

Válaszok Fiáth Richárd opponensi bírálatára

Zátonyi Anita:

„Idegszövetbe implantálható, polimer alapú mikroelektród – hálózatok kialakítása és vizsgálata”

című PhD dolgozatához

Először is szeretnék köszönetet mondani, hogy ilyen figyelmet szentelt dolgozatomnak. Köszönöm alapos véleményét, részletekbe menő, koncepcionális kérdéseket, igyekeztem érdemben válaszolni minden feltett kérdésére.

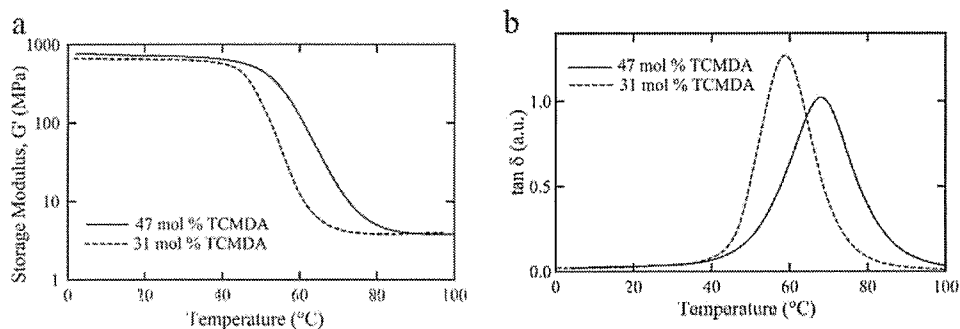
K1:

Van-e esetleg elképzelése a doktorjelöltnek arról, hogy vajon milyen módszerekkel lehetne tovább csökkenteni az elasztikus modulusát az alakemlékező polimer eszközöknek, hogy például testhőmérsékleten még puhább, rugalmasabb legyen az anyag? Hogyan lehetne ezt úgy megoldani, hogy néhány fokkal a testhőmérséklet alatt viszonylag még szilárd, beszúrásra alkalmas legyen?

V1:

Az alakemlékező polimer alapú eszköz monomer oldatának szintézisét és az eszköz kialakításának kezdeti lépéseit hagyományos MEMS technológia segítségével a The University of Texas at Dallas egyetemen végezték el. A monomer oldat bifunkcionalizált akrilát, triciklodekán-dimetanol-diakrilát (TCMDA), trifunkcionalizált alkén, 1,3,5-triallil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-trion (TATATO) és trifunkcionalizált tiol, Tris [2-merkaptopropioniloxi)etil]izocianurát (TMICN) oldatok, sztöchiometrikus arányú elegyből áll össze. Az akrilát komponens moláris koncentrációját módosítva, megváltozik a rugalmassági állandó és az üvegesedési hőmérséklet (átmeneti hőmérséklet) értéke. Ez azt jelenti, hogy nagyobb moláris koncentrációnál megnövekszik mind az átmenet hőmérséklet, mind a rugalmassági állandó értéke. Ennek oka, hogy a kopolimer lánc vázát az *alkén* és a *tiol* funkciók csoportokkal rendelkező monomer egységek alkotják. Ebbe a vázba épülnek be az alkén funkciók csoporttal rendelkező egységek, az így kialakuló sztérikus gátlás következménye, hogy a rigid-rugalmas átmenet magasabb hőmérsékleten következik be. A fentiekből következően a rugalmassági állandó értéke csak úgy csökkenthető, hogy a testhőmérsékletnél alacsonyabb hőmérsékleten már elkezdődik az átmenet. Az anyagválasztékon való módosítás jelenleg sajnos nem elérhető fejlesztési irány számunkra. Stiller at al. pár hónappal ezelőtt megjelent cikkükben egy új fejlesztése irányról írnak. Átmenetet követően 20 MPa (vs. 300 MPa) rugalmassági állandót sikerült elérniük, azonban a polimer hidrolitikus degradációját, a kötések bomlását figyelték meg 2 hét beültetést követően.

	31 mol% TCMDA	47 mol% TCMDA
Y (MPa)	3,86 ± 0,07	3,97 ± 0,18
Tg (°C)	58	67



1. ábra Különböző akrilát monokonzentrációknál felvett tiolén/akrilát alapú rendszer termomechanikai görbéi. (Simon et al., 2016).

K2:

Az értekezésben leírtak alapján kb. 10 perc áll rendelkezésre a beszúrára mielőtt a hőre lágyuló mikroelektrod elveszíti a szilárdságát. Korábbi kutatások eredményei alapján azonban a planáris szilícium alapú elektrodok nagyon lassú beszúrása (kb. 1 mm/mp vagy lassabb) jobb minőségű agyi elektromos jeleket eredményez, kevésbé károsítja az agyszövetet, vagyis kevesebb idegsejt pusztul el az elektrod körül. Egy mélyebben elhelyezkedő agyi terület megcélzása ezzel a beszúrási sebességgel azonban már kimerítené ezt a 10 perces időkeretet. Mit gondol, hogyan, milyen módszerekkel lehetne növelni a beszúrára használható időt? Például az agyszövet lokális hűtése az elektrod körül alkalmas lehetne erre?

V2:

Elméleti lehetőségként, rossz hővezető polimer vékony rétegét bevonatként alkalmazva lassítani lehetne az alakemlékező polimer által érzékelt lokális hőmérsékletváltozást. Például Parylene C hővezető képessége $0,084 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$, miközben tiolén/akrilát esetében ez az érték $0,3 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$. Ekkor azonban számolnunk kell azzal, hogy megnő az elektrodokat hordozó szár keresztmetszete, ami hátrányosan hat a szöveti immunreakció szempontjából.

Lokális hűtés alkalmazására számos szakirodalmi publikációt találtam, ezek a cikkek főként az epilepsziás rohamok csillapítását tűzték ki célul a hőmérséklet csökkentésén keresztül:

- Epidurális, szubdurális hűtött sóoldat segítségével: a hűteni kívánt területet hűtött sóoldattal permetezik, ebben az esetben azonban a hűteni kívánt terület nagysága és a hűtés mértéke nem szabályozható. Esetünkben nem elég lokális hűtési megoldás.
- Peltier hűtőmodul alkalmazása: lokális hűtés valósítható meg vele, azonban jelentősen bonyolítja a műtéti eljárást (pl. a hűtőmodul meleg oldalát egy hőelnyelőhöz kell csatlakoztatni, a hőelvezetést általában víz cirkulálásával oldanak meg). A Peltier és az agyszövet érintkezési felületén reaktív asztrogliózis alakul ki.
- Hűtött folyadék (etanol, metanol, sóoldat) cirkuláltatása egy fém csövön keresztül, amely érintkezik a hűteni kívánt területtel. Hátránya, hogy a folyadék cirkuláltatásához jelentős felszereltségre (folyadék hűtése, pumpák a cirkuláltatáshoz stb.) van szükség, ami szintén bonyolítja a műtéti eljárást.
- Artérián keresztül, keringési rendszerbe juttatott hűtött vér vagy sóoldat: nem legkevésbé lokális, legkevésbé kutatott terület. Hatással van a test teljes keringési rendszerére.

Az a) – c) megoldási lehetőségekkel csak agyfelszíni hűtés valósítható meg a mélyebb rétegeket sokkal kevésbé érinti. Peltier esetében például agyfelszínen 18°C-ot csökkent a hőmérséklet 2.4 mm-rel távolabb a csökkenés már csak 6°C volt.

K3:

Az alakemlékező implantátumok által szimultán rögzített egysejtek maximális száma négy volt egy agyi pozícióban. Ez a szám véleményem szerint kissé alacsonynak tűnik egy 8 elektróddal rendelkező eszközhöz képest. Bár ezt az alacsony értéket okozhatja a vizsgált agyi struktúra speciális felépítése (pl. a vizsgálható idegsejtek egy vékony rétegben helyezkednek el és emiatt csak 1-2 elektróddal detektálható), de egyéb tényezők is közre játszhatnak, például az agyszövet sérülése vastagabb szárral rendelkező implantátumok esetén vagy egy nagyobb mértékű vérzés. Véleménye szerint milyen egyéb okok játszhattak közre abban, hogy ilyen alacsony volt az egyszerre vizsgálható neuronok száma? Miért a hippocampusra esett a választás az in vivo kísérletek során az eszközök validálásához? Volt-e esetleg olyan, hogy egyetlen csatornáról több idegsejt aktivitását is sikerült elkülöníteni?

V3:

A fent említett körülményeken kívül, beültetéskor nem motoros beültetőt használtunk, kézzel navigáltuk a célzót, ebből következően nagy mechanikai stressz érhet a szövetet, ami alapján magyarázható a kevés egység aktivitás, amit mérni tudtunk. Sajnos nem volt olyan csatorna, amin több idegsejt aktivitását láttunk, ez azzal is magyarázható, hogy csak kevés egység aktivitást sikerült mérnünk, ahhoz pedig az elvezető pontok távol helyezkedtek el egymástól (188 μm), hogy ugyanazt a neuront több elvezető ponton is láthassuk. Ehhez legfeljebb 50 μm távolságba kellene az elvezető pontokat elhelyezni.

Mind az elvezető pontok egymástól való távolsága, mind az elektródokat hordozó szár hosszúsága adott volt. Az 5 mm hosszú szár, végétől számítva 1,5 mm-en helyezkedtek el az elvezető pontok, így adódott, hogy a hippocampusból sikerült egység aktivitást mérni. Ezen kívül a hippocampusban mérhető gamma oszcilláció detektálásával még a hisztológiai vizsgálat előtt igazolni tudtuk, hogy az alsó elektródok már a hippocampusban helyezkednek el, így tudtuk, hogy nem hajlott el beültetés közben (Buzsáki et al., 2012).

K4:

A doktorjelölt a következőket írja az értekezés 62. oldalán a platina bevonat elkészítésénél: „Recording sites have been electroplated by maintaining current density of 10 mA/cm².” Röviddel utána azonban a következőt írja: „Current density need to be kept below 10 mA/cm², otherwise desorption of the deposited layer from the surface in to the electrolyte occurred [31], [41].” Kérem, hogy tisztázza az ellentmondást.

V4:

10 mA/cm² volt az a felső küszöbérték, amit elérve még stabil réteget sikerült leválasztanom.

Az áramsűrűség növelése a szemcsefinomodás irányába hat (Bockris et al., 1992). A nukleációnak (vagy gócképződésnek) kedvez a nagyobb áramsűrűség, azonban a réteg növekedése szempontjából alacsonyabb áramsűrűség preferált. A legtöbb fém elemi módosulata olyan potenciál-tartományban stabil, ami kívül esik a víz stabilitási tartományán. Platina leválasztása során szinte mindig versengő folyamatként van jelen az oldószer bomlása is, és a fém leválasztásával együtt kisebb-nagyobb arányban hidrogén is fejlődik (Kuo et al., 2004; Schlesinger et al., 2010). Áramsűrűség növelésével fejlődő hidrogén belső feszültséget eredményez a leválasztott rétegben (Saraloglu et al., 2013;

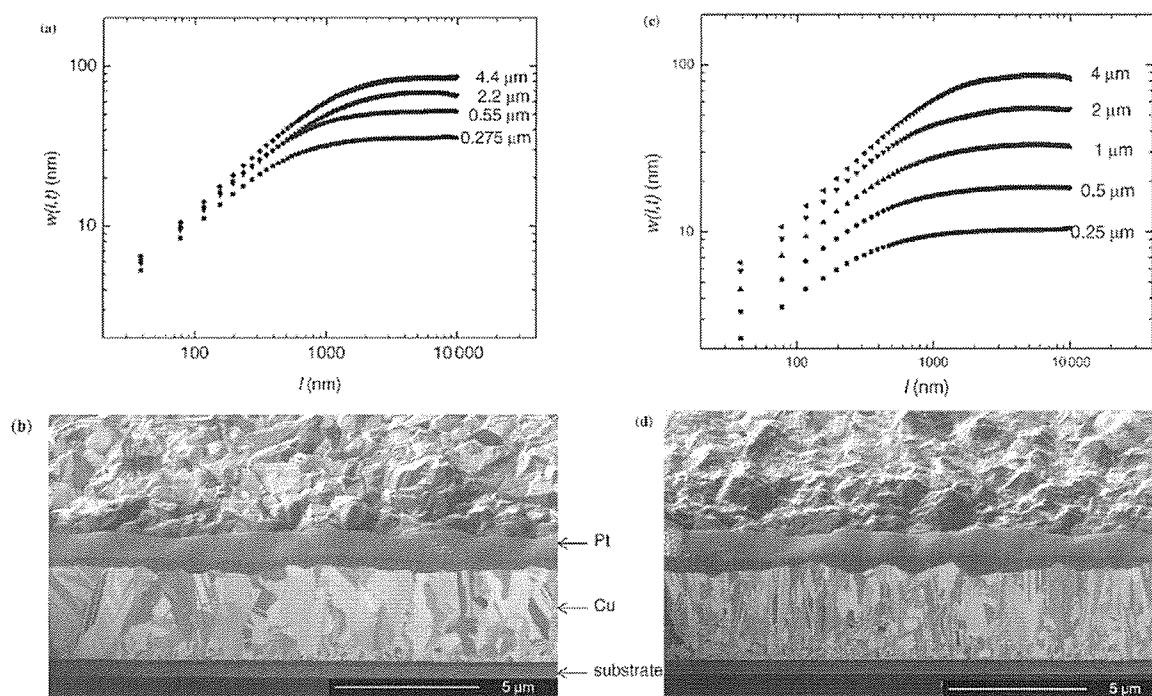
Mizushima et al., 2006). 10 mA/cm²-ben állapítottam meg azt az áramsűrűség értéket, amely még nem eredményezett túl laza szerkezetű vagy feszültséges réteget.

K5:

A kapott durvasági tényező (kb. 23, 75. oldal) hasonló, mint az irodalomban leírt értékek (20-500), azonban a tartomány alsó végén található. A mért neurális jel minőségének javítása céljából lenne esetleg értelme javítani ezen az értéken? Ha igen, hogy lehetne ezt megoldani? Meg tudja esetleg becsülni, hogy mekkora lenne a jel-zaj viszony javulása, ha a durvasági tényező inkább a tartomány felső végében lenne?

V5:

Az irodalomból vett eredmények főként mm vagy cm mérettartományba eső területről származnak, szemben az általam készített 15-20 μm átmérőjű elektródokkal. A felületi érdesség (vagy felületi durvaság) különös sajátossága, hogy függ attól, hogy mekkora területről származó adatok alapján számoljuk ki. Ha a mintavételezéshez használt terület kellően nagy, akkor a felület egészét valóban jellemző telítési durvaságot mérhetjük meg. A két méretskála közötti átmenet folyamatos. Szemléltetésül a felületi érdesség méretfüggésének szokásos ábrázolásmódját mutatja be a 2. ábra.

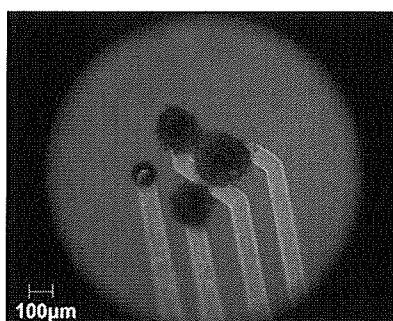


2. ábra A felületi érdesség alakulása normális (bal oldali ábrák) és anomális esetben (jobb oldali ábrák). Felső ábrák: a felület érdességének alakulása a mérési skála függvényében különböző mintavastagságokra. Alsó ábrák: fókuszált ionsugaras mintaporlasztás után a leválasztott rétegekről kapott keresztmetszeti kép. A fenti ábrák a Cu/Pt határfelület leképezésének felelnek meg (Lafouresse et al., 2007).

Az elektródok az eszközben mintegy elsüllyesztve ülnek, leválasztás során pedig törekednem kellett arra, hogy a leválasztott réteg a kontaktusokon belül maradjon. Erre azért van szükség, mert annak érdekében, hogy egysejt aktivitást minél nagyobb valószínűséggel mérhessünk, minél kisebb geometriai átmérőre van szükségünk ($A < 2000 \mu\text{m}^2$, de elektrokortikográfia esetében az

elektrodfelület további csökkentése pl. $A \approx 100 \mu\text{m}^2$ javasolt). Kísérleteim során, nagyobb durvasági tényezőt értem el potenciosztatikus leválasztási körülmények között, ekkor azonban a leválasztott réteg a kontaktusok köré is nőtt, akkor a mért komplex impedancia értéke $|Z| < 10 \text{ k}\Omega$ -nak adódott. Ez ugyanabban a nagyságrendben található, amit későbbiekben a galvanosztatisztikus leválasztással értem el ($|Z| < 60 \text{ k}\Omega$), azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a kontaktus határain belül sikerült maradnom. Mivel a termikus zaj arányos a mért impedancia valós részének gyökével (1. egyenlet) és az impedanciák a 2 leválasztási módszert tekintve egy nagyságrendbe estek, nem várnék jelentősebb jel/zaj viszony javulást, viszont az egysejt aktivitás felvételének valószínűsége csökkenne

$$V_{\text{rms}} = \sqrt{4RkT\text{Re}(Z)\Delta f} \text{ (Johnson vagy termikus zaj)} \quad (1)$$



3. ábra Potenciosztatikus körülmények között leválasztott platina. Az optikai mikroszkópos képeken jól látható, hogy a leválasztás során az elvezető pontok geometriai átmérője jelentősen megnőtt.

K6:

Számít valamit a porózus platina használata esetén (pl. Bevonat kialakításának nehézsége, mechanikai stabilitás, elektromos tulajdonságok), hogy milyen anyagú kontaktusra (arany, platina) kerül a bevonat?

V6:

A leválasztással elért impedancia javulás azonos nagyságrendbe esett (kb. $60 \text{ k}\Omega$). Hosszú távú stabilitás vizsgálatot végeztem a leválasztott rétegeken, min. 2 héten keresztül követtem nyomon a szerkezetekben esetlegesen bekövetkezett változásokat elektrokémiai impedancia spektroszkópia segítségével. Egyik esetben sem történt számottevő változás a különböző helyettesítő áramkörü elemek értékeiben. Ebből levonható az a következtetés, hogy a leválasztott réteg tapadás szempontjából stabilan kötődik a különböző fémezéssel ellátott elektrodfelületekhez.

Mind arany, mind platina elektródokkal ellátott eszközt teszteltük in vivo körülmények között, a réteg stabilitását igazoltam explantációt követően pásztázó elektronmikroszkópia segítségével. Ebben az esetben sem figyeltem meg különbséget a két eszköz között. Ezzel igazoltam, hogy a rétegek tapadás és mechanikai stabilitás szempontjából is stabilak maradnak in vivo körülmények között történő használatuk esetén. SMP hordozón elhelyezett arany elektródok esetén pedig egysejt aktivitást vezettünk el akut kísérletek során, a porózus platina réteg impedanciacsökkentő hatásának köszönhetően.

A különböző felületek miatti hatások, a leválasztás szempontjából, a felületről számított második atomsornál már nem számottevőek (ha nincs az eltérő rácsállandók miatt számottevő mechanikai feszültség, ez azonban jelentkezett volna a hosszú távú stabilitásvizsgálatok során).

K7:

Tudott-e esetleg egysejt-aktivitást (akciós potenciálokat) detektálni a kifejlesztett μ ECoG eszközzel az agy felszínéről? Az elektród kontaktusainak mérete ($20\ \mu\text{m}$) elméletileg alkalmassá teszi erre, amennyiben a kemény agyhártya eltávolításra került.

V7:

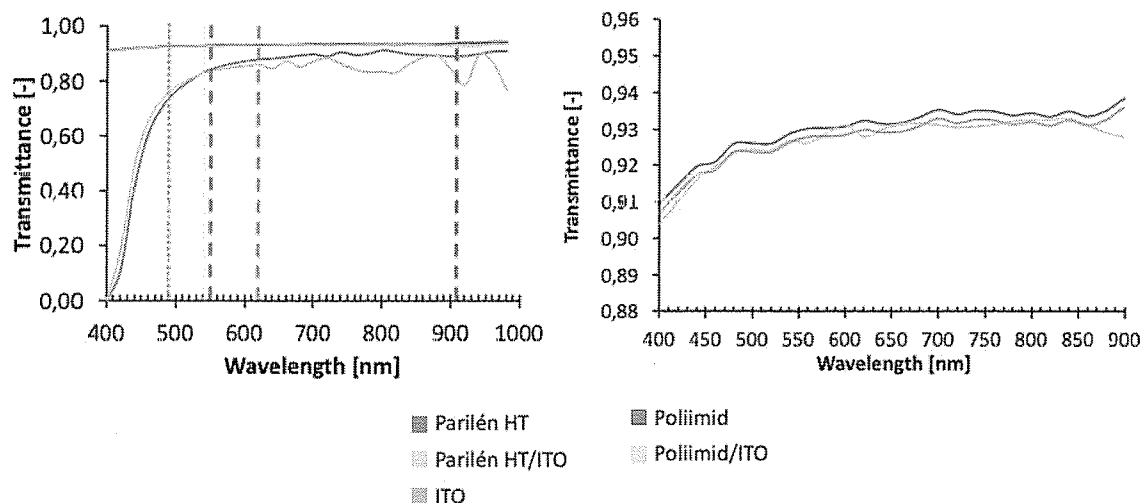
Kísérleteink során, sajnos nem sikerült egysejt aktivitást elvezetni, ennek legfőbb oka, hogy az általunk tervezett eszköz nem fedett le elegendően nagy területet ahhoz, hogy apikális dendriteken egysejt aktivitást mérhessünk. Ezen kívül az elvezető pontok a porózus platina leválasztását követően se emelkedtek ki az eszköz síkjából (poliimid szigetelő réteg vastagsága $4\ \mu\text{m}$). Ha voltak is a közelben aktív neuronok, az akciós potenciálok amplitúdója nem emelkedett ki azonosítható mértékben az alapvonalból. A porózus platina stabilitását azonban igazoltuk flexibilis hordozón in vivo körülmények között. Későbbiekben egy új elrendezéssel, az eszköz síkjából kiemelkedő elvezetésekkel vagy a hordozó polimer hexametildiszilazánnal (HDMS) való bevonásával próbálkoznánk a kísérlet sikeressége érdekében. A HDMS bevonat energetikailag hidrofób felületet biztosít, ami agyfelszínről történő elvezetés esetén az elvezető pontok közötti söntellenállás elkerülése mellett biztosítani az agyfelszínnel a megfelelő kontaktust.

K8:

Körülbelül mekkora lehet a különbség a transzmittanciában a polimer réteg és a vezető réteg (indium-ón-oxid) között a multimodális vizsgálatokhoz fejlesztett μ ECoG eszközök esetén? Vagyis arra vagyok kíváncsi, hogy mennyire romlik le a képalkotás minősége (pl. két-foton kalcium képalkotás esetén), ha közvetlenül az elektródok alatt elhelyezkedő idegsejteket vizsgálunk (a $150\ \mu\text{m}$, illetve $300\ \mu\text{m}$ átmérőjű mikroelektródok alatt például több sejt is elfér)? A képalkotás alatt mekkora műtermékek láthatók az elektrofiziológias jelekben ebben az esetben?

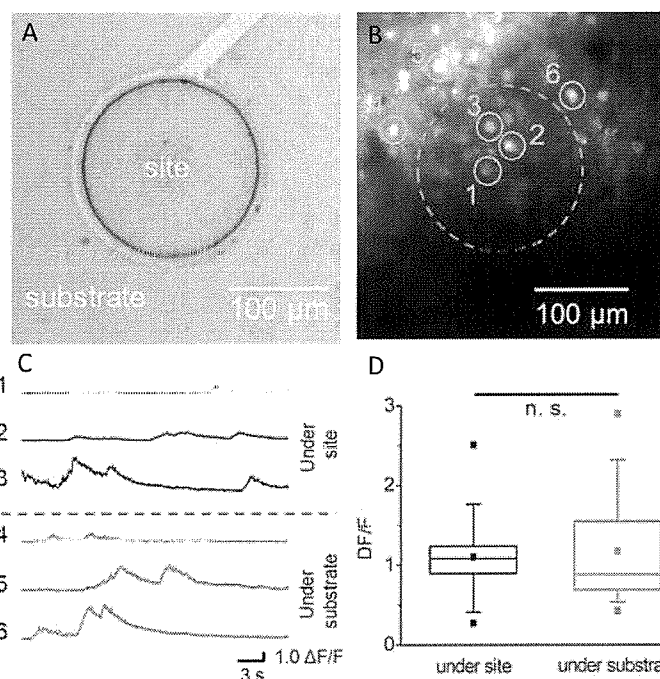
V8:

$380 - 900\ \text{nm}$ hullámhossz tartományon végzett mérések igazolták, hogy az ITO jelenléte befolyásolja a transzmittanciát, azonban a polimerek közötti különbségek sokkal inkább meghatározóak optikai méréseknél (pl. $T_{\text{ITO}}(900\ \text{nm}) > 0,9$; $T_{\text{Parilén HT}}(900\ \text{nm}) > 0,9$; $T_{\text{poliimid}}(900\ \text{nm}) < 0,9$). Mérési eredmények a 4. ábrán láthatóak. Itt megjegyzendő, hogy a polimer rétegek vastagsága minden esetben μm -es tartományba esett (transzmittanciás mérések esetében $8\ \mu\text{m}$), míg az ITO vastagsága $100\ \text{nm}$ volt. A 4. ábra részletesebb magyarázattal megtalálható a disszertáció 94 – 95. oldalán, 4.3.1 *Optical evaluation, Figure 25*.



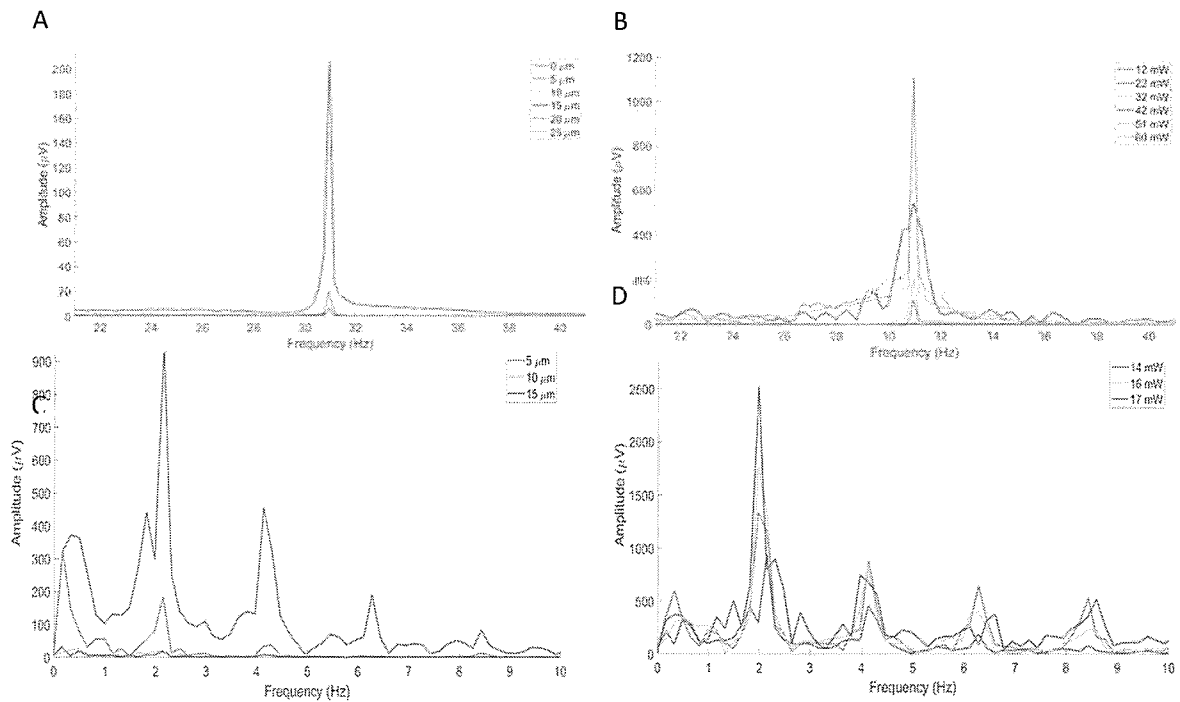
4. ábra 380 – 900 nm -en mért transzmittancia értékek különböző polimer hordozók, illetve polimer/ITO szerkezetek esetében.

Két foton mikroszkópiával vizsgáltuk az elektródok alatt, a genetikailag kódolt fluoreszcens jelölt sejtek fluoreszcens intenzitását, az ITO jelenlétének hatását a képkalkotásra. Az 5.b ábrán 250 μm -rel az agyfelszín alatt (L2/3), GCaMP6f expresszáló sejtek láthatóak a szubsztrát (Parilén HT) és az ITO elvezető pontok alatt. Szaggatott vonallal jelöltük az elvezető pont határát és folytonos vonallal az azonosított sejteket az elvezető pontok (1, 2, 3) és a szubsztrát (4, 5, 6) alatt. Az eszközt az agyfelszínen ($Z=0$ pozícióban) helyeztük el. Az 5.c ábrán, a b) ábrán kiemelt sejtektől származó 30 másodperces fluoreszcens Ca^{2+} felvétel látható. A fluoreszcens intenzitás változás ($\Delta F/F$) amplitúdója azonos mértékben emelkedett ki az alapvonalból aktív sejtek esetében és a Ca^{2+} aktivitás mutató görbe menete és lecsengése is azonos volt, így a felvételek alapján elmondható, hogy az ITO jelenléte nem fejtett ki csillapító hatást a fluoreszcens intenzitás tekintetében. 25 – 25 (felvevő pont alatt és szubsztrát) véletlenszerűen kiválasztott GCaMP6f-t expresszáló sejt Ca^{2+} csúcsairól készült statisztikai vizsgálat (Mann – Whitney U test: $p > 0,5$) alapján elmondható, hogy a fluoreszcencia változását mutató adatok mediánja alig tér el egymástól, számtani középértéke pedig szinte egybeesik a két esetet vizsgálva (5.d ábra).



5. ábra *In vivo* Ca^{2+} képalkotás. (a) 150 μm átmérőjű ITO felvevő pont. (b) ECoG alatt 250 μm -re látható GCaMP6f expresszáló sejtek. (c) 30 másodperces Ca^{2+} aktivitást mutató felvételek. Az aktivitást fluoreszcens változásban ($\Delta F/F$) fejezzük ki. A kiválasztott sejtek a (b) panelen láthatóak, a számozás azonos. (d) Véletlenszerűen kiválasztott 25 – 25 sejtről készült statisztikai vizsgálat (Mann-Whitney U teszt: $p > 0.5$). Az első oszlopdiagramra az ITO felvevő pont alatti sejtek értékei kerültek, a második oszlopdiagramra a szubsztát alattiak.

Nagy lokális teljesítmény-sűrűségű fénymikroszkópos megfigyelő rendszerből (pl. pásztázó két-foton mikroszkópból) érkező fényforrás fotoelektromos zajt generál az elvezető pontokon, ami a mért elektrofiziológiai jeleket zajjal terheli, illetve műtermékeket generál az elektromos jelben. *In vivo* kísérleteket megelőzően fotoelektromos méréseket végeztünk ACSF oldatban. 33 mW lézerteljesítményt alkalmazva, rezonáns módban, illetve 13 mW lézerteljesítményt alkalmazva, galvo módban pásztáztuk végig a lézert az ECoG-ra fókuszálva ($z = 0$), majd ECoG alatt $z = -25 \mu\text{m}$ – ig (rezo), illetve $z = -15 \mu\text{m}$ – ig (6.a, c ábra). Emellett $z = 0$ pozícióban a lézerteljesítményt változtatva (12 mW – 60 mW között rezo módban, 13 mW – 17 mW között galvo módban) vizsgáltuk a keletkezett fotoelektromos zaj amplitúdóját (6.b, d ábra). Rezonáns tükrökkel történő pásztázás esetén azt a következtetést vontuk le, hogy 33 mW teljesítményű lézersugarat 5 μm -rel az eszköz síkja alá fókuszálva, galvo tükrökkel történő pásztázás esetében 13 mW teljesítményű lézersugarat 10 μm -rel az eszköz síkja alá fókuszálva, a fotoelektromos zaj olyan szint alá csökkenthető, amelynek hatására az elektrofiziológiai jel nem szennyeződik a mérőpontok közelében kialakul és terjedő fotoelektromos műtermékekkel. Emellett megállapítottuk azt is, hogy az eszköz síkjára fókuszálva ($z = 0$), 12 mW-os lézerteljesítmény még biztonságosan használható a fotoelektromos zajok elektrofiziológiai jelelvezetést zavaró hatása nélkül.



6. ábra Pásztázás rezonáns tükrökkel (a, b) 33 mW lézerteljesítmény mellett, pásztázás galvo tükrökkel (c, d) 13 mW lézerteljesítmény mellett, különböző mélységekből felvett fotoelektromos zaj amplitúdója (a,c), illetve $Z=0$ pozícióban fokozatosan emelkedő lézerteljesítmény mellett felvett fotoelektromos zaj mértéke (a, d).

Dátum: 2020.07.08

Zátonyi Anita

Zátonyi Anita

PhD hallgató

