

INTRAKORTIKÁLIS SOKCSATORNÁS ELEKTRÓDOK ÉS SZÖVETBARÁT BEVONATOK FEJLESZTÉSE, TESZTELÉSE ÉS ALKALMAZÁSA

Tézisfüzet a Ph.D. disszertációhoz

Grand László Bálint

Témavezetők: Prof. Dr. Karmos György
Dr. Ulbert István



Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai Kar
Interdiszciplináris Műszaki Tudományok Doktori Iskola

Budapest, 2010

Bevezetés

A központi idegrendszer neuronhálózatainak vizsgálatánál alapvető jelentőségűek a neuronok akciós potenciáljait és a neuronpopulációk mezőpotenciáljait regisztráló extracelluláris elvezetések. E célra régóta használt, üveg kapillárisokkal és/vagy fémhuzal alapú elektródokkal kis csatornaszámú elvezetés valósítható meg, de ezek előállítási technológiája sokszor nehézkes és nem elegendően pontos. Ezzel szemben a szilícium alapú mikroelektromechanikus eszközök (MEMS) előállítási technológiájával nagy darabszámban, pontosan reprodukálhatóan hozhatók létre kis méretű, sokcsatornás elektródok. Az agyszövetbe való implantálás során fontos, hogy az elektród minél kisebb mértékben sértse az agyszövetet. A trauma mértékét az elektród méretei és alakja, valamint az implantálás módja határozza meg. A MEMS technológia egyik nagy előnye – az, hogy segítségével az elvezető kontaktusok nagyszámban helyezhetők el az elektróda felületén – lényeges tulajdonság az extracelluláris kutatások jövőjének szempontjából nézve, hiszen az összetett agyi funkciók megértéséhez nélkülözhetetlen az idegsejtek populációs szinten való tanulmányozása. A sokcsatornás elvezetési technológia kutatásban történő alkalmazásával különböző lokális neuronális hálózatok működési módjairól, idegsejt populációk közötti kommunikációról, agyterületek közötti funkcionális összeköttetések miértjeiről tudhatunk meg többet.

Doktori munkám során részt vettem a Magyar Tudományos Akadémia Pszichológiai Kutatóintézetében (MTA PKI) folyó extracelluláris neurális jelek elvezetésén alapuló állatkísérleti kutatásokban, a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Elektrofiziológiai Laboratóriumának beindításában, az MTA Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetében (MTA MFA) meginduló szilícium alapú agyi elektródok előállítását megcélzó kutatási projektben, valamint az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetében (MTA KOKI) folytatott agyi elektródák biokompatibilitásának témakörével foglalkozó kutatásban. Az értekezésemben bemutatásra kerülő eredmények ötvözik a mérnöki innovációt és a neurobiológiai vizsgálatokat. Meg vagyok győződve arról, hogy e két irány egymást kiegészíti és mindkét területen kölcsönösen elősegíti az eredményes kutatómunkát.

Kutatásaim egyik célja egy olyan hazai, szilícium alapú, 24 csatornás agyi szenzor kidolgozása volt, amelynek megfelelő mechanikai tulajdonságai lehetővé teszik az agyszöveten kívül a dura és pia mater átszúrását is, valamint legömbölyített alakjának, de éles hegyének köszönhetően a lehető legkisebb mértékben roncsolja a szövetet. Az előállításához szükséges – a szilícium szelet kétoldali nedves marásán alapuló – technológia kidolgozása során külön figyelembe lett véve, hogy az elektród méretei a biológiai feladat kívánalmai szerint legyenek megváltoztathatók. Az előállított elektródák működését impedancia mérések és in vivo, akut patkánykísérletekben rögzített agyi bioelektromos aktivitás alapján karakterizáltam.

Kutatásaim második témájához a motivációt az a tény adta, hogy az implantált elektródákat az agyszövet idegen testként kezeli, rövid illetve hosszútávú immunválasszal reagál jelenlétükre. Az elvezetett jel minőségében ez folyamatos romlást, majd végül teljes használhatatlanságot okoz. Kutatásaim során a NeuroProbes konzorcium által rendelkezésre bocsájtott, különböző bioaktív anyagokkal bevont, illetve bevonat nélküli szilícium elektródok biokompatibilitását vizsgáltam az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben (MTA KOKI). A bevonatok rövid- és hosszútávú hatékonyságát az elektród szűrt csatornája körül található neuronok számának kontrollhoz való hasonlítása alapján definiáltam. Ezekon kívül a szűrt csatorna környékén található gliasejtek morfológiája, szinapszisok és mikrovérzések, valamint az explantált elektródok elemzése is értékes eredményekkel szolgált.

Harmadik célom az volt, hogy a sokcsatornás elvezetés alkalmazását egy aktuális biológiai kérdéskör kutatásán keresztül mutassam be. E célra egy fémvázaz, az MTA PKI-ben kifejlesztett sokcsatornás multielektrodát alkalmaztam. A macska hallókérgének egyes rétegeiben a természetes alvás-ébrenléti ciklus különböző fázisai alatt, valamint ketamin-xylazin altatásban az akusztikus információ feldolgozás bioelektromos jeleit elemeztem. Utóbbi kísérlet nemcsak a krónikusra – azaz hosszútávra – beültethető sokcsatornás elektródok alkalmazásának előnyeit bizonyítja, de fontos eredményekkel szolgál a hallókéreg más – egyéb szenzoros kérgi területeken nem tapasztalható – éberségi állapottól függő működési mechanizmusainak megértéséhez.

Új tudományos eredmények

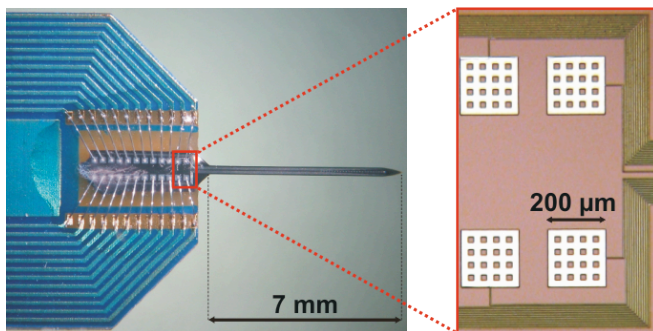
I. Téziscsoport: Kétoldali nedves kémiai marással előállítható sokcsatornás neurális elektróda tervezése, megvalósítása és tesztelése [Grand és mtsai (2010a)]

A Magyarországon megtervezett és előállított szilícium elektród létrehozásának igénye a NeuroNexus Technologies és a Michigani egyetem Neural Engineering laboratóriumában töltött első doktoranduszi évem után merült fel bennem. Az ott sok éve kutatott, sokcsatornás, kisméretű, ám igen törekeny, valamint az itthon a 90-es években kifejlesztett, fém alapú, megbízható, robosztus, de csak kézíleg előállítható és ezért nehézkesen, kis számban reprodukálható multielektródok megismerése motivált egy új, a michiganinél jobb mechanikai tulajdonsággal rendelkező, de a szilícium technológia által nagyszámban és pontosan reprodukálható, kisméretű és minimális szövetroncsoló alakkkal rendelkező multielektróda létrehozására.

I.1. Megterveztem egy 24 csatornás, jó mechanikai tulajdonságokkal rendelkező, akut intrakortikális elvezetésre használható Si multielektródot.

A 7 mm hosszú, 280 μm széles, 80 μm vastagságú elektród kontaktusai 100 μm távolságra helyezkednek el egymástól. Utóbbiak és a hozzájuk tartozó vezetékek anyaga platina. A litográfiai eljáráshoz 4 maszkot terveztem, amelyek méretei figyelembe veszik a nedves kémiai marások során létrehozni

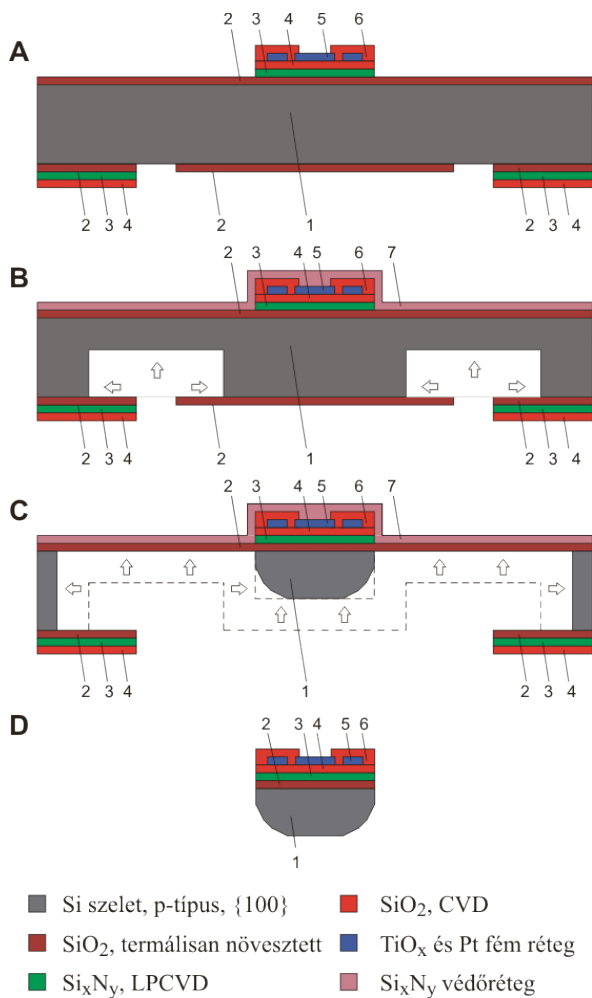
kívánt geometriát. Az elektród befogásához speciális, kétoldalon földelt nyomtatott áramköri panelt (NYÁK) terveztem, amelynek formája az akut elvezetési környezethez illeszkedik, ezáltal könnyen befogható a mikromanipulátorba. A szilícium tűn és a NYÁK-on elhelyezkedő kontaktusok ultraszónikus forrasztással lettek összekötve (1. ábra). Az első magyar szilícium multielektród létrehozásához az I.2. tézispontban bemutatott technológiát használtuk fel.



1.ábra. 24 csatornás, 7 mm hosszú, 280 µm széles, 80 µm vastag neurális elektród akut intrakortikális elvezetéshez. A jobb oldalon lévő ábra a kontaktáláshoz kitalált rácsos struktúrát mutatja meg a kontaktálás előtt. A 24 elvezető kontaktus az elektró hegyénél található.

I.2. Sikerült előállítani az egykristályos Si – CMOS technológiával kompatibilis – kétoldali anizotróp nedves kémiai marásával párhuzamos oldalfalakkal, lekerekített élekkel és hajóorr alakú hegygel határolt sokcsatornás neurális elektródot, amelynek méretei tág határok között változtathatók.

Az eljárás során az MTA MFA-ban egy standard, 3 inches, <100> orientációjú, p-típusú, kétoldalon polírozott, 200 μm vastagságú szilícium szeleten (2.ábrán 1-es számmal jelölve) négy lépésben hoztuk létre az I.1. tézispontban leírt neurális elektródákat. A kezdeti lépésben különböző vékonyfilm rétegek és litográfia alkalmazásával visszük fel és alakítjuk ki a szelet két oldalán a szigetelő rétegeket (2,3,4), az elektród kontaktusokat és a hozzájuk tartozó kivezető vezetékeket (5) és az előoldali passziváló réteget (6) (2.A. ábra). A rákövetkező lépésben anizotróp nedveskémiai marással szilícium-dioxid maszk segítségével a hátoldalon kialakítunk egy merőleges oldalfalakkal rendelkező relief ábrát, mellyel definiáljuk a hasáb vastagságát (2.B. ábra). A 2.C. ábrán látható lépésben folytatjuk az anizotróp nedveskémiai marást a szilícium-dioxid maszk eltávolítása után maszk nélkül, amíg a tömbi Si-ot át nem marjuk. A tű hegyének élességét is e két lépésben alkalmazott anizotróp marással érjük el, és egy speciális izotróp marást alkalmazva legömbölyített éleket és kevésbé szövetroncsoló, hajóorr-szerű (félkúp alakú) hegyet hozunk létre. Ez a szövetkárosodás elkerülése miatt fontos (Isd. II. téziscsoport). Az utolsó lépésben eltávolításra kerülnek a nedves kémiai marástól az előoldal megfelelő helyeit óvó és maszkoló rétegek (7); a tűket kipattintjuk a Si keretből, valamint a speciális alakú nyomtatott áramköri elemre való kontaktálás is megtörténik.

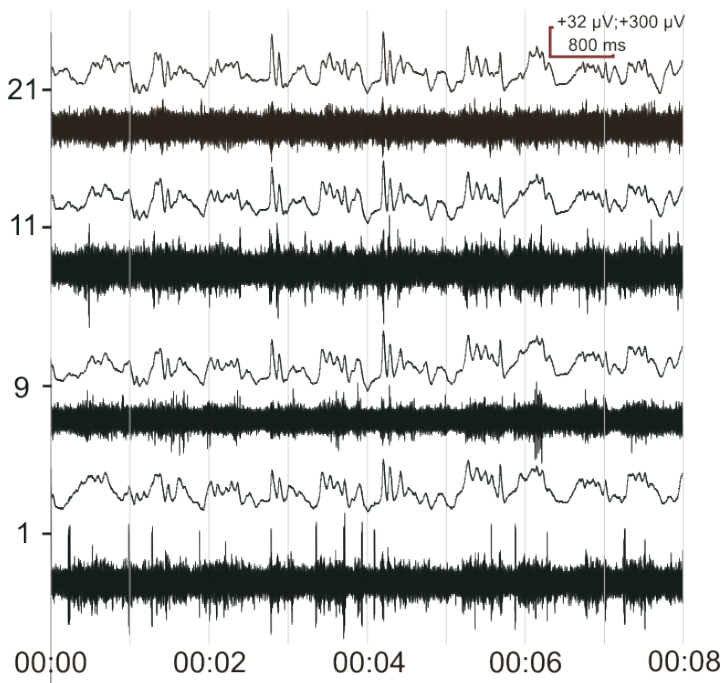


2.ábra. A magyar szilícium neurális elektród előállításához kikísérletezett technológiai sor főbb lépéseit és az elektród létrejöttét keresztmetszeti perspektívából bemutató, nem méretarányos, sematikus ábra.

I.3. In vivo patkánykísérletek alapján bizonyítottam, hogy az I.2. tézispontban leírt elektródokkal akut kísérlet során megfelelő minőségű mezőpotenciál, soksejt- és egysejtaktivitás vezethető el.

Az állatkísérletek előtt in vitro, 1 kHz-en, 500 nA-es mérőáram mellett (BAK model EASI-1, BAK Electronics) 3 elektróda, tehát $3 \times 24 = 72$ kontaktus impedanciáját lemértem. Ez alapján az átlagimpedancia $1067.36 \pm 99.91 \text{ k}\Omega$ volt. A kísérletekben ketamin-xylozinnal altatott patkányok putamenjéből és motoros kérgéből vezettem el az extracelluláris bioelektromos aktivitást. A sokcsatornás széles spektrumú jelből (0.1-7000 Hz, 20kHz/csatorna mintavétel, 16 bit) a mezőpotenciált (LFP, sáváteresztő szűrő: 0.1-500 Hz, 24 dB/decade, 0 fázistolás), és a többsejt aktivitást (MUA, sáváteresztő szűrő: 500-5000 Hz, 24 dB/oct, 0 fázistolás) különválasztottam. A soksejt aktivitásokról az egyes neuronokhoz tartozó egysejt aktivitásokat a Dataview 4.7 szoftverbe épített CEM algoritmussal és a Klustawin szoftverrel válogattam ki.

A kontaktusokkal jó minőségű LFP-t és MUA-t sikerült elvezetni (3. ábra). A rögzített MUA aktivitásokról az első kísérletben legalább 2, a másodikban legalább 6 csatornáról tudtam egysejt aktivitás kiválogatni. Ezek alapján az elektród működőképességét sikerült igazolnom.



3.ábra. Az I.2. tézispontban leírt 24 csatornás elektróddal a putamenből elvezetett jel. Az ábra a négy legnagyobb amplitúdójú MUA-val rendelkező csatornát és a hozzájuk tartozó LFP-t mutatja. Mértékegység: +32 μV (MUA), +300 μV (LFP); Erősítés: EEG (1000x), MUA (50.000x).

II. Téziscsoport: A patkány agykéregbe rövid és hosszútávra implantált, biokompatibilis bevonatokkal bevont, inaktív NeuroProbes szilícium elektródok körül kialakuló immunreakciók elemzése [Grand és mtsai (2010b)].

A NeuroProbes az európai unió FP6-os keretprogramján belül létrejött konzorcium, amelynek tizenegy kutató laboratórium és három cég a tagja. Fő célja olyan sokcsatornás, háromdimenziós

elektród tömbök előállítása, amelyek a bioelektromos aktivitás elvezetése mellett stimulálásra és gyógyszeradagolásra is használhatók, valamint minimálisan károsítják az agyszövetet. A konzorciumi projektek közül a magyar résztvevő MTA PKI által teljesítendő feladatokból a biokompatibilitási vizsgálatok témakörével foglalkoztam. Ezen kutatásokból értékes tapasztalatokat szereztem, ami alapján a magyar szilícium elektród körül várható immunreakciók hatását is megbecsülhetem.

II.1. Kimutattam, hogy az inaktív NeuroProbes elektródokra depozitált biokompatibilis bevonatok főleg rövidtávon fejtenek ki immunreakciót elnyomó/csökkentő hatást az elektróda körüli agyszövetben. A túlélő neuronok számának alapján megállapított hatékonysági sorrendjük rövid (1 hét) és hosszútávon (8 hét) is megegyezett: 1. dexametazon (DexM), 2. hialuron sav (Hya) és DexM keverék, 3. bevonat nélküli Si, 4. dexrán (Dex), 5. Hya (legkevésbé hatékony).

Kimutattam az inaktív, NeuroProbes, négyágú fésű szilícium elektródok agykéregbe szúrt pályája körül az implantálást követő rövid (1, 2 hét), illetve hosszútávon (4, 8, 12 hét) bekövetkező neuronok eloszlásbeli változását. Ezenkívül bebizonyítottam, hogy a Hya, a Dex, a DexM, illetve a Hya/DexM keverékkel bevont és agykéregbe implantált inaktív Neuroprobes elektródok körül rövid (1 hét) illetve hosszútávon (8 hét) kialakuló immunreakció miképpen különbözik a bevonat nélküli elektród

(Si) környezetében tapasztaltaktól. Az elektród pályák közelében található idegsejtek számának referenciához való hasonlításával megállapítottam az egyes bevonatok hatékonysági sorrendjét.

A kísérletek során patkányok (n=13) agykérgébe négyágú, 2 mm hosszú, inaktív, kivezető kábel nélkül álló Neuroprobes – bevonat nélküli és Hya, Dex, DexM, valamint Hya/DexM bevonattal rendelkező – elektródok lettek implantálva.

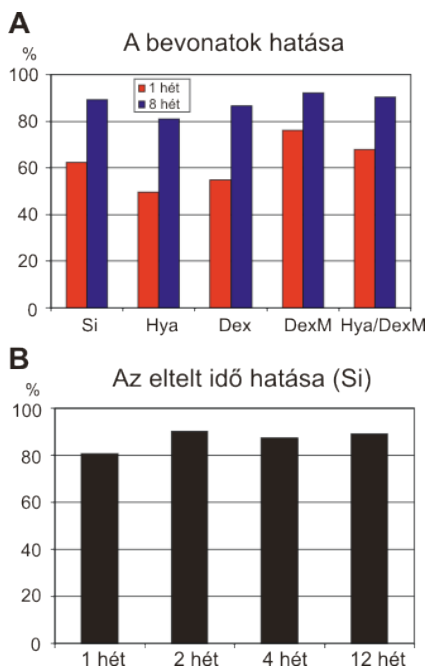
Az implantálás után a megfelelő idő elteltével fixáltuk az agyat, eltávolítottuk az elektródákat, majd a szúrt csatorna környékén elhelyezkedő szövetet vibrotómmal szeleteltük fel. A szeleteket specifikus neuron (NeuN) és glia (GFAP) jelölővel festettük meg, majd fénymikroszkópon keresztül 10x-es nagyítás mellett digitalizáltuk. Az agykéreg összes rétegéből származó szeleteken egy képre helyezett háló segítségével a szúrt csatorna 100 μm , 200 μm , 300 μm és 400 μm -es környezetében, sztereológiai módszerek felhasználásával végeztük a sejtek megszámlálását. A szúrt pálya melletti lokális vérzés kizáró ok volt, ezen metszeteket nem vettük figyelembe. A kontroll mindig az adott szelet ép, a szúrt csatornától legtávolabbra eső részéről származott.

A neuronszám csökkenése legjelentősebben az 1 hetes túlélést követően, a szúrt pálya 100 μm -es környezetében jelentkezett. Hosszútávon (8 hét) a kezdeti nagymértékű csökkenés moderálódott, a szúrt csatornától és gyulladástól távol elhelyezkedő kontroll területen számolt sejtszámhoz közelített. A

bevonatok rövid- és hosszútávú hatékonysága megegyezett, ami a következő: Hya<Dex<Si<Hya/DexM<DexM (4.A. ábra).

Megvizsgáltuk, hogy a bevonat nélkül álló Si elektród környékén túlélő neuronok aránya hogyan változik az idő múlásával (4.B. ábra). 1 hét elteltével 77.8%, 2 hét után körülbelül 85% volt a túlélő neuronok aránya, ami hosszútávon stabilizálódott.

Összefoglalva megállapítható, hogy a legnagyobb neuron pusztulás a szűrt pálya 100 μm -es környezetében fordul elő az implantálás után 1 héttel.

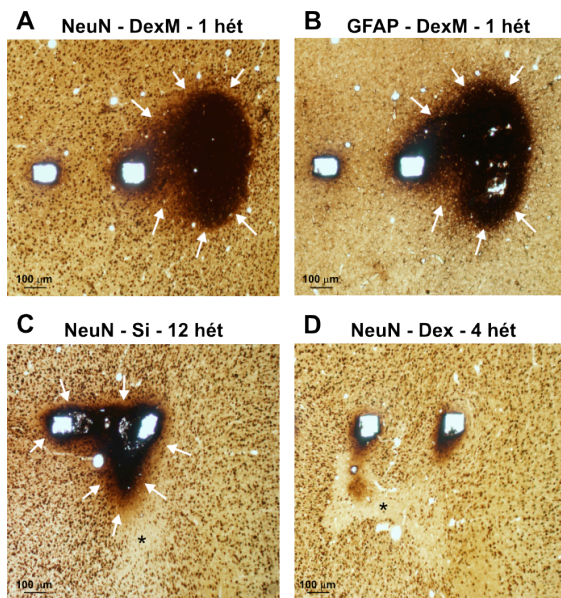


4.ábra. A különböző bevonatok rövid (1 hét)– és hosszútávú (8 hét) hatékonysága, amelyet a szűrt pálya 100 μm -es körzetében maradt

neuronok számának kontrollhoz viszonyított százalékos aránya határoz meg (A). A bevonat nélkül beültetett Si elektród neuronszám alapján definiált biokompatibilitási értékeit az idő múlásával bemutató ábra (B).

II.2. Kimutattam, hogy az implantálás során esetlegesen jelentkező vérzésnek mind rövid-, mind pedig hosszútávon komoly roncsoló hatása van az elektród körüli szövet állapotára nézve. Eredményeim szerint a felszíni rétegektől a mélyebb rétegek felé haladva csökken az erek megsértésének, így a vérzés roncsoló hatásának veszélye. Ezen eredmények magyarázatot adhatnak arra, hogy az implantált elektródok kontaktusainak egy részéről (főleg a felszínközeli rétegekből), gyakran miért nem vezethető el minőségi bioelektromos aktivitás.

A vérzés neuronokra és gliasejtekre gyakorolt hatását elemeztük rövid- és hosszútávon fénymikroszkóppal. A komolyabb vérzés hatása mind 1, mind pedig 12 héttel az implantáció után jelentős volt (5.A-D. ábrák). A szövet roncsolt, nagyon kevés neuron található a szúrt csatorna közelében. Néhány esetben a roncsolt szövet közelében elhelyezkedő súlyos neuronpusztulás látható, amely régióban a gliasejtek nagyobbak és sötétebbek voltak, mint a kontroll régióban.



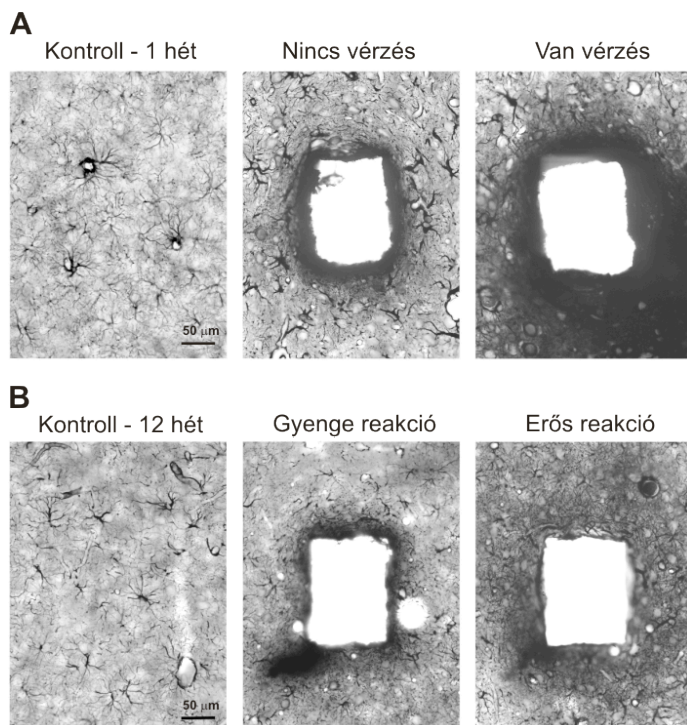
5.ábra. Az implantálás során fellépő vérzés hatása az elektród behelyezését követő 1, 4, és 12 héttel. A Dex fegyorsítja a vérrög lebontásának idejét, ezért a Dex bevonatú elektród környékén csökkent immunreakció volt látható (D).

Megvizsgáltuk a szupra-, illetve infragranuláris rétegekben futó kis és nagyméretű erek eloszlását is. Megállapítottuk, hogy mind a kis, mind pedig a nagyméretű erekből sokkal gazdagabban van behálózva a szupragranuláris ($274 \text{ ér}/2.55 \text{ mm}^2$, méret: $12 \mu\text{m}^2 - 1467 \mu\text{m}^2$, átlag: $165 \pm 186 \mu\text{m}^2$), mint az infragranuláris ($188 \text{ ér}/2.55 \text{ mm}^2$, méret: $12 \mu\text{m}^2 - 1273 \mu\text{m}^2$, átlag: $132 \pm 169 \mu\text{m}^2$) réteg. Az erek a szupra és infragranuláris rétegek 1.77%-át, illetve 0.97%-át borították. Az adatokból látható, hogy a felszíntől a

mélybe haladva csökken az erek megsértésének, így a vérzés roncsoló hatásának megjelenési valószínűsége.

A szúrt csatorna körül kialakuló gliózist kvalitatív módon elemeztem GFAP-val festett szeleteken fény- és elektronmikroszkóp felhasználásával.

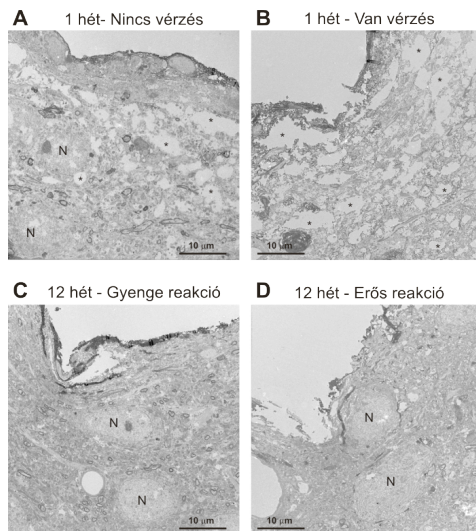
Rövidtávon (1 hét) nagy és erősen festett gliasejtek voltak láthatók a csatorna közelében (6.A. ábra). Hosszabb távon a gliasejtek száma és alakja a kontrollhoz tért vissza még az elektród közvetlen közelében lévő szövetben is, valamint az irodalomban sokszor leírt gliális pajzs nem volt megfigyelhető (6.B. ábra). A fénymikroszkópos vizsgálat alapján nem volt jelentős különbség a bevonatok gliasejtekre gyakorolt hatásában. Ugyanazon elektród ágai különböző mértékű gliális reakciót idéztek elő, amely valószínűleg a vérzéssel hozható összefüggésbe. Súlyos vérzés hatására a környező szövet láthatóan sérült, a gliasejtek nagyokká és erősen festetté váltak.



6. ábra. A szűrt csatorna közvetlen közelében fellépő glia reakció az implantálást követő 1 (A) és 12 (B) hét elteltével vérzés jelenléte, illetve annak távolléte esetén.

Egészséges neuronok sejttesteinek az implantált elektród közelében kell lenniük, hogy több/egysejt aktivitást lehessen rögzíteni. A fénymikroszkópos majd az elektronmikroszkópos felvételeken (7. ábra) is jól látszottak a NeuN festett neuronok a szűrt csatornához közel. Ép neuronok már az elektród 10 μm-es környezetében is láthatóak voltak az implantálás után 1 héttel, ha a vérzést sikerült elkerülni (7.A. ábra), de soha nem voltak

közelebb $\sim 50 \mu\text{m}$ -nál, ha az implantálás során vérzés fordult elő. A gliasejtek és nyúlványaik $5\text{-}10 \mu\text{m}$ vastag réteget növesztettek az elektródok ágai körül. Tömött, erős gliális pajzs nem volt látható, inkább a gliasejtek és neuronok nyúlványainak keveredése volt jellemző. 12 hét elteltével a szövet teljesen ép volt a $100 \mu\text{m}$ -en belüli távolságon (7.C-D.). Kismértékű strukturális változás volt csak megfigyelhető, de a GFAP pozitív asztroglialis nyúlványok száma többnek tűnt a szúrt csatorna $30\text{-}50 \mu\text{m}$ -es környezetében. A fénymikroszkópos vizsgálatok alapján elmondható, hogy a nyúlványok hálózata nem alkotott tömött gliális pajzsot.



7. ábra. Az elektródkörül szövet 1 és 12 hét utáni elektronmikroszkópos képe, amely vérzés jelenlétében (B) és távollétében (A), illetve gyenge (C) és erős immunreakció (D) mellett mutatja a szövetben lévő szakadásokat (*) és közeli neuronokat (N).

A szűrt csatorna körül elhelyezkedő szinapszisok épségét elektronmikroszkóppal vizsgáltam meg. 1 és 2 hét után sérült szinapszisok voltak láthatók. A sérülés mértéke szoros összefüggést mutatott a szövet makroszintű sérülésével. Általánosságban elmondható, hogy a pre- és posztzinaptikus részek külső membránja szakadozott volt, míg a szinaptikus rés és a vezikulák épségben maradtak.

III. Téziscsoport: Információfeldolgozás a macska hallókérgében a természetes alvás-ébrenléti ciklus különböző fázisai és altatás alatt.

A szenzoros információfeldolgozás agykérgi folyamatainak vizsgálatára egyre gyakrabban alkalmazzák a sokcsatornás rétegelvezetéseket. Kísérleteimben az MTA PKI Összehasonlító Pszichofiziológiai Laboratóriumában szabadon mozgó, 24 csatornás fémvázas multielektroddal krónikusan implantált macskákon, természetes alvás-ébrenléti ciklus és ketamin-xylazin altatás alatt vizsgáltam az akusztikus kiváltott potenciálok és spontán agyi sejtaktivitás változásait.

III.1. Krónikusan beépített, sokcsatornás elektródról elvezetett jelek elemzése alapján megmagyaráztam, hogy macskán a lassúhullámú alvás (SWS) alatt a hallókérgi intrakortikális kiváltott válaszban a korai komponenseket követő lokális pozitívítás hasonló folyamatokat tükröz, mint a spontán megjelenő down-state-ként leírt folyamat. Ezenkívül bizonyítottam, hogy a ketamin-xylazin altatás

nem mindenben megfelelő modellje a természetes lassúhullámú alvási fázisnak.

Alvás alatt nem reagálunk a minket érő legtöbb hangingerre. A talamikus és kortikális folyamatok felelősek a felesleges hangingerrek kiszűréséért. Kutatásaim megmutatták, hogy a lassúhullámú alvási fázis (Slow Wave Sleep, SWS) alatt jelentkező spontán down-state-ként ismertetett állapot intrakortikális jellemzői és a hangingerrel kiváltott potenciál tranziens összetevői után jelentkező aktivitás intrakortikális jellemzői nagyon hasonlóak, valamint azt is, hogy a hanginger által kiváltott kortikális hiperpolarizáció lehet felelős a kérgi információfeldolgozás időszakos gátlásáért.

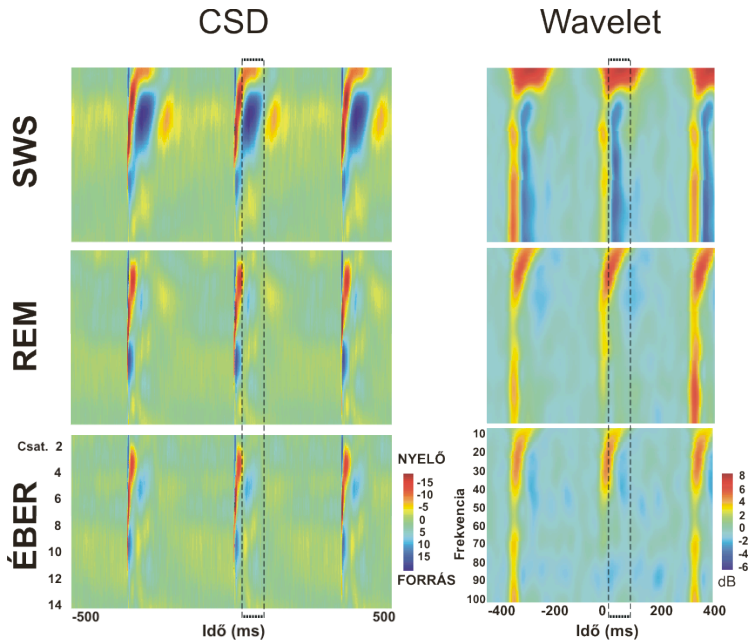
A kísérleti macskák (n=5) hallókérgéből krónikusan beültethető, 24 csatornás fémvázaz rétegelektroddal vezettem el a bioelektromos aktivitást. Ezen kívül az állat állapotának követésére fine wire és wire egycsatornás fémelektroddokkal a motoros és látókérgnek felszínéről, a hippokampuszokból, a nyaki izomokból (Elektromiogram, EMG), és a szemkörnyéki izmokból (Elektrookulogram, EOG) vezettem el az aktivitást.

SWS alatt a hangingerrek hatására az agykéreg mélyebb rétegeiből a kezdeti tranziens összetevők után nagy amplitúdójú, pozitív mezőpotenciál komponens (25-100ms) jelentkezett. A SWS, a gyors szemmozgással járó alvás (Rapid Eye Movement, REM) és az éber állapotokban a koppanó akusztikus ingerrel kiváltott válaszok idő-frekvencia (Wavelet), áramsűrűség eloszlás (CSD) és MUA analízisének eredményeit összehasonlítva

megállapítottam, hogy SWS-ben az akusztikus kiváltott potenciál mély pozitív komponense alatt (25-100 ms) a kérgi teljesítmény jelentősen csökkent a 10-100 Hz-es tartományban az alap aktivitáshoz képest (8. ábra). A mély pozitív mezőpotenciál-komponens ideje alatt (25-100 ms) a többsejt aktivitás is drasztikusan lecsökkent a kéreg összes rétegében. A CSD térkép a mezőpotenciál mély pozitív komponense alatt az agykéreg középső rétegeiben a sejtekből kifolyó áramot (hiperpolarizáció) mutatott (8. ábra).

Az agykérgi teljesítmény, a többsejt aktivitás drasztikus lecsökkenése, valamint a hiperpolarizációs áramok együttesen arra engednek következtetni, hogy a lassúhullámú alvásban hangingerrel kiváltott mély pozitív komponens diszfacilitációs folyamatokat tükröz.

Megállapítottam, hogy az SWS-ben hanginger által kiváltott down-state – az előzőekben leírt tulajdonságok alapján – hasonló tulajdonságokat mutat, mint a ketamin-xylazin (KX) altatás alatt látható down-state.



8. ábra. Az SWS, REM és ÉBER állapotok alatt hangingerrel kiváltott potenciálok CSD és idő-frekvencia (Wavelet) térképe.

Megvizsgáltam, hogy a KX altatásban jelentkező spontán EEG aktivitásmintázata milyen mértékben mutat hasonlóságot az SWS alatt tapasztaltakkal, különös tekintettel a lassúhullámú aktivitásra.

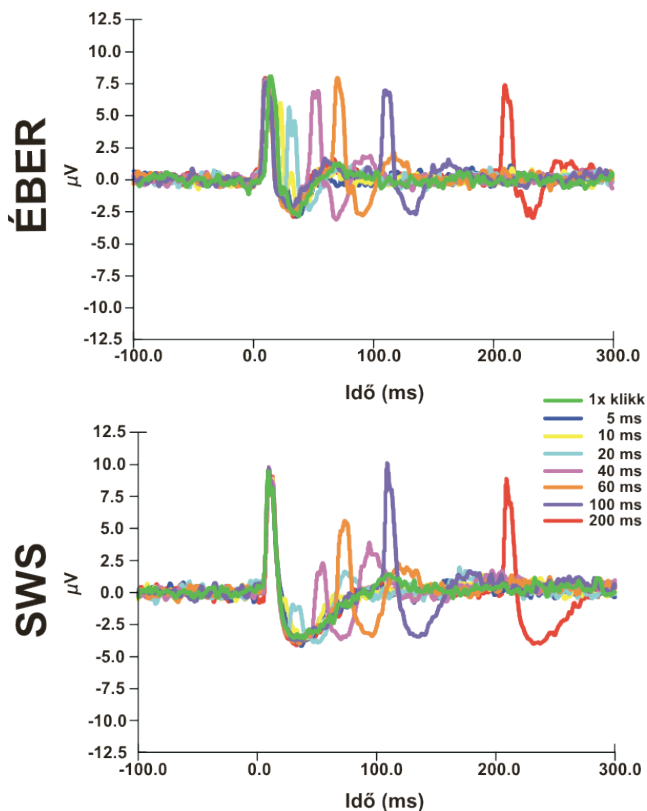
Megállapítottam, hogy KX altatás alatt a hallókéregről elvezetett mezőpotenciál nagy amplitúdójú, folytonos lassúhullámú aktivitást mutatott. Ilyen amplitúdójú és mértékű lassú aktivitás nem volt tapasztalható a spontán SWS állapotban. Az SWS alatti down-state megjelenési gyakorisága (0.2-0.5 1/s)

jóval alacsonyabb, mint a KX altatás alatt (0.5-1.5 1/s). Ezenkívül a KX alatti down-state szignifikánsan hosszabbnak is bizonyult. Míg a mély SWS állapotban az adott hanginger 60-100%-a tudott pontosan időhöz kötött down-state-et kiváltani, addig ez az arány a KX altatásban csak 5-10% volt. Ezekből az adatokból azt a következtetést vontam le, hogy a KX altatás hatására a hallókéreg működési módja megváltozik; a spontán alvásban kifejeződő kortikális dinamika más, mint narkózis alatt. Az egyes kutatócsoportok által sokszor használt KX altatás tehát nem jól modellezi a természetes mélyalvást.

III.2. Páros hanginger alkalmazásával kimutattam, hogy SWS alatt a pár második hangingere jelentősen kisebb választ vált ki a 25-100ms-os késleltetési tartományban, azaz a kiváltott down-state alatt. Eredményeim szerint a kiváltott down-state a hallókéregben mélyalvást megőrző funkciót lát el.

Csontvezetőn keresztül páros koppanó hangingert adtam macskáknak (n=5). A pár második tagja váltakozó ingerközötti intervallummal (Interstimulus Interval, ISI) követte az elsőt (5, 10, 20, 40, 60, 100, 200 ms). A hanginger mindkét tagjával kiváltott potenciálokot, soksejtaktivitásokat (9. ábra) és CSD-eket elemeztem. Kísérleteim megmutatták, hogy SWS alatt a pár első tagját követő második ingert az elsőtől viszonyított 25-100 ms-os időablak elejétől a vége felé különböző késleltetéssel adva, a kiváltott soksejt aktivitás, valamint a kiváltott potenciál

amplitúdója is fokozatosan növekszik (9. ábra). SWS alatt a pár második tagja által kiváltott soksejt aktivitás és kiváltott mezőpotenciál amplitúdója körülbelül 100 ms késleltetést alkalmazva éri el ugyanazt a szintet, mint az első hanginger, míg ébrenlétben ugyanez már a hanginger követő néhány tíz ms-os időtartományon belül megtörténik.



9.ábra. Éber és SWS fázisban páros hangingerrel kiváltott soksejt aktivitások átlaga. A hanginger első tagját 0 ms-nál érzézt, amit a második váltakozó ISI-vel követett (5, 10, 20, 40, 60, 100, 200 ms).

Ezen eredményekből arra következtettem, hogy a III.1. tézispontban leírt, az SWS alatt hanginger által kiváltott down-state (szinaptikus csend kialakulása) egy olyan alvást megóvó folyamat, amely az akusztikus agykéreg információfeldolgozását a hangingert követő 25-100 ms-os tartományban lezárja. A kiváltott korai mezőpotenciál-komponens amplitúdója nem csökkent SWS alatt, ami azt jelzi, hogy – legalábbis az akusztikus modalitás esetén – az inger által kiváltott ingerület eléri a hallókérget, tehát – a hagyományos elmélettel szemben – a talamusz nem szünteti meg a kérgi inputot. Tehát a hallókéregnek a down-state alatt egyfajta alvásmegőrző funkciója érvényesül, aminek hatására az egyed nem ébred fel, folytatja az alvást, legalábbis az irreleváns hangingerek esetén.

Az eredmények felhasználási területe

A három fő témakör mindegyike az agyi elektródok felhasználásához, illetve a bioelektromos jelek sokcsatornás elvezetésének kérdésköréhez kapcsolódik. A bemutatott magyar szilíciumelektród egy konkrét alkalmazási példa. Ennek előállítását követően – a bemutatott technológia és az MTA MFA-ban időközben beszerzett mélyreaktív ionmaró segítségével – a mélyagyi részecskébe implantálható, 5-8 cm hosszú, mechanikailag stabil és 2 gyógyszeradagoló csatornával rendelkező elektródok megvalósítására tett kísérleteket kezdtünk meg. Az elektród ágainak és elvezető kontaktusainak száma, az elektród geometriája, méretei, ezáltal a mechanikai tulajdonságai széles tartományban

változtathatók. A már létrehozott elektród rugalmas, polyimid alapú vezetékre kikontaktálásával krónikus, hosszútávra beültethető elektródákat is elő lehet állítani. Az elektróda kontaktusainak impedanciáját különböző bevonatokkal kezelve (pl. Szén nanocsövek) lényegesen csökkenteni lehetne. A kontaktus felülete – ionszelektív hártvány segítségével – *in vivo*, extracelluláris ionszenzorként is használható lehetne. Ilyen és ezekhez hasonló jellegű kutatások a közeljövőben várhatók.

Ahhoz, hogy a sokcsatornás elektródokat megbízhatóan lehessen alkalmazni krónikus elvezetésekre és hogy a jel amplitúdója ne csökkenjen fokozatosan, szükséges a kialakuló rövid és hosszútávú immunreakciók csökkentése, elnyomása. A bemutatott kísérleti eredményekből látható, hogy a különböző bevonatok – főleg rövidtávon – hatással voltak az immunreakció mértékére. A dexametazont hosszú távon, lassú és szabályozható módon az elektród környezetében adagolva elképzelhető, hogy az immunreakció szignifikáns mértékben csökkenthető. Ehhez jelenthetnek a későbbiekben megoldást a bevonatba ágyazott vagy az elektród felületéhez kötve immobilizált dexametazont tartalmazó nanopartikulák. Eredményeink szerint a sejtpusztulás és az immunreakció mértéke növekszik, ezáltal valószínűleg az elvezetett jel minősége csökken az implantáció során a mikrovérzések miatt a vérből belépő nagymennyiségű citokinek hatására. Megmutattam, hogy a szupragranuláris rétegekben jóval több és nagyobb ér fut, mint az infragranulárisban. Ezáltal az implantálás során is nagyobb az esélye az ott futó erek megsértésének. Pontos orvosi képalkotó

berendezések műtét előtti használatával csökkenthető a főbb erek megsértésének valószínűsége. Modern képalkotási eljárások és biobevonatok együttes használatával növelhető lenne a hosszútávú elvezetés sikerességének esélye.

Sokcsatornás elvezetési technológia alkalmazásával sikerült bizonyítanom, hogy hangingerrel modulálható a hallókéreg oszcillátoros aktivitása a természetes SWS fázis alatt, valamint azt, hogy a hallókérgi intrakortikális folyamatok SWS-ben különböznek a REM és éber állapotokban, valamint más szenzoros területeken tapasztaltaktól.

A halló modalitás az egyetlen, ami alvás alatt is folyamatosan figyeli a környezetünkben végbemenő folyamatokat. Eredményeim szerint az SWS fázis alatt a kéreg információfeldolgozását időszakosan megszüntető folyamatok fontos szerepet játszanak abban, hogy az alvó egyed ne ébredjen fel. Ezen mély alvási állapotot megóvó és fenntartó folyamatok létezéséből következtethetünk arra, hogy az SWS alatt az egyed alapvető létfunkcióival összefüggő fontos folyamatok játszódhatnak le.

Fontos eredmény, hogy a KX altatás nem jól modellezi az SWS állapotot. A Steriade és munkatársai által publikált adatok KX altatott macskákról származtak, ami alapján messzemenő következtetéseket vontak le a talamusz természetes mélyalvás alatti funkcióit illetően. Ezen következtetések alapos átgondolására intenek a dolgozatomban leírt eredmények.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Karmos György professzor úrnak, hogy egyetemi éveim alatt kiváló előadásával felkeltette az érdeklődésemet az elektrofiziológia iránt és meghívott tudományos diákköri hallgatónak. Az együtt töltött hat év során nemcsak szakmailag, de emberileg is sokat tanulhattam tőle.

Köszönöm Ulbert Istvánnak, hogy tanított és rengeteg munkája mellett mindig jutott rám ideje. Köszönettel tartozom, hogy nemcsak arra adott lehetőséget, hogy az általa folytatott kutatásokba kapcsolódjak be, hanem támogatott és segítséget nyújtott új ötletek, kutatási irányok megvalósításához. Szintén köszönöm neki, hogy nemzetközi konferenciákon vehettem részt, amivel sok újat tanulhattam.

Köszönöm Wittner Lucának, hogy vele dolgozhattam és az MTA KOKI-ben tőle sajátíthattam el a felhasznált immunhisztokémiai módszereket. Nagyon felkészült, kiváló tanárt és kedves embert ismerhettem meg személyében.

Mestereimnek köszönettel tartozom azért is, mert az amerikai-magyar ösztöndíj megnyeréséhez segítségül nyújtott támogatólevelükön felül a visszaérkezésemkor is bíztak bennem és lehetőséget adtak a folytatásra.

Köszönöm Dombovári Balázs és Csercsa Richárd doktorandusz kollegáimnak, hogy a doktori évek jó és inspiráló hangulatban teltek el. Szeretném megköszönni nekik azt is, hogy mindig számíthattam rájuk, bármilyen probléma megoldásáról volt is szó.

Köszönöm a Pázmány Péter Katolikus Egyetemnek és Roska Tamás professzor úrnak, hogy lehetőséget teremtettek a kutatásaim megvalósításához. Az Elektrofiziológiai Laboratórium, ugyanúgy mint az egész Információs Technológiai Kar – szellemiségéhez méltóan – óriási lehetőséget nyújtott, hogy interdiszciplináris kutatásokat folytathassak.

Szeretném megköszönni Dr. Acsády Lászlónak, az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Thalamus kutatócsoportjának vezetőjének, hogy az immunhisztokémiával kapcsolatos kutatásokat a laboratóriumában végezhettem. Dr. Czigler Istvánnak, az MTA Pszichológiai Kutatóintézet igazgatójának, valamint Dr. Bársony Istvánnak, az MTA Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézet igazgatójának köszönöm, hogy az általuk irányított intézményekben lehetőséget nyújtottak a közös munkához.

Az MTA MFA kutatócsoport segítségével nélkül nem készülhetett volna el a magyar sokcsatornás szilíciumelektród. Szakmai felkészültségük, türelmük, odaadásuk és lelkesedésük rám is kiemelkedően motiválóan hatott. Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Battistig Gábornak, aki lehetővé tette a kutatások pályázati forrás nélküli megkezdését, és Pongrácz Anitának, aki sokat segített a kutatás szervezésében és véghezvitelében. A csapat többi tagjának, Vázsonyi Évának, Márton Gergelynek, Gubán Dorottyának és Payer Károlynének is hálásan köszönöm szakmai felkészültségüket, ötleteiket és önzetlen segítségüket.

Utoljára, de nem utolsó sorban szüleimnek, testvéreimnek, menyasszonyomnak, az egész családomnak és barátaimnak szeretnék köszönetet mondani. Nélkülük, az ő állandó és feltétel nélküli szeretetük, bátorításuk és megértésük nélkül nem sikerült volna idáig eljutnom. Elnézést kérek tőlük az általam okozott nehéz és kellemetlen helyzetekért, és mindent köszönök nekik, mert mindent nekik köszönhetek.

Publikációk

Folyóirat közlemények (összesített impact faktor: 21.298)

- [1] D. Fabo, Z. Magloczky, L. Wittner, A. Pek, L. Eross, S. Czirjak, J. Vajda, A. Solyom, G. Rasonyi, A. Szucs, A. Kelemen, V. Juhos, **L. Grand**, B. Dombovari, P. Halasz, T.F. Freund, E. Halgren, G. Karmos, I. Ulbert, “ Properties of in vivo interictal spike generation in the human subiculum, “ *Brain*, vol. 131, no. 2, pp. 485-499, 2008
- [2] R. Csercsa, B. Dombovári, D. Fabó, L. Wittner, L. Eröss, L. Entz, A. Solyom, G. Rásonyi, A. Szücs, A. Kelemen, R. Jakus, V. Juhos, **L. Grand**, A. Magony, P. Halász, T. Freund, S. Cash, G. Karmos, E. Halgren, I. Ulbert, “Laminar analysis of the slow wave activity in humans, “ *Közlésre elfogadva, Brain*. 21/04/2010
- [3] **L. Grand**, B. Dombovari, R. Csercsa, L. Wittner, A. Magony, G. Karmos, I. Ulbert, “ Cortical gating of auditory information processing in sleep, “ *A kézirat a benyújtásra való előkészítési fázisban van*
- [4] **L. Grand**, A. Pongrácz, É. Vázsonyi, G. Márton, R. Fiáth, B. P. Kerekes, D. Gubán, G. Karmos, I. Ulbert, and G. Battistig, “ A novel multisite silicon probe for high quality laminar neural recordings, “ *Módosítva és másodsorra beadva, Sensors Actuat A-Phys.*, 2010a
- [5] **L. Grand**, L. Wittner, S. Herwik, E. Göthelid, P. Ruther, S. Oscarsson, H.P. Neves, B. Dombovari, R. Csercsa, G. Karmos, I. Ulbert, “ Short and long term biocompatibility of NeuroProbes silicon multielectrodes, “ *J Neurosci Methods*, vol. 189, pp. 216-29, Jun 2010b

Konferencia kiadvány

- [6] A.A.A. Aarts, H.P. Neves, I. Ulbert, L. Wittner, L. **Grand**, M.B.A. Fontes, S. Herwik, S. Kisban, O. Paul, P. Ruther, R.P. Puers, C. Van Hoof, "A 3D slim-base probe array for in vivo recorded neuron activity," *Proceedings of IEEE/EMBS*, 2008; pp. 5798-5801

Konferencia poszterek és absztraktok

- [1] **L. Grand**, B. Dombovari, E. Boldizsar, G. Karmos, I. Ulbert, "Cortical Gating of Auditory Information Processing in Sleep," *FENS Forum Abstracts*, 8-12 July 2006; 3:A073.6
- [2] I. Ulbert, R. Csercsa, L. **Grand**, E. Boldizsár, A. Magony, B. Dombovári, G. Karmos, "Evoked 'up' states in the cat auditory cortex," *FENS Forum Abstracts*, 8-12 July 2006; 3:A073.019
- [3] I. Ulbert, L. **Grand**, B. Dombovári, R. Csercsa, A. Magony, E. Boldizsár, G. Karmos, "Evoked cortical hyperpolarization controls auditory information processing in natural non-REM sleep," *SNF Conference*, 14-18 Oct 2006; 239.231/G23
- [4] N.B. Langhals, L. **Grand**, R.J. Vetter, D.R. Kipke, "Characterization Of Noise And Capacitive Losses Of Microelectrodes Through Recordings And Modeling," *IEEE BMES Conf*, 26-29 Sept 2007; P3.112.
- [5] B. Dombovári, L. **Grand**, L. Wittner, G. Karmos, I. Ulbert, "Comparison of auditory information processing in sleep and anesthesia," *IBRO workshop*, 24-26 Jan 2008; P85
- [6] R. Csercsa, A. Magony, B. Dombovari, L. **Grand**, D. Fabo, L. Entz, L. Wittner, L. Eross, I. Ulbert, "Laminar properties of sleep slow oscillation in humans," *FENS Forum Abstracts*, 12-16 July 2008; 4: 160.163
- [7] R. Csercsa, B. Dombovari, **L. Grand**, A. Magony, L. Wittner, L. Eross, G. Karmos, I. Ulbert, "Supragranular origin of slow sleep oscillations in the human frontal lobe," *Codybs Workshop*, 21-25 June 2009
- [8] L. **Grand**, B. Dombovari, R. Csercsa, L. Wittner, A. Magony, G. Karmos, I. Ulbert, "Cortical gating of auditory information processing in sleep," *Codybs Workshop*, 21-25 June 2009.
- [9] L. **Grand**, L. Wittner, E. Göthelid, P. Janssen, S. Oscarsson, H.P. Neves, P. Ruther, I. Ulbert, "Characterization of long-term tissue reaction around Neuroprobes silicon multielectrodes," *Front Syst Neurosci Conf Abst*, 2009; 10.3389/conf.neuro.01.2009.04.123
- [10] L. **Grand**, L. Wittner, E. Göthelid, S. Oscarsson, S. Herwik, P. Ruther, K.P. Neves, G. Karmos, I. Ulbert, "Assessing tissue reaction around

- Neuroprobes silicon multielectrodes with different coatings," *SFN Conference*, 17-21 Oct 2009; 390.391/HH399
- [11] K. Seidl, S. Herwik, R. Csercsa, B. Dombóvári, **L. Grand**, T. Torfs, H.P. Neves, I. Ulbert, O. Paul, P. Ruther, "Acute recording in rat using CMOS-based high-density silicon microprobe array for electronic depth control," *SFN Conference*, 17-21 Oct 2009; 664.610/DD641
- [12] B. Dombóvári, K. Seidl, S. Herwik, T. Torfs, **L. Grand**, R. Csercsa, O. Paul, H. P. Neves, P. Ruther, and I. Ulbert, "Acute recordings using microelectrode arrays with electronic depth control," *IBRO workshop (Pecs, Hungary)*, pp. P7-05, 21-23 Jan, 2010.
- [13] R. Fiáth, D. Horváth, **L. Grand**, L. Wittner, B. Dombóvári, G. Karmos, I. Ulbert, and R. Csercsa, "Laminar distribution of the spontaneous multiunit activity in the cat auditory cortex during slow wave sleep," *IBRO workshop (Pecs, Hungary)*, pp. P4-10, 21-23 Jan, 2010.
- [14] **L. Grand**, A. Pongrácz, É. Vázsonyi, G. Márton, D. Gubán, G. Battistig, G. Karmos, and I. Ulbert, "A novel multisite silicon probe fabricated by using an economical wet etching process for high quality laminar neural recordings " *IBRO workshop (Pecs, Hungary)*, pp. P7-11, 21-23 Jan, 2010.
- [15] D. Horváth, **L. Grand**, L. Wittner, B. Dombóvári, S. Kisban, S. Herwik, P. Ruther, H. Neves, G. Karmos, and I. Ulbert, "Long term implantation of silicon-based micro probe arrays " *IBRO workshop (Pecs, Hungary)*, 21-23 Jan, 2010.

Szabdalom

- [1] G. Battistig, **L. Grand**, Gy. Karmos, K. Payer, A. Pongrácz, I. Ulbert, É. Vázsonyi, "Eljárás CMOS technológiába integrálható, egykristályos Si alapú, nedves kémiai marással készített, párhuzamos oldalfalakkal és lekerekített élekkel határolt extracelluláris elektródok előállítására," *A bejelentés ügyszáma: P0900774, A bejelentés időpontja: 2009.12.10.*