

Agy-gép interfészek új perspektívában: a neocortex egyidejű vizsgálata nagy sűrűségű mikroelektród rendszerekkel és kétfoton mikroszkópiával

OTKA PD 121015, 2016.12.01 - 2019.11.30

Projekt záró beszámoló

Projektvezető:

Dr. Márton Gergely
marton.gergely@ttk.mta.hu

Tartalom

Összefoglalás.....	2
1. Mikroszkópokkal történő egyidejű használatra optimalizált MEMS mikroelektródok.....	3
2. A kétfoton lézer által gerjesztett fotoelektromos műtermék elektrofiziológiai jelből történő elmiminálása.....	5
3. Elektrofiziológiai mérésekkel és kétfoton mikroszkópiával kapott adatokat feldolgozó neurális hálók fejlesztése.....	7
4. A projekt további hatásai	8

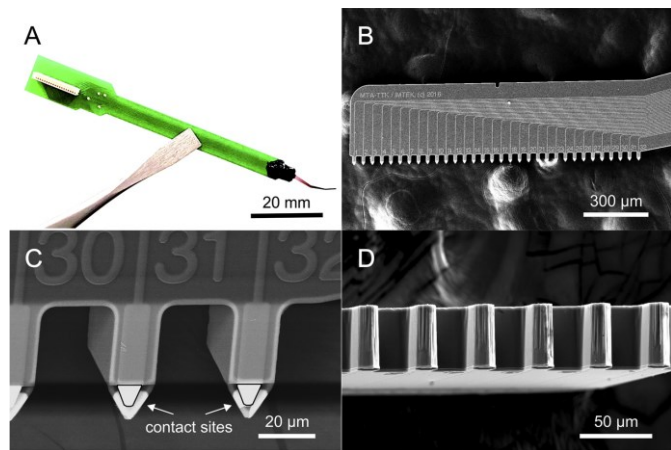
Összefoglalás

Az alábbi beszámoló három olyan részeredményt mutat be röviden, melyek az agy-gép interfészekben hasznosítható módon lehetővé teszik a neocortexben lévő neuronok jeleinek egyidejű regisztrációját nagy sűrűségű mikroelektród rendszerekkel és kétfoton mikroszkópiával. Az eredmények között szerepelnek a mikroszkóp geometriájához optimalizált in vitro és in vivo mikro-elektromechanikai rendszerek (MEMS) gyártástechnológiájával készült multielektródok, a fotoelektromos hatásból eredő, a hasznos jeleknél nagyságrendekkel nagyobb amplitúdójú műtermékeket elimináló algoritmus, valamint olyan modern mesterséges neurális hálók, melyek az elektrofiziológiai és kétfoton mikroszkópos jelfolyamokban sejtaktivitásokat találnak és különböztetnek meg. Ezekből az eredményekből 3 db olyan nemzetközi, lektorált, impact faktoral rendelkező, Q1 besorolású folyóiratcikk született, melyben a projektvezető utolsó szerzőként szerepel. Az összefoglaló végén említésre kerülnek a kutatás további, még nem publikált hatásai. Például a mérések végzésére különböző hátráltató tényezők miatt nem alkalmas holtidőkben többek között az agy-gép interfészek szakirodalmát áttekintő cikk megírásába kezdtünk.

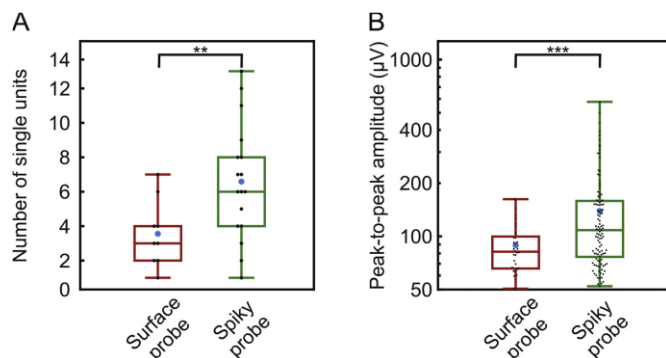
1. Kétfoton mikroszkóppal történő egyidejű használatra optimalizált MEMS mikroelektródok

Az *in vitro* használatra fejlesztett MEMS eszközről részletesebb leírás található az alábbi publikációban: Meszéna Domokos, Kerekes Bálint Péter, Pál Ildikó, Orbán Gábor, Fiáth Richárd, Holzhammer Tobias, Ruther Patrick, Ulbert István, Márton Gergely: A silicon-based spiky probe providing improved cell accessibility during *in vitro* slice recordings, *Sensors And Actuators B-Chemical* 297 Paper: 126649 (2019), *impakt faktor*: 6,393

Az ebben a tanulmányban bemutatott 32-csatornás, 25 μm -tól 100 μm -ig terjedő raszterű multielektródokkal az egy sorban kiálló érzékelőfelületeket enyhén az agyszeletek felszíne alá tudjuk juttatni, és az eszközök minden egyes felhasználása során olyan egysejt aktivitásokat mértünk, melyek az ún. éles hullám ("sharp wave") populációs aktivitásokat kísérték. A kialakítás előnye, hogy az ún vakfolt problémát ("dead spot problem") megoldja, Ez a probléma akkor jelentkezik, amikor az érzékelőfelületek az elektródtestek élétől vagy hegyétől túl távol helyezkednek el. Ez megnehezíti vagy ellehetetleníti azt, hogy pl. egy üvegpipettával szimultán tudjunk a közeli sejtekből jeleket elvezetni. Az újonnan kifejlesztett „tüskés” (spiky) multielektródjainkkal sikeresen végeztünk ilyen páros méréseket, két-foton mikroszkóp objektív alatt. Ezek a mérések validált ("ground truth") adatokat szolgáltathatnak az egyes neuronaktivitások detektálásához és sejtenkénti szétválogatásához. A multielektródról készült képek és részletek a használatával kapott eredményekből az 1-2. ábrán láthatóak.

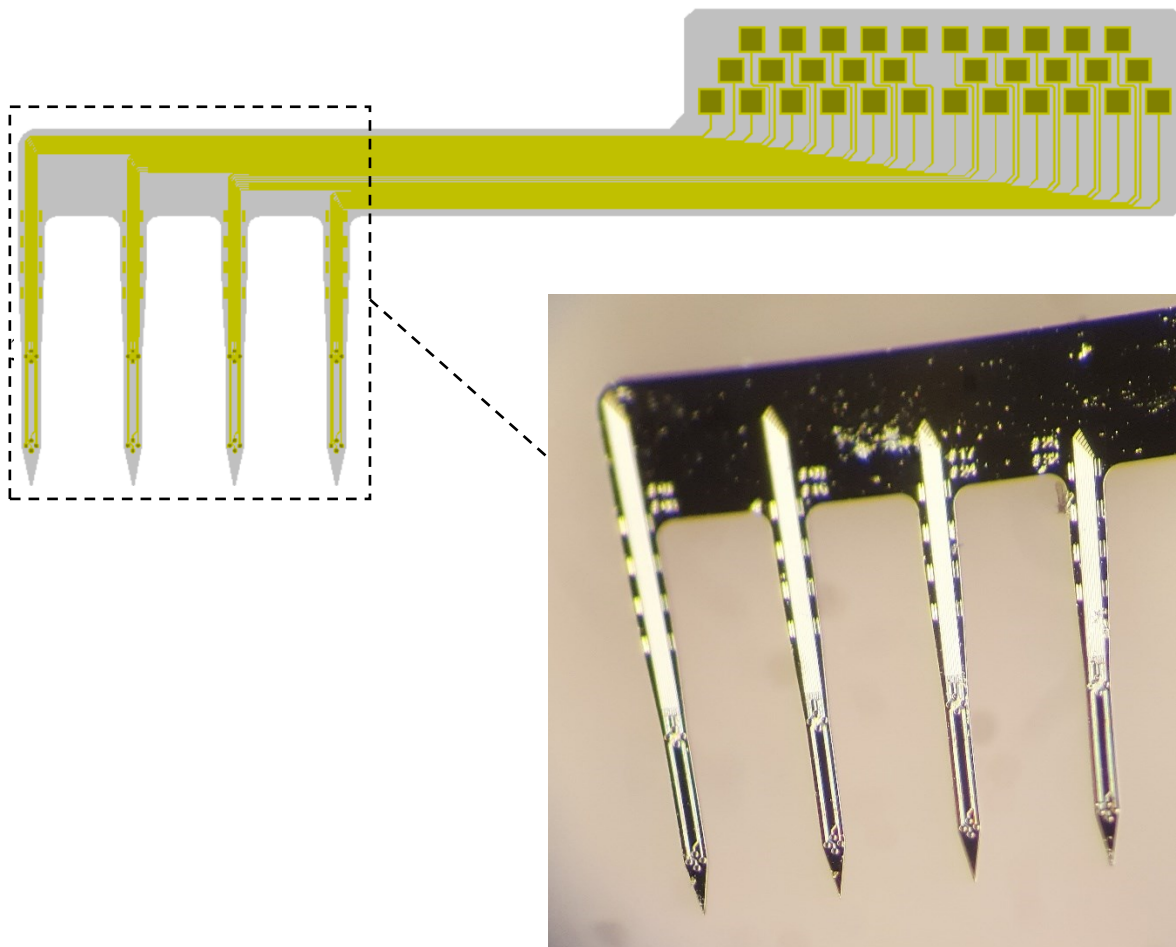


1. ábra: A kétfoton mikroszkóp objektív alatti használatra tervezett „tüskés” (spiky) 32-csatornás MEMS mikroelektród



2. ábra: az újonnan kifejlesztett tüskés mikorelektróddal mért jelek összehasonlítása hagyományos *in vitro* használatos elektród jeleivel. Előbbivel nagyobb számú és amplitúdójú egysejt aktivitás mérhető.

In vivo használatra szánt MEMS eszközöket terveztünk és gyártattunk a freiburgi Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK) intézettel kooperációban. Az eszközöket háromféle elektród-elrendezéssel alakítottuk ki. Ezek mindegyike 32 csatornát tartalmaz, négy száron. Készültek lineáris – 900 μm és 1800 μm hosszán elosztott konstrukciók, valamint a 3. és 5. kortikális réteget célzó tetródokat tartalmazóak (3. ábra). A kész implantátumokról előzetesen pásztázó elektronmikroszkópos képeket készítettünk, valamint előzetes impedancia-teszteket végeztünk sóoldatban, hogy meggyőződjünk a használhatóságukról. A tesztek során nem tapasztaltunk anomáliát. A beültetéseket végeztünk GCaMP6f fehérjét expresszáló génmódosított egerek neocortex agyi régióiba, azonban a kísérletek alacsony száma miatt ezeket a méréseket még nem találtuk közlésre alkalmasnak.

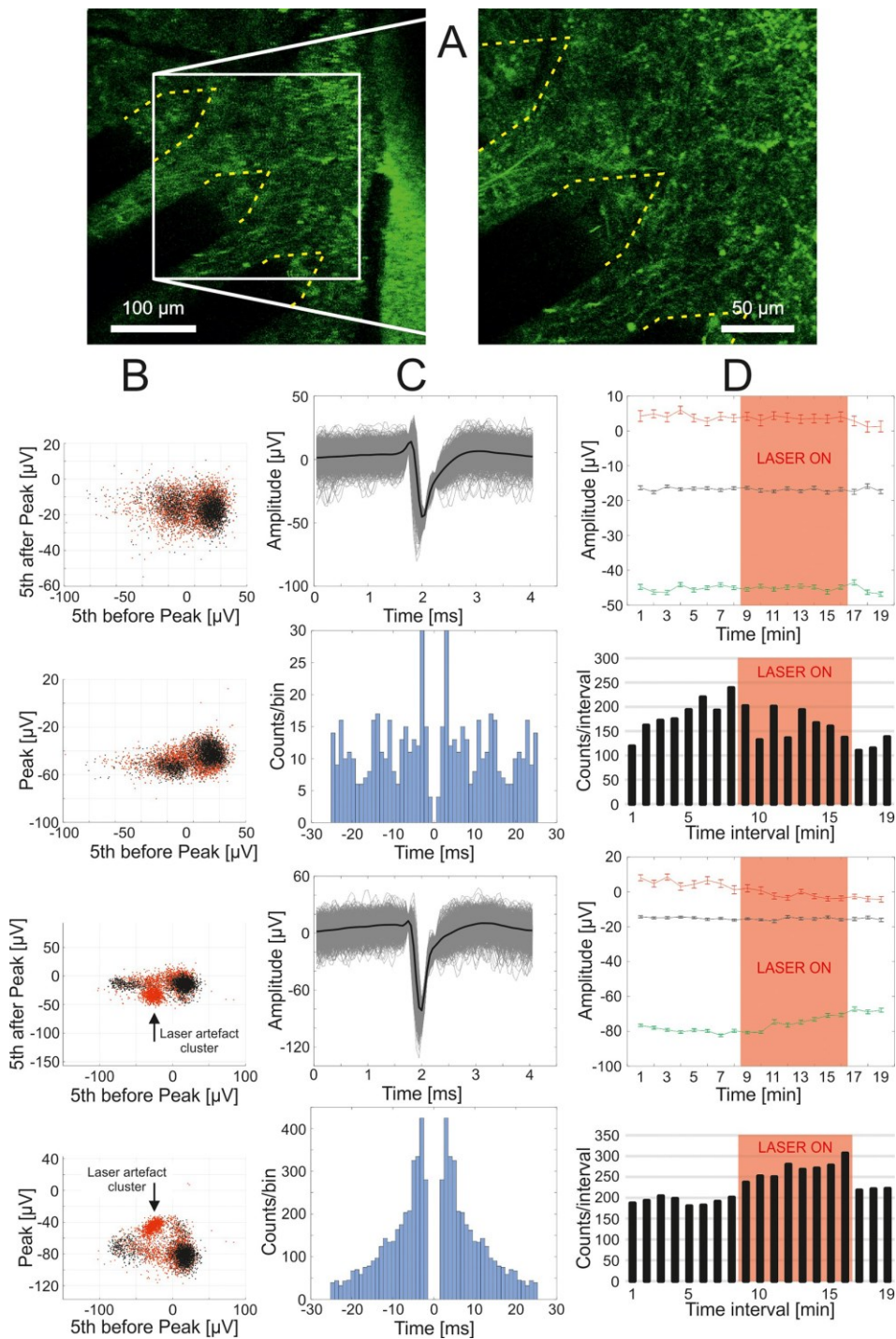


3. ábra: Az in vivo használatra fejlesztett eszköz mikrotechnológiai maszkterve (fent) és a legyártott eszköz mikroszkópos felvétele (lent).

2. A kétfoton lézer által gerjesztett fotoelektromos műtermék elektrofiziológiai jelből történő eliminálása

Erről a részeredményről részletesebb leírás található az alábbi publikációban: Orbán Gábor, Meszéna Domokos, Tasnády Kinga Réka, Rózsa Balázs, Ulbert István, Márton Gergely: Method for spike detection from microelectrode array recordings contaminated by artifacts of simultaneous two-photon imaging, PLOS ONE 14 : 8 p. e0221510 (2019), impact faktor: 2,776.

Korábbi publikációk szerint a szimultán végzett két-foton képalkotás és MEMS multielektrodokkal történő elektrofiziológiai mérések közben a fotoelektromos zaj súlyos problémát okoz. Saját, GCaMP6f fehérjét expresszáló génmódosított egerek agyszövetében végzett kísérleteink alapján, amikor az elektrodok a két-foton ablakon belül helyezkednek el, a képalkotó lézer a legnagyobb egysejt aktivitásoknál körülbelül 50-szer nagyobb amplitúdójú műtermékeket generál, és az összetett spektrummal rendelkező fotoelektromos zaj egyszerű szűrőkkel nem küszöbölhető ki. Szerencsére azonban egy ún. fésűszűrő ("comb filter") alapú, adaptív algoritmussal sikeresen eliminálni tudtuk a műtermékeket, olyan mértékben, hogy a két-foton mikroszkópiával szimultán mért elektrofiziológiai jelekből lehetőségünk legyen egysejt aktivitások detektálására, sőt, sejtek szerinti elkülönítésére ("spike sorting"). A szűrt jelekben kis amplitúdójú, tüskeszerű műtermékek még maradtak, melyek szinkronban voltak a lézerzajjal, de ezek az egysejt aktivitások többségénél már jóval kisebbek voltak. Ezt a szűrőt azokra a jel-részletekre is alkalmaztuk, melyeknél a képalkotó lézer ki volt kapcsolva, hogy ezek megfelelő referenciát szolgáltatassanak annak megállapítására, a módszer valóban alkalmas a sejtaktivitások elkülönítése a lézerzajjal terhelt jelekben. Az adaptív fésűszűrővel szűrt elektrofiziológiai jelekből detektált egysejt aktivitásokat jellemző vonások ("feature"-ök) stabilitását megvizsgáltuk aszerint, hogy változnak időben és a lézerzaj hatására: a kísérletek során egy-egy 8 perces két-foton képalkotás-mentes felvétel után bekapcsoltuk a két-foton mikroszkópot és a MEMS multielektrod környezetében lévő szövetet pásztáztuk 8 percen keresztül, majd a 4 percre újra kikapcsoltuk a mikroszkópot. A kifejlesztett algoritmusunkat alkalmazva, a sejtaktivitások elkülönítéséhez használt vonásokat nem befolyásolta a két-foton mikroszkóp által kibocsátott lézerfény, ezek az egymás után következő zajos és zajmentes mérések alatt stabilak maradtak (ld. 4. ábra a következő oldalon). Ezzel a módszerrel legjobb tudásunk szerint elsőként váltunk képessé arra, hogy egy szimultán két-foton mikroszkópiás és MEMS multielektrodos mérésekben egysejt-aktivitásokat detektáljunk és különítsünk el egyes idegsejtek szerint. Az újonnan kifejlesztett módszernek hátrányai is akadnak: alkalmazásához "tisztá", lézerzajmentes felvételeket kell készíteni a szövetből a szimultán mérés előtt (és célszerűen utána is), hogy verifikálhatóak legyenek az egysejt aktivitások vonásai. Továbbá, az alkalmazott fésűszűrő jobban torzítja az egysejt aktivitásokat, mint pl. az általánosabban használt 300 Hz és 3000 Hz közötti sáváteresztő szűrő. A módszer továbbfejleszhető komplexebb szoftverré, mely figyelembe veszi a lézerzaj periodicitását és nemcsak frekvenciatartományban, hanem időtartományban is szűri azt.

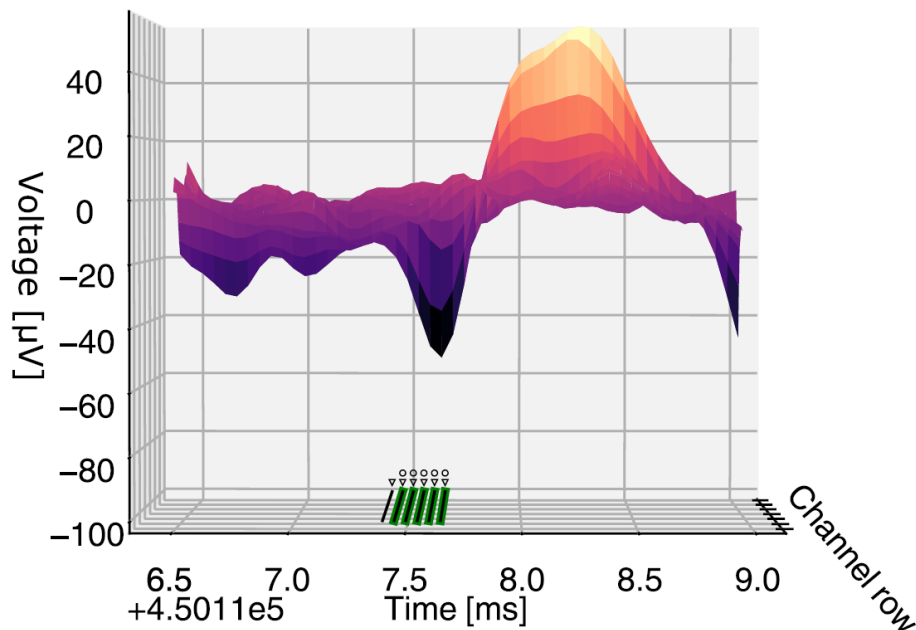


4. ábra. Szimultán elektrofiziológiai és kétfoton mikroszkópos mérések reprezentatív eredményei. A vizsgált jeleket szolgáltató elektródok a kétfoton képablakban helyezkedtek el (A). Az ábra B-D része két példát szemléltet a megkülönböztetett egysejt aktivitásokra. Potenciális egysejt aktivitások jellemző vonások szerint ábrázolva a fésűszűrővel szűrt jelekből (B), azok átlagos jelalakja és autokorrelogramja (C). A fellelt aktivitások stabilitásának validációját a kétfoton lézer mentes és a lézerrel terhelt időszakokban az ábra D része mutatja be.

3. Elektrofiziológiai mérésekkel és kétfoton mikroszkópiával kapott adatokat feldolgozó neurális hálók fejlesztése

Erről a részeredményről részletesebb leírás található az alábbi publikációban: Rácz Melinda, Liber Csaba, Németh Erik, Fiáth Richárd, Rokai János, Harmati István, Ulbert István, Márton Gergely: Spike detection and sorting with deep learning, Journal of Neural Engineering AiP (2019), impakt faktor: 4,551.

Felismerve, hogy a konvolúciós neurális hálók az utóbbi években rohamos mértékben hódítanak teret a jelfeldolgozás különböző területein, sejtaktivitások automatikus felismerésére alkalmas neurális hálókat fejlesztettünk mind a kétfoton mikroszkópiával, mind az elektrofiziológiai mérésekkel kapott jelek számára. Az elektrofiziológiai jeleket feldolgozó hálókból született a fent említett publikáció, melyben bemutatjuk rövid-hosszú távú memóriával (Long short term memory, LSTM) kiegészített konvolúciós neurális háló teljesítményét. Az eredmények alátámasztják, hogy a háló alkalmasak valós időben pontos akciós potenciál érzékelésre és klasszifikációra, ami egy agy-gép interfész vezérlő szoftverének gerincét alkothatja.



5. ábra: egy akciós ponteciál háromdimenziós képe és az érzékelés eredménye. A jelölt pozitív szakasz (zöld vonalak, körökkel jelölve) és az LSTM-mel kiegészített neurális háló által érzékelt adatpontok (vékony fekete vonalak, háromszögekkel jelölve).

4. A projekt további hatásai

A már elfogadott publikációkon túl az alábbi témákat tervezzük folyóiratcikkben közölni.

Simultaneous use of two-photon microscopy and 128-channel microelectrode arrays. (Rácz Melinda, Meszéna Domokos, Orbán Gábor, Rokai János, Fiáth Richárd, Ulbert István, Márton Gergely)

A fotoelektromos zaj eliminálására kifejlesztett módszert sikeresen alkalmaztuk 128-csatornás multielektrodok esetében is. A kétfoton mikroszkópiával kapott és az elektrofiziológiai jeleket korreláltattuk egymással.

Brain-computer interfaces: a review. (Nánási Tibor, Orbán Gábor, Rácz Melinda, Köllöd Csaba, Ulbert István, Márton Gergely)

A projekt során előre nem tervezett holtidők adódtak olyan okokból, mint a különböző multielektrodok elkészítésének elhúzódása, a kétfoton mikroszkóp szervizelésére – utóbbi miatt 2019-ben 5 hónapig nem volt lehetőségünk méréseket végezni. Ezek a holtidők viszont lehetőséget adtak arra, hogy az adatelemzésen túl az agy-gép interfészek kutatási területét összefoglaló cikk megírásába fogjunk.

Fluorescent conductive polymer coating on implanted microelectrodes for visualization in two-photon microscopes. (Orbán Gábor, Marek Tamás, Meszéna Domokos, Kerekes Bálint Péter, Tasnády Kinga Réka, Ulbert István, Mészáros Gábor, Keresztes Zsófia, Márton Gergely)

A kétfoton mikroszkópban fluoreszcens PEDOT bevonattal ellátott elektródokkal kapott előzetes eredményeket konferencián közzöltük, a témát folyóiratcikké tervezzük fejleszteni.