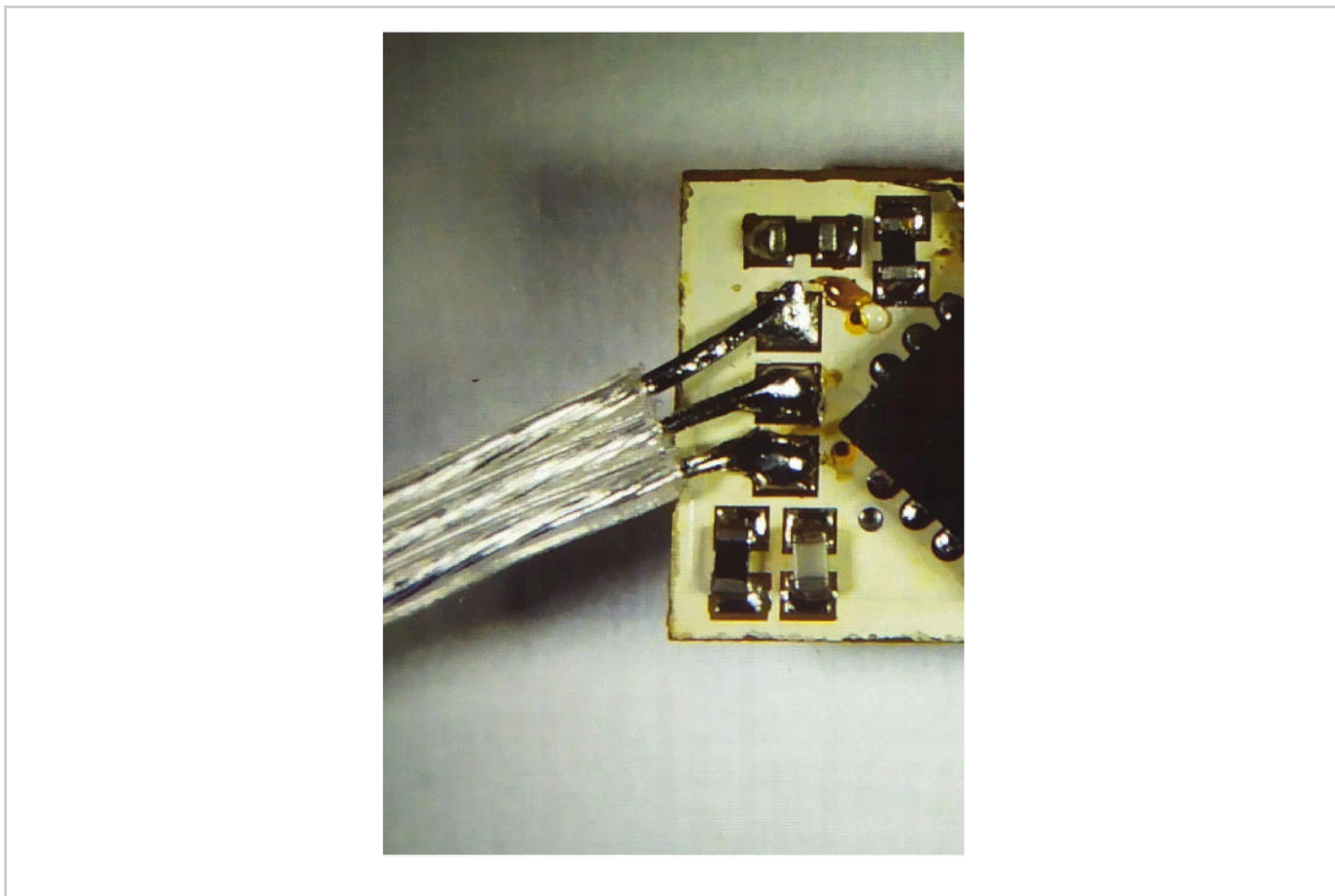
**Figure 4: Placement of programming wires** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 5: Placement of antenna wire and jumper wires** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

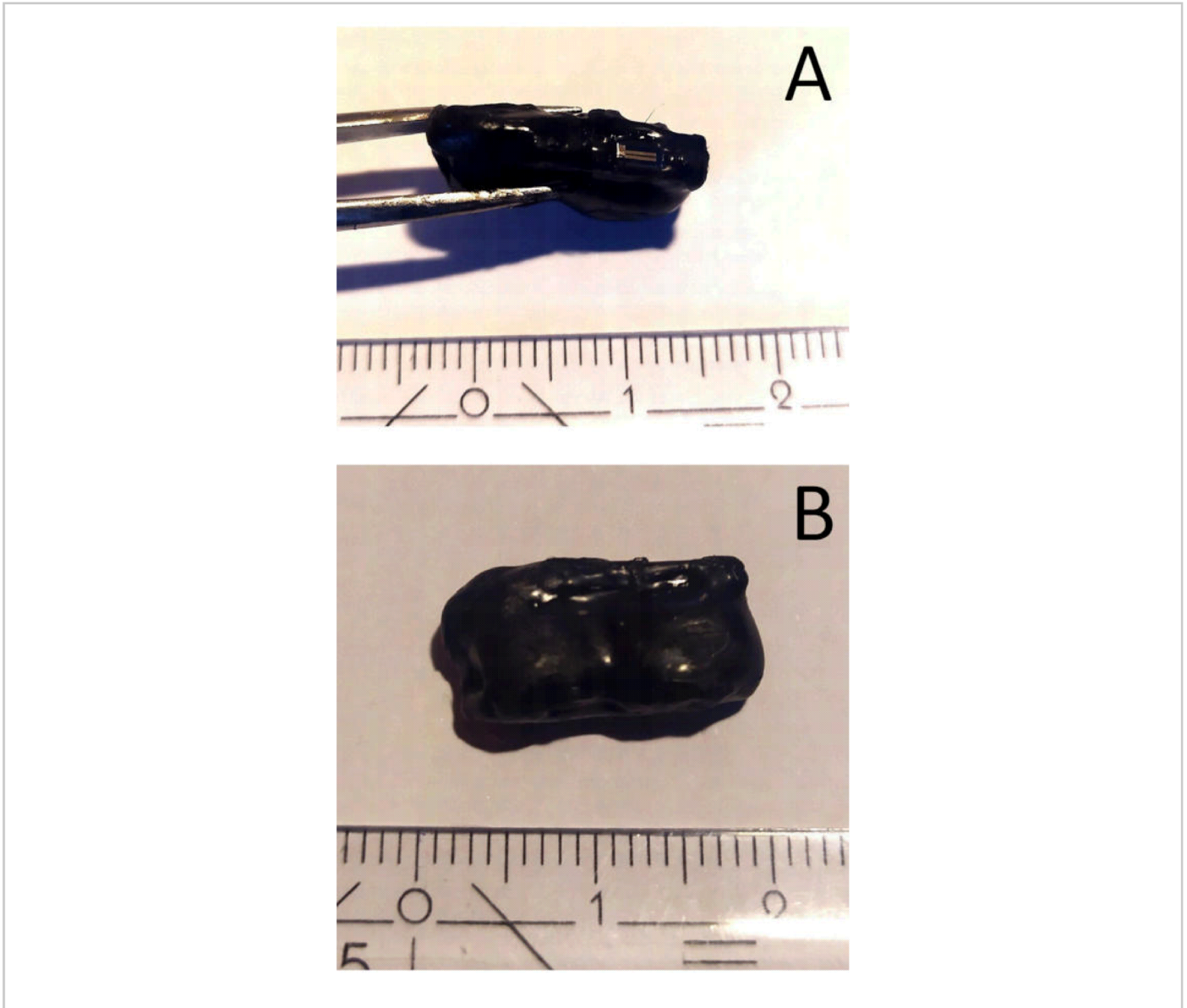


**Figure 6: Placement of battery holders** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

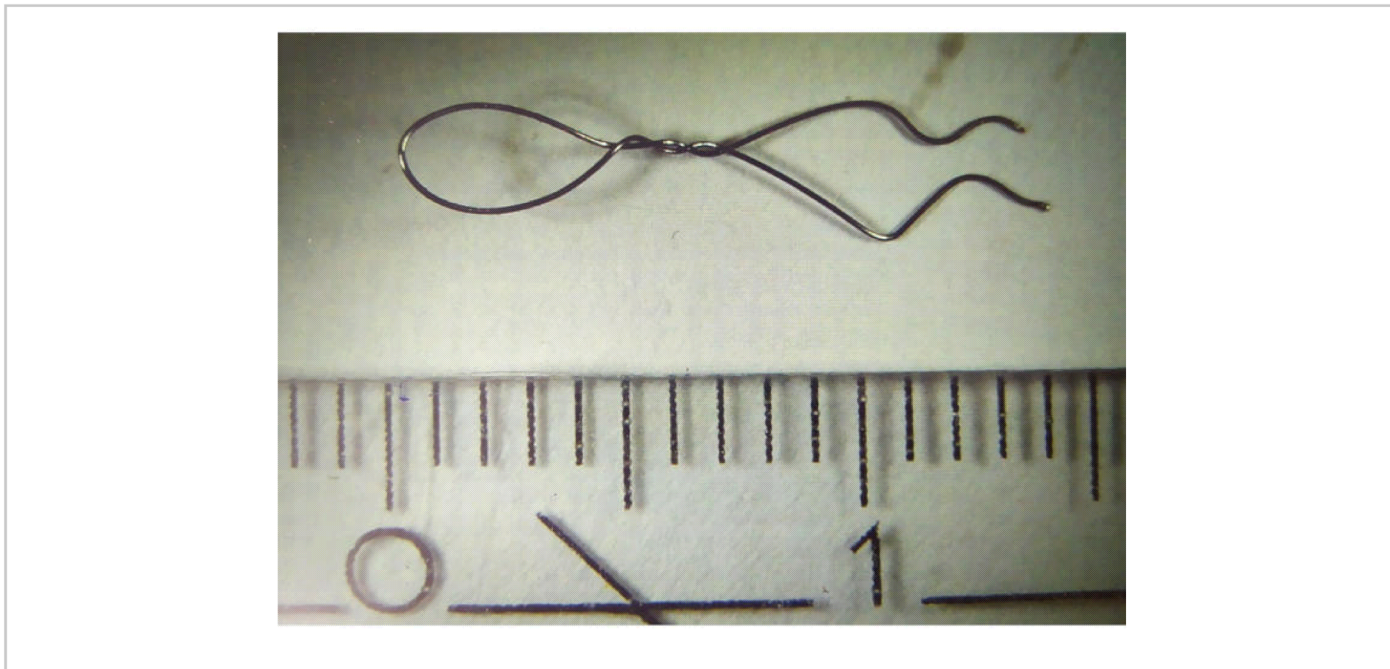


**Figure 7: Soldering of the pH sensor assembly to the electronics** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)





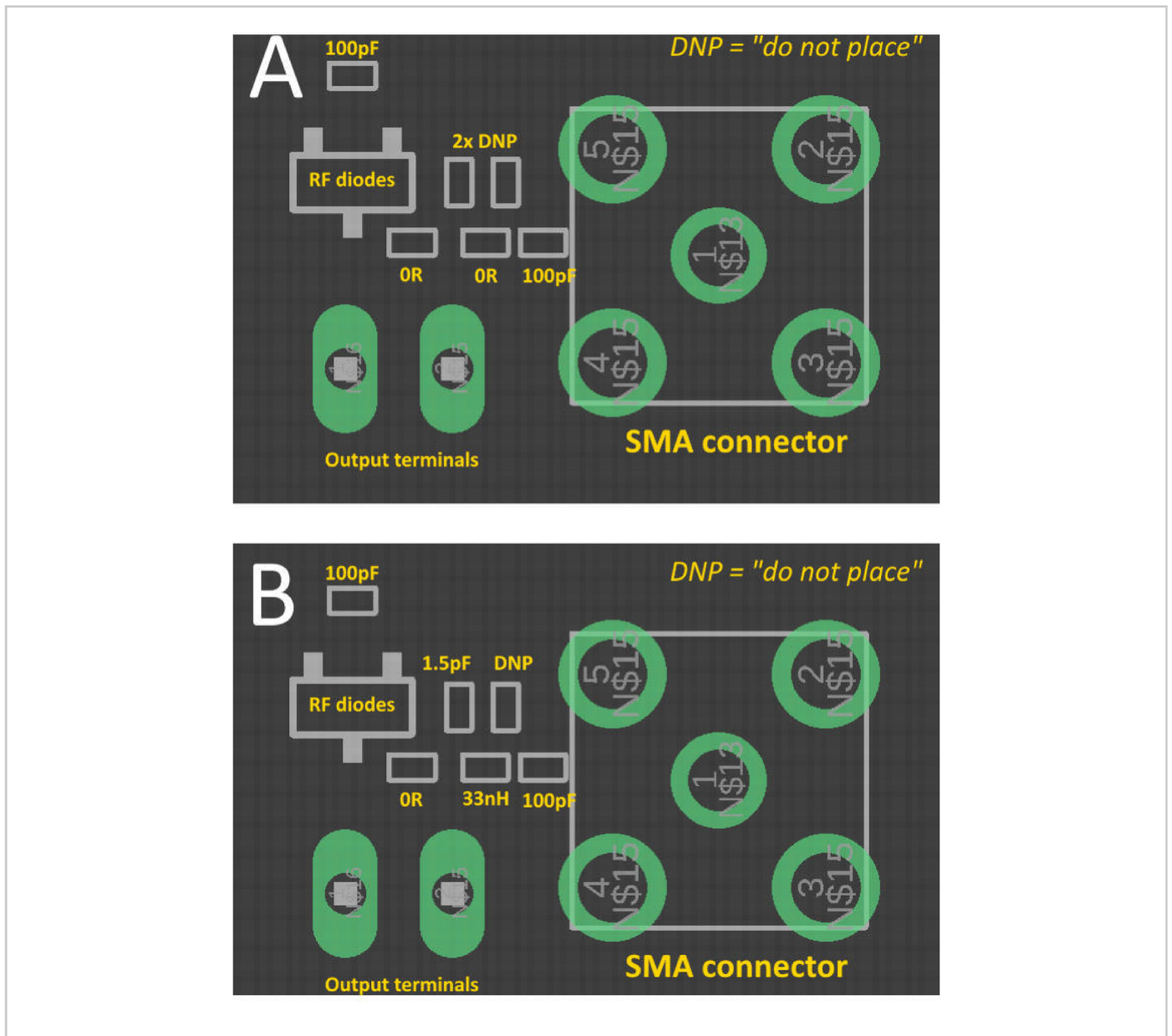
**Figure 8: Finished encapsulated sensor. (A) side view, (B) back view** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



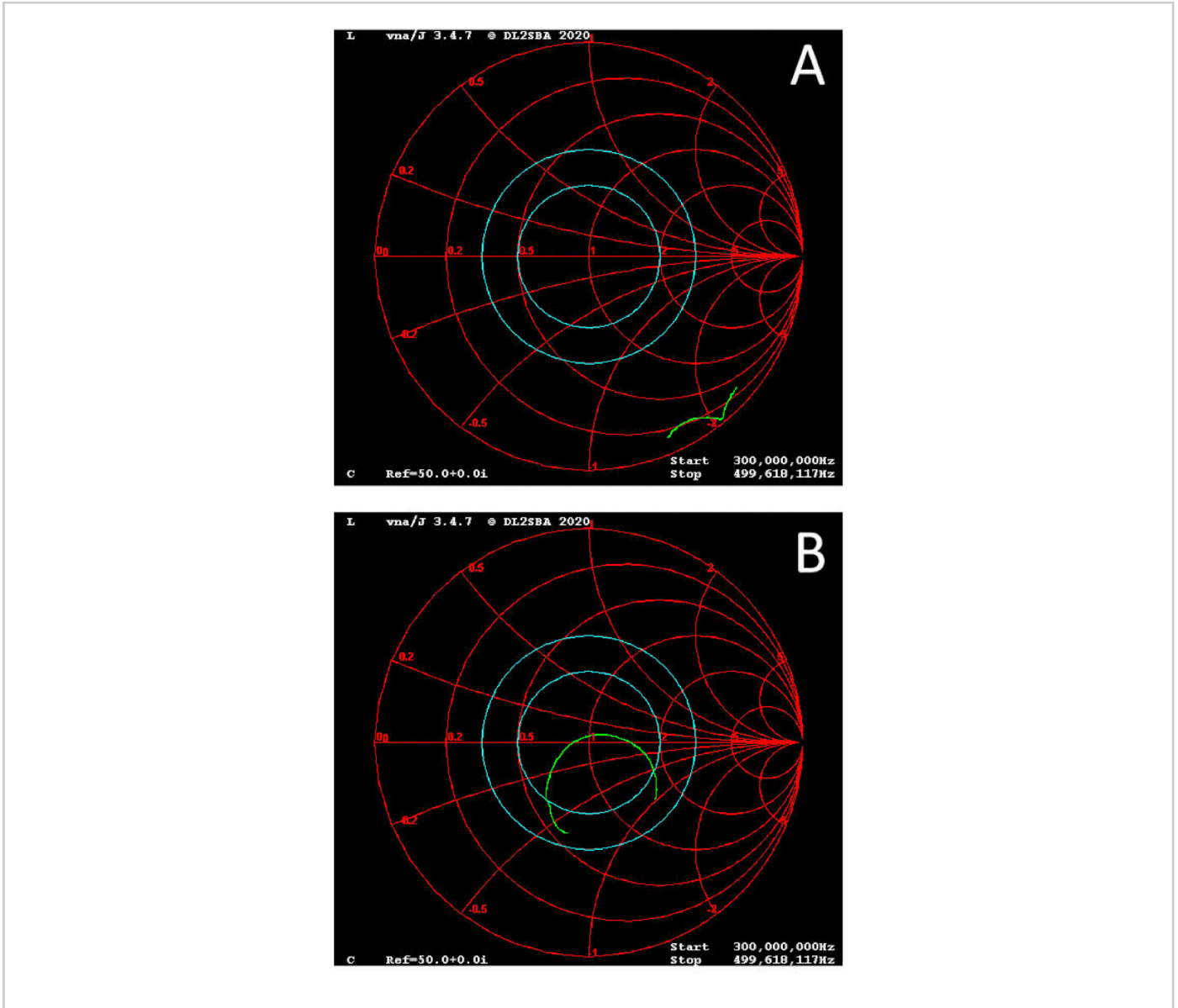
**Figure 9: Titanium wire hook** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 10: Attachment of the wire hook to the implantable device** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 11: Placement diagram for the rectenna. (A)** with matching components, **(B)** without matching components, ready to be matched with a vector network analyzer [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 12: Smith chart.** (A) unmatched rectenna, (B) matched rectenna [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

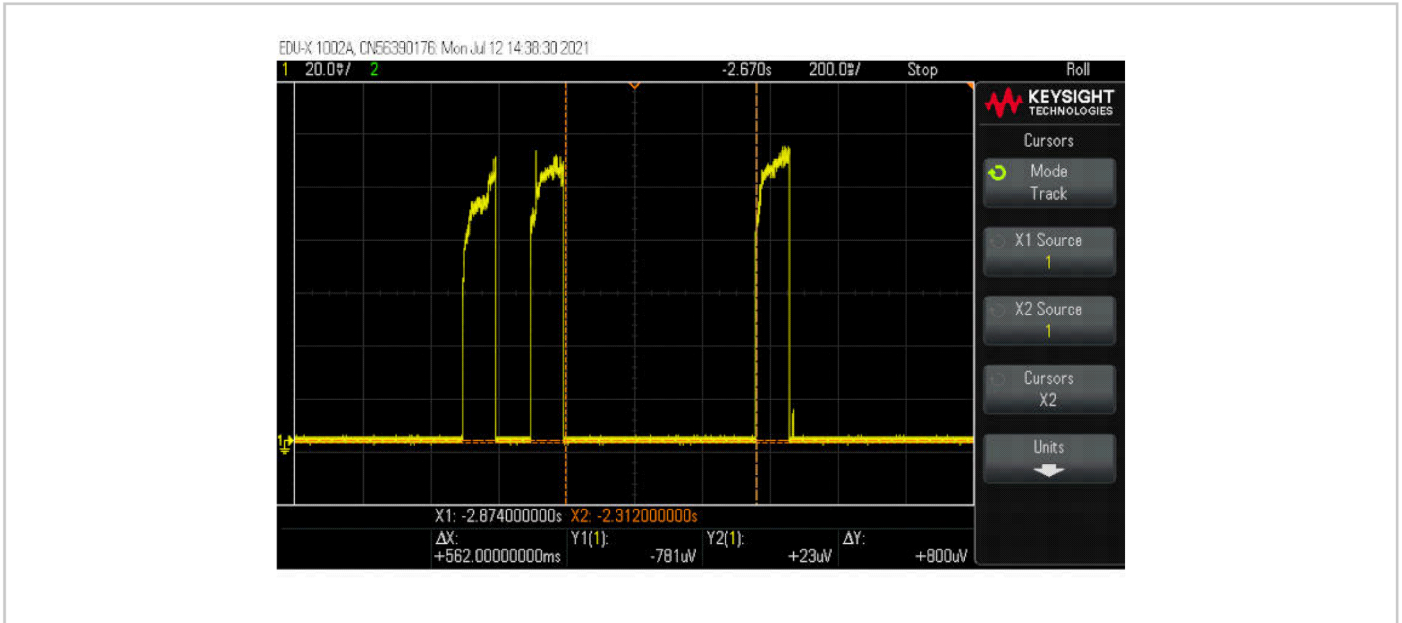
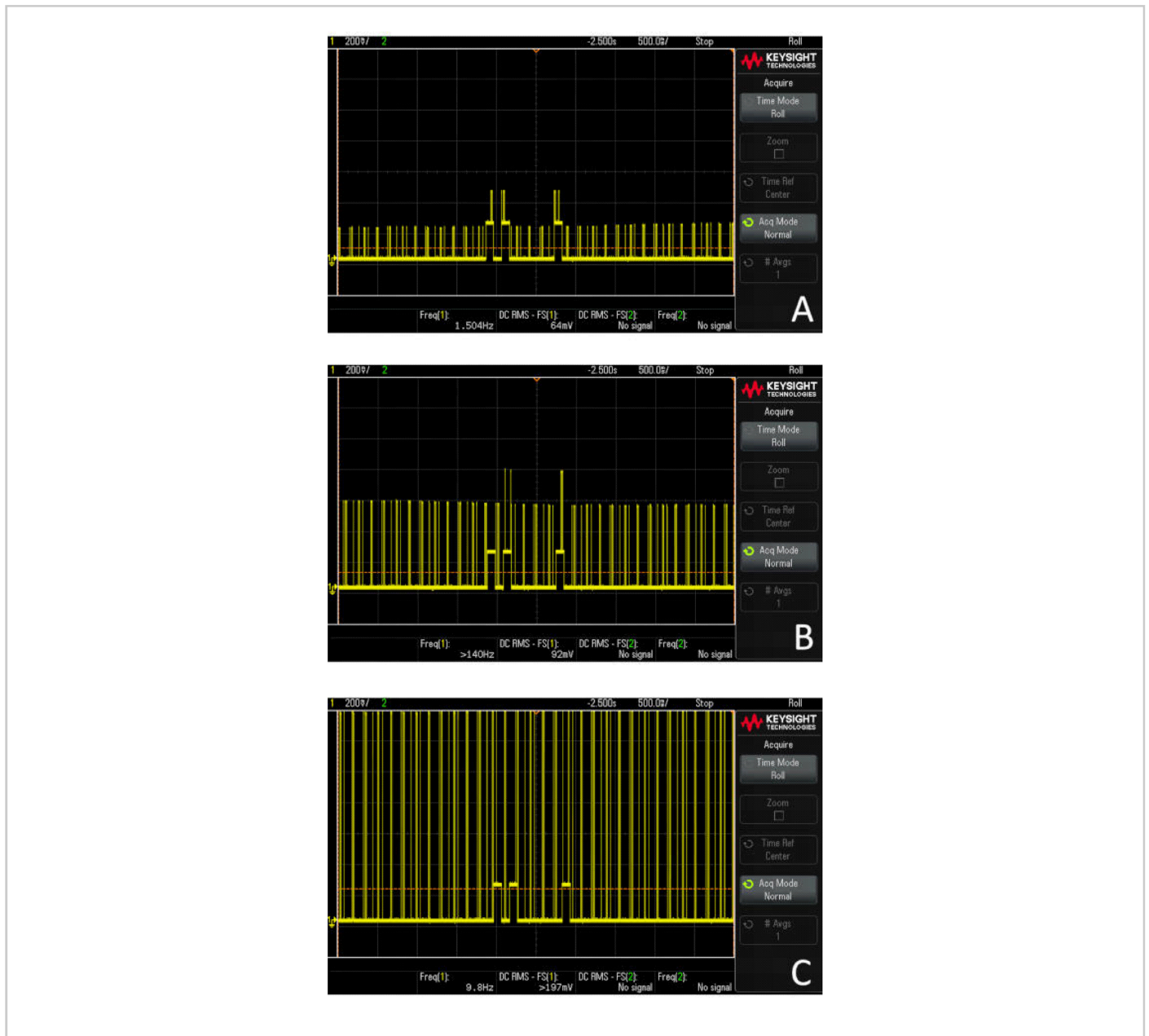
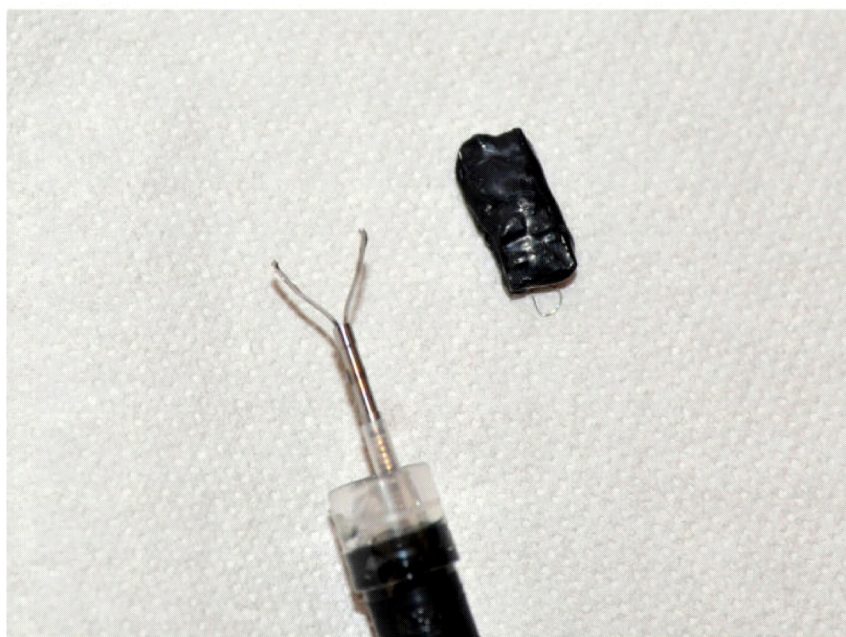


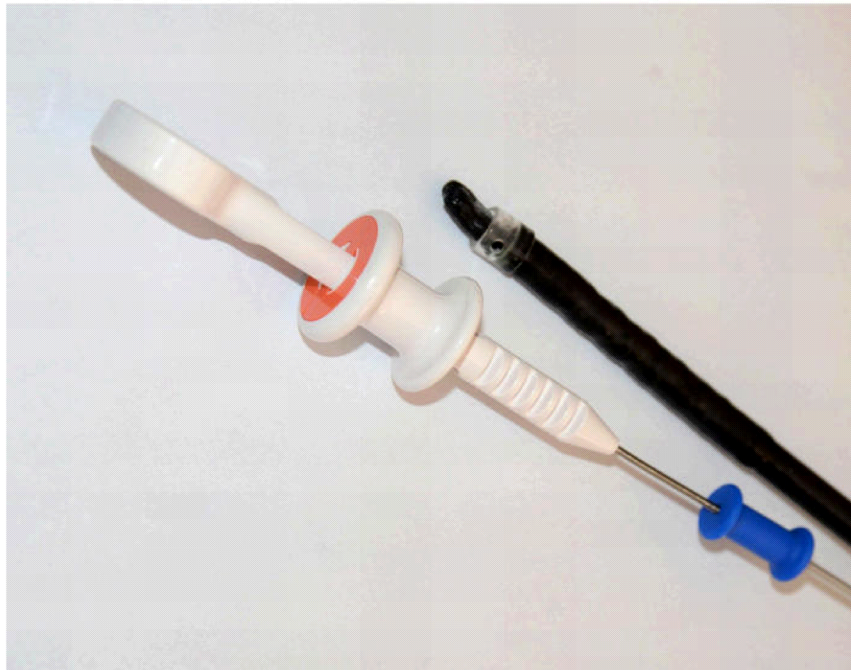
Figure 13: Example response of the rectenna to the incoming data from the sensor [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 14: Example response when in the presence of RF noise (nearby phone with an active GSM call).** (A) 20 cm between the edge of the phone and receiver, (B) 10 cm between the edge of the phone and receiver, (C) 5 cm between the edge of the phone and receiver [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

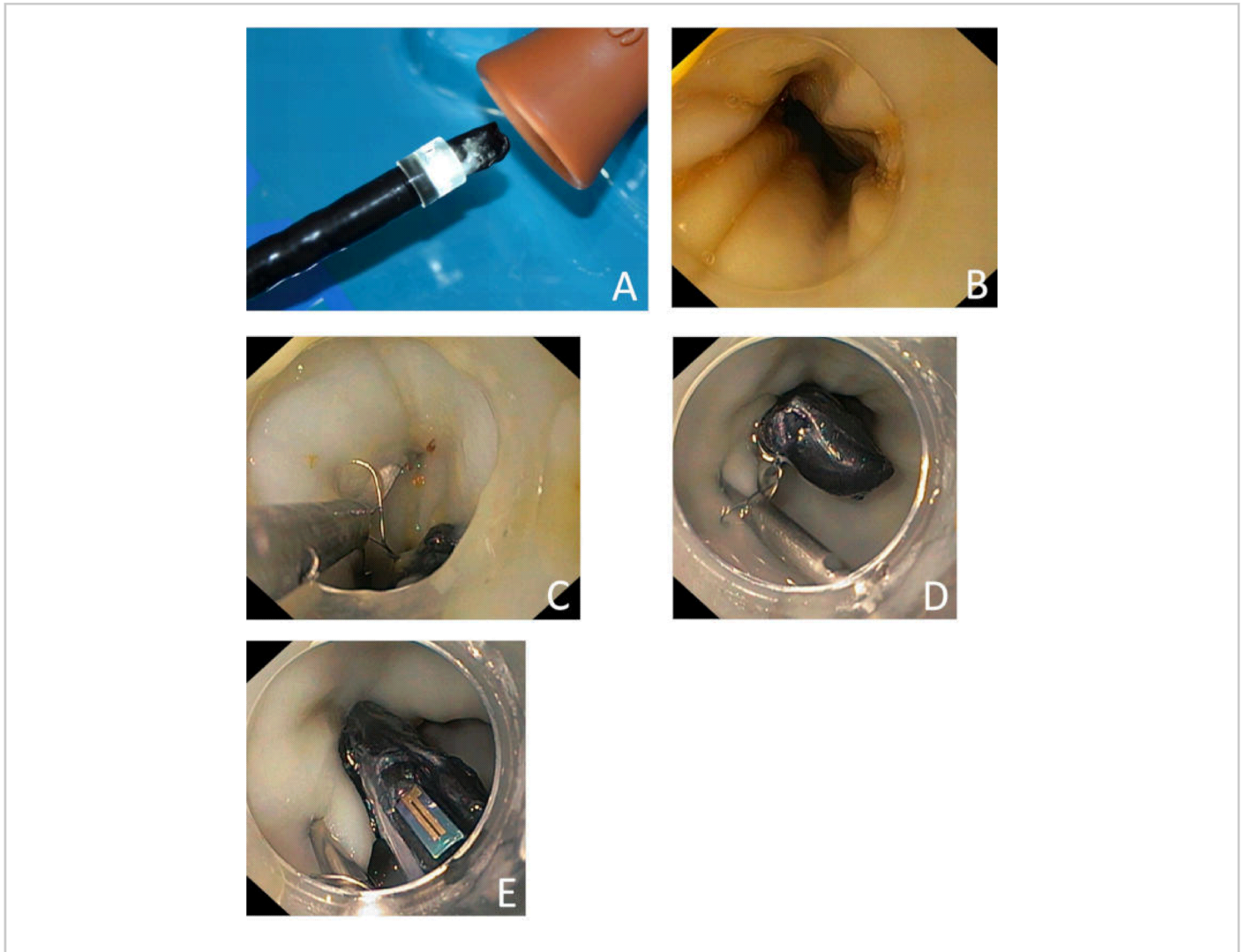


**Figure 15: Picture of the endoscope with hemostatic clip and implantable pH sensor** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 16: Implantable pH sensor grasped with the hemostatic clip in a cap** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

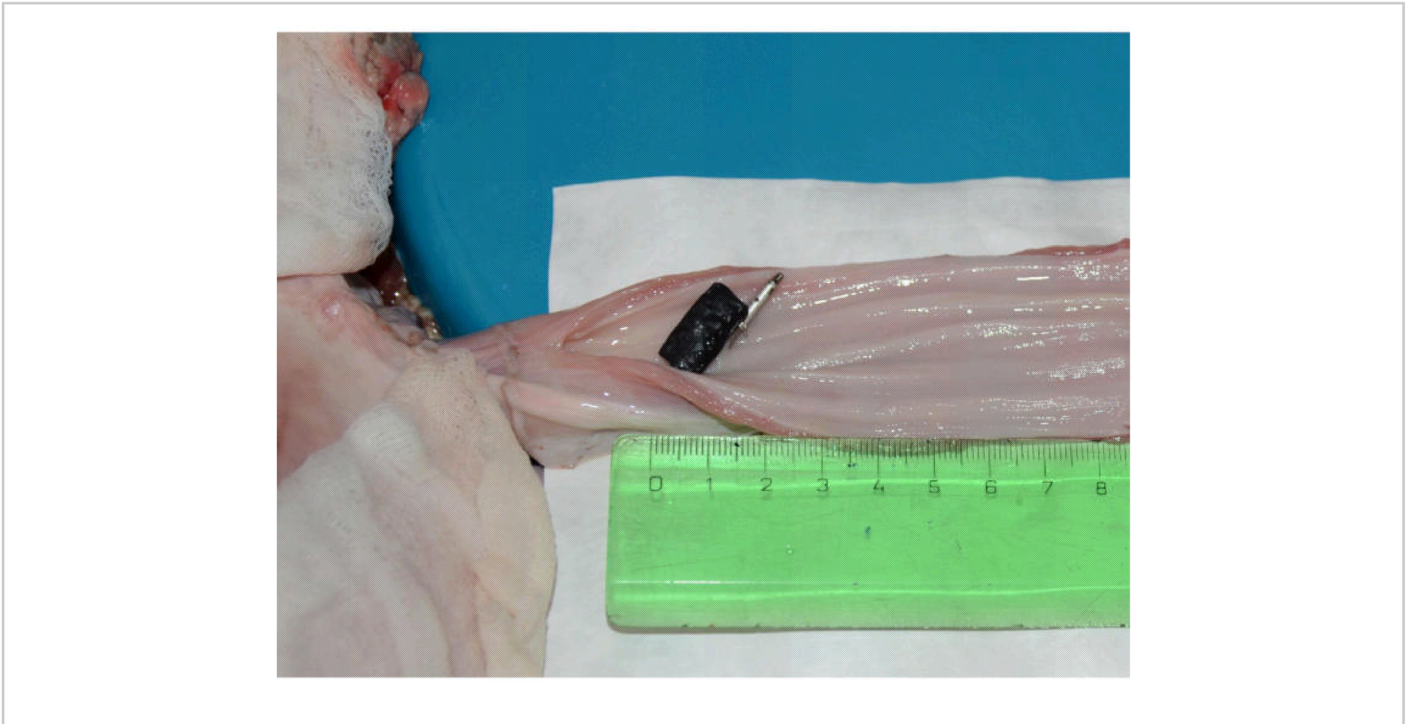




**Figure 17: Implantation of the sensor.** (A) insertion of the endoscope with the implantable pH sensor into the model, (B) place of implantation - 3 cm above the gastroesophageal junction, (C) preparation of the clip placement, (D) the clip was successfully placed, (E) view of the ISFET pH sensor, implanted to the proximity of lower esophageal sphincter [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 18: Injection of the pH buffer solution through the endoscope channel** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 19: Dissected esophagus of the ex vivo model with the implanted sensor** [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Calibration data		
pH value (cal. meter) [-]	Pulse length [ms]	Calc. volt. output [mV]
3.98	400	1200
10.01	710	1510

**Table 1: Example calibration data**

Measured data				
pH value (cal. meter) [-]	Calc. volt. output [mV]	Estimated pH [-]	Error [abs. pH]	Error [%]
0.62	1010	0.28	-0.34	-54%
3.98	1200	3.98	0.00	0%
10.01	1490	9.62	-0.39	-4%
0.62	1020	0.48	-0.14	-23%
7.01	1350	6.90	-0.11	-2%
3.98	1220	4.37	0.39	10%
10.01	1480	9.43	-0.58	-6%
3.98	1210	4.17	0.19	5%
7.01	1350	6.90	-0.11	-2%
		<b>Std. deviation of pH [-]</b>	<b>0.30</b>	
		<b>Mean error [-]</b>	<b>0.25</b>	

**Table 2: Measured data (test with beakers)**

Measured data				
pH value (cal. meter) [-]	Calc. volt. output [mV]	Estimated pH [-]	Error [abs. pH]	Error [%]
0.62	1010	0.28	-0.34	-54%
3.98	1220	4.37	0.39	10%
7.01	1340	6.70	-0.31	-4%
10.01	1520	10.20	0.19	2%
		<b>Std. deviation of pH [-]</b>	<b>0.36</b>	
		<b>Mean error [-]</b>	<b>0.31</b>	

**Table 3: Measured data (test in an *ex vivo* model)**

**Supplemental File 1: spreadsheet.xlsx.** Spreadsheet for calibrating and processing of the data from the sensor [Please click here to download this File.](#)

**Supplemental File 2: pcb1.zip.** Gerber manufacturing data for the implantable device [Please click here to download this File.](#)

**Supplemental File 3: pcb2.zip.** Gerber manufacturing data for the receiver [Please click here to download this File.](#)

**Supplemental File 4: firmware\_10s.zip.** Firmware for the microcontroller with 10 s transmission period [Please click here to download this File.](#)

**Supplemental File 5: firmware\_1min.zip.** Firmware for the microcontroller with 1 min transmission period [Please click here to download this File.](#)

**Supplemental File 6: firmware-test.zip.** Firmware for the microcontroller without 24 h pause before activation [Please click here to download this File.](#)

**Supplemental File 7: Schematic diagram of the electronics** [Please click here to download this File.](#)

## Discussion

This method is suitable for researchers who work on the development of novel active implantable medical devices. It requires a level of proficiency in the manufacturing of electronic prototypes with surface mount components. The critical steps in the protocol are related to the manufacturing of the electronics, especially populating the PCBs, which is prone to operator error in placement and soldering of small components. Then, correct encapsulation is crucial to prolong the lifetime of the device when exposed to moisture and liquids. The implantation method was designed with simplicity in mind. The risk of perforation of the esophagus

or other adverse events during the implantation is minimal. Hemostatic clips are widely used in clinical practice; thus, no special training is needed to perform the implantation.

The device can be easily modified to accompany other sensors with voltage output, i.e., resistive sensors and other ISFET sensors. This gives great flexibility to utilize the whole concept in other areas of research and clinical practice; it is not limited to research of novel methods of treatment of GERD in the case of a pH ISFET sensor.

The constructed device is miniature; it weighs 1.2 g and occupies 60% less volume ( $0.6 \text{ cm}^3$ ) than the closest commercialized implantable pH sensor. Further miniaturization could be achieved by the integration of the ISFET onto the PCB with wires bonded directly to the PCB. This, however, would significantly increase the barrier of entry in terms of required equipment (it would require at least a manual wire bonder). Thus, a more economically viable alternative with a pre-packaged ISFET sensor by the manufacturer was presented.

As for the power source, silver oxide/alkaline/carbon-zinc 1.5 V cells provide better performance and do simplify the circuit design. The use of primary lithium batteries or Li-Ion batteries in this device form factor could lead to potential problems. Small primary lithium batteries have high output resistance, which would cause significant voltage drops, potentially leading to the brown-out of the microcontroller and RF transmitter. Lithium-ion batteries, on the other hand, are incompatible with 3.3 V microcontrollers (their operating voltage is around 3.0-4.2 V), adding complexity to the circuitry (requirement of a regulator or DC/DC step-down converter). For these reasons, two primary 1.5 V button cells are the

best readily available type of battery based on the availability, operating voltage, and sufficiently low output resistance.

The sensor exhibits good accuracy for esophageal pH monitoring; the mean error of pH in an *ex vivo* model was 0.31 with a standard deviation of 0.36. Despite the washing step with deionized water between each buffer addition, a larger deviation in the *ex vivo* model could have been caused by minor mixing of the different buffer solutions in the esophagus, which may have altered the pH of the solutions. The sensitivity of the used ISFET pH sensor almost follows the Nernstian slope ( $-58 \text{ mV/pH}$  for  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) at  $-51.7 \text{ mV/pH}$ . The sensitivity is higher than reported in antimony-based pH sensors for monitoring GERD ( $-45 \text{ mV/pH}$ )<sup>21</sup>.

The delay of 24 h between the insertion of batteries and the start of the wireless transmission routine was introduced to accommodate for encapsulation epoxy curing and instances where the lab for manufacturing of electronics is present at a different location than the endoscopic surgery room. This delay can be altered by modifying the source code and recompiling the firmware.

Depending on the nature of the experiment, which will be done by the researchers, suitable epoxy (cost versus performance) can be chosen. The initial experiments were done with automotive-grade epoxy, which was suitable for initial experiments but not for *in vivo* experiments from the point of biocompatibility. For survival experiments, a medical-grade epoxy that is ISO10993 compliant for long-term contact with mucous membranes shall be chosen. Also, coatings that improve biocompatibility (e.g., PTFE or parylene) can further reduce the rejection rate of the implant and/or inflammation/irritation of the implantation site.

The fully passive rectenna receiver can be improved by biasing the detector diodes to improve the sensitivity<sup>22,23</sup>. In case that improved immunity against electromagnetic interference or RF noise is required, the diode detector can be further modified by adding a highly selective band SAW filter between the RF input and diode detector<sup>24</sup>. If longer-range communication is required, an active ASK receiver (or a software-defined receiver - SDR) can be used. In both cases, the center frequency of the receiver shall be set to 431.73 MHz (frequency of the crystal multiplied by 32 by the PLL in the RF transmitter integrated circuit) and the resolution bandwidth of around 150-250 kHz. The RF output frequency is both voltage and temperature-dependent, and drifts up to 50 kHz from the center frequency were observed during normal operation. The output power in the band can then be monitored and used to decode the pH value according to the protocol. The use of an active receiver is recommended for initial testing. If used inside an implantable device, it comes with an increase in complexity and a major energy penalty. It cannot provide the "zero-power" advantage that the Schottky detector provides.

Today, virtually all active implantable medical devices are not designed with interoperability in mind. Their configuration is done manually by a surgeon or practitioner<sup>25</sup> and does not cooperate. The implantable device presented in this method together with a passive rectenna receiver, shows a way to realize seamless data transfer from a disposable sensor to another implantable device. While commercially available RF modules for implantable devices based on the heterodyne concept exist, the receiver mode is very power demanding<sup>26</sup>. With the presented solution, no active receiver in the neurostimulator is required; the circuit can be built to be completely passive. The main advantages of taking real-time patient data into account are to improve

the efficacy of the therapy and significantly lower the power consumption. For example, in the case of GERD therapy, a pH sensor presented in the manuscript can be implanted above the lower esophageal sphincter after the implantation of the stimulator to automatically adapt the neurostimulation pattern to maximize the effect of the therapy while minimizing the power consumption. As the implantation of the sensor to the inner esophageal wall is prone to dislocation after several days, it makes more sense to design the sensor as a battery-powered one. Thanks to the higher volumetric energy density of primary batteries, the use of a primary power source is superior to a sensor that contains a wireless power receiving circuit, charging coil, and capacitor-based energy storage. The overall efficiency of the wireless charging is also heavily dependent on the spatial orientation of the coils, which would introduce yet another difficulty to the design. Wireless charging provides benefits to the permanently implanted microneurostimulators, i.e., to the submucosa<sup>14</sup>. The battery-powered pH sensor provides a possibility to optimize the energy consumption of such a microneurostimulator. Instead of permanent/regular neurostimulation of the sphincter, the pH sensor can show when the stimulation is needed (i.e., primarily at night and/or which hours of the day) and what power output is the lowest possible to achieve sufficient lower esophageal sphincter pressure. These closed-loop or quasi-closed-loop implantable systems can become a promising alternative to current traditional systems, offering smaller implantable devices with less-invasive implantation and improving the treatment's efficacy.

## Disclosures

The authors have nothing to declare.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Charles University (project GA UK No 176119) for supporting this study. This work was supported by the Charles University research program PROGRES Q 28 (Oncology).

## References

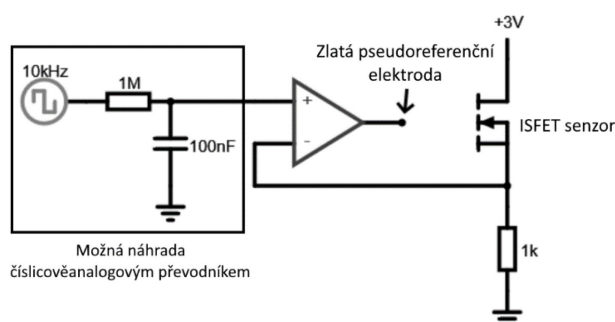
1. El-Serag, H. B., Sweet, S., Winchester, C. C., Dent, J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. **63** (6), 871-880 (2014).
2. Gyawali, C. P. et al. Modern diagnosis of GERD: the Lyon Consensus. *Gut*. **67** (7), 1351-1362 (2018).
3. Cesario, S. et al. Diagnosis of GERD in typical and atypical manifestations. *Acta Biomedica*. **89** (5), 33-39 (2018).
4. Sifrim, D., Gyawali, C. P. Prolonged wireless pH monitoring or 24-hour catheter-based pH impedance monitoring: Who, When, and Why? *American Journal of Gastroenterology*. **115** (8), 1150-1152 (2020).
5. Chae, S., Richter, J. E. Wireless 24, 48, and 96 Hour or impedance or oropharyngeal prolonged pH monitoring: Which test, when, and why for GERD? *Current Gastroenterology Reports*. **20** (11), 52 (2018).
6. Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., Cho, H. -J. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol*. **817**, 39-71 (2014).
7. Sanmiguel, C. P. et al. Effect of electrical stimulation of the LES on LES pressure in a canine model. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **295** (2), G389-G394 (2008).
8. Rodríguez, L. et al. Electrical stimulation therapy of the lower esophageal sphincter is successful in treating GERD: final results of open-label prospective trial. *Surgical Endoscopy*. **27** (4), 1083-1092 (2013).
9. Rinsma, N. F., Bouvy, N. D., Masclee, A. A. M., Conchillo, J. M. Electrical stimulation therapy for gastroesophageal reflux disease. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. **20** (3), 287-293 (2014).
10. Rodríguez, L. et al. Two-year results of intermittent electrical stimulation of the lower esophageal sphincter treatment of gastroesophageal reflux disease. *Surgery*. **157** (3), 556-567 (2015).
11. Kwiatek, M. A., Pandolfino, J. E. The Bravo™ pH capsule system. *Digestive and Liver Disease*. **40** (3), 156-160 (2008).
12. Karamanolis, G. et al. Bravo 48-hour wireless pH monitoring in patients with non-cardiac chest pain. objective gastroesophageal reflux disease parameters predict the responses to proton pump inhibitors. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. **18** (2), 169-173 (2012).
13. Rodríguez, L. et al. Two-year results of intermittent electrical stimulation of the lower esophageal sphincter treatment of gastroesophageal reflux disease. *Surgery (United States)*. **157** (3), 556-567 (2015).
14. Hajer, J., Novák, M., Rosina, J. Wirelessly powered endoscopically implantable devices into the submucosa as the possible treatment of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology Research and Practice*. **2019**, 1-7 (2019).
15. Deb, S. et al. Development of innovative techniques for the endoscopic implantation and securing of a



- novel, wireless, miniature gastrostimulator (with videos). *Gastrointestinal Endoscopy*. **76** (1), 179-184 (2012).
16. Shin, P., Mikolajick, T., Ryssel, H. pH Sensing Properties of ISFETs with LPCVD Silicon Nitride Sensitive-Gate. *The Journal of Electrical Engineering and Information Science*. **2**, 82-87 (1997).
  17. Benhamou, P. -Y. et al. Closed-loop insulin delivery in adults with type 1 diabetes in real-life conditions: a 12-week multicentre, open-label randomised controlled crossover trial. *The Lancet Digital Health*. **1** (1), e17-e25 (2019).
  18. Nikolic, M. et al. Tailored modern GERD therapy - steps towards the development of an aid to guide personalized anti-reflux surgery. *Scientific Reports*. **9** (1), 19174 (2019).
  19. Hajer, J., Novák, M. Autonomous and rechargeable microneurostimulator endoscopically implantable into the submucosa. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. **139**, e57268 (2018).
  20. Pavelka, M., Roth, J. *Parietal Cells Of Stomach: Secretion Of Acid. Functional Ultrastructure*. 202-203, Springer, Vienna (2010).
  21. Jones, R. D., Neuman, M. R., Sanders, G., Cross, F. S. Miniature antimony pH electrodes for measuring gastroesophageal reflux. *The Annals of Thoracic Surgery*. **33** (5), 491-495 (1982).
  22. *Avago technologies designing detectors for RF/ID tags application note 1089*. at <<http://docs.avagotech.com/docs/AV02-1577EN>> (2008).
  23. Waugh, R. W., Buted, R. R. The zero bias schottky diode detector at temperature extremes-problems and solutions. *Proceedings of the WIRELESS Symposium*. 175-183 (1996).
  24. Satoh, Y., Ikata, O., Miyashita, T. *RF SAW filters*. at <<http://www.te.chiba-u.jp/lab/ken/Symp/Symp2001/PAPER/SATOH.PDF>> (2011)
  25. Soffer, E. Effect of electrical stimulation of the lower esophageal sphincter in gastroesophageal reflux disease patients refractory to proton pump inhibitors. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. **7** (1), 145 (2016).
  26. *Microsemi ZL70323 MICS-band RF miniaturized standard implant module (MiniSIM)*. at <[https://www.microsemi.com/document-portal/doc\\_download/135307-zl70323-datasheet](https://www.microsemi.com/document-portal/doc_download/135307-zl70323-datasheet)> (2015).

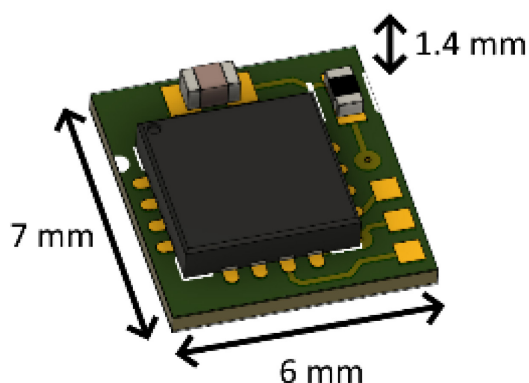
#### 4.9 Návrh miniaturního analogového obvodu pro polovodičové pH senzory

Dnes dostupné mikrokontrolery disponují širokým spektrem analogových a číslicových periferií. Cílem práce bylo prezentovat analogový vyhodnocovací obvod („front-end“), který lze s výjimkou jedné pasivní komponenty (rezistoru) implementovat na miniaturním mikrokontroleru Microchip PIC16LF1704 (4 x 4 x 0,9 mm). Schéma zapojení je na obr. 19.



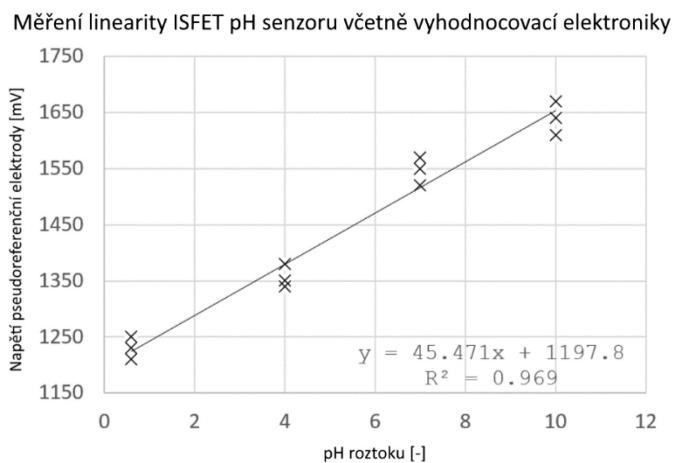
Obr. 19: Schéma zapojení analogového obvodu pH senzoru

Podstatou je kombinace analogově-digitálního (AD) a digitálně-analogového (DA) převodníku, operačního zesilovače, a jedné pasivní komponenty – rezistoru, který je bočníkem pro měření proudu procházejícího ISFET senzorem. DA převodník lze nahradit zapojením s číslicovým výstupním pinem (vývodem), jedním rezistorem a jedním kondenzátorem, které tvoří jednoduchý nízkopásmový filtr prvního řádu. Výsledná velikost celého obvodu pro vyhodnocení včetně procesoru, který je schopen vyhodnocení dat a jejich interpretace, může být zmenšena až na 7 x 6 x 1,4 mm včetně dvouvrstvého plošného spoje o tloušťce 0,4 mm, viz obr. 20.



Obr. 20: Vizualizace velikosti vyhodnocovacího obvodu

Výsledný obvod byl otestován na fyziologických roztocích s různým pH (pH = 0,6; 4,0; 7,0 a 10,0). Naměřená data jsou uvedena na grafu 2. Vzhledem k tomu, že detailní charakterizace senzoru byla provedena výrobcem a hlavním cílem bylo ověřit funkčnost



Graf 2: Měření linearity pH senzoru a vyhodnocovací elektroniky

což prokazuje linearitu vyhodnocovací elektroniky v rozsahu pH, který je relevantní pro zamýšlenou aplikaci (pH 0,6 až 10 pro kyselý i zásaditý reflux).

### **Konferenční příspěvek**

M. NOVÁK, J. ROSINA, J. HAJER: Utilization of implantable ISFET pH sensors for personalized therapy of GERD, GASTRO 2021 PRAGUE, Praha, Česká republika

elektronického obvodu, nikoliv senzoru jako takového, bylo provedeno celkem 12 měření na čtyřech pufrách o různých hodnotách pH (pufrы byly připraveny a následně titrovány roztokem NaOH a HCl při současném měření kalibrovaným pH metrem). Koeficient determinace („R kvadrát“) pro lineární regresní model je 0,969,



# Utilization of implantable ISFET pH sensors for personalized therapy of GERD

**M. NOVÁK<sup>1</sup>, J. ROSINA<sup>1</sup> and J. HAJER<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Medical Biophysics and Medical Informatics, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Internal Medicine, Third Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Královské Vinohrady, Prague, Czech Republic

## INTRODUCTION

Long-term implantable pH monitoring coupled together with neurostimulation therapy is a promising alternative for GERD treatment, where other alternatives fail. There is an opportunity of replacing potentially toxic antimony-based pH sensors with a more biocompatible silicon-chip based ISFET sensors.

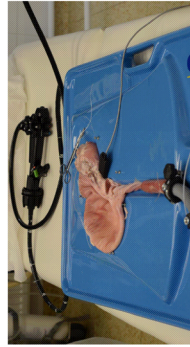
## AIM

Testing of a miniature (3 sqmm) ISFET pH sensor with an integrated on-chip gold reference electrode in an ex-vivo model.  
 Design of an analog front-end for the sensor.  
 Verification of the sensor performance both in physiological and pathological (pH 0.6 – 10) esophagus pH environment.

## METHOD

Design of an analog front-end for the sensor which requires only one microcontroller-integrated operational amplifier and three passive components, without the need for the on-chip digital-to-analog converter.

Verification of the analog front-end and sensor in an ex-vivo model based on a porcine stomach and esophagus.



Ex-vivo model used for the sensor evaluation

## RESULTS

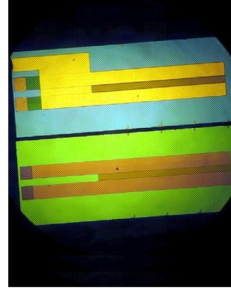
The performance of a miniature ISFET pH sensor with an integrated gold pseudoreference electrode was verified in an ex-vivo mode by injection solutions of varying pH in the esophagus with subsequent DI water clean-up before the next solution.

An analog front-end based on a commercially available PT1616F microcontroller (Microchip) was designed with utilization of only 3 passive components.

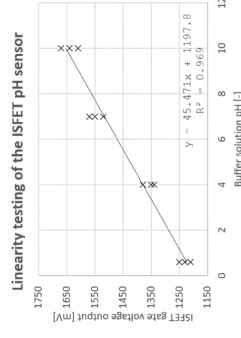
The overall power consumption of the sensor is 31 µW, including the microcontroller core running at 250 kHz.

The sensor is linear in pH range of 0.6 to 10 (R<sup>2</sup> = 0.969).

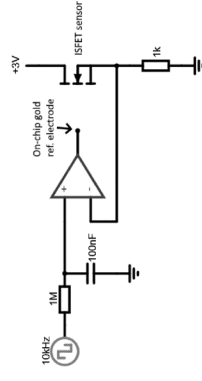
The utilized sensor does not require direct contact of toxic antimony with the tissue and/or bodily fluid, only inert silicon-based chip.



Picture of the miniature silicon-nitride based pH sensor with a gold pseudoreference electrode



Plot of measurement results with the ISFET pH sensor in the ex-vivo model



Schematic diagram of the analog front-end of the ISFET pH sensor. The on-chip reference gold electrode signal, which is driven by the operational amplifier, is used as the sensor output, while the drain-source current is kept constant with a operation amplifier driven feedback loop

## CONCLUSIONS

Miniature ISFET pH sensors with an on-chip gold reference electrode are a promising alternative for minimally obstructive pH monitoring.

The power consumption of these sensors including the analog front-end can be very low (tens of µW).

Integration of these sensors requires only one operational amplifier and two external passive components.

The sensor offered linear performance (12 samples, R<sup>2</sup> = 0.969) in both physiological and pathological pH range in esophagus (0.6 to 10).

## REFERENCES

1. Reich, W.O.A., Redwood, A.J. Chicago. Classification of Esophageal Motility Disorders: Lessons Learned. Curr. Gastroenterol. Rep. 2017, 19, 37. doi:10.1007/s11894-017-0576-7.
2. Fournier, M.; Zoljaj, H.; Elshar, M.J.; Danishi, M. Advances in the Diagnosis of GERD Using the Esophageal pH Monitoring. Gastro-Esophageal Impedance-PH Monitoring, And Antimony-Based pH Sensors. J. Clin. Med. 2016, 6, 1934–1946.
3. Chu, C.; Du, Q.; Li, C.; Zhang, L.; Zhou, X.; Zuo, F.; Zhang, Y.; Li, F.; Xie, G.; Li, Y. Ambulatory 24-Hour Multichannel Intraluminal Impedance-PH Monitoring and High Resolution Esophageal Manometry for the Diagnosis of Esophageal Disease from 0172056.
4. Kovacek, M.A.; Pandolfino, J.E. The Bravo™ PH Capsule System. Dig. Liver Dis. 2008, 40, 156–160. doi:10.1016/j.dld.2007.10.025.
5. Cooper, K.; Harrison, A. The Exposure to and Health Effects of Antimony. Indian J. Physiol. Occup. Physiol. 2007, 41, 137–140.
6. Wilson, E.; Ewald, G. Continuous PH Monitoring with Monocrystalline Antimony Electrodes: Toxicity Considerations from Studies on Heparitized Human Plasma. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1983, 43, 539–542.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Charles University, project GA UK No 1761/19, and by the Charles University research program PROGRES Q 28 (Oncology).

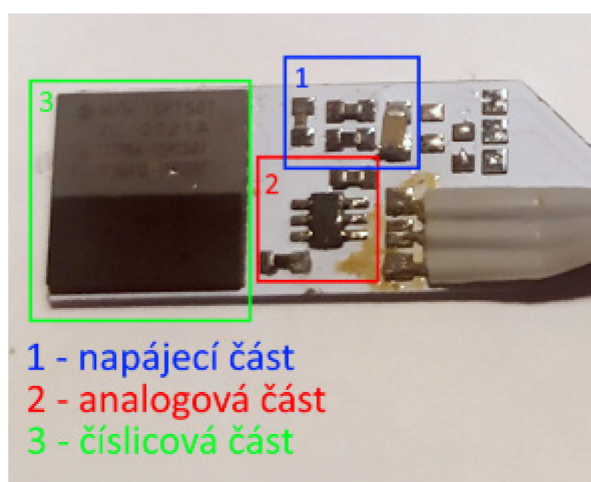
## CONTACT INFORMATION

Mr. Marek Novák, marek.novak@f3.cuni.cz

#### 4.10 Design a konstrukce finálního implantabilního pH senzoru

Konstrukce finálního typu pH senzoru i neurostimulátoru pro zpětnovazebný systém spočívá v použití modulu InsightSIP ISP1507-AL postaveného na mikrokontroleru nRF52810-CAAA, který je opatřen rádiofrekvenčním obvodem pro obousměrnou komunikaci v pásmu 2,4 GHz. Vedle toho obsahuje primární i sekundární krystalový oscilátor, obvod pro impedanční přizpůsobení antény (balun), blokovací kondenzátory a integrovanou anténu. Schéma zapojení pH senzoru je na obr. 24. Zapojení sestává ze tří primárních částí – napájecí, analogové a číslicové.

Napájecí část je tvořena dvěma primárními alkalickými články AG1, které přímo napájejí číslicovou část. Analogová část je tvořena operačním zesilovačem TLV341, který je přímo napájen z mikrokontroleru prostřednictvím jednoho z konfigurovatelných výstupů. Vlastní měření pH zajišťuje zapojení s operačním zesilovačem. Mezi neinvertující vstup a zem je připojen rezistor o odporu 10 kΩ a zároveň je neinvertující vstup připojen na *source* elektrodu (analogická k emitoru bipolárního tranzistoru) ISFET senzoru. *Drain* elektroda (analogická ke kolektoru bipolárního tranzistoru) je připojena na napájecí napětí operačního zesilovače. Zlatá pseudoreferenční elektroda je připojena na výstup operačního zesilovače. Neinvertující vstup operačního zesilovače je připojen na výstup rezistor-kondenzátor (RC) filtru, který filtruje PWM výstup mikrokontroleru, který emuluje DA převodník. Mikrokontroler pravidelně měří napětí baterie, na základě čehož vypočítá střihu pulzně šířkově modulovaného signálu, který po filtraci udržuje konstantní napětí na bočníku a tím konstantní proud ISFET senzorem. Princip funkce obvodu je, že operační zesilovač se z principu své funkce snaží minimalizovat napěťový rozdíl mezi invertujícím a neinvertujícím vstupem, tedy obě napětí se mají ideálně rovnat. Toho dosáhne v případě,



Obr. 21: Rozmístění komponent pH senzoru

kdy je proud procházející 10 kΩ rezistorem roven hodnotě

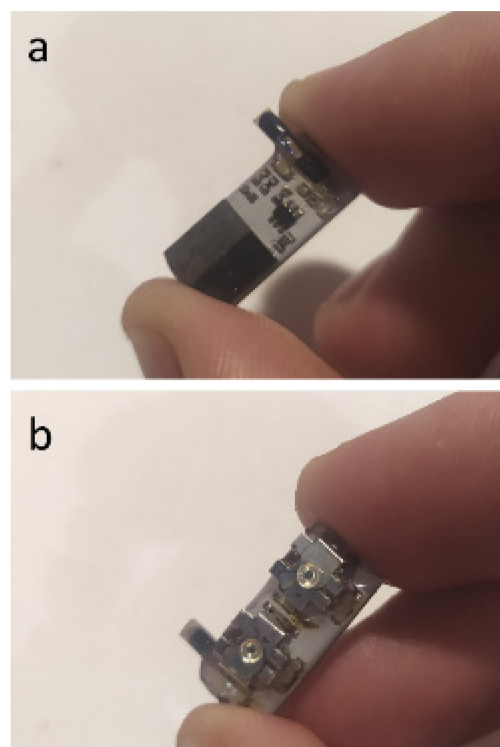
$$I_R = U_{noninv} / R$$



Obr. 22: Způsob připojení pH senzoru k zařízení

potenciál napříč hodnotami pH roztoku tak lze řídit úroveň otevření ISFET. Zároveň s tím je ale díky tomuto napětí lineárně závislé na hodnotě pH roztoku. Je proto přímo měřeno mikrokontrolerem prostřednictvím integrovaného AD převodníku.

Rozmístění komponent je na obr. 21. Modul s mikrokontrolerem je umístěn na levém konci plošného spoje z důvodu minimálního vlivu okolních komponent na integrovanou anténu. Dvě pouzdra pro vložení AG1 baterie jsou na opačné straně plošného spoje. Na tento plošný spoj je rovněž naletován pH senzor, který je na vlastním plošném spoji umístěn z výroby. Způsob připevnění a propojení pH senzoru je znázorněn na obr. 22. Po ověření funkce zařízení a pH senzoru vložení baterie a otestováním pomocí externí stanice a příslušného software (funkce externí stanice a software jsou podrobně popsány v kapitole 4.11) bylo zařízení enkapsulováno v epoxidu. Pohled na sesazené a z jedné strany enkapsulované zařízení je na obr. 23. Poté byla



Obr. 23: Pohled na enkapsulované zařízení – a) pohled na stranu součástek; b) pohled na stranu baterií

znovu ověřena jeho funkčnost ponořením do roztoků s pH o hodnotě 4,0 a 7,0 po dobu jedné hodiny v každém roztoku. Tím byla ověřena vodotěsnost, tedy schopnost zařízení zůstat funkční v agresivním prostředí jícnu, a dále funkčnost pH senzoru, který měnil výstupní hodnotu (napětí pseudoreferenční elektrody).



#### 4.11 Externí stanice a ovládací software

Externí stanice pro řízení neurostimulátoru a příjem dat z neurostimulátoru a pH senzoru byla zrealizovaná pomocí vývojové desky Nordic Semiconductor PCA10056 (obr. 25), která disponuje mikrokontrolerem nRF52840 s komunikačním rozhraním, které převádí mezi univerzální sériovou sběrnici (USB) a univerzální asynchronní sběrnici (UART).



Obr. 25: Vývojová deska PCA10056

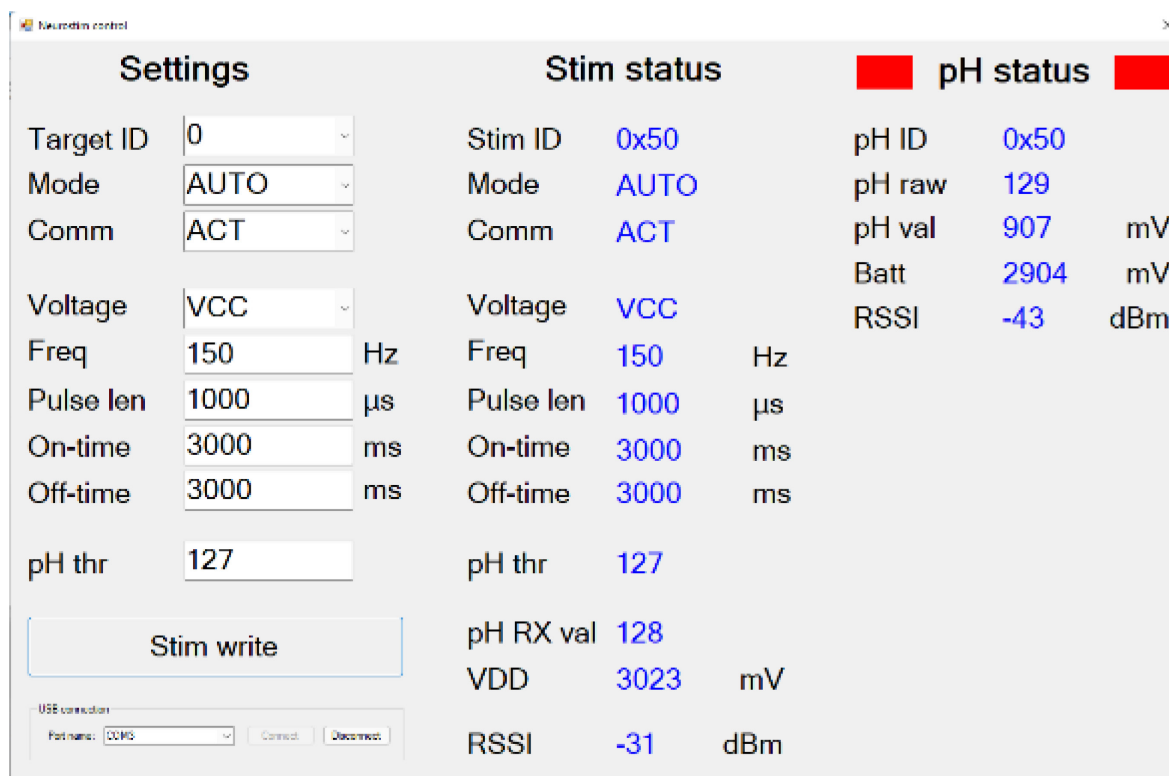
Ovládací software pro externí stanici je naprogramován v jazyce Visual Basic .NET. Ten komunikuje s externí stanicí, která přijímá data z neurostimulátoru a pH senzoru a zároveň s tím zajišťuje konfiguraci neurostimulátoru. Ovládací software (obr. 26) je rozdělen na tři hlavní funkční celky. V levém sloupci uživatel zadává jednotlivé parametry neurostimulace:

- **Target ID:** cílové ID – každý vzorek neurostimulátoru má své unikátní číslo, kterým označí data, která posílá, a pod kterým přijímá konfigurační data
- **Mode:** Operační režim – OFF (neurostimulace je vypnuta), MAN PERM (stimulace probíhá konstantně, bez přestávky – hlavně určeno pro diagnostiku při výrobě), MAN MOD (modulace neurostimulačních pulzů zadanými parametry On-time and Off-time, viz níže) a AUTO (řízení neurostimulace na základě hodnoty pH v jícnu)
- **Comm:** Perioda komunikace neurostimulátoru s okolím, ACT (aktivní režim, komunikuje jednou za dvě sekundy), SLP (režim spánku, pro transport,



komunikuje jednou za 15 sekund) a ULP (nizkopřikonový režim, komunikuje jednou za deset minut, určeno pro dlouhodobé skladování neurostimulátoru)

- **Voltage:** Napětí neurostimulačních pulzů, VDD (napětí baterie) a VCC (12 V ze spínaného zdroje)
- **Freq:** Frekvence neurostimulačních impulzů v Hz
- **Pulse len:** Délka neurostimulačního impulzu v mikrosekundách – „střída“
- **On-time:** Relevantní pro operační režimy AUTO a MAN MOD – délka, po kterou je stimulace aktivní
- **Off-time:** Relevantní pro operační režimy AUTO a MAN MOD – délka, po kterou stimulace není aktivní (pauza mezi jednotlivými neurostimulačními průběhy o délce On-time)
- **pH thr:** Hranice, kdy je v operačním režimu ACT zahájena neurostimulace na základě pH měření



Obr. 26: Ovládací software

Po stisknutí tlačítka Stim write se zadané hodnoty uloží do mezipaměti. Při příštím odeslání dat z neurostimulátoru se pomocí ACK packetu (potvrzení příjmu dat odesláním potvrzovací zprávy – viz podrobný popis komunikačního protokolu v kapitole 4.1) zadané hodnoty zapíší do neurostimulátoru. Střední sloupec je určen pro zobrazení dat, která zasílá neurostimulátor – jedná se o kompletní konfiguraci – a nad rámeček toho je zobrazena hodnota, kterou neurostimulátor přijímá z pH senzoru (pH RX val), pokud je v operačním režimu ACT, napájecí napětí mikrokontroleru (VDD) a ukazatel síly signálu (RSSI) v dBm.

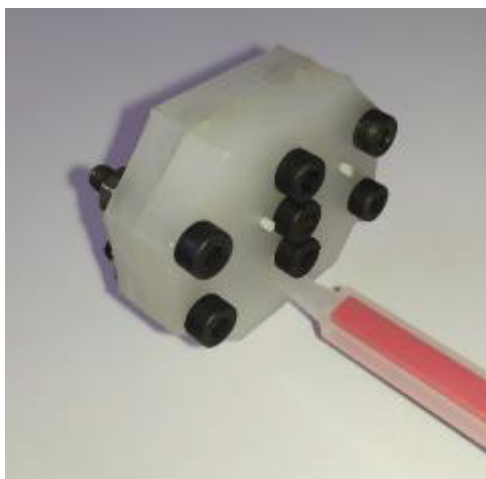
Pravý sloupec zobrazuje data z pH senzoru – konkrétně upravenou hodnotu z AD převodníku podělená tak, aby se hodnota vešla do 8 bitů (0 až 255) z důvodu úspory bezdrátově zasílaných dat, reálnou vypočtenou hodnotu napětí pseudoreferenční elektrody ISFET senzoru v milivoltech a napětí baterie. Software tak v sobě kombinuje možnost zobrazení dat z obou zařízení v reálném čase včetně konfigurace chování neurostimulátoru. Uživatelské rozhraní bylo přizpůsobeno tak (např. velikost textu a barevnost), aby umožnilo snadnou orientaci a čitelnost při provádění *in vitro* a *in vivo* experimentů.

#### ***4.12 Metoda enkapsulace zařízení pomocí epoxidu a P3HT polymeru***

Vzhledem k implantaci neurostimulátoru a pH senzoru bylo nutné vyvinout metodu enkapsulace, která zajistí ochranu elektroniky před agresivním prostředím uvnitř těla a zároveň bude biokompatibilní, tedy bude minimalizováno riziko rejekce implantátu. Dalším požadavkem na metodu byla možnost jejího snadného a rychlého provedení při minimalizaci nákladů.

Prvním krokem byla rešerše vhodných typů epoxidových pryskyřic, které jsou na základě testování výrobcem biokompatibilní, a je možné je vytvrdit při nízké (ideálně pokojové) teplotě. Tento požadavek vyplývá na základě toho, že společně s elektronikou jsou enkapsulovány i baterie, které v nabitém stavu nelze zahřívat na teplotu vyšší než 60 °C (45). Častým problémem dvousložkových epoxidů je nedokonalé smíchání jejich složek nebo nepřesný dávkovací poměr jednotlivých složek, který může vést k neúplné polymerizaci části monomerů a/nebo oligomerů. Monomery a oligomery se přitom vyznačují toxicitou (46). Jednou z příčin je přítomnost vysokoenergetických a tedy nestabilních vazeb, které mají tendenci reagovat s biologickými systémy – u epoxidů je to způsobeno cyklickým etherem o třech atomech, tato část molekuly má vysoké kruhové napětí. U některých epoxidů byla prokázána mutagenita (47). Pro další omezení tohoto rizika byla vyvíjena metoda pokrytí zařízení enkapsulovaného v epoxidu tenkou vrstvou biokompatibilního polymeru, vycházející z existující technologie, která se pro zvýšení biokompatibility implantátů používá, konkrétně pokrytí zařízení tenkou vrstvou Parylenu C. Tento polymer je ale aplikován chemickou depozicí z plynné fáze (CVD) (48), což je metoda, která je pro výrobu jednotek kusů prototypů drahá a zdlouhavá. Cílem výzkumu tedy bylo vyvinout obdobnou technologii, kde by se polymer aplikoval z kapalně fáze (ponořením či nástřikem) s následným odpařením rozpouštědla.

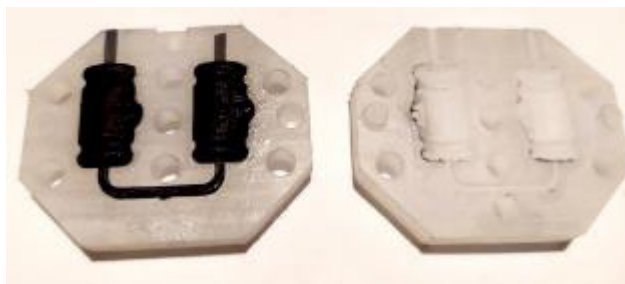
Na základě informací dostupných v datových listech výrobců a dostupnosti na českém trhu byla zvolena epoxidová pryskyřice Loctite EA M-31 CL (Henkel), která je určena pro lepení a kompletaci zdravotnických prostředků. Výrobcem je testována v souladu s ISO10993, výsledná biokompatibilita ovšem závisí i na metodě aplikace a vytvrzení, proto byla po vývoji metody provedena její validace podle této normy (kapitola 4.13).



Obr. 27: Forma pro vstřikování epoxidu

Díky nízké viskozitě epoxidu před vytvrzením připadaly v úvahu dvě metody aplikace – prosté nanesení na plochu, kterou je třeba ochránit před okolními vlivy nebo lití (nízkotlaké vstřikování) do formy. Forma (obr. 27) byla vyrobena frézováním na tříosém obráběcím centru z polyvinylidenfluoridu (PVDF). Vzhledem k tomu, že je použitý epoxid velmi dobrým lepidlem, bylo nutné zvolit materiál o velmi nízké povrchové energii, aby nedošlo k trvalému přilepení formy k prototypu (49), které by vedlo k poškození formy a/nebo výrobku. Další možností byl Teflon neboli polytetrafluorethylen (PTFE), ten nebyl zvolen z důvodu velmi nízké tuhosti a s tím spojené obtížnosti přesného obrobení a možnosti deformace při vstřiku epoxidu. Forma sestává ze dvou částí (obr. 28), které byly navrženy v 3D návrhovém prostředí Autodesk Fusion 360. Tvar dutin ve formě může být přizpůsoben parametrům a velikosti zařízení.

Před vstřikem nezpolymerizované pryskyřice se do formy vloží elektronika a forma se uzavře pomocí postranních šroubů. Poté se do formy vstříkne pryskyřice a při pokojové nebo mírně zvýšené teplotě (max. 50 °C) se vytvrdí.



Obr. 28: Rozložená forma

Po vytvrzení (24 hodin při pokojové teplotě, 5 hodin při 50 °C) je forma rozdělena a výrobky vyjmuty. Pro zvýšení biokompatibility byla vyvinuta metoda následné povrchové úpravy výrobků enkapsulovaných v epoxidu spočívající v pokrytí tenkou vrstvou polymeru P3HT. Roztok polymeru byl připraven rozpuštěním 0,05 g P3HT (výrobce Ossila, regioregulární 94,2 %; průměrná molární hmotnost 36,1 kg/mol) v 24,95 g chloroformu (0,2% roztok) za pokojové teploty pomocí magnetického míchadla. Odpařování chloroformu bylo omezeno přiložením hodinového skla na kádinku. Po rozpuštění byla enkapsulovaná elektronika ponořena do roztoku polymeru po dobu 3 sekund s následným vyjmutím a odpařením rozpouštědla. Díky vysoké těkavosti chloroformu trvá odpaření jednotky sekund a nedochází ke stečení roztoku. Pro odstranění stopových zbytků chloroformu z povrchu je model

implantátu ponořen nejprve do deionizované vody a poté do isopropylalkoholu za intenzivního míchání po dobu 15 min. Nakonec je model sušen v horkovzdušné troubě při 50 °C po dobu jedné hodiny. Výsledná podoba výrobků bez a s nanesením polymeru P3HT je na obr. 29.



*Obr. 29: Enkapsulované vzorky implantabilních zařízení*

### **4.13 Nezávislé posouzení biokompatibility zkonstruovaných zařízení**

*Pozn: Centrum laboratorních činností Státního zdravotního ústavu je akreditováno ČIA podle normy ČSN EN ISO IEC 17025 jako zkušební laboratoř č. 1206, níže uvedené zkoušky na dobrovolnících a zvířatech je Centrum oprávněno vykonávat v rámci akreditace. Zvláštní schválení etické komise pro toto konkrétní hodnocení tak není vyžadováno.*

Nezávislé hodnocení biokompatibility dle platné normy ISO10993 bylo provedeno Státním zdravotním ústavem, protokoly jsou přílohou této disertační práce. Seznam provedených zkoušek:

- Zkouška cytotoxicity dle ČSN EN ISO 10993-5
- Zkouška kožní dráždivosti *in vitro* dle ČSN EN ISO 10993-23
- Zkouška intrakutánní reaktivity dle ČSN EN ISO 10993-23
- Zkouška kožní dráždivosti ve skupině dobrovolníků dle ČSN EN ISO 10993-23
- Zkouška sensibilizace *in chemico* DPRA
- Zkouška sensibilizace *in vitro* Lu Sens
- Zkouška sensibilizace LLNA dle ČSN EN ISO 10993-10

Byly testovány dva vzorky – epoxid Loctite EA M-31 CL vytvrzovaný při zvýšené teplotě v PVDF formě (vzorek „*implant-epoxy*“) a epoxid Loctite EA M-31 CL vytvrzovaný při zvýšené teplotě v PVDF formě s následným pokrytím vrstvou polymeru P3HT vytvořenou z 0,2 % roztoku P3HT v chloroformu s následným odpařením rozpouštědla při atmosférickém tlaku a při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny (vzorek „*implant-p3ht*“).

Test cytotoxicity (Příloha 1) dopadl pro oba vzorky negativně – měření byla provedena v souladu s ISO 10993-5 ve dvojici. Výsledky měření stupně toxicity extraktu na základě výpočtu životnosti kultury (procento přeživších buněk po působení extraktu proti negativní kontrole) na základě fluorimetrické metody jsou (pro 100% extrakt) 76,4 resp. 96,3 % pro vzorek „*implant\_epoxy*“ a 90,5 resp. 90,4 % pro vzorek „*implant\_p3ht*“. Životnost kultury vyšší než 70 % znamená, že zkoušený materiál není cytotoxický.

Test dráždivosti *in vitro* (Příloha 2) byl proveden na extraktech ve fyziologickém roztoku a v sezamovém oleji (polární a nepolární rozpouštědlo). Celkem bylo využito 24 tkání EpiDerm, na kterých byly vzorky testovány jejich inkubací po dobu 18 h v přítomnosti extraktů. Dále byla použita negativní a pozitivní kontrola. Viabilita (životnost) buněk byla

posouzena spektrofotometricky. Oba zkoušené materiály nevykazují dráždivé účinky, životaschopnost tkání po 18 hod. expozice byla pro polární / nepolární rozpouštědlo u vzorku epoxidu 81,9 % / 92,7 % a u vzorku epoxidu s polymerem P3HT 91,8 % / 99,2 %. V této zkoušce vykazovala modifikace povrchu polymerem P3HT lepší vlastnosti z hlediska biokompatibility.

Testy intrakutánní reaktivity (Příloha 3, Příloha 4) byly provedeny na vzorku třech laboratorních králíků pro každý ze zkoumaných materiálů, kdy byly na několika místech provedeny intradermální vpichy extraktu z polárního a nepolárního rozpouštědla. Dle klasifikační tabulky bylo v čase 24, 48 a 72 hodin zhodnoceno, zda se tvoří intradermální reakce na aplikovaný extrakt – erytém, resp. edém. Po trojím vyhodnocení se provede statistické zhodnocení. Ani jeden ze sledovaných vzorků po intradermální injekci extraktu nevyvolal podráždění kůže. Vzorek s aplikovaným polymerem P3HT vykázal při extrakci polárním rozpouštědlem na sledovaném vzorku zvířat lepší vlastnosti než vzorek bez vrstvy polymeru a mírně horší vlastnosti při extrakci nepolárním rozpouštědlem.

Testy kožní dráždivosti na skupině dobrovolníků (Příloha 5, Příloha 6) byly provedeny na vzorku 30 osob přiložením vzorku na gázovém terčíku na horní část paže. Zároveň s tím byla aplikována pozitivní kontrola v podobě 0,4 ml 20% roztoku SDS (dodecylsírán sodný) v uzavřené komůrce. Doba expozice byla postupně prodlužována na intervaly 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h a 4 h. Klasifikace kožních reakcí byla provedena ihned po odstranění krytu, dále 1 h, 2 h, 24 h, 48 h a 72 h po skončení aplikace. Na oba zkoušené materiály v uvedených intervalech nezareagoval nikdo z 30 dobrovolníků, na pozitivní kontrolu 30 z 30 dobrovolníků. Zkoušené materiály tedy nejsou kožním dráždidlem.

Test senzibilizace *in chemico* DPRA (Příloha 7) je založen na principu, kdy se chemická látka, která vyvolává senzibilizaci kůže, kovalentně naváže na kožní protein. Jedná se tedy o kvantifikaci reaktivity testované látky se syntetickým peptidem, který simuluje kožní proteiny. Podle míry reaktivity peptidu s chemikálií se látka zařadí do jedné z kategorií, které rozlišují senzibilizující látky od nesenzibilizujících. Látka je považována jako senzibilizující, pokud je deplece peptidu oproti negativní kontroly vyšší o více než 13,89 %. Naměřená deplece proteinu byla 1,3 % a 1,4 % u vzorků implant-epoxy resp. implant-p3ht. Deplece u negativní kontroly byla 0 %, u pozitivní kontroly (roztok cinnamaldehydu) 88,4 %. Výluhy obou zkoušených materiálů ve fyziologickém roztoku nemají potenciál způsobovat senzibilizaci.

Test sensibilizace *in vitro* metodou LuSens (Příloha 8), který nevyžaduje použití lidských dobrovolníků, je založen na immortalizované (schopné nekonečného dělení jako např. známá linie HeLa) adherentní linii lidských keratocytů, které obsahují reportérový gen pro luciferázu, pod kontrolou antioxidačního elementu z potkanů. Jako reportér aktivity (kožní dráždivosti) je kvantitativně měřena indukce luciferázového genu. Extrakty ze vzorků na základě testování nevykazovaly senzibilizující potenciál a nejsou kožním dráždidlem, ani při měření pomocí *in vitro* metody LuSens.

Test senzibilizace *in vivo* na lokálních lymfatických uzlinách myši (Příloha 9) byl proveden na vzorku 28 laboratorních myši. Základní princip metody spočívá v tom, že senzibilizátory navozují primární proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách v místě aplikace zkoušeného materiálu. Na dorzální plochu obou uší byl zvířatům aplikován roztok v podobě 100% extraktu a dále negativní a pozitivní kontrola. Zvířata ve všech skupinách byla v 8. den testu bez klinického obrazu. Po humanitním utracení bylo provedeno zvážení zvířat a odebrání tkáně ze střední části ušního boltce, ze které byly vyjmuty aurikulární lymfatické uzliny. Ty byly zváženy a poté rozmělněny a po přidání reagensů provedeno měření bioluminiscence, ze které je vypočítán stimulační index, který odpovídá úrovni reakce lymfatických uzlin na potenciální senzibilizující látku. Ani jeden ze zkoušených materiálů nevykazuje potenciál senzibilizace pro kůži.

Na základě provedených zkoušek a rozhodovací matice v normě ISO10993 prošly oba testované materiály hodnoceními, která mají být zvažována u zařízení pro krátkodobou (do 24 hodin) implantaci do tkáně či kosti s výjimkou krve (50). Pro delší časový rámec (do 30 dní nebo nad 30 dní) by bylo nutné provést další zkoušky, např. genotoxicity. Vzhledem k aktuální fázi projektu ale bylo rozhodnuto o tom, že provedení těchto zkoušek by bylo časově a finančně neúčelné. Fakt, že dané materiály nejsou cytotoxické a nevykazují senzibilizační účinky je dostatečným důkazem o tom, že při implantaci do zvířat bude riziko rejekce implantátu způsobené materiálem enkapsulace minimální.



#### **4.14 Ověření funkčnosti zpětnovazebního systému řízení neurostimulace**

V software neurostimulátoru je implementován zpětnovazební řídicí algoritmus, který po jeho aktivaci z externí stanice autonomně upravuje neurostimulační průběhy na základě hodnoty pH, která je v jícnu. Při snížení pH pod stanovený limit (u refluxní choroby jícnu stanoven zpravidla jako snížení pH v oblasti nad horním jícnovým svěračem pod hodnotu 4,0 (51)) je zahájena neurostimulace podle přednastaveného programu. Úpravami software v neurostimulátoru lze dosáhnout různých chování v závislosti na požadavcích, lze implementovat scénář, kdy bude neurostimulace po zjištění snížení pH pod stanovený limit trvat nepřetržitě až do vrácení pH nad hraniční hodnotu (tedy směrem do normálních hodnot pH), případně může být intenzita neurostimulace zesílena. Pro ověření stability software neurostimulátoru byl při testování vypnut watchdog (mechanismus, který při neočekávaném zastavení programu automaticky iniciuje restart) a do úvodní smyčky byl přidán kód, který zaznamenává počet restartů programu (zapiše informaci o restartu při každém spuštění), pokud by nastala situace, kdy při neočekávané situaci dojde k samovolnému restartu programu.

Pro otestování funkčnosti zpětnovazebního řízení systému byl navržen in-vitro experiment provedený se dvěma páry implantabilních zařízení, přičemž každý experiment byl zopakován třikrát. *In vitro* experiment byl proveden z důvodu redukce počtu zvířat, která budou v úvodní testovací fázi celého systému využita. Na začátku byla provedena kalibrace pH senzoru pomocí pufrů o hodnotách pH 4,0 a 10,0. Byla provedena tři měření v každém pufru. Na základě těchto dat byla určena hranice pro počátek refluxní epizody (pH = 4,0 a nižší) a zároveň s tím byla ověřena správnost funkce pH senzoru (reaguje na změny pH). Zprůměrovaná hodnota pro pH = 4,0 se pro další experimentování stala hraniční hodnotou, při které má neurostimulátor zareagovat spuštěním neurostimulace. Při překročení hraniční hodnoty pH směrem k normálním hodnotám má být neurostimulace pozastavena.

Po kalibraci pH senzoru bylo přistoupeno k samotnému experimentu – ten byl proveden v časovém rozmezí 15 minut po kalibraci, 6 hodin po kalibraci a 24 hodin po kalibraci. Byl připraven roztok kyseliny chlorovodíkové o molární koncentraci 0,16 M, která odpovídá fyziologické koncentraci v lidském žaludku (52), čtyři kyselé 0,1 M citrátofosforečnanové pufrů o pH 3,2; 3,6; 4,4 a 4,8 a neutrální 0,1 M citrátofosforečnanový pufr o pH 7,0. Stejný typ pufru byl zvolen z důvodu zamezení nežádoucích reakcí při jejich vzájemném promíchávání (při vyjmutí a vložení implantátu z jednoho pufru do druhého při

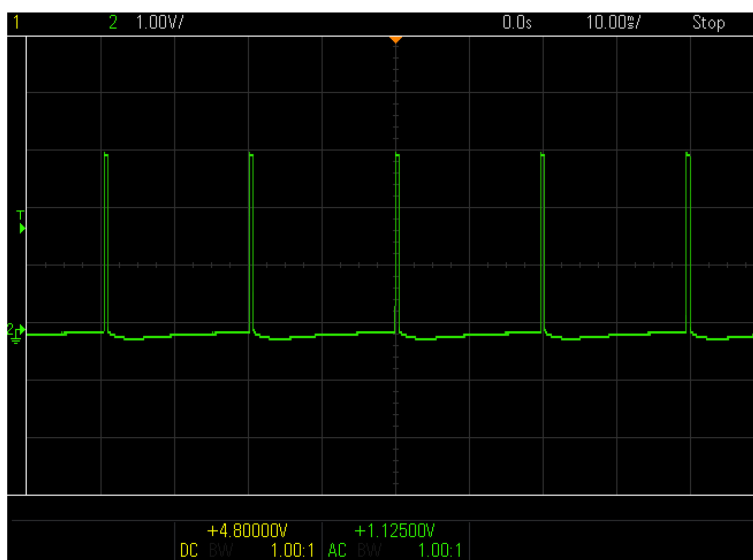
provádění experimentu). Roztoky byly připraveny v kádinkách, objem každého z pufrů a roztoku kyseliny chlorovodíkové byl 200 ml. Cílem pufrů o pH 0,8 (kyselina chlorovodíková) a pH 7,0 bylo otestovat základní funkčnost, cílem ostatních pufrů pak otestovat drift (pozdvolnou ztrátu kalibrace ISFET senzoru) v čase.

Do každé z kádinek byl vložen pH senzor po dobu 5 minut pro ustálení hodnoty. Bylo zaznamenáno, zda neurostimulátor změnil stav neurostimulace (došlo k zahájení nebo pozastavení), a doba od vložení do pufru, za kterou se tato změna stala. Sekvence vložení pH senzoru do roztoků pH o různých hodnotách byla následující:

**7,0 → 0,8 → 4,8 → 4,4 → 3,6 → 3,2 → 0,8 → 3,2 → 3,6 → 4,4 → 4,8 → 7,0 → 3,2 → 4,8**

Tato sekvence byla zopakována celkem dvakrát pro oba senzory. Po skončení experimentu byl pH senzor před provedením dalšího experimentu vložen do neutrálního pufru o pH = 7,0. Příklad naměřených neurostimulačních pulzů při aktivaci zpětnovazebního systému při poklesu pH pod stanovenou úroveň je na obr. 30. Měření neurostimulačních pulzů bylo provedeno osciloskopem za použití osciloskopické sondy s krokosvorkami, která byla připojena k oběma pozlaceným elektrodám na horní straně implantabilního neurostimulátoru.

Statistické zhodnocení měření pH v časovém rozmezí 24 hodin je v tabulce 2. Naměřená data jsou v tabulce 3 na konci této kapitoly. Byla prokázána funkčnost zpětnovazebního systému – neurostimulátor vždy správně reagoval na naměřené hodnoty. U pH senzorů byla v souladu s informacemi výrobce



Obr. 30: Naměřené neurostimulační pulzy

zjištěna mírná ztráta kalibrace senzorů, a to jak ve změně citlivosti (měřené v mV/pH), tak v naměřeném driftu (posun naměřených hodnot v čase vlivem nestability pseudoreferenční elektrody a ISFET senzoru). Naměřený drift odpovídá změně v naměřené hodnotě pH max.

o hodnotu 0,4 až 0,5, což je z hlediska diagnostiky GERD a výkyvů hodnot pH v jícnu nesignifikantní. Tento drift neměl během 24hodinového sledování vliv na korektní funkci zpětné vazby, naměřené hodnoty byly v rozsahu  $\pm 0,4$  pH ve 100 % a 93,3 % případů (senzor 1 resp. senzor 2), v rozsahu  $\pm 0,8$  pH byly naměřené hodnoty ve 100 % sledovaných případů.

*Tabulka 2: Zpracované výsledky z in vitro experimentu*

<b>Parametr</b>	<b>Senzor 1</b>	<b>Senzor 2</b>
Senzitivita - 15 min [mV/pH]	48.9	52.1
Senzitivita - 6 hod [mV/pH]	47.2	51.3
Senzitivita - 24 hod [mV/pH]	48.2	52.5
Drift - 15 min [mV]	---	---
Drift - 6 hod [mV]	-1.5	-14.1
Drift - 24 hod [mV]	-24.9	-20.1

Tabulka 3: Výsledky in vitro experimentu

Experiment 1, stimulátor + senzor 1			
Hraniční hodnota pro pH = 4,0 [-]			101
pH pufry [-]	pH raw [-]	pH výstup [mV]	Stimulace aktivní
čas = 15 min			
7.0	124	871	ne
0.8	83	583	ano
4.8	109	766	ne
4.4	107	752	ne
3.6	99	696	ano
3.2	97	682	ano
0.8	82	576	ano
3.2	98	689	ano
3.6	100	703	ano
4.4	107	752	ne
4.8	110	773	ne
7.0	127	892	ne
3.2	98	689	ano
4.8	109	766	ne
7.0	124	871	ne
čas = 6 hod			
7.0	123	864	ne
0.8	81	569	ano
4.8	108	759	ne
4.4	104	731	ne
3.6	100	703	ano
3.2	97	682	ano
0.8	81	569	ano
3.2	98	689	ano
3.6	100	703	ano
4.4	105	738	ne
4.8	109	766	ne
7.0	123	864	ne
3.2	97	682	ano
4.8	108	759	ne
7.0	122	857	ne
čas = 24 hod			
7.0	120	843	ne
0.8	78	548	ano
4.8	104	731	ne
4.4	102	717	ne
3.6	98	689	ano
3.2	94	661	ano
0.8	78	548	ano
3.2	95	668	ano
3.6	97	682	ano
4.4	102	717	ne
4.8	105	738	ne
7.0	121	850	ne
3.2	94	661	ano
4.8	106	745	ne
7.0	121	850	ne

Experiment 1, stimulátor + senzor 2			
Hraniční hodnota pro pH = 4,0 [-]			106
pH pufry [-]	pH raw [-]	pH výstup [mV]	Stimulace aktivní
čas = 15 min			
7.0	128	899	ne
0.8	83	583	ano
4.8	111	780	ne
4.4	109	766	ne
3.6	103	724	ano
3.2	99	696	ano
0.8	82	576	ano
3.2	99	696	ano
3.6	103	724	ano
4.4	108	759	ne
4.8	112	787	ne
7.0	129	907	ne
3.2	98	689	ano
4.8	112	787	ne
7.0	127	892	ne
čas = 6 hod			
7.0	124	871	ne
0.8	80	562	ano
4.8	109	766	ne
4.4	106	745	ano - hraniční
3.6	100	703	ano
3.2	97	682	ano
0.8	80	562	ano
3.2	97	682	ano
3.6	100	703	ano
4.4	106	745	ano - hraniční
4.8	109	766	ne
7.0	125	878	ne
3.2	97	682	ano
4.8	110	773	ne
7.0	126	885	ne
čas = 24 hod			
7.0	125	878	ne
0.8	79	555	ano
4.8	109	766	ne
4.4	106	745	ano - hraniční
3.6	99	696	ano
3.2	97	682	ano
0.8	80	562	ano
3.2	97	682	ano
3.6	100	703	ano
4.4	104	731	ano
4.8	109	766	ne
7.0	126	885	ne
3.2	97	682	ano
4.8	109	766	ne
7.0	126	885	ne

## **5 Diskuze**

### **5.1 Srovnání s komerčně dostupnými řešeními**

Jediným komerčně dostupným řešením pro neurostimulační léčbu refluxní choroby jícnu byl systém EndoStim, který byl v klinické praxi využíván do roku 2019, kdy bylo ohlášeno ukončení činnosti stejnojmenné společnosti, která daný systém uvedla na trh v EU (53). Dané implantabilní zařízení mělo konstrukci podobnou kardiostimulátorům, sestávalo z podkožně implantovatelného zařízení s drátovými elektrodami, které byly implantovány do oblasti dolního jícnového svěrače. Neurostimulační průběhy se poté konfigurovaly prostřednictvím bezdrátového „programátoru“, který je analogií externí stanice popisované v této práci (7). V oblasti kapslového pH monitoringu je v klinické praxi k dispozici systém Medtronic Bravo (54), jehož funkce je ekvivalentní pH senzoru, který byl vyvinut.

Systém prezentovaný v této práci je inovativní z hlediska velikosti, minimálně invazivní implantovatelnosti v rámci jednoho endoskopického výkonu, biokompatibility a dále z hlediska schopnosti obou zařízení spolupracovat a poskytovat tím personalizovanou léčbu GERD, která může v reálném čase reagovat na změny zdravotního stavu. Z tohoto úhlu pohledu se jedná o jednu z prvních, ne-li první realizací podobného rozsahu.

### **5.2 Zhodnocení výsledků *in-vitro* experimentu**

Provedený *in vitro* experiment prokázal funkčnost zpětné vazby – řízení neurostimulace na základě dat z pH senzoru, přičemž obě zařízení komunikovala bezdrátově. Implantabilní neurostimulátor během 24hodinového testování ve 100 % případů správně interpretoval data z pH senzoru a reagoval adekvátně (aktivací / deaktivací neurostimulace). Senzor v průběhu testování vykázal dostatečnou stabilitu pro zjištění přítomnosti refluxátu v jícnu (maximální odchylka byla kolem 0,4 až 0,5 pH od skutečné hodnoty).

### **5.3 Zhodnocení výsledků nezávislého posouzení biokompatibility**

Biokompatibilita výsledných výrobků byla posouzena v souladu s normou ČSN EN ISO 10993. Konkrétně byla zhodnocena cytotoxicita, senzibilizace a intrakutánní reaktivita. Všechny tyto zkoušky dopadly negativně (tedy nebyla zjištěna toxicita nebo dráždivost vzorku). Z hlediska hodnocení bezpečnosti AIMD se zhodnocuje, na jakou tkáň má zdravotnický prostředek vliv a délka kontaktu. Na základě toho je definován rozsah zkoušek dle rozhodovací matice v ČSN EN ISO 10993-1 (50).

*Poznámka – rozhodovací matice není otištěna z důvodu toho, že české technické normy ani jejich úseky nelze na základě § 5 odst. 8 zákona 22/1997 Sb. o technických požadavcích na výrobky rozmnožovat a/nebo rozšiřovat bez souhlasu České agentury pro standardizaci.*

Vyvinuté materiály a metoda enkapsulace jsou již nyní dle požadavků normy a výsledků provedených zkoušek vyhodnoceny jako vhodné pro výrobu zařízení pro krátkodobou implantaci (do 24 hodin) do tkáně či kosti. Pro delší časový rámec (do 30 dní nebo nad 30 dní) by bylo nutné provést další zkoušky, např. genotoxicity. Pro aktuální fázi projektu je nicméně nejdůležitější fakt, že dané materiály nejsou cytotoxické a nevykazují senzibilizační účinky. Riziko rejekce implantátu při dlouhodobějších experimentech na zvířatech je tak minimalizováno a jedná se o výrazný posun dopředu oproti enkapsulační metodě, která se používala při první implantaci do prasete (kapitola 4.4).

#### **5.4 Limitace řešení, spolehlivost**

*In vitro* experiment prokázal spolehlivost navrženého hardware i stabilitu software v implantabilních zařízeních i v externí stanici. Typická výdrž baterie neurostimulátoru bez generování neurostimulačních pulzů je 5 dní v SLP režimu (odeslání telemetrických dat jednou za 15 sekund) a 30 dní v ULP režimu (odeslání telemetrických dat jednou za 10 minut). Výdrž baterie implantabilního pH senzoru je 7 dní, což je doba, která v drtivé většině případů překročí typickou dobu retence pH senzoru ve stěně jícnu při upevnění pomocí hemostatického klipu, která se udává v jednotkách dní (23). V průběhu testování finálního systému nedošlo k selhání hardware nebo software.

Hlavní limitací systému je v současné době omezený napěťový rozsah generování neurostimulačních impulzů (u amplitudy volba dvou možností – využití napětí baterie a možnost generování napětí 12 V pomocí spínaného zdroje) a absence režimu s regulací amplitudy proudu, což je limitováno pouze ručním osazením komponent. Použitím miniaturnější technologie zejména pro pasivní součástky a strojovým osazením lze dosáhnout implementace variabilního proudového zdroje, který bude rozsahem generovaných neurostimulačních impulzů zcela ekvivalentní řešení EndoStim. Práce se primárně soustředila na vytvoření robustní platformy pro vývoj řešení pro léčbu refluxní choroby jícnu, což se podařilo, a v rámci další práce lze modul proudového zdroje doimplementovat.

## **5.5 *Budoucí práce***

Na výsledky této práce bude navázáno provedením dalších animálních experimentů, které budou zaměřeny na nalezení optimální frekvence neurostimulačních pulzů a dalších parametrů pro maximalizaci léčebného účinku při léčbě GERD, a to s objektivním měřením kontrakce dolního jícnového svěrače high-resolution manometrickou sondou. Z hlediska návrhu hardware bude provedena další miniaturizace, která bude spočívat ve strojovém osazení komponent a s tím spojeného použití menších komponent. Dále bude místo použitého Bluetooth modulu, který v sobě integruje mikrokontroler, zdroje hodinové frekvence (ve formě krystalů) a anténu, umístěn čip s mikrokontrolerem přímo na hlavní spoj s vlastním návrhem antény, což umožní její impedanční přizpůsobení pro prostředí uvnitř těla a tím zlepšení dosahu bezdrátové komunikace.

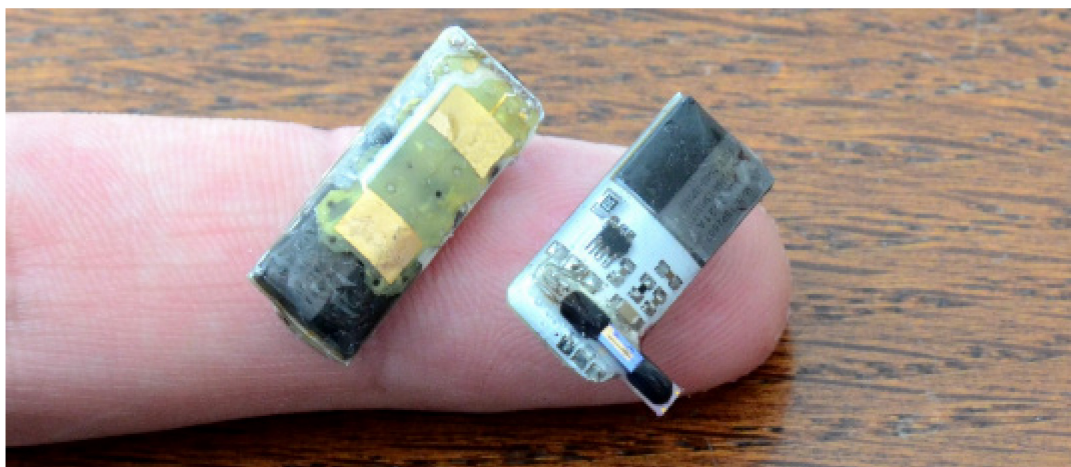
## 6 Závěr

Cílem práce bylo zkonstruovat systém pro léčbu refluxní choroby jícnu pomocí neurostimulace dolního jícnového svěrače. Tento cíl se podařilo splnit konstrukcí systému prototypů implantabilních zdravotnických prostředků, které spolu komunikují prostřednictvím na míru vyvinutého bezdrátového komunikačního rozhraní. Tento systém je bezdrátově konfigurovatelný prostřednictvím externího zařízení, kdy lze nastavovat chování zpětné vazby a napěťový průběh stimulačních impulzů.

Funkčnost systému (obr. 31) včetně zpětnovazebního řízení byla úspěšně otestována *in vitro* a bylo provedeno také několik experimentálních implantací tvarově obdobných funkčních prototypů do *ex vivo* modelu (jícen a žaludek prasete) i živých zvířat. Použitá metoda submukozního pocketingu společně s konstrukcí prototypů implantabilních zařízení se ukázala být jako spolehlivá a bezpečná.

Biokompatibilita materiálů používaných při konstrukci daného řešení byla nezávisle ověřena Státním zdravotním ústavem a při testu cytotoxicity a kožní dráždivosti nebyla ani v jednom případě (celkem byly provedeny tři testy – *in vivo* na dobrovolnících, *in vivo* na buňkách a *in vitro* pomocí metody LuSens). Souběžně s tím byla vyvinuta metoda enkapsulace libovolných prototypů implantabilních zařízení, kterou lze jednoduše použít i pro řešení dalších výzkumných a vývojových projektů.

Na výsledky práce může být v budoucnu navázáno provedením animálních experimentů, které se budou zaměřovat na nalezení optimálních průběhů neurostimulačních impulzů a vhodné nastavení zpětnovazebního řízení pro maximalizaci léčebného účinku při minimalizaci případných nežádoucích účinků a spotřeby energie neurostimulátoru.



Obr. 31: Pohled na vyvinutý systém – neurostimulátor vlevo, pH senzor vpravo



## 7 Seznam literatury

1. RIORDAN, Michael, Lillian HODDESON a Conyers HERRING. The invention of the transistor. *Reviews of Modern Physics* [online]. 1999, **71**(SUPPL. 2). ISSN 00346861. Dostupné z: doi:10.1103/revmodphys.71.s336
2. MACKAY, R. Stuart. Radio Telemetry from Within the Human Body. *IRE Transactions on Medical Electronics* [online]. 1959, **ME-6**(2), 100–105. ISSN 0097-1049. Dostupné z: doi:10.1109/IRET-ME.1959.5007926
3. LOZANO, Andres M., Nir LIPSMAN, Hagai BERGMAN, Peter BROWN, Stephan CHABARDES, Jin Woo CHANG, Keith MATTHEWS, Cameron C. MCINTYRE, Thomas E. SCHLAEPFER, Michael SCHULDER, Yasin TEMEL, Jens VOLKMANN a Joachim K. KRAUSS. Deep brain stimulation: current challenges and future directions. *Nature Reviews Neurology* [online]. 2019, **15**(3), 148–160. ISSN 17594766. Dostupné z: doi:10.1038/s41582-018-0128-2
4. HELM, Standiford, Nikita SHIRSAT, Aaron CALODNEY, Alaa ABD-ELSAYED, David KLOTH, Amol SOIN, Shalini SHAH a Andrea TRESOT. Peripheral Nerve Stimulation for Chronic Pain: A Systematic Review of Effectiveness and Safety. *Pain and Therapy* [online]. 2021, **10**(2), 985–1002. ISSN 2193651X. Dostupné z: doi:10.1007/s40122-021-00306-4
5. SOFFER, Edy E. Gastric Electrical Stimulation for Gastroparesis. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* [online]. 2012, **18**(2), 131–137. ISSN 2093-0879. Dostupné z: doi:10.5056/jnm.2012.18.2.131
6. MCCALLUM, Richard W., Zhiyue LIN, Jameson FORSTER, Katherine ROESER, Qingjiang HOU a Irene SAROSIEK. Gastric Electrical Stimulation Improves Outcomes of Patients With Gastroparesis for up to 10 Years. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2011, **9**(4), 314-319.e1. ISSN 15423565. Dostupné z: doi:10.1016/j.cgh.2010.12.013
7. RODRÍGUEZ, Leonardo, Patricia RODRIGUEZ, Beatriz GÓMEZ, Juan C. AYALA, Danny OXENBERG, Alberto PEREZ-CASTILLA, Manoel G. NETTO, Edy SOFFER, W. John BOSCARDIN a Michael D. CROWELL. Two-year results of intermittent electrical stimulation of the lower esophageal sphincter treatment of gastroesophageal reflux disease. *Surgery (United States)* [online]. 2015, **157**(3), 556–567. ISSN 15327361. Dostupné z: doi:10.1016/j.surg.2014.10.012
8. SOFFER, Edy. Effect of electrical stimulation of the lower esophageal sphincter in gastroesophageal reflux disease patients refractory to proton pump inhibitors. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2016, **7**(1), 145. ISSN 2150-5349. Dostupné z: doi:10.4292/wjgpt.v7.i1.145
9. CESARIO, Silvia, Serena SCIDA, Chiara MIRAGLIA, Alberto BARCHI, Antonio NOUVENNE, Gioacchino LEANDRO, Tiziana MESCHI, Gian Luigi DE' ANGELIS a Francesco DI MARIO. Diagnosis of GERD in typical and atypical manifestations. *Acta Biomedica* [online]. 2018, **89**(5), 33–39. ISSN 25316745. Dostupné z: doi:10.23750/abm.v89i8-S.7963
10. HINDY, Pierre, Jinwha HONG, Yvette LAM-TSAI a Frank GRESS. A comprehensive review of esophageal stents. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*. 2012, **10**(8), 526–534. ISSN 15430790.

11. PETER, Shajan a Klaus MÖNKEMÜLLER. Ablative Endoscopic Therapies for Barrett's-Esophagus-Related Neoplasia. *Gastroenterology Clinics of North America* [online]. 2015, **44**(2), 337–353. ISSN 15581942. Dostupné z: doi:10.1016/j.gtc.2015.02.014
12. PORTALE, Giuseppe, Jeffrey A. HAGEN, Jeffrey H. PETERS, Linda S. CHAN, Steven R. DEMEESTER, Tasha A.K. GANDAMIHARDJA a Tom R. DEMEESTER. Modern 5-Year Survival of Resectable Esophageal Adenocarcinoma: Single Institution Experience with 263 Patients. *Journal of the American College of Surgeons* [online]. 2006, **202**(4), 588–596. ISSN 10727515. Dostupné z: doi:10.1016/j.jamcollsurg.2005.12.022
13. TUSTUMI, Francisco, Cintia Mayumi Sakurai KIMURA, Flavio Roberto TAKEDA, Rodrigo Hideki UEMA, Rubens Antônio Aissar SALUM, Ulysses RIBEIRO-JUNIOR a Ivan CECCONELLO. PROGNOSTIC FACTORS AND SURVIVAL ANALYSIS IN ESOPHAGEAL CARCINOMA. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)* [online]. 2016, **29**(3), 138–141. ISSN 0102-6720. Dostupné z: doi:10.1590/0102-6720201600030003
14. SHAH, Nirali a Sandhya IYER. Management of Gastroesophageal Reflux Disease: A Review of Medical and Surgical Management. *Minimally Invasive Surgery* [online]. 2014, **2014**, 1–5. ISSN 2090-1445. Dostupné z: doi:10.1155/2014/654607
15. LORD, R. Absence of Gastroesophageal Reflux Disease in a Majority of Patients Taking Acid Suppression Medications After Nissen Fundoplication. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2002, **6**(1), 3–10. ISSN 1091255X. Dostupné z: doi:10.1016/S1091-255X(01)00031-2
16. ROBERTS, Kurt E. Controversies in the treatment of gastroesophageal reflux and achalasia. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2006, **12**(20), 3155. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v12.i20.3155
17. KATZ, Philip O, Lauren B GERSON a Marcelo F VELA. Guidelines for the Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux Disease. *American Journal of Gastroenterology* [online]. 2013, **108**(3), 308–328. ISSN 0002-9270. Dostupné z: doi:10.1038/ajg.2012.444
18. HAJER, J., M. NOVÁK a J. ROSINA. Wirelessly Powered Endoscopically Implantable Devices into the Submucosa as the Possible Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology Research and Practice* [online]. 2019, **2019**, 1–7. ISSN 1687-6121. Dostupné z: doi:10.1155/2019/7459457
19. STEPHAN, D., S. ATTWOOD, J. LABENZ a F. WILLEKE. EndoStim®-Therapie – eine neue minimal-invasive Technologie in der Antirefluxchirurgie. *Der Chirurg* [online]. 2018, **89**(10), 785–792. ISSN 0009-4722. Dostupné z: doi:10.1007/s00104-018-0706-2
20. PAIREDER, Matthias, Ivan KRISTO, Milena NIKOLIC, Gerd JOMRICH, Johannes STEINDL, Erwin RIEDER, Reza ASARI a Sebastian F. SCHOPPMANN. Electrical stimulation therapy of the lower esophageal sphincter in GERD patients— a prospective single-center study. *European Surgery - Acta Chirurgica Austriaca* [online]. 2021, **53**(1), 29–34. ISSN 16824016. Dostupné z: doi:10.1007/s10353-020-00678-5
21. MEDTRONIC INC. *Enterra® Therapy - Gastric Electrical Stimulation System* [online]. B.m.: Medtronic Inc. 2002. Dostupné

- z: <https://europe.medtronic.com/content/dam/medtronic-com/global/Patients/Documents/ges-ent37800-ptmanl.pdf>
22. DANG, Wenting, Libu MANJAKKAL, William Taube NAVARAJ, Leandro LORENZELLI, Vincenzo VINCIGUERRA a Ravinder DAHIYA. Stretchable wireless system for sweat pH monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, **107**, 192–202. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2018.02.025
  23. AZZAM, Rimón Sobhi, Gabriela Barge AZZAM a Ary NASI. WIRELESS PH MONITORING AND CONVENTIONAL ESOPHAGEAL PH MONITORING: COMPARATIVE STUDY OF DISCOMFORT, LIMITATIONS IN DAILY ACTIVITIES AND COMPLICATIONS. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)* [online]. 2021, **34**(1), 1–5. ISSN 2317-6326. Dostupné z: doi:10.1590/0102-672020210001e1566
  24. HASEEB, Abdul, Noman LATEEF, Muhammad BILAL, Kumar GAURAV, Jason PRUDOM a Ali MUSANI. Bravo® Capsule Aspiration: A Rare Case Report. *Cureus* [online]. 2017, (August). ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.1556
  25. SHIN, Myung Seok. Esophageal pH and Combined Impedance-pH Monitoring in Children. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition* [online]. 2014, **17**(1), 13. ISSN 2234-8646. Dostupné z: doi:10.5223/pghn.2014.17.1.13
  26. ENOKA, Roger M., Ioannis G. AMIRIDIS a Jacques DUCHATEAU. Electrical Stimulation of Muscle: Electrophysiology and Rehabilitation. *Physiology* [online]. 2020, **35**(1), 40–56. ISSN 1548-9213. Dostupné z: doi:10.1152/physiol.00015.2019
  27. RODRÍGUEZ, L., P. RODRÍGUEZ, M. G. NETO, J. C. AYALA, J. SABA, D. BEREL, J. CONKLIN a E. SOFFER. Short-term electrical stimulation of the lower esophageal sphincter increases sphincter pressure in patients with gastroesophageal reflux disease. *Neurogastroenterology & Motility* [online]. 2012, **24**(5), 446–450. ISSN 13501925. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2982.2012.01878.x
  28. KARASTOGIANNI, S., S. GIROUSI a S. SOTIROPOULOS. pH: Principles and Measurement. In: *Encyclopedia of Food and Health* [online]. B.m.: Elsevier, 2016, s. 333–338. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00538-9
  29. BOBACKA, Johan, Zhiqiang GAO, Ari IVASKA, Andrzej LEWENSTAM, Johan BOBACKA a Ari IVASKA. Mechanism of ionic and redox sensitivity of p-type conducting polymers. Part 1. Theory. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 1994, **368**(1–2), 23–31. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/0022-0728(93)03080-9
  30. JUNG, Yoon Suk a Dong Il PARK. Submucosal injection solutions for endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *Gastrointestinal Intervention* [online]. 2013, **2**(2), 73–77. ISSN 22131795. Dostupné z: doi:10.1016/j.gii.2013.09.003
  31. MAPLE, John T., Barham K. ABU DAYYEH, Shailendra S. CHAUHAN, Joo Ha HWANG, Sri KOMANDURI, Michael MANFREDI, Vani KONDA, Faris M. MURAD, Uzma D. SIDDIQUI a Subhas BANERJEE. Endoscopic submucosal dissection. *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 2015, **81**(6), 1311–1325. ISSN 00165107. Dostupné z: doi:10.1016/j.gie.2014.12.010
  32. FLEISCHMANN, Carola, Andreas PROBST, Alanna EBIGBO, Siegbert FAISS, Brigitte SCHUMACHER, H.-P. ALLGAIER, F.L. DUMOULIN, Ingo

- STEINBRUECK, Michael ANZINGER, Joerg MARIENHAGEN, Anna MUZALYOVA a Helmut MESSMANN. Endoscopic Submucosal Dissection in Europe: Results of 1000 Neoplastic Lesions From the German Endoscopic Submucosal Dissection Registry. *Gastroenterology* [online]. 2021, **161**(4), 1168–1178. ISSN 00165085. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2021.06.049
33. DEB, Sanchali, Shou-jiang TANG, Thomas L. ABELL, Tyler MCLAWHORN, Wen-Ding HUANG, Christopher LAHR, S.D. Filip TO, Julie EASTER a J.-C. CHIAO. Development of innovative techniques for the endoscopic implantation and securing of a novel, wireless, miniature gastrostimulator (with videos). *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 2012, **76**(1), 179–184. ISSN 00165107. Dostupné z: doi:10.1016/j.gie.2012.03.177
  34. GONZALEZ, Humberto C. a Vic VELANOVICH. Enterra® therapy: Gastric neurostimulator for gastroparesis. *Expert Review of Medical Devices* [online]. 2010, **7**(3), 319–332. ISSN 17434440. Dostupné z: doi:10.1586/erd.10.4
  35. NORDIC SEMICONDUCTOR ASA. *Enhanced ShockBurst User Guide* [online]. 2016 [vid. 2022-01-24]. Dostupné z: [http://developer.nordicsemi.com/nRF5\\_SDK/nRF5\\_SDK\\_v12.x.x/nRF5\\_SDK\\_12.1.0\\_offline\\_doc.zip](http://developer.nordicsemi.com/nRF5_SDK/nRF5_SDK_v12.x.x/nRF5_SDK_12.1.0_offline_doc.zip)
  36. WENZL, Tobias G., Christoph MORODER, Morten TRACHTERNA, Mike THOMSON, Jiri SILNY, Gerhard HEIMANN a Heino SKOPNIK. Esophageal pH Monitoring and Impedance Measurement: A Comparison of Two Diagnostic Tests for Gastroesophageal Reflux. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. 2002, **34**(5), 519–523. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/00005176-200205000-00009
  37. DOVE, Ilka. *Mathematics & Computer Science Analysis of Radio Propagation Inside the Human Body for in-Body Localization Purposes* [online]. B.m., 2014. University of Twente. Dostupné z: [http://essay.utwente.nl/66071/1/Dove\\_MA\\_TE.pdf](http://essay.utwente.nl/66071/1/Dove_MA_TE.pdf)
  38. STOTT, Tracey L. a Michael O. WOLF. Electronic interactions in metallated polythiophenes: What can be learned from model complexes. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2003, **246**(1–2), 89–101. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/S0010-8545(03)00114-0
  39. FANZIO, Paola, Chi Tung CHANG, Maciej SKOLIMOWSKI, Simone TANZI a Luigi SASSO. Fully-polymeric ph sensor realized by means of a single-step soft embossing technique. *Sensors (Switzerland)* [online]. 2017, **17**(5), 1–11. ISSN 14248220. Dostupné z: doi:10.3390/s17051169
  40. ROSSETTI, Nicolò, Jo'Elen HAGLER, Pierre KATEB a Fabio CICOIRA. Neural and electromyography PEDOT electrodes for invasive stimulation and recording. *Journal of Materials Chemistry C* [online]. 2021, **9**(23), 7243–7263. ISSN 20507526. Dostupné z: doi:10.1039/d1tc00625h
  41. HUMPOLICEK, Petr, Vera KASPARKOVA, Petr SAHA a Jaroslav STEJSKAL. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. 2012, **162**(7–8), 722–727. ISSN 03796779. Dostupné z: doi:10.1016/j.synthmet.2012.02.024
  42. WEN, Yangping a Jingkun XU. Scientific Importance of Water-Processable PEDOT-PSS and Preparation, Challenge and New Application in Sensors of Its Film Electrode: A Review. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2017, **55**(7), 1121–1150. ISSN 0887624X. Dostupné

- z: doi:10.1002/pola.28482
43. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Chloroform* [online]. 2022 [vid. 2022-03-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroform>
  44. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Bromobenzene* [online]. 2022 [vid. 2022-03-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromobenzene>
  45. PANASONIC. *Panasonic CG320A Batteries Datasheet* [online]. 2017. Dostupné z: [https://b2b-api.panasonic.eu/file\\_stream/pids/fileversion/3464](https://b2b-api.panasonic.eu/file_stream/pids/fileversion/3464)
  46. GOSAVI, Sulekha Siddharth, Siddharth Yuvraj GOSAVI a Rama Krishna ALLA. Local and systemic effects of unpolymerised monomers. *Dental research journal* [online]. 2010, 7(2), 82–7. ISSN 2008-0255. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013462><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3177373>
  47. EHRENBERG, L. a S. HUSSAIN. Genetic toxicity of some important epoxides. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* [online]. 1981, 86(1), 1–113. ISSN 01651110. Dostupné z: doi:10.1016/0165-1110(81)90034-8
  48. KUPPUSAMI, Sushmitha a Reza H OSKOUEI. Parylene Coatings in Medical Devices and Implants: A Review. *Universal Journal of Biomedical Engineering* [online]. 2015, 3(2), 9–14. ISSN 2333-2662. Dostupné z: doi:10.13189/ujbe.2015.030201
  49. MADEIRA, Danielle M.F., Osvaldo VIEIRA, Luís Antonio PINHEIRO a Benjamim DE MELO CARVALHO. Correlation between Surface Energy and Adhesion Force of Polyethylene/Paperboard: A Predictive Tool for Quality Control in Laminated Packaging. *International Journal of Chemical Engineering* [online]. 2018, 2018. ISSN 16878078. Dostupné z: doi:10.1155/2018/2709037
  50. ČSN EN ISO 10993-1 - BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ ZDRAVOTNICKÝCH PROSTŘEDKŮ. *Úřad pro technickou normalizaci; metrologii a státní zkušebnictví*. 2021
  51. SIFRIM, D. Gastro-oesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux. *Gut* [online]. 2004, 53(7), 1024–1031. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gut.2003.033290
  52. PAVELKA, Margit a Jürgen ROTH. Parietal Cells of Stomach: Secretion of Acid. In: *Functional Ultrastructure* [online]. Vienna: Springer Vienna, 2010, s. 202–203. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-211-99390-3\_105
  53. PRUTCHI, David. *GERD-Treatment EndoStim is Liquidated* [online]. 2019 [vid. 2022-03-10]. Dostupné z: <http://www.implantable-device.com/2019/12/08/gerd-treatment-endostim-is-liquidated/>
  54. KWIATEK, M.A. a J.E. PANDOLFINO. The Bravo™ pH capsule system. *Digestive and Liver Disease* [online]. 2008, 40(3), 156–160. ISSN 15908658. Dostupné z: doi:10.1016/j.dld.2007.10.025

## 8 Seznam obrázků

Obr. 1: Metoda endoskopického submukozního pocketingu v jícnu.....	14
Obr. 2: Zapojení diodového zdvojovače střídavého signálu.....	20
Obr. 3: Stavový automat externí stanice .....	35
Obr. 4: Schéma bezdrátové komunikace v rámci systému .....	36
Obr. 5: Vložení implantátu do submukozní kapsy.....	38
Obr. 6: Endoskopická implantace neurostimulátoru a ověření funkčnosti. a) In-vivo model. b) Zavedení endoskopu. c) Prototyp neurostimulátoru ve smyčce. d) Navázání bezdrátové komunikace s neurostimulátorem. e) HDSDR software pro příjem dat. f) Detail OOK modulovaných dat vysílaných neurostimulátorem. g) Pozice modelu při pořízení RTG snímku. h) RTG snímek neurostimulátoru. i) Fotografie neurostimulátoru. ....	48
Obr. 7: Schéma zapojení neurostimulátoru.....	50
Obr. 8: Konstrukce bezbateriového neurostimulátoru. a) Plošný spoj (zadní strana). b) Plošný spoj (přední strana). c) Připojení přijímací cívky. d) Připojení stimulačních elektrod. e) Enkapsulované zařízení (přední strana). f) Enkapsulované zařízení (zadní strana). .....	65
Obr. 9: Postup endoskopické implantace neurostimulátoru. a) Aplikace metylenové modři pro zvýraznění submukozy. b) Vytvoření submukozní kapsy. c) Prostor uvnitř submukozní kapsy. d) Vložení neurostimulátoru do submukozní kapsy. e) Pohled na elektrody přiložené k muscularis propria. f) Uzavření kapsy hemostatickými klipy. ....	66
Obr. 10: Rozmístění komponent neurostimulátoru.....	74
Obr. 11: Pohled na bipolární pozlacené elektrody.....	74
Obr. 12: Pohled na obě enkapsulovaná zařízení; pH sensor vlevo, k neurostimulátoru jsou připojeny vodiče pro dobíjení .....	75
Obr. 13: Schéma zapojení neurostimulátoru.....	76
Obr. 14: pH senzory .....	77
Obr. 15: Struktura P3HT a PEDOT .....	78
Obr. 16: Polymer P3HT .....	78

Obr. 17: Nanesené funkční vrstvy na pH senzor a) PEDOT:PSS b) P3HT.....	79
Obr. 18: Fotografie pH senzoru vedle endoskopu s grasperem.....	81
Obr. 19: Schéma zapojení analogového obvodu pH senzoru .....	112
Obr. 20: Vizualizace velikosti vyhodnocovacího obvodu .....	112
Obr. 21: Rozmístění komponent pH senzoru.....	115
Obr. 22: Způsob připojení pH senzoru k zařízení.....	116
Obr. 23: Pohled na enkapsulované zařízení – a) pohled na stranu součástek; b) pohled na stranu baterií.....	116
Obr. 24: Schéma zapojení pH senzoru.....	117
Obr. 25: Vývojová deska PCA10056.....	118
Obr. 26: Ovládací software .....	119
Obr. 27: Forma pro vstřikování epoxidu.....	122
Obr. 28: Rozložená forma.....	122
Obr. 29: Enkapsulované vzorky implantabilních zařízení.....	123
Obr. 30: Naměřené neurostimulační pulzy .....	128
Obr. 31: Pohled na vyvinutý systém – neurostimulátor vlevo, pH senzor vpravo .....	134

## 9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Hodnoty naměřené při testování pH senzoru.....	82
Tabulka 2: Zpracované výsledky z in vitro experimentu.....	129
Tabulka 3: Výsledky in vitro experimentu .....	130

## 10 Seznam grafů

Graf 1: Výsledky statického měření polymerního pH senzor na bázi a) PEDOT:PSS; b) P3HT.....	80
Graf 2: Měření linearitu pH senzoru a vyhodnocovací elektroniky .....	113

## **11 Seznam příloh**

Příloha 1: Protokol – Zkouška cytotoxicity dle ČSN EN ISO 10993-5

Příloha 2: Protokol – zkouška kožní dráždivosti in vitro dle ČSN EN ISO 10993-23

Příloha 3: Protokol – Zkouška dráždivosti in-vivo dle ČSN EN ISO 10993-23 – vzorek „implant-epoxy“

Příloha 4: Protokol – Zkouška dráždivosti in-vivo dle ČSN EN ISO 10993-23 – vzorek „implant-p3ht“

Příloha 5: Protokol – Zkouška kožní dráždivosti ve skupině dobrovolníků dle ČSN EN ISO 10993-23 – vzorek „implant-epoxy“

Příloha 6: Protokol – Zkouška kožní dráždivosti ve skupině dobrovolníků dle ČSN EN ISO 10993-23 – vzorek „implant-p3ht“

Příloha 7: Protokol – zkouška senzibilizace kůže, metoda in chemico – DPRA

Příloha 8: Protokol – zkouška sensibilizace in vitro Lu Sens

Příloha 9: Protokol – zkouška senzibilizace kůže – zkouška na lokálních lymfatických uzlinách myši