



Elektrokortikográfia alkalmazásai agyi rendellenességek vizsgálatára

PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISFÜZETE

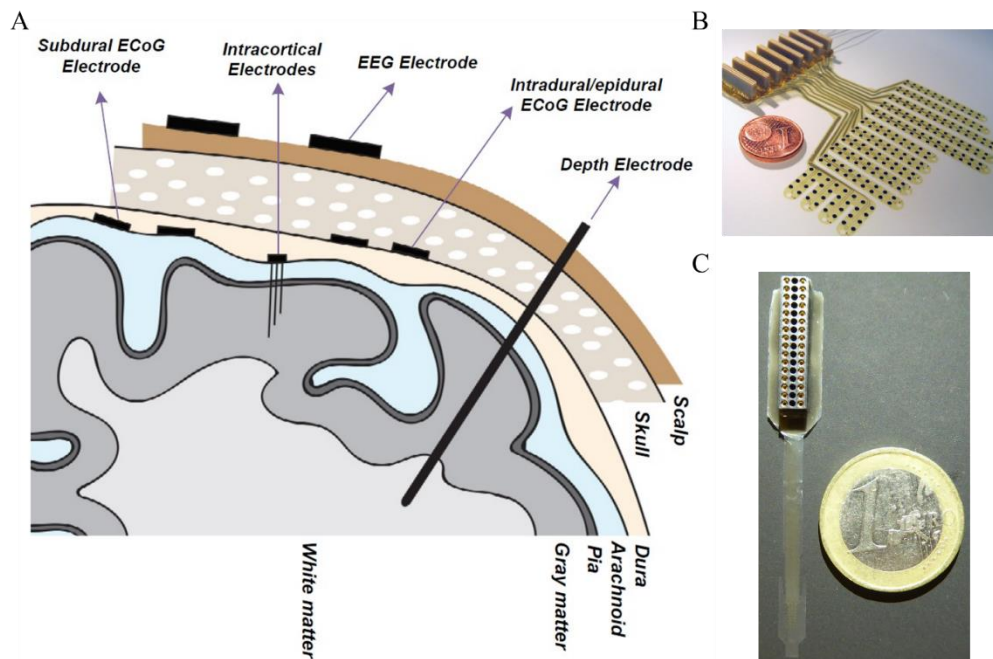
Fedor Flóra Zsófia

Témavezető: Zoltán Fekete, PhD

Pannon Egyetem
Mérnöki Kar
Vegyésmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskola
Veszprém
2021

1. Elméleti háttér

Az elektrokortikográfia az elektroencefalográfiai jelek közvetlen kortikális elektródákkal történő rögzítésének módja, ami által az extracerebrális szövet jelfelfogó hatása kisebb, mint a klasszikus EEG felvételek esetében (1/A ábra). A mérés elvégezhető akut módon rövid idő alatt a műtét során vagy krónikusan hosszabb ideig vizsgálva az agy eszelegesen kóros elektromos jeleit. Két típusú elektródrendszer alkalmazható ECoG mérésekre: egymástól egyenlő távolságra lévő elektródokból álló hálózat ágyazható be különféle szilícium alapú polimerekbe, vagy egyedi merev elektródok is alkalmazhatóak a kortikális felszínre helyezve vagy a koponyához erősítve¹. Ez a technológia platina-iridium vagy rozsdamentes acél elektródákkal méri az elektromos aktivitást^{2,3}. A rögzített terület térbeli felbontása növelhetővé válik, ha a kortikális felszín követő flexibilis bevonóanyaggal vonják be az elektródot⁴.



1. ábra. (A) Különböző elektródtípusok és pozíciójuk az agyszövethez viszonyítva⁵. (B) Poliimid alapú μ ECoG eszköz^{6,7}. (C) Átlátszó μ ECoG elektród Parilén HT szubsztrát bevonattal⁸.

Ma az elektrokortikográfia az agykutatás rendkívül népszerű eszközévé különböző kortikális jelenségek vizsgálatára⁹, mivel az invazivitásuk az EEG mérő eszközök és az intrakortikális elektródok között van¹⁰. A technológia egyik nagy előnye, hogy az ECoG eszközök szabadon tervezhetőek, a mikrofabrikáció lehetővé teszi a kutatók számára, hogy a kísérleti beállításuknak megfelelő eszközt használják. Számos flexibilis polimer anyagot^{11,12} használnak μ ECoG eszközökhöz mint a poliimid¹³⁻²⁶, poli(p)-xililén különböző funkciós csoportokkal mint a parilén C²⁷⁻⁴⁰, a parilén HT⁸, az SU-8^{24,41}, és a szilikon⁴²⁻⁴⁴(példák: 1. ábra/B&C).

2. A PhD kutatás célja

2.1 Az egér 4-aminopiridin epilepszia modell vizsgálata

Eben a tanulmányban a 4-aminopiridin (4-AP) epilepszia modell elektrofiziológiai és viselkedési vonatkozásait vizsgáltam két dózisban. A 4-AP görcskeltő hatását először az 1970-es évek elején írták le. Azóta ismertté vált, hogy a 4-AP erős hatással van az emlősökre, a következő tüneteket váltja ki: izgatottság, nyálképződés, remegés, zavar az izommozgásban, klónusos-tónusos görcsök, szív- vagy légzésleállás, halál⁴⁵. Számos kémiai modell létezik epilepszia jellegű aktivitás kiváltására rágcsálókban és a molekuláris kutatások is egér modelleket használnak a rövid reprodukciós idejük, nagy alomszámuk és könnyű genetikai módosíthatóságuk miatt, ugyanakkor egyes esetekben nincsen konszenzus az irodalomban bizonyos kémiai modellek alkalmazásával kapcsolatban. A 4-AP epilepszia modell alkalmazhatóságának kiegészítésének érdekében vizsgáltam a hasfalon keresztül beadott 4-AP hatását két dózisban, EEG és viselkedés monitorozásával B6N típusú egereken. A két dózist a releváns irodalom alapján állapítottam meg⁴⁵⁻⁴⁸.

2.2 Poliimid ECoG elektród validációja patkány ketamin skizofrénia modellen

Az extracelluláris események számos technikával mérhetőek a legegyszerűbb kézzel készített csavarelektrodtól az epikraniális elektródáig, vagy complex előregyártott vékonyréteg

elektrodrendszerekig⁴⁹⁻⁵¹. A polimer μ ECoG rendszer egyik nagy előnye, hogy képes egyszerre több funkcionálisan eltérő kérgi területről is elvezetni egyidőben agyi oszcillációkat invazívan a kéreg felszínéről, non-invazívan pedig a koponyáról. Az egyszerűbb kézzel készített csavarelektrodok ezzel szemben sérülést okozhatnak a kérgi felszínen, az egymáshoz viszonyított pozíciójuk nem állandó, továbbá méretükből fakadóan a számuk limitált.

Az agyi tevékenységek komplexitása és sokfélesége és az EEG technikák limitációi miatt a kortikális konnektivitás mérése ma is kihívást jelent. A konnektivitás betegségek mint a skizofrénia vagy az autizmus patomechanizmusában jelentős szerepe van a temporális kérgi oszcillációk változásának. A tanulmány célja egy olyan krónikusan beültethető μ ECoG elektród fejlesztése volt, mellyel a neurális oszcillációk vizsgálata lehetővé válik egyidőben egy nagyobb kérgi területről.

2.3 Tiolén-akrilát ECoG validációja

A tanulmányt megelőzően a hőre lágyuló polimerek használata az intrakortikális mikroelektrodokra korlátozódott. F. Vitale et al.³² a szubdurális mikroelektrod rendszerek krónikus biokompatibilitásának növelésére bemutatott egy hidrogél bevonatot mint extracelluláris matrix réteget. Száraz állapotban a hidrogélek Young's modulusza GPa tartományban van (pl. 3.4 GPa⁵²). Azonban ha az intrakraniális tér nedves környezetének tesszük ki, akár néhány MPa (pl., 2.6 MPa⁵²) is elérhető. A legnagyobb hátránya (ami egyben a legnagyobb előnye is) a hidrogéleknek, a jelentős víz abszorpciójuk. 10-70% között van a duzzadási mértéke ami további kockázatot jelent a strukturális degradációra és a fém leválásra. A duzzadás kockázata továbbá, hogy növeli a távolságot a kontaktuspontok és az aktív neuronok között, amivel egyidőben a koponyaűri nyomást is növeli. Az újonnan tervezett polimer anyagok inger (pl., hőmérséklet, ion koncentráció, pH, nedves környezet) hatására változásokon mennek keresztül. A hidrogélekhez hasonlóan, a hőre lágyuló polimerek megtartják a mechanikai szilárdságukat (Young's moduluszuk GPa tartományban van) implantáció alatt, így könnyen kezelhetők a műtéteket megelőzően és utána is. Bár az alakemlékező polimerek (SMPk) népszerűek az in vivo tanulmányokat folytató kutatók körében, főleg tüelektrodokat borítására használják. Az SMP mint hordozóanyag használata μ ECoG elektródok esetében krónikus kísérletekben egy még felfedezetlen és nagy potenciállal rendelkező terület, mivel az SMP használata enyhítheti az idegen test reakciót.

3. Módszerek

3.1 Elektródok

3.1.1 A 32 csatornás poliiimid elektród gyártása

A poliiimid ECoG elektród 32 kontaktusponttal rendelkezik 4x8-as elrendezésben, melynek az átmérője 300 mikron. Az elektród gyártása a MEMS (micro-electro-mechanical systems) gyártástechnológián alapul mely részét képezik a fotolitográfia, a vékonyréteg képzés és száraz maratási lépések¹². A megközelítés előnye, hogy ember és makákó tanulmányokra is megfelelő méretben is ki lehet alakítani⁵³⁻⁵⁵, illetve kombinálni más agyi képalkotási technikákkal. A mikromegmunkálási folyamat során a 4"-os szilícium szubsztrátot hordozóként. Miután 1:20 hidrogén-fluorid oldatba mártják, a hordozót 4 mikron vastag poliiimidd réteggel vonják be (PI2611, HD Microsystems GmbH, Germany).

A műveleti sorrend a következőképpen alakul:

1. Szilícium szelet (hordozó) kialakítása
2. Poliiimid vékonyréteg felvitele
3. Pt leválasztás
4. Platina mintázat kialakítása
5. Poliiimid vékonyréteg felvitele
6. Kontaktus- és kontúrablakok maszkjának kialakítása
7. Kontaktus- és kontúrablakok nyitása
8. Maszkoló réteg eltávolítása és a fóliaelektródok lehúzása a hordozóról

Ezt követően az elektródokat egy PreciDiP (Preci-dip SA, Switzerland) csatlakozóhoz forrasztják 265°C-on Ón/Ezüst forrasztó ötvözet segítségével.

A mikroelektród gyártása a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpontjában lévő tiszta szobában történt együttműködésben Dr. Zátonyi Anitával.

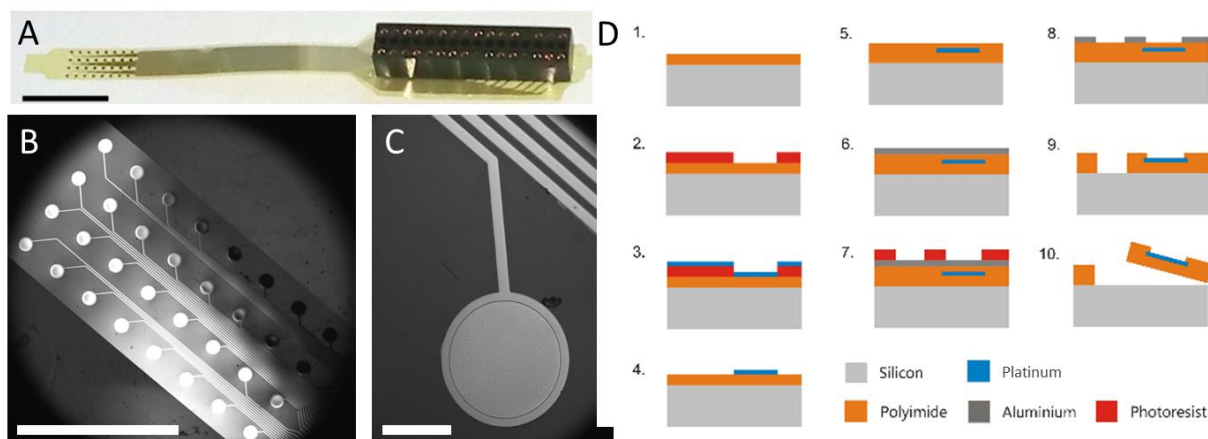


Figure 2. (A) A használatra kész μ ECoG elektród. A 32 kontaktus mikroszkópos képe (B) és egy kontaktuspont (C). A skálák 10 mm, 0.5 mm and 150 μ m-t mutatnak. Az elektród gyártási eljárásának sematikus ábrája (D).

3.1.2 A 31 csatornás tiolén-akrilát alapú μ ECoG elektród gyártása

Az elektródok gyártása a Qualia Labs, Inc.-ben történt, míg az elektrokémiai tulajdonságok vizsgálata a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Karának Implantálható Mikrorendszerek Kutatócsoportjában történt. A műtétek, kísérletek és a fluoreszcens adatok kiértékelése a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Neuronhálózat és Dendritikus Aktivitás Kutatócsoportjában történt.

A μ ECoG elektród tervezése során elsődleges volt, hogy krónikus egér kísérletekben is könnyen használható legyen, ahol az egyszerű alkalmazhatóság mellett a limitált hely és a súly is kihívást okoz. Mivel a kítűzött jövőbeli cél az, hogy ezt az eszközt kompatibilissá tegyük agyi képalkotó technikákkal egy kraniális ablakon keresztül, egy szimmetrikus elrendezés -31 kontaktusponttal- került megállapításra. Az eszköz kinézete a 3/A ábrán látható. A hálózat első és utolsó sora 3-3 kontaktuspontot, míg a középső 5 sor 5-5 kontaktuspontot tartalmaz, mind egyenlő távolságra egymástól. Az eszköz végső vastagsága $\sim 14 \mu$ m a csak SMP-t tartalmazó régiókban és $\sim 18 \mu$ m a kontaktusok területén (3/C ábra). A kontaktusok átmérője és a közöttük lévő távolság 100 μ m és 400 μ m. A mikrofabrikációs eljárás, mely a Qualia Labs, Inc.-ben történt, a korábban publikált gyártási eljárás alapján⁵⁶. Röviden, egy tiolén-akrilát alapú szubsztrát bevonva 2 μ m Parylene C bevonattal. Az eszközöket fotolitográfiai eljárással mintázták 400 nm vastag arany és

300 nm vastag porlasztott iridium-oxid réteggel (SIROF). A 3. ábra B részén látható az eszköz sematikus réteg összeállítása jelölve az egyes rétegek méreteit. A mikrofabrikációs lépések végén az elektródra egy Omnetics csatlakozó (A79022-001, Omnetics Connector Corp., USA) került. A vezetőrétegek és a csatlakozó tűi közötti kapcsolat kialakítása kétkomponensű vezetőképes epoxy gyantával (CW2400, Chemtronics, USA) történt, ami ezután szobahőmérsékleten száradt 24 órán keresztül. A kapcsolatok borítását Araldite 1401 ragasztó (Huntsman Advanced Materials, TX, USA) adta.

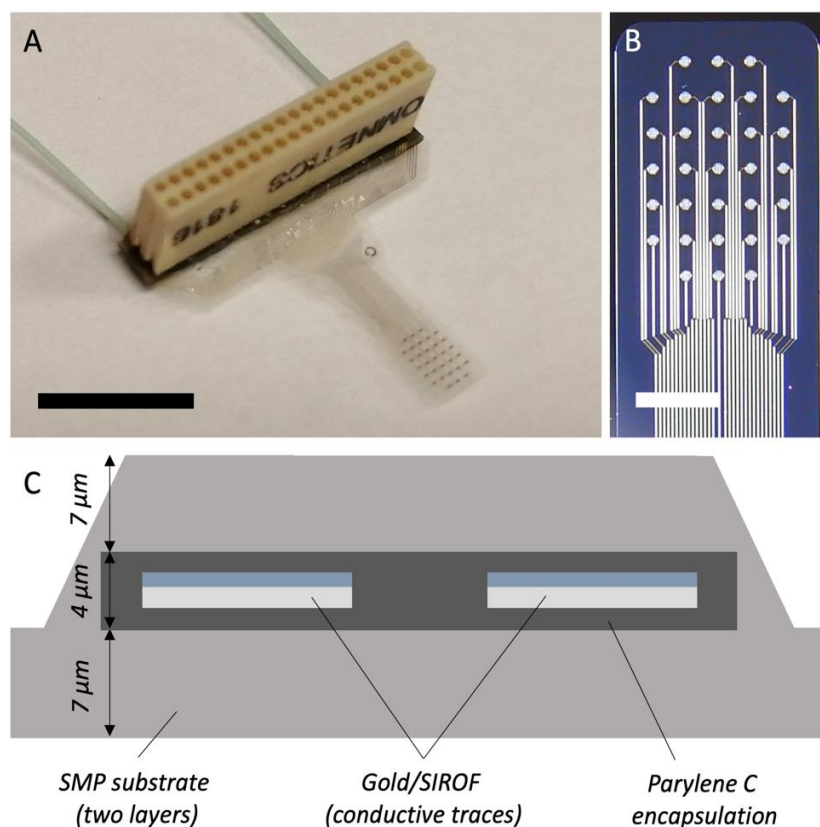


Figure 3. (A) Kép a használatra kész tiolén-akrilát alapú μ ECoG elektródról és (B) mikroszkópos felvétel a kontaktuspontokról. A skálák 5 és 1 mm-t mutatnak. (C) Sematikus ábra az eszköz keresztmetszetéről és az azt alkotó rétegekről (skála nem megfeleltethető).

3.2 Műtétek

3.2.1 A 32-csatornás poliimid elektród beültetése

A műtétek, a kísérletek és az adatok kiértékelése az Eötvös Loránd Kutatóegyetem Proteomika kutatócsoportjában történt együttműködésben Dr. Borhegyi Zsolttal és Prof. Dr. Juhász Gáborral.

A tanulmányban Wistar patkányokat (350–500 g) használtunk. 2-4 állat volt egy ketrecben ad libitum hozzáféréssel táplálékhoz és vízhez (fény 9:00-18:00). A patkányok altatása Isoflurane-nal (0.5-1 %, Forane, Abbott) történt, ezt követte a befogásuk a sztereotaxisba. A műtési terület feltárása és megtisztítása után az elektródnak méretének megfelelő koponyacsont elvékonyítása történt. Az elektródhoz képes anterior, poszterior és laterális irányokban csavar elektródok biztosították a konstrukció stabilitását, míg a bal fül elé a bőr alá helyezett plate elektród volt a referencia a mérésekhez (4/A ábra). Az elvékonyított csont felhajtása (mediális irányba dura mater sértése nélkül) után az elektród úgy került elhelyezésre a kéri felszínre, hogy minden kontaktuspont érintkezzen a felszínnel (4/B ábra). A 25. kontaktus a Bregmával egy vonalban, attól 0.5-1 mm-re laterálisan volt található, az elektród hosszanti széle pedig párhuzamos volt a középvonallal. Az elektród elhelyezését a csont visszahajtása követte (4/C ábra). Az elektród fölötti csontot UV fényre kötő cement (TetricEvoFlow, Ivoclar Vivadent; Liechtenstein) stabilizálta, amelyet fogorvosi cement (GC America Inc., USA) vont be a csavarokkal és a referenciával együtt (4/D ábra). Egy földelő csavar elektród volt a kisagy fölé helyezve. Egy 5 mm átmérőjű LED dióda (Bright LED Hong Kong Ltd.) a szemgolyó mögé helyezve biztosította a fényforrást a vizuális kiváltott potenciál mérésekhez. A műtéteket követően, az állatok antibiotikumot kaptak (2,5% Baytril, Bayer Hungária Ltd., Hungary) és legalább 3 napig lábadozhattak.

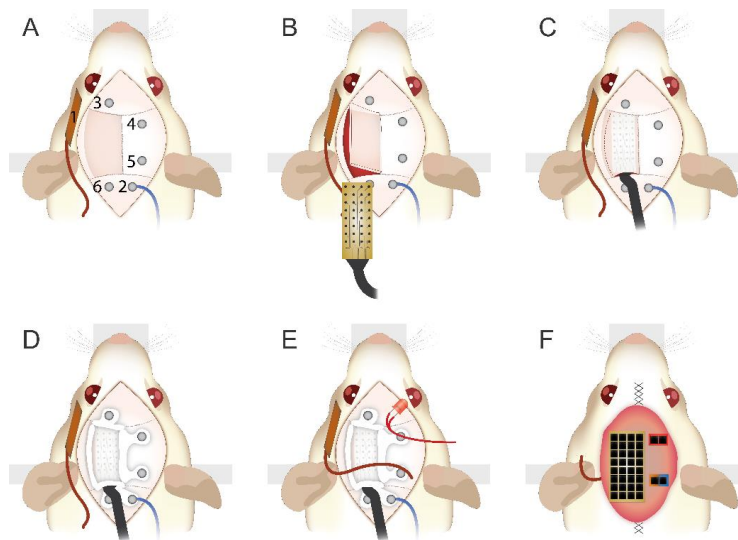


Figure 4. Az elektród beültetés lépései. (3,4,5,6): A stabilizáló csavarok az elektród körül. (1): A referencia plate a bal fül elé helyezve (2): Földelő csavarelektrod a kisagy fölött.

3.2.2 A 31- csatornás tiolén-akrilát alapú μ ECoG elektród beépítése

A kísérletben használt minden egér házon belül került tenyésztésre a C57BL6/J törzsből. A kísérletek kivitelezése a hatályos EU irányelvvel (2010/63/EU) és a hatályos kormányrendelettel (40/2013.(II. 14.)) összhangban történt. Az in vivo felvételek és az immunhisztokémiai vizsgálatok a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben készültek Madarász Miklóssal együttműködésben.

A kísérlet alanya három felnőtt hím C57BL6/J egér volt. Az ECoG, a referencia elektród és a befogó beépítése ugyanabban a műtétben történt. Az egerek altatása fentanylal (0.05 mg/kg), medetomidinnel (0.5 mg/kg), midazolammal (5 mg/kg) i.p., a helyi érzéstelenítés pedig ropivacaine-nel (5 mg/kg, subcutaneously) történt. Szemgél (Opticorn A) védte a szemet a kiszáradástól, a műtési területet pedig Betadinnal fertőtlenítettük. A koponya fölött lévő bőrt eltávolítottuk az alatta lévő csontot pedig 3% H₂O₂-al kezeltük. A téglalap alakú 2.5x3.8 mm-es kraniotómia két rövidebb éle a szagittális és lambdoid varratok fölött helyezhett el. A kraniotómia elkészítése 0.3 mm-es fűrófejjel (1AU, Busch & CO) történt. Azon a szélen ahol az elektród huzalozása vezet ki, egy csont emelkedő biztosítja az egyszerűbb elhelyezést. Ringer oldatba áztatott steril tamponokkal (Gelita, BBraun) történt a felület folyamatos hidratációja. A dura eltávolítása után a az elektród kortikális felszínre való elhelyezése történt borítva két üveg

fedőlemezzel (belső: 2.5 mm x 3.8 mm, külső: 3.2 mm x 4.2 mm, 0.15 mm vastag üvegek, optikai ragasztóval összeillesztve (NOA71, Norland). A fedőüveget a csonthoz ragasztottuk, ezzel lezárva a kraniotómiát. A ragasztó megkötése után a csatlakozó egy következő lépésben került fixálásra a koponyához, amikor a szubsztrát még fedetlen részei is lefedésre kerültek ragasztóval. A kisagy bal része fölé referencia elektródot építettünk be. Fogorvosi cement (Relyx Luting cement, 3M) és pillanatragasztó (Super Bond Gel, Loctite) keverékét használtuk ezekben a lépésekben. Fogorvosi ragasztóval (Super-Bond C&B) befogó fémlapot erősítettünk a műtési terület anterior részére. Az üveg fedőlemezek és a befogó beépítése annak érdekében történt, hogy két-foton mikroszkópiára alkalmas legyen a mérés (ezt egy jövőbeli cikkben prezentáljuk). Revertor (2.5 mg/ kg), flumazenil (2.5 mg/ kg) és nexodal (1.2 mg/ kg) i.p. beadásával ébresztettük fel az állatot, melosolute (0.2 mg/ kg) Ringer oldat beadása szolgálta a fájdalomcsillapítást és hidratálást. A kísérletek megkezdése előtt az egerek 3 napon keresztül lábadozhattak.

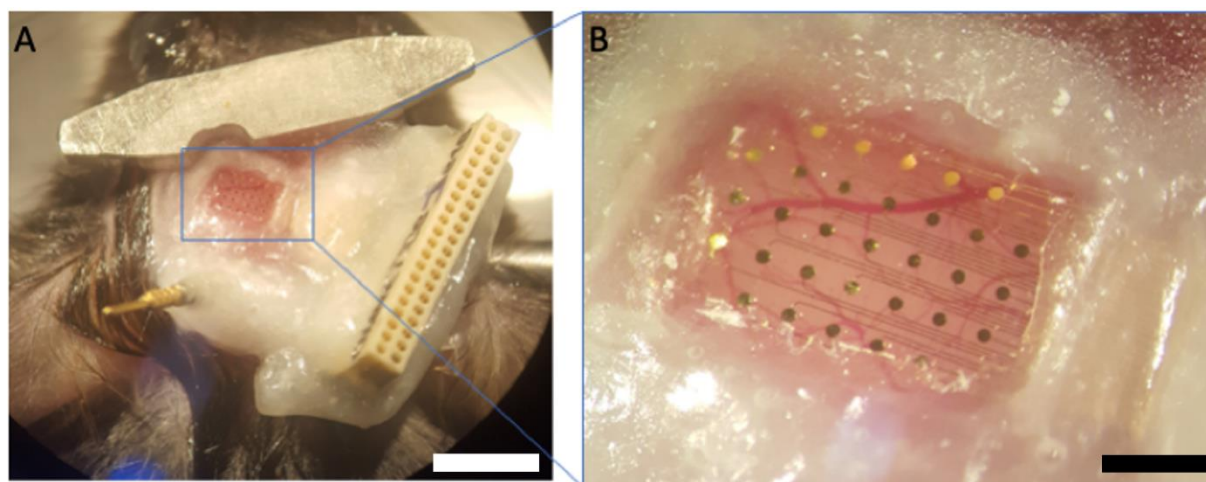


Figure 5. (A) Kísérleti elrendezés a kérgi felszínen. (B) Porlasztott iridium-oxid kontaktuspontok elhelyezkedése a kérgi felszínen az erezhöz képest. A skálák 5 és 1 mm-t mutatnak.

3.3 Immunhisztokémia

3.3.1 *Agyszövet előkészítése immunhisztokémiára*

A neuronális populációk fizikai állapotát és az asztrogliózist vizsgáltam a biokompatibilitás vizsgálata érdekében.

Poszt-mortem immunhisztokémiai jelölést végeztem a beültetés után átlagosan 80 nappal 3 állaton. Transzkardiális perfúzióhoz 0.9% NaCl oldattal mostam ki az állat keringését amíg a máj és a tüdő elszíntelenedett, ezután 4% PFA oldatot keringettem 20 percig. Nem használtam pikrinsavat. 20 perc perfúzió után az agyat kivettem az elektród eltávolítását követően. A kivett agyat 4% PFA oldatban posztfixáltam a hisztológiai jelölésig.

3.3.2 *Immunofluoreszcens jelölés*

A kivett mintákat 30% szukróz oldatba (PBS-ben) merítettem 4°C-on legalább egy éjszakán keresztül, vagy ameddig az agy átitatódott. A koronális metszeteket (krio, 40 µm vastag) csúszó mikrotómmal (Leica SM2010 R) készítettem, majd 24 lyukú lemezekben tároltam 1% PBS-ben 0.3% Na-aziddal. A szabadon lebegő metszeteket háromszor 10 percig mostam 1x PBS-el, majd blokkoltam egy órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoló pufferben (5% Bovine Serum Albumin (Thermo Scientific)) ami 0.3% Triton-X-et (Sigma) tartalmazott a membrán permeabilizációjának érdekében. A blokkolást 3x10 perc mosás követte 0.3% Triton-X-el, majd a GFAP antitest került rá a metszetekre 1% PBS-ben. A szeleteket egy éjszakán keresztül 4°C-on tartottam további 3x10 perc mosás és a megfelelő másodlagos antitesttel való kezelés előtt. A másodlagos antitest mellett, fluoreszcens Nissl festést is tettem a metszetekre kettő órán keresztül szobahőmérsékleten. A nem bekötött másodlagos antitesteket 1% PBS-el mostam le (3x10 perc). A metszeteket DAPI-t tartalmazó fedőanyaggal Fluoromount-G (#00-4959-52, Invitrogen) fedtem le. A tárgylemezeket a fluoreszcens képalkotásig 4°C-on sötétben tartottam.

3.3.3 Antitestek és képalkotás

A szabadon lebegő metszeteket a következő elsődleges antitestekkel jelöltem: fluoreszcens Nissl festés (NeuroTrace) (1:200, #N21480, Invitrogen) és csirke anti-gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) (1:2500, #PA1-10004, Invitrogen). A GFAP-t fajspecifikus másodlagos antitesttel tettem láthatóvá (5 µg/mL, kecske anti-csirke Alexa Fluor 647, #A-21449, Invitrogen). Az immunofluoreszcens képalkotásra két nappal a jelölés után került sor 20x-os nagyításon Slide Scanner (Pannoramic MIDI II, 3DHISTECH) segítségével kék (DAPI-Q filter) zöld (FITC-Q filter) és távoli vörös (Cy5-Q filter) megvilágítással. A képalkotást követően a képeket a Case Viewer (3DHISTECH) programmal dolgoztam fel és 300 dpi felbontásban TIFF formátumban exportáltam.

4. Új tudományos eredmények és lehetséges hasznosításuk

4.1 A 4-AP által indukált epilepszia karakterizálása B6N egerekben csavarelektrodok segítségével

A tanulmány fő megállapítása, hogy jelentős különbség van az alacsony és magas dózis által kiváltott változásokban az agyi aktivitásbeli rohamok és a mozgás tekintetében is. Az alacsonyabb dózist jellemzi az alacsonyabb amplitúdótartományban történő növekedés, a roham későbbi kialakulása, és rohamok nagyobb változékonysága. Ebben az esetben a viselkedésbeli roham kialakulása az EEG tüskés aktivitásához képest eltolódott. A magasabb dózist jellemzi az EEG és az mozgás aktivitásának nagyobb intenzitása. Az egerekben megfigyelt viselkedés lényegesen eltér a patkány rohamok jellegzetességeitől, nem jelennek meg az epileptikus rohamok jellegzetes stádiumai, ehelyett egy folyamatosan növekvő majd csökkenő kortikális tüskés aktivitás látható. A beta-, theta-, és gamma frekvenciasávokban történt teljesítmény növekedést figyeltem meg. A 10 mg/kg dózis esetében a viselkedésbeli roham késéssel követte az agyi aktivitást, a tüskék amplitúdója hozzávetőlegesen megkétszereződött az alacsonyabb dózishoz képest és a nagyjából másfél órás roham hamarabb érte el a csúcspontját. A 10 mg/kg-os dózis melyet Yamaguchi & Rogawski vizsgáltak Swiss egérben, hasonlóan hatásos B6N egerekben is, továbbá a tanulmány megerősíti Van Erum et al. javaslatát a Racine-skála felülvizsgálatával kapcsolatban^{46,57}. Az eredmények alapján az alacsonyabb, 4 mg/kg dózist a rohamok kezdeti szakaszának vizsgálatára javaslom. A 10 mg/kg dózis megbízhatóan alkalmazható súlyos epilepsziás aktivitás kialakítására annak ellenére, hogy az jelentősen eltér a patkányokban tapasztalt rohamoktól. A 4-AP dózisának beállításával az egér modell finomhangolhatóvá vált és nagyobb bizonyossággal alkalmazhatóvá molekuláris tanulmányok számára. Azonban szeretném hangsúlyozni, hogy az egér epilepszia modell nagyban különbözik az emberben tapasztalt változásoktól, hiszen nem spontán kialakuló rohamaktivitást eredményez, így az epileptikus rohamok genezise általa nem vizsgálható.

4.2 A patkány skizofrénia modell vizsgálata flexibilis poliimid alapú μ ECoG elektróddal

A poliimid alapú μ ECoG elektród előnye, hogy egyidőben képes több funkcionálisan eltérő kérgi területről elvezetni kérgi oszcillációkat invazívan a kortikális felszínről vagy non-invazívan a koponyáról. A kontaktuspontok pozíciója és mérete szabadon változtatható, a polimer réteg pedig átlátszóvá is tehető optikai képalkotási módszerekkel való kombinálás érdekében⁵⁸. A skizofrénia-szerű disszociációs állapotot intraperitoneálisan beadott ketaminnal váltottam ki. Az injekciót követően a magas gamma frekvenciában megnövekedett aktivitás volt látható. A gamma frekvencia teljesítmény spektrumának analízisével egy 150Hz-es csúcs volt látható, melyet Cordon et al. írt le 2015-ben⁵⁹. A koherencia klaszterezés egyedülálló megközelítés mely meghatározza a hasonlósági mérésekkel az agykéreg funkcionális egységeit miközben nyomon követi a kapcsolatok hálójának változásait is. Az agyterületek kapcsolódási struktúrájának a vizualizálása nem egyértelmű problémakör, a koherencia klaszterezése által ábrázolhatóvá válik a kapcsolatok szerkezeti hálója, mely hasznos lehet a feltáró adatelemzés számára. A stabil koherencia térképek hátterében erősen zavart teljesítmény eloszlás volt látható a ketamin beadását követően. Ez befolyásolhatja az agyterületek közötti szinkronitás viszonyokat ezáltal okozva a dezorientált viselkedést. A ketamin beadásnak komoly hatása volt a jel terjedésére a patkány kérgen és a poliimid ECoG megbízható eszköznek bizonyult az elektromos jelek tér-időbeli mintázatában bekövetkező változásainak vizsgálatára. A ketamin beadás hatására a fiziológiás állapotban kevesebb térben nagyobb elterjedésű klaszter széttöredezett, nagyobb számú, kisebb kiterjedésű klaszterek voltak megfigyelhetőek. Ezzel párhuzamosan a vizuális kiváltott válaszok térbeli terjedését is befolyásolta a ketamin, a fiziológiás állapotban lévő normál terjedési mintázat eltűnt, feltételezhetően azért, mert a vizuális információ feldolgozás során az agyterületek közötti információátvitel normál láncát blokkolta a ketamin. A bemutatott adatfeldolgozási módszerrel kombinálva az elektród alkalmas magas felbontású krónikus kortikális mérésekre patkány modellen.

4.3 A tiolén-akrilát alapú μ ECoG elektród alkalmazhatóságának vizsgálata

A tiolén-akrilát alapú μ ECoG elektród krónikus (10 hét) beültetésének hatását vizsgáltam az egér agykéregre. DAPI, NeuroTrace és GFAP jelöléseket alkalmaztam koronális metszeteken. Vizsgáltam a sejtszám változását DAPI festés alapján ami minden sejt magját festi. Az elsődleges kontrollhoz képest (kontralaterális félteke) páros t-tesztel kimutattam, hogy nem volt szignifikáns különbség a sejtszámban ($P=0.77315$). Vizsgáltam továbbá a fluoreszcens intenzitás változását a három jelölésben. A DAPI esetében nem találtam szignifikáns változást a jelintenzitásban a beültetett elektród alatti kérgi terület és az elsődleges kontroll között ($P=0.067666$). A krónikus immunválasz, amelyet a GFAP asztrocita jelöléssel és a fluoreszcens Nissl jelöléssel tettem láthatóvá kimutatta, hogy az idegen test reakció az beültetést követő 80. napon is még folyamatban volt. Mindkét esetben a fluoreszcens jel intenzitásának különbségét vizsgáltam a két kérgi terület között. Az elsődleges kontrollhoz képest a GFAP szignál intenzitásának különbsége szignifikáns volt ($P=1,19E^{-13}$) mutatva, hogy 10 hétnyi beültetés után is folytatódtak a helyreállítási és hegesedési mechanizmusok. Szintén szignifikáns volt a NeuroTrace szignál intenzitásának változása is az elsődleges kontroll kérgi régióhoz képest ($P=0.000186$) ami tükrözi az idegsejtekben történő következetesen magas fehérjeszintézist, mivel sérült vagy regenerálódó neuronokban a Nissl-anyag a sejtest perifériáján oszlik el. Másodlagos kontrollként egy állatba csak fedőüveget (az elektród fölötti koponyarész helyettesítőjét) építettünk be elektród beültetés nélkül hogy lássuk, hogy a fedőlemez által kifejtett nyomás okozta-e a változásokat. A GFAP és NeuroTrace esetében a fluoreszcens intenzitás változások szintén magasak voltak (GFAP: $P=0.003566$, NeuroTrace: $P=0.001807$), míg a DAPI fluoreszcens intenzitásának különbségében nem volt szignifikáns változás ($P=0.199614$). Ezeknek az állatoknak a szövettani vizsgálata alátámasztotta, hogy az intenzitás változások nem a tervezett elektród jelenetéből, hanem a fedőüveg jelenlétéből és a sebészeti beavatkozásból fakadnak (pl. a dura mater eltávolításából). Ez a tanulmány az első, amely megerősíti a tiolén-akrilát alapú μ ECoG eszköz használhatóságát mint krónikusan beültethető neurális interfész.

5. Publikációk

5.1 Tézispontokhoz tartozó tudományos publikációk

Fedor, F. Z., Paraczký, C., Ravasz, L., Tóth, K., Borhegyi, Z., Somogyvári, Z., ... & Fekete, Z. (2020). Electrophysiological and behavioral properties of 4-aminopyridine-induced epileptic activity in mice. *Biologia Futura*, 1-8.

Fedor, F. Z., Zátónyi, A., Cserpán, D., Somogyvári, Z., Borhegyi, Z., Juhász, G., & Fekete, Z. (2020). Application of a flexible polymer microECoG array to map functional coherence in schizophrenia model. *MethodsX*, 101117.

F. Z. Fedor, M. Madarász, A. Zátónyi, Á. Szabó, T. Lőrincz, V. Danda, L. Spurgin, C. Manz, B. Rózsa, Z. Fekete (2021). Soft, thiol-ene/acrylate-based electrode array for long-term recording of intracranial EEG signals with improved biocompatibility in mice
<https://doi.org/10.1002/admt.202100942>

5.2 Egyéb tudományos publikációk

Kovács, R. Á., Vadászi, H., Bulyáki, É., Török, G., Tóth, V., Mátyás, D., ... & Kardos, J. (2021). Identification of Neuronal Pentraxins as Synaptic Binding Partners of C1q and the Involvement of NP1 in Synaptic Pruning in Adult Mice. *Frontiers in immunology*, 11, 3792.

Zátónyi, A., Szabó, Á., Fedor, F., Horváth, Á. C., Pongrácz, A., & Fekete, Z. (2018). Trendek a polimer alapú mikroimplantátumok fejlesztésében. *ANYAGOK VILÁGA*, 15(1), 17-33.

Zátónyi, A., Fedor, F., Borhegyi, Z., & Fekete, Z. (2018). In vitro and in vivo stability of black-platinum coatings on flexible, polymer microECoG arrays. *Journal of neural engineering*, 15(5), 054003.

6. Irodalomjegyzék

- 1 Yang, T., Hakimian, S. & Schwartz, T. H. Intraoperative ElectroCorticoGraphy (ECog): indications, techniques, and utility in epilepsy surgery. *Epileptic Disorders* **16**, 271-279 (2014).
- 2 Vakani, R. & Nair, D. R. Electrocorticography and functional mapping. *Handbook of clinical neurology* **160**, 313-327 (2019).
- 3 Bazhenov, M., Lonjers, P., Skorheim, S., Bedard, C. & Destexhe, A. Non-homogeneous extracellular resistivity affects the current-source density profiles of up-down state oscillations. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **369**, 3802-3819 (2011).
- 4 Buzsáki, G., Anastassiou, C. A. & Koch, C. The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature reviews neuroscience* **13**, 407-420 (2012).
- 5 Ranjandish, R. & Schmid, A. A Review of Microelectronic Systems and Circuit Techniques for Electrical Neural Recording Aimed at Closed-Loop Epilepsy Control. *Sensors* **20**, 5716 (2020).
- 6 Fekete, Z. & Pongracz, A. Multifunctional soft implants to monitor and control neural activity in the central and peripheral nervous system: A review. *Sensor Actuat B-Chem* **243**, 1214-1223, doi:10.1016/j.snb.2016.12.096 (2017).
- 7 Rubehn, B. & Stieglitz, T. In vitro evaluation of the long-term stability of polyimide as a material for neural implants. *Biomaterials* **31**, 3449-3458, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.053 (2010).
- 8 Zátonyi, A. *et al.* Transparent, low-autofluorescence microECoG device for simultaneous Ca²⁺ imaging and cortical electrophysiology in vivo. *Journal of neural engineering* **17**, 016062 (2020).
- 9 Engel, A. K., Moll, C. K., Fried, I. & Ojemann, G. A. Invasive recordings from the human brain: clinical insights and beyond. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 35-47 (2005).
- 10 Burle, B. *et al.* Spatial and temporal resolutions of EEG: Is it really black and white? A scalp current density view. *Int J Psychophysiol* **97**, 210-220, doi:10.1016/j.ijpsycho.2015.05.004 (2015).
- 11 Hassler, C., Boretius, T. & Stieglitz, T. Polymers for neural implants. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **49**, 18-33 (2011).
- 12 Fekete, Z. & Pongrácz, A. Multifunctional soft implants to monitor and control neural activity in the central and peripheral nervous system: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **243**, 1214-1223 (2017).
- 13 Kuzum, D. *et al.* Transparent and flexible low noise graphene electrodes for simultaneous electrophysiology and neuroimaging. *Nature communications* **5**, 1-10 (2014).
- 14 Yeager, J. D., Phillips, D. J., Rector, D. M. & Bahr, D. F. Characterization of flexible ECoG electrode arrays for chronic recording in awake rats. *J Neurosci Meth* **173**, 279-285 (2008).
- 15 Chen, Y.-Y. *et al.* Design and fabrication of a polyimide-based microelectrode array: application in neural recording and repeatable electrolytic lesion in rat brain. *J Neurosci Meth* **182**, 6-16 (2009).
- 16 Wurth, S. *et al.* Long-term usability and bio-integration of polyimide-based intra-neural stimulating electrodes. *Biomaterials* **122**, 114-129 (2017).
- 17 Baek, D.-H. *et al.* A thin film polyimide mesh microelectrode for chronic epidural electrocorticography recording with enhanced contactability. *Journal of neural engineering* **11**, 046023 (2014).
- 18 Ordonez, J. S., Boehler, C., Schuettler, M. & Stieglitz, T. in *2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 5134-5137 (IEEE).
- 19 Boppart, S. A., Wheeler, B. C. & Wallace, C. S. A flexible perforated microelectrode array for extended neural recordings. *IEEE Transactions on biomedical engineering* **39**, 37-42 (1992).
- 20 Wu, F., Im, M. & Yoon, E. in *2011 16th International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference*. 966-969 (IEEE).

- 21 Zátonyi, A. *et al.* Functional brain mapping using optical imaging of intrinsic signals and
simultaneous high-resolution cortical electrophysiology with a flexible, transparent microelectrode
array. *Sensors and Actuators B: Chemical* **273**, 519-526 (2018).
- 22 Cogan, S. F. *et al.* Sputtered iridium oxide films for neural stimulation electrodes. *Journal of
Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society
for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for
Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* **89**, 353-361 (2009).
- 23 Ni, H.-j., Liu, J.-g., Wang, Z.-h. & Yang, S.-y. A review on colorless and optically transparent
polyimide films: Chemistry, process and engineering applications. *Journal of Industrial and
Engineering Chemistry* **28**, 16-27 (2015).
- 24 Márton, G. *et al.* A multimodal, SU-8-platinum-polyimide microelectrode array for chronic in vivo
neurophysiology. *PLoS One* **10**, e0145307 (2015).
- 25 Cheung, K. C., Renaud, P., Tanila, H. & Djupsund, K. Flexible polyimide microelectrode array for
in vivo recordings and current source density analysis. *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 1783-
1790 (2007).
- 26 Constantin, C. P., Aflori, M., Damian, R. F. & Rusu, R. D. Biocompatibility of polyimides: A mini-
review. *Materials* **12**, 3166 (2019).
- 27 Konerding, W., Froriep, U., Kral, A. & Baumhoff, P. New thin-film surface electrode array enables
brain mapping with high spatial acuity in rodents. *Scientific reports* **8**, 1-14 (2018).
- 28 Qiang, Y. *et al.* Transparent arrays of bilayer-nanomesh microelectrodes for simultaneous
electrophysiology and two-photon imaging in the brain. *Science advances* **4**, eaat0626 (2018).
- 29 Toda, H. *et al.* Simultaneous recording of ECoG and intracortical neuronal activity using a flexible
multichannel electrode-mesh in visual cortex. *Neuroimage* **54**, 203-212 (2011).
- 30 Kaiju, T. *et al.* High spatiotemporal resolution ECoG recording of somatosensory evoked potentials
with flexible micro-electrode arrays. *Frontiers in neural circuits* **11**, 20 (2017).
- 31 Brodnick, S. K. *et al.* μ ECoG recordings through a thinned skull. *Frontiers in neuroscience* **13**,
1017 (2019).
- 32 Vitale, F. *et al.* Biomimetic extracellular matrix coatings improve the chronic biocompatibility of
microfabricated subdural microelectrode arrays. *PLoS One* **13**, e0206137 (2018).
- 33 Ledochowitsch, P. *et al.* Strategies for optical control and simultaneous electrical readout of
extended cortical circuits. *J Neurosci Meth* **256**, 220-231 (2015).
- 34 Park, D.-W. *et al.* Fabrication and utility of a transparent graphene neural electrode array for
electrophysiology, in vivo imaging, and optogenetics. *Nature protocols* **11**, 2201-2222 (2016).
- 35 Richner, T. J. *et al.* Optogenetic micro-electrocorticography for modulating and localizing cerebral
cortex activity. *Journal of neural engineering* **11**, 016010 (2014).
- 36 Kwon, K. Y., Sirowatka, B., Weber, A. & Li, W. Opto- μ ECoG array: A hybrid neural interface with
transparent μ ECoG electrode array and integrated LEDs for optogenetics. *IEEE transactions on
biomedical circuits and systems* **7**, 593-600 (2013).
- 37 Castagnola, V. *et al.* Parylene-based flexible neural probes with PEDOT coated surface for brain
stimulation and recording. *Biosensors and Bioelectronics* **67**, 450-457 (2015).
- 38 Schendel, A. A. *et al.* A cranial window imaging method for monitoring vascular growth around
chronically implanted micro-ECoG devices. *J Neurosci Meth* **218**, 121-130 (2013).
- 39 Pepin, B. Transparent Micro-electrocorticography (ECoG) Arrays for Optogenetic Mapping of
Surface Potentials. (2013).
- 40 Khodagholy, D. *et al.* NeuroGrid: recording action potentials from the surface of the brain. *Nat
Neurosci* **18**, 310-315, doi:10.1038/nn.3905 (2015).
- 41 Zhang, J. *et al.* Stretchable Transparent Electrode Arrays for Simultaneous Electrical and Optical
Interrogation of Neural Circuits in Vivo. *Nano Lett* **18**, 2903-2911,
doi:10.1021/acs.nanolett.8b00087 (2018).

- 42 Henle, C. *et al.* First long term in vivo study on subdurally implanted micro-ECoG electrodes, manufactured with a novel laser technology. *Biomed Microdevices* **13**, 59-68, doi:10.1007/s10544-010-9471-9 (2011).
- 43 Blau, A. *et al.* Flexible, all-polymer microelectrode arrays for the capture of cardiac and neuronal signals. *Biomaterials* **32**, 1778-1786, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.014 (2011).
- 44 Mineev, I. R. *et al.* Biomaterials. Electronic dura mater for long-term multimodal neural interfaces. *Science* **347**, 159-163, doi:10.1126/science.1260318 (2015).
- 45 Schafer, E. W., Jr., Brunton, R. B. & Cunningham, D. J. A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. *Toxicol Appl Pharmacol* **26**, 532-538, doi:10.1016/0041-008x(73)90291-3 (1973).
- 46 Yamaguchi, S. & Rogawski, M. A. Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* **11**, 9-16, doi:10.1016/0920-1211(92)90016-m (1992).
- 47 Humphreys, S. R. *et al.* Toxicity and antileukemic effectiveness of pyridine derivatives and 1,3,4-thiadiazole derivatives in mice. Relationship to nicotinamide antagonism. *Cancer Res* **22**, Suppl 483-550 (1962).
- 48 Pasantes-Morales, H. & Arzate, M. E. Effect of taurine on seizures induced by 4-aminopyridine. *J Neurosci Res* **6**, 465-474, doi:10.1002/jnr.490060404 (1981).
- 49 Rubehn, B., Bosman, C., Oostenveld, R., Fries, P. & Stieglitz, T. A MEMS-based flexible multichannel ECoG-electrode array. *J Neural Eng* **6**, 036003, doi:10.1088/1741-2560/6/3/036003 (2009).
- 50 Słowiński, P. *et al.* Background EEG connectivity captures the time-course of epileptogenesis in a mouse model of epilepsy. *Eneuro* **6** (2019).
- 51 Wu, C., Wais, M., Sheppy, E., del Campo, M. & Zhang, L. A glue-based, screw-free method for implantation of intra-cranial electrodes in young mice. *J Neurosci Methods* **171**, 126-131, doi:10.1016/j.jneumeth.2008.03.001 (2008).
- 52 Lecomte, A., Descamps, E. & Bergaud, C. A review on mechanical considerations for chronically-implanted neural probes. *Journal of neural engineering* **15**, 031001 (2018).
- 53 Rubehn, B., Bosman, C., Oostenveld, R., Fries, P. & Stieglitz, T. A MEMS-based flexible multichannel ECoG-electrode array. *Journal of neural engineering* **6**, 036003 (2009).
- 54 Hollenberg, B. A., Richards, C. D., Richards, R., Bahr, D. F. & Rector, D. M. A MEMS fabricated flexible electrode array for recording surface field potentials. *J Neurosci Meth* **153**, 147-153 (2006).
- 55 Sillay, K. A. *et al.* Long-term measurement of impedance in chronically implanted depth and subdural electrodes during responsive neurostimulation in humans. *Brain Stimul* **6**, 718-726 (2013).
- 56 Zátonyi, A. *et al.* A softening laminar electrode for recording single unit activity from the rat hippocampus. *Scientific reports* **9**, 1-13 (2019).
- 57 Van Erum, J., Van Dam, D. & De Deyn, P. P. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy Behav* **95**, 51-55, doi:10.1016/j.yebeh.2019.02.029 (2019).
- 58 Zátonyi, A. *et al.* in *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*. 610.
- 59 Cordon, I. *et al.* Coupling in the cortico-basal ganglia circuit is aberrant in the ketamine model of schizophrenia. *European neuropsychopharmacology* **25**, 1375-1387 (2015).