

Újszerű elvezetési technikák fejlesztése egysejt-szintű idegéletteni kutatásokra



Meszéna Domokos

Témavezető:

Dr. Ulbert István, MD., D.Sc.

A PhD Disszertáció tézisei

PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM
INFORMÁCIÓS TECHNOLÓGIAI ÉS BIONIKAI KAR
ROSKA TAMÁS MŰSZAKI ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Budapest, 2019

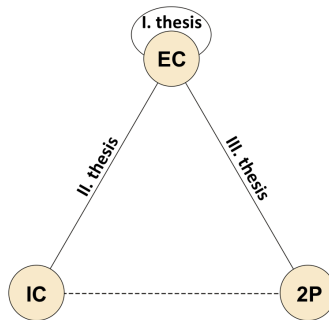
1. Bevezetés és célkitűzések

Az agy megfigyelhető globális állapotainak (úgy mint kognitív folyamatok vagy adott viselkedési formák) biofizikai feltérképezésére különféle megközelítéseket dolgoztak ki és alkalmaztak, mind alulról-felfelé ('*bottom-up*'), mind pedig felülről-lefelé ('*top-down*') történő leírási stratégiák mentén. Az alulról építkező megközelítés legelterjedtebb módszerei az intra- és extracelluláris elektródák útján történő invazív elektrofiziológiai mérések. Az intracelluláris (IC) és az extracelluláris (EC) szavak a mérőelektróda helyét jelzik a megcélzott sejteken belül és kívül. Míg ezek az eszközök, melyek hozzáférést biztosítanak egy vagy több neuron által generált bioelektromos eseményekhez, a celluláris neurotechnológia húzóeszközeivé váltak, invazív jellegük által a hosszútávú és klinikai felhasználásuk korlátozott maradt.

A skála túloldalán ezzel párhuzamosan többféle képalkotó (fMRI, PET) és rögzítési (EEG, MEG) módszereket is kifejlesztettek, amelyek képesek több régió vagy akár az egész agy aktivitásának lekövetésére. Ezen technológiák mindegyikének nagy előnye, hogy nem-invazívak, és így a human klinikai alkalmazásokban is felhasználhatóvá válnak, ahelyett, hogy állatkísérletekre szorítkoznánk. Mindkét megközelítés egyidejű, intenzív fejlődésének ellenére a közbülső részben még mindig van egy jelentős, fel nem tárt rés, nevezetesen az, hogy az egyes sejteket miként lehet térben és időben összehangolni helyi hálózati szinten, hogy specifikus kognitív funkciókat képezzenek. [1, 2]. Ez az úgynevezett '*mezoskopikus*' szint a közelmúltban nagy érdeklődésre tett szert a ideglettanban (és a hozzá tartozó neurotechnológiában), és ez áll a jelen tézis fókuszában is. A mezoskopos tartományt extracelluláris sokcsatornás multielektrodákkal fogom megvizsgálni, amelyek szélesebb területet mintavételeznek, mint az egyelektrodás mérések.

Disszertációmban az *in vitro* agyszeletek elektrofiziológiáját veszem alapul, penetráló extracelluláris, lamináris multielektrodák használatával. Az agy vékony szeletekre vágása lehetővé teszi a mélyebben elhelyezkedő idegsejtekhez való hozzáférést is. Az agyszelet preparátumok olyan idegi tevékenységek vizualizálására vagy elvezetésére is használhatók, amelyeket egyébként nehéz (vagy akár lehetetlen) elérni és *in vivo* körülmények között megfigyelni. Az *in vivo* körülményekhez hasonlóan ekkor is megfigyelhetőek populációs aktivitások, mint például az '*éleshullámú aktivitás*' vagy akár más inherens oszcillációk is [3]. Ezenkívül az *in vitro* agyszelet-mérések további előnye, hogy különböző modalitások kombinálhatóak, amelyek ismét kihívást jelentenének élő állatban. Többek között ilyen kombinációk a tézisekben felsorolt kolokalizált és szimultán IC-EC felvételek vagy a szimultán két-foton (2P) lézermikroszkopos képalkotás [4, 5, 6].

Az értekezés főbb témái a következők: A 'Elméleti háttér' fejezet az IC és az EC potenciálok biofizikai elméletét és azok kapcsolatát tárja fel, valamint bemutatja a legújabb technológiai fejlesztéseket és ezek korlátait. Ezt megismerve az 'Anyagok és módszerek' fejezet részletezi a disszertációs munka során használt sokcsatornás szilícium elektródákat, ezt követően a kísérleti összeállításokat tárgyalja át és az adatelemzési módszerek, valamint szövettani eljárások leírásával zárul. Miután így a munka elméleti és módszertani alapjai is kontextualizálva lettek, az 'Eredmények' fejezet a szerző hozzájárulásait három független téziscsoportra osztva mutatja be: Az 1 ábrán egy



1. ábra. Téziscsoportok (élek) és főbb témakörök (csomópontok) közti összefüggések.

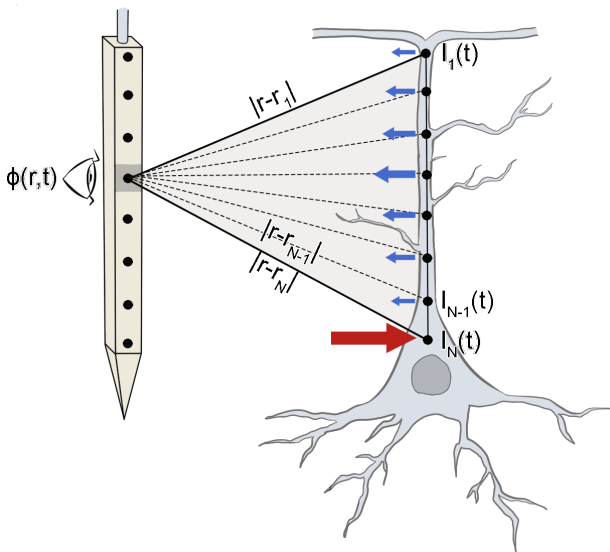
háromszöggel szemléltetem a főtézisek (élek) és alkalmazott kísérleti technikák (csomópontok) kapcsolatait. Habár vannak apró kivételek (például alkalmankénti IC-2P felvételek a II. Téziscsoportban, szaggatott vonallal jelölve), az élek és csomópontok képviselik a legfontosabb alkalmazott rögzítési módozatokat és interakciókat. Az I. Téziscsoport egy újszerű sokcsatornás, tüskeszerűen kiálló kontaktusokkal rendelkező szilícium érzékelő kifejlesztését és tesztelését mutatja be a javított minőségű *in vitro* rögzítésekre tervezve, továbbá egy szisztematikus és kvantitatív összehasonlítással kiemeli az elektróda előnyeit egy, a kereskedelmi forgalomban kapható, sokcsatornás felszíni elektródával szemben. Ez a fejezet csak az EC rögzítésre összpontosít egyéb IC (patch-clamp) technika ötvözése nélkül, és csak egy reprezentatív 2P ábrával mutatja meg, hogy a tüskés elektróda egyébként kompatibilis a két-foton mikroszkópiás képalkotással. A II. Téziscsoport viszont már a kolokalizált és szimultán IC-EC elvezetésre kifejlesztett kísérletes megközelítést részletezi, bemutatja a keletkezett 'ground-truth' adathalmazt, és példát ad a rögzített adatok egy további alkalmazására modell alapú számításokban. E tézisnek nem célja bármelyik adatelemzési módszer (például

klaszterező algoritmusok vagy forrás-lokalizációs módszerek) kritikai kiértékelése, csupán egy specifikus, az egysejt-szintű áramforrás-sűrűség elemzés (skCSD) módszerén való előzetes alkalmazás történik meg a felhasznált adatokkal. A III. Téziscsoport a kombinált sokcsatornás EC és 2P lézeres képalkotás rögzítése során fellépő műtermék, az ún. '*fotoelektromos artefakt*' leírásával indul. A fotoelektromos műtermék szennyezőhatásának kiküszöbölésére szolgáló legújabb stratégiák tárgyalásra kerülnek limitációikkal együtt. Ezután egy kísérleti protokollt mutatok be az időben és térben összehangolt EC és 2P mérések megvalósítására, mind lézeres műtermékkel és anélkül. A protokoll lehetővé teszi a fotoelektromos artefakt vizsgálatát, de ellenőrzési adatokat is szolgáltat a mérések validációjához. A továbbiakban bemutatásra kerül egy, a kombinált felvételek felhasználásával kifejlesztett speciális szűrési algoritmus az extracelluláris jeleken detektált fotoelektromos hatás eliminálására. A disszertáció végül a '*Következtetések és jövőbeli tervek*' fejezettel zárul, mely felsorakoztatja doktori munka új tudományos hozzájárulásait kapcsolódó publikációkkal kiegészítve, valamint kitekintést ad a jövőbeli tervekre és lehetséges alkalmazásokra.

2. Eszközök és módszerek

A neuronok intracelluláris elektrokémiai aktivitása elkerülhetetlenül generál extracelluláris változásokat is az átfolyó transzmembrán áramok által. Az ionáramok, amelyek a sejtaktivitás során ki- be mozognak, csak közvetetten mérhetők extracellulárisan, az elektromos mezőre gyakorolt hatásuk révén. Az EC elektróda egy referenciaértékhez viszonyított mért jeleket rögzít és továbbít egy jelerősítőhöz. A transzmembrán áramok által kiváltott EC potenciál időben és térben is dinamikusan változik, mivel számos áram összeadódhat az EC médium egy adott lokációjában [1, 7, 8]. Tehát az EC potenciál egyszerre tartalmazza a szinaptikus bemenetek és a tüzelési kimenetek összesített jelét, valamint a helyi és távolabbi (térfogatvezetéssel terjedt) aktivitásokat is abban a régióban, ahol az EC mérőelektróda található [9, 8]. Az EC potenciál keletkezésének több biofizikai alapelve régóta ismert. Azonban még akadnak elméleti és kísérleti nyitott kérdések, amelyek hátráltatják az EC potenciáljának kiterjedt értelmezését és teljes funkciójának megértését. A sokcsatornás EC felvételekhez kifejlesztett eszközök széles választékából a kísérletek során a következő jellemzőkre koncentráltam:

- akut rágcsgáló
- *in vitro* agyszelet

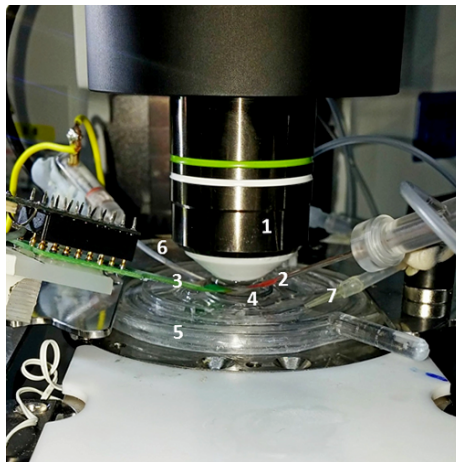


2. ábra. Az extracelluláris potenciál keletkezésének és mérésének elméleti illusztrációja. Az extracelluláris potenciál $\Phi(r, t)$ az elektróda kontaktuson mérve mint egy súlyozott összeg adódik, az összesített transzmembrán áramok $I(t)$ aktivitása által, adott kompartmentális sejt-elektroda távolságokra számolva (r).

- lamináris (1D) kontaktus elrendezés
- szilícium alapú vagy acél szár
- penetráló, illetve felszíni kialakítás
- politródok (16-32 csatorna)

A felvételeket így három különböző, sokcsatornás multielektrodával végeztem, melyek megfeleltek a fenti kritériumoknak. A rögzítési protokollokat mindhárom tézis csoportban hasonló parametrikus beállításokkal alkalmaztam, de a set-upon végzett kisebb változtatások is részletezésre kerülnek. Akut horizontális hippokampusz szeleteket preparáltam kifejlett Wistar patkányokból (200-350 g, egyenletes nem-arány, összesen #30 sikeres kísérlet a dolgozat benyújtásának időpontjában). A Wistar patkányokon kívül Thy1-GCaMP6 transzgenikus egereket is használtam populációs képalkotáshoz 2P mikroszkópiás vizsgálat alatt. Az állatokat a Természettudományi Kutatóközpontban tenyésztették. A táplálék és vízellátás folytonosan rendelkezésre

állt és spontán, *ad libidum* módon történt, és 12–12 órás világos-sötét ciklust tartottunk fenn. Az összes protokoll a magyar állatkezelési és kísérletekre vonatkozó törvény (1998, XXVIII, 243/1998. szakasz) irányelveit követte. Az MTA Állatjóléti és Kísérletes Bizottsága, valamint egyéb állategészségügyi és élelmiszer-ellenőrző szervek jóváhagyták a kísérleti terveket (engedélyszám: PEI/001/2290-11/2015). Erőfeszítéseket tettünk az állatok szenvedésének minimalizálására és a felhasznált állatok számának csökkentése érdekében is. A kísérletet megelőzően az állatokon mély anesztéziát alkalmaztam izofluránnal (min. 0,2 ml/100 g), majd gyors dekapitációt követően az agyukat kíméletesen, de azonnal eltávolítva jeges vágóoldatba merítettem (2–3 °C), karbogénnel átbuborékolatva (95 % O₂, 5% CO₂). A vágóoldat a következő összetevőket tartalmazta (mM-ben): 250 szacharóz, 26 NaHCO₃, 10 D-glükóz, 1 KCl, 1 CaCl₂ és 10 MgCl₂. A teljes hippokampális formációt tartalmazó, 500 µm vastag horizontális metszeteket vágtam mindkét féltekéből vibratóm segítségével (VT1200s, Leica, Nussloch, Németország). A szeleteket a kísérlet előtt legalább 1 órán át szobahőmérsékleten (20–22 °C) normál összetételű '*mesterséges cerebrospinális folyadék*' (aCSF) oldatban inkubáltam. A felvételeket ennek a standard aCSF átkeringetésével végeztem (mM-ben): 124 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 D-glükóz, 4 KCl, 2 CaCl₂ és 2 MgCl₂.



3. ábra. A szimultán IC-EC mérési összeállítás közelképe a két-foton objektív alatt. Címkek a következők: Olympus 20x objektív (1), patch-clamp pipetta intracelluláris oldattal töltve (2), EC sokcsatornás elektróda (NeuroNexus) és csatlakozója (3), agyszület és leszorító gyűrű (4), duál-perfúziós aCSF kamra (5), referencia elektróda (6), aCSF keringetés kivezetése (7).

A teljes rögzítési rendszert egy két-foton pásztázó lézer mikroszkóp alatt állítottam össze, melyet a Femtonics magyar cég fejlesztett ki egy átalakított Olympus BX61 mikroszkópra, amely egy közeli-infravörös (NIR) kamera mód mellett 2P fluoreszcens móddal is rendelkezik. A mintaasztalt, valamint a kétoldali mikromanipulátorkat a Luigs-Neumann (LN) integrált vezérlőrendszer motorjai kezelik (Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Németország). A 3 ábrán az összeállított kísérleti elrendezés közelképét láthatjuk.

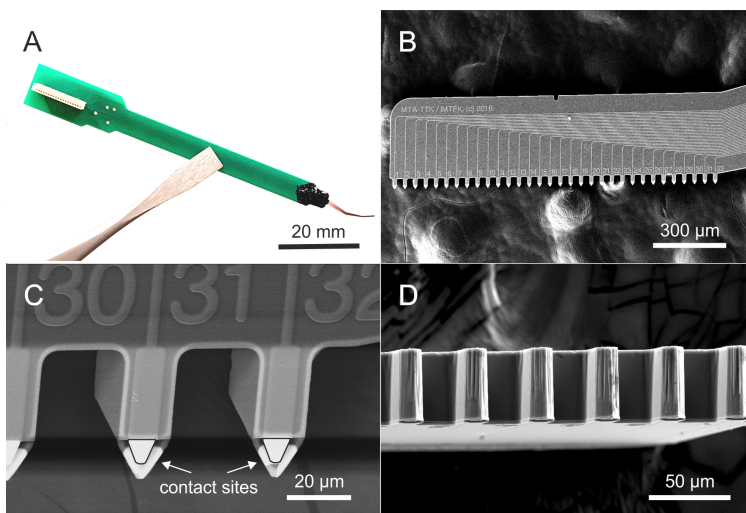
A patch-clamp rendszer (Axon Instruments, USA) több alegységből áll. A felvétel során a jelet először a MultiClamp 700B erősítőhöz továbbítjuk, amely maximalizálja a jel-zaj arányt, és lehetővé teszi a "whole-cell" konfigurációs feszültség- vagy áram-kapcsolt elvezetési módokat, majd a Digidata 1550B A/D konverter segítségével továbbítja a digitalizált jeleket a számítógépre. A MultiClamp Commander szoftvert használtam az üvegpipettás mérési paraméterek és kompenzációk beállításához. A pClamp10 szoftvercsomag részeként a Clampex megjelenítő felület monitorozta a mért jeleket, ezen a platformon építettem ki a sejt karakterizációs protokollokat is. A statisztikákra, transzformációkra és adatrendezésre a Clampfit elemző szoftvert használtam. A többcsatornás szilícium elektródák jeleit továbbítottam az Intan RHD2000 elvezetőrendszerbe (Intan Technologies, USA), melynek feladata volt a nyers adatok rögzítése, előerősítése és digitalizálása is egyben. A rendszer egy 32 csatornás előerősítő chipből (RHD2132) és egy RHD2000 FPGA-alapú interfész kártyából állt. Ez egy nyílt forrású hardver biopotenciálók rögzítéséhez, és vékony, rugalmas kábelezéssel lett szerelve. Az Intan RHD2000 saját szoftvere vizualizálja az adatokat, működteti az előerősítőt, és itt állítható be többek között a mintavételi frekvencia is. A széles sávú jeleket (0,1 Hz-től 7 kHz-ig) 20 kHz-es mintavételi frekvenciával rögzítettem.

3. Új tudományos eredmények

I. Téziscsoport: újszerű, tüskés multielektroda kifejlesztése és tesztelése extracelluláris elvezetésekben

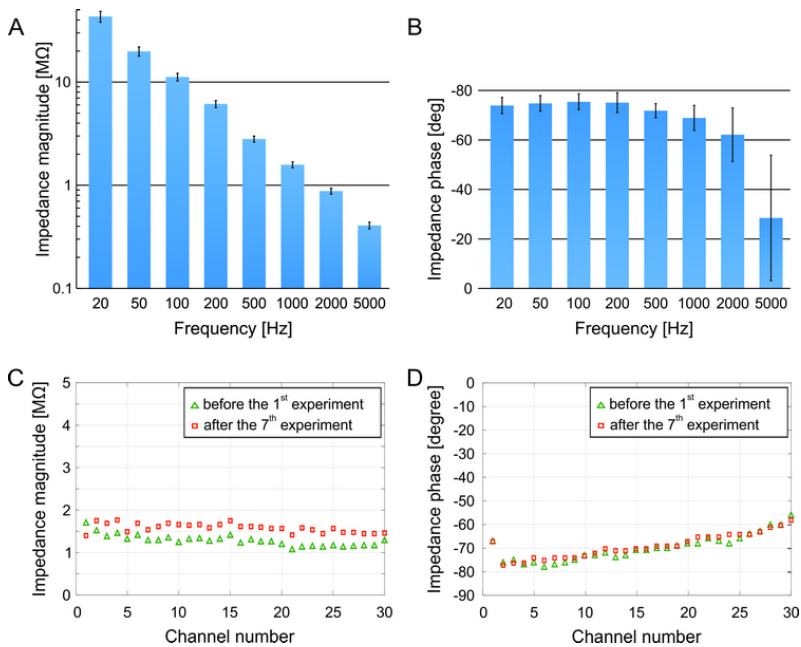
I.a. Kialakítottam egy újszerű, szilícium alapú sokcsatornás, lamináris in vitro multielektrodát, amely kiálló, tüskés kontaktuspontokkal rendelkezik, az agyszelet mérések minőségének javítására. Továbbá optikailag ellenőriztem az elkészített nyílhegyszerűen kiálló kontaktusok formáit pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálattal. Ezenfelül karakterizáltam az elektrokémiai impedanciák nagyságát és fázisszögeit, valamint a tüskés elektróda zajszintjét fiziológiás sóoldatban.

A tüskés elektróda egyetlen szilícium szárból áll, amelyen 32 kiálló, Pt/Ir/IrO_x elvezetési pontot találunk, három különböző távolság-felosztásban: 25 μm, 50 μm és 100 μm. Az ideálisan meghajlított szár segítségével megmutattam, hogy a tüskés elektródák kompatibilisek olyan nagy méretű, in vitro vízimmerziós objektívekkel, amelyeket két-foton mikroszkópiás képalkotásban használunk.



4. ábra. A tüskés elektróda optikai képe (A) és pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) képei (B-D). Jól láthatóak nyílhegy formájú, kiálló elvezetési kontaktusok (C).

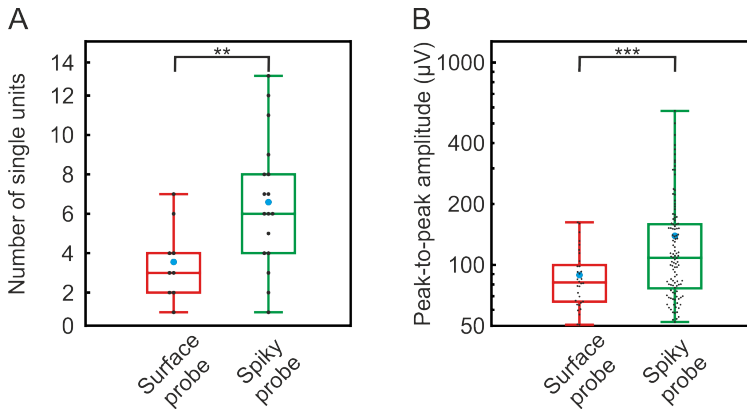
Az összehasonlító elemzésben alkalmazott nagy sűrűségű (25 μm kontaktus felosztású) tűskés elektróda átlagos impedancia magnitúdója $1,27 \pm 0,1 \text{ M}\Omega$ 1 kHz-en mérve, átlagosan $-70 \pm 5^\circ$ fázisszöggel. Ezenfelül teszteltem a tűskés kontaktusok robusztusságát és újra felhasználhatóságát is. Az impedancia változásokat intenzív használatot követően (7 kísérletben összesen 17 különálló beszúrással) vizsgáltam meg, az impedancia tesztek megismétlésével. Az összes kontaktus átlagos impedancia magnitúdója csak kevésbé nőtt az utolsó kísérlet után, $1,5 \pm 0,1 \text{ M}\Omega$ értékre. Az impedancia fázisszögei nem változtak jelentősen ($-69 \pm 5^\circ$) a kiterjedt tesztelés után sem.



5. ábra. Impedancia spektroszkópia eredményei (A-B). Láthatóak a frekvencia növelésre monoton csökkenést mutató magnitúdók és fázisszögek, valamint a csatornák közti kis szórás. A tűskés kontaktusok stabilitás vizsgálatának eredményei 1 kHz-es frekvencián (C-D).

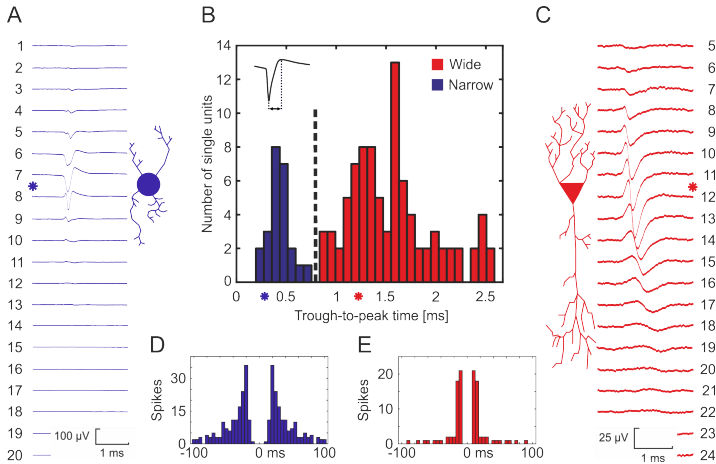
Megmértem továbbá a 32 kontaktus RMS zajszintjét fiziológias sóoldatban. A tüzelési sávban (500–5000 Hz) a zajszint $4,63 \pm 0,51 \mu\text{V}_{\text{rms}}$. A elektródát az agyseleltre helyezve az átlagos zajszint 10 - 20 %-kal nőtt meg.

I.b. A kiálló kontaktusok segítségével kvantitatív módon igazoltam, hogy a tervezett tüskés elektróda nagyobb idegsejt hozamot és magasabb jel amplitúdót biztosít egy kereskedelmi forgalomban lévő felszíni elektródához képest. Megmutattam továbbá, hogy a nagy sűrűségű tüskés elektróda alkalmas a klaszterezett egysejt aktivitások feltételes sejt típusba sorolására az extracelluláris hullámformák tér- és időbeli elemzése alapján, melyet a több, egymással szomszédos kontaktus együttes mintavétele tett lehetővé.



6. ábra. Az elvezetési teljesítmények kvantitatív összehasonlítása. A Box diagramokon láthatjuk a jól elkülönített egysejt klaszterek számának eloszlását (A) és a tüzelési hullámformák csúcstól csúcsig számolt amplitúdóit (B) a nagy sűrűségű tüskés elektróda és a hokiütő típusú felszíni elektróda esetében. ** $p = 0.0078$; *** $p = 0.0000049$

A nagy sűrűségű (25 µm kontaktus felosztású) tüskés elektródát összehasonlítottam egy kereskedelmi forgalomban kapható, "hokiütő" becenevű, lamináris felszíni elektródával (in vitro U-probe, Plexon Inc., Texas, USA). Az átlagos idegsejt hozam pozíciónként 6,6 volt a tüskés elektróda, valamint 3,6 a hokiütő elektróda esetében. Az átlagos jel amplitúdó $139,2 \pm 96,4$ µV-nak adódott a tüskés elektródán és $89,08 \pm 30,2$ µV-nak a hokiütő elektródán. Míg a maximális amplitúdó csak 162,32 µV volt a hokiütő elektródán, a tüskés elektródán 576,79 µV maximális amplitúdót mértem. A korábbi vizsgálatokkal összhangban a nagyobb átlagos tüzelési amplitúdók feltehetően közelebb helyezkedő sejteknek felelnek meg, mivel az extracelluláris jelalakok a távolság növelésével esést és kilapulást mutatnak.



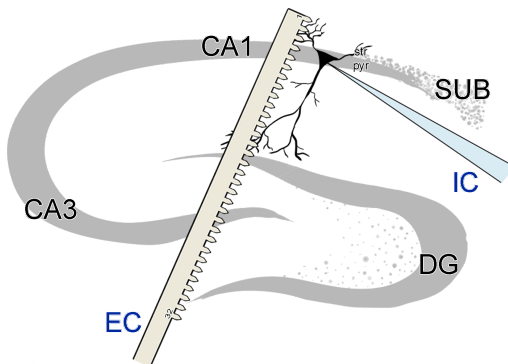
7. ábra. A feltételezett interneuron (A, D) és piramisjejt (C, E) klaszterezési eredményei az extracelluláris hullámforma analízist követően. Az elektródával rögzített összes egység hullámforma felfutási idejének bimodális eloszlása.

A nagy sűrűségű (25 μm kontaktus felosztású) tűskés elektróda részletes lekötését kihasználva megmutattam, hogy ez az elektróda miként képes térben és időben túlmintavételezni az egység aktivitásokat. Két reprezentatív egység aktivitás esetén további paramétereket is vizsgáltam, nevezetesen a csúcstól a csúsig tartó időt, a kezdeti kapacitív csúcs jelenlétét, a tüzelési autokorrelogram jellemzőit és a jelalak térbeli eloszlását. A két reprezentatív klasztert feltételezett sejtípusokba csoportosítottam az említett részletes, sokcsatornás kritériumok nyomán.

Az I. Téziscsoporthoz kapcsolódó publikáció: **[III]**.

II. Téziscsoport: Kolokalizált, szimultán intra- és lamináris extracelluláris elvezetések sejt morfológiával kiegészítve: "ground-truth" adathalmaz előállítása

II.a. Kidolgoztam egy új mérési módszert, amely validációs adatot szolgáltat sokcsatornás extracelluláris elektrofiziológiához, in vitro. Ennek a kolokalizált és szinkron kísérleti protokollnak az alkalmazásával mind az intracelluláris, mind pedig az extracelluláris adatok megfelelően elvezethetővé váltak a megcélzott idegsejtről. Emellett utólagos strukturális információval egészítettem ki a validációs célú elektrofiziológiai adatsorokat, teljes 3D neuronális morfológia és a megfelelő sejt-elektroda távolságok rekonstruálásával. Ezekből a felvételekből összeállítottam és közzétettem egy online, nyílt forrású adatkönyvtárat a rögzített sejtekről, az értekezés során felsorolt összes elektrofiziológiai és morfológiai információval együtt. A könyvtár és a hozzá tartozó táblázatos útmutató egy folyamatosan bővülő, frissített validációs adat gyűjteményként szolgál.



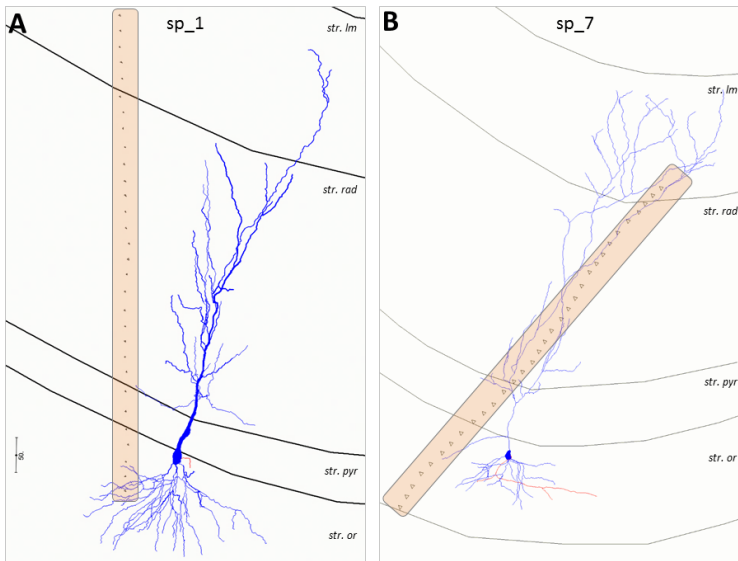
8. ábra. Az intra- és extracelluláris mérési összeállítás sematikus ábrázolása a hippocampusz CA1 régió piramisisejt rétegében.

Kidolgoztam egy módszert a kolokalizált és szinkron intra- és extracelluláris jelek rögzítésére szub-milliszekundum pontossággal. Az extracelluláris felvételeket szomatikus patch-clamp egészítette ki a multielektroda közvetlen közelében. Mivel ezeket az *in vitro* kísérleteket két-foton mikroszkópiás mérőkörnyezetben terveztem, így lehetővé vált az elektroda és idegsejt helyzetének megfelelő vizuális monitorozása. A sikeres szimultán mérés elfoga-

dási kritériumai a következők voltak:

- Minden 3 perces felvétel során legalább 100 tüzelési időpont észlelését vártam, így biztosítva minden adatfájlban a kellő tüzelésszámot (1).
- A folytonos aktivitás fenntartása érdekében beinjektált tartóáramnak konstansnak kell maradnia az egyes adatfájlok során, továbbá nem léphet ki a fizioiógias tartományból, mely ideálisan 300 pA alatti áramokat jelent (2).
- Az adatok előfeldolgozását követően a megfogott neuron tüzelésének legalább egy extracelluláris csatornán detektálhatóvá kell válnia, legalább az átlagolt jelelakokon (3).

Ezenkívül a patch-clamp mérések elején ún. Ramp-tesztet, áramlépcsős vizsgálatot végeztem a feltételezett sejtípusok jellemzésére és egyéb későbbiekben felhasználható intracelluláris paraméterek meghatározására.



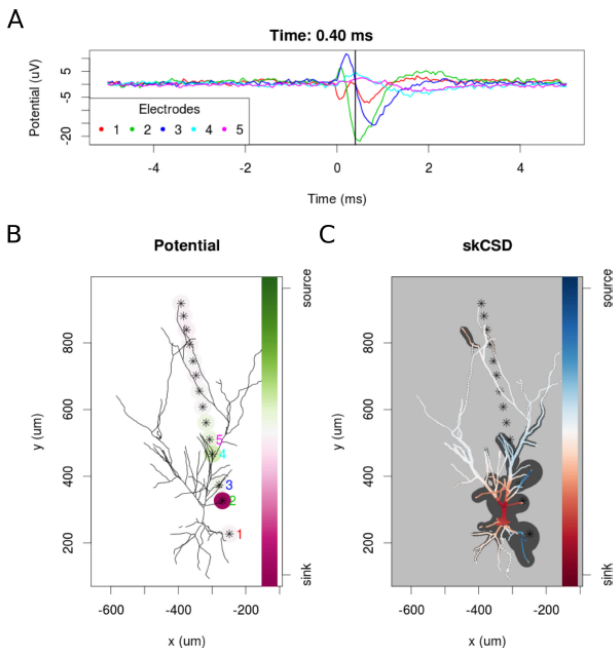
9. ábra. Kétdimenziós pillanatképek két 3D rekonstruált neuron morfológiáról és a hozzájuk tartozó EC elektróda pozíciókról.

Az elektrofiziológiai mérésen felül a kísérleti protokollba két-foton képalkotást is beépítettem, hogy még teljesebben kihasználjam a rendelkezésre álló multimodális adatrögzítést. A két-foton z-stack projekciók látóterét úgy állítottam be, hogy lefedje mind az elektróda pozícióját, mind pedig a főbb sejtkompartimentumokat (sejttest, apikális kezdeti szakasz, és proximális bazális dendriték). A mélység szintje (z-sík) tipikusan -200 μm és 0 μm közé került (utóbbi voltaképp a szelet felszíne). A z-stack felbontását (vagyis a lépést egyes síkok között) jellemzően 3 μm -nek adtam meg, amely a kis dendritikus nyúlványok lekövetéséhez is elegendő a teljes a 3D morfológia mentén. A kísérleti protokoll végén a patch-pipettát óvatosan kihúztam, a szeletet eltávolítottam a kamrából, és paraformaldehid oldatba helyezve fixáltam *post-hoc* szövettani rekonstrukcióhoz. A megfogott sejtek passzív módon töltődtek fel a fluoreszcens markerekkel (Alexa594 és Fluo-4) és a szövettani jelzőmolekulával (Neurobiotin) az intracelluláris oldat diffúziója által. Azokban az esetekben, amikor az összes szövettani lépés (fixálás, újrametszés és a neurobiotin kicsapatása) sikeres volt, a sejtek digitális 3D rekonstruálásra kerültek a NeuroLucida szoftver segítségével. A rekonstrukciókkal a pontos térbeli sejt-elektroda távolságok a kontaktusok és a szubcelluláris kompartmentumok között így meghatározhatóvá váltak.

A tézisek benyújtásáig összesen #16 idegsejtet rögzítettem sikeresen #12 állatból a II. Téziscsoportban bemutatott szimultán és kolokalizált protokoll felhasználásával. Az elemszám növelése jelenleg is folyamatban van, és frissítésre szorul, amennyiben új sikeres adatok válnak elérhetővé.

II.b. A keletkezett szimultán elektrofiziológiai adatok segítségével egy új egysejt-szintű forráslokalizációs módszer, az skCSD került tesztelésre egy kollaboratív project keretében. Ilyen forráslokalizálást a szakirodalomban először teszteltünk és validáltunk valós kísérleti adatokkal rekonstruált, részletes idegsejt morfológián.

Mindezen anatómiai és szimultán elektrofiziológiai adatok együttes felhasználása lehetővé tette, hogy valós kísérleti adatokkal támogassunk és validáljunk modell alapú egysejt számításokat. Ez volt az első alkalom az irodalomban, amikor a kutatók részletes morfológia mentén határozták meg a sejt szintű áramforrás-sűrűséget (skCSD), vagyis az extracellulárisan mért potenciálok eredeti transzmembrán forrásait. A megfigyelt tér- és időbeli dinamika összhangban volt a korábban becsült mintázatokkal, azaz a szomatikus áramok többnyire dominálták az akciós potenciál kezdeti lépéseit, és ezeket a proximális dendritágak mentén megfelelő ellenáramok



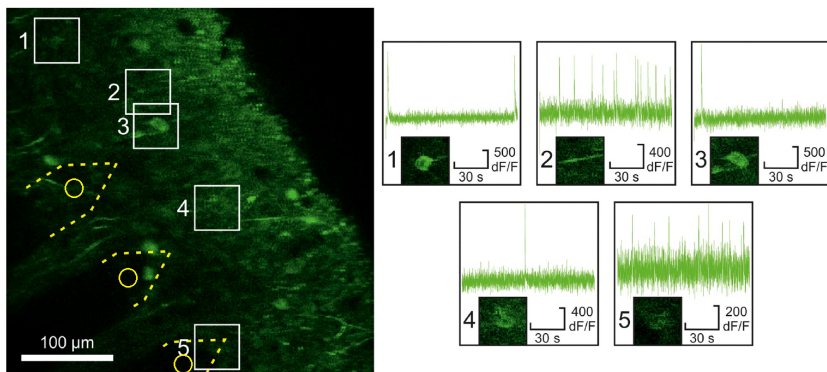
10. ábra. A CA1 piramissejt tüske által kiváltott átlagának skCSD rekonstruálása. Az 5 potenciális csatornán az EK potenciál időbeli lefolyása (A). A cella és a szilikon szonda helyzeteinek az átfedésben lévő EK potenciáldinamikával (B). Az áramforrás sűrűségének rekonstruálása a mért EK potenciálok és a modellezett sejt morfológia (C) alapján.

egyensúlyozták ki. Ez a példa bemutatta az skCSD módszer alkalmazhatóságát valós kísérleti adatokon és segíthet olyan további kísérletek tervezésében (egy iteratív "kísérlet-adatelemzés együttműködésben"), amelyek célja azon szinaptikus bemenetek dinamikai feltárása, melyek az idegsejtet tüzelésre készítetik.

A II. Téziscsoportra vonatkozó publikáció: [II].

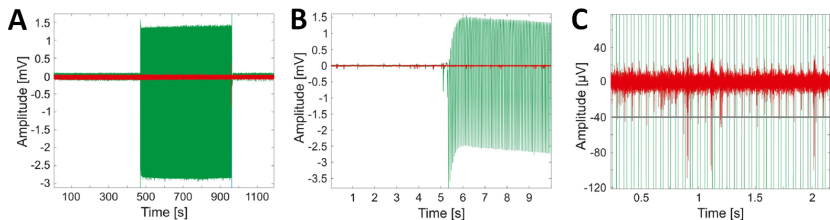
III. Téziscsoport: Sokcsatornás extracelluláris elvezetés és két-foton pásztázó lézermikroszkópiás képalkotás kombinálása a fotoelektromos műtermék kísérleti karakterizációjára

III.a. Kísérleteket terveztem és végeztem mind lézeres műtermék mentes, mind pedig lézer által generált fotoelektromos artefaktal szennyezett adatgyűjtésre egyetlen kísérleti munkameneten belül. Az így létrehozott adatsor alkalmas a keletkezett fotoelektromos műtermék karakterizációjára és egy artefakt elimináló algoritmus átfogó tesztelésére.



11. ábra. A beültetett szilícium alapú multielektroda közvetlen közelében készült szimultán két-foton lézermikroszkópiás felvétel. A képalkotás több sejttest és dendrit aktivitását is leköveti (a példák az ábra bal oldalán láthatók) azonos látótérben az elektróda kontaktus pontjaival (sárga körökkel kiemelve).

Kísérletesen bizonyítottam, hogy a generált fotoelektromos hatás nem azonos a szkanner zajával, és a kontaktusokon átívelően változó természetű. Ezenfelül azonos látómezőben egyidejűleg végeztem két-foton képalkotást és extracelluláris méréseket. A két-foton gerjesztést úgy állítottam be, hogy elegendő legyen a transzgenikus Ca^{2+} jelek megbízható detektálásához anélkül, hogy a fém alapú extracelluláris elektróda károsodást szenvedne. Ennek a kísérletnek a segítségével a sejtszintű Ca^{2+} jelek és az extracellulárisan detektált egység aktivitások összehasonlíthatóvá váltak.



12. ábra. A szűrt jel (piros) átfedésben megjelenítve az eredeti, szűrés nélküli (zöld) adatokkal. Látható, hogy a két-foton lézer által generált fotoelektromos artefakt jelentősen csökkent, és a háttérzajból immár kiemelkednek a detektálható egysejt aktivitások.

III.b. Megmutattam, hogy az egysejt aktivitási klaszterek még lézerszennyezett jelviszonyok között is detektálhatók maradnak, valamint a csoportosított tüzelések a lézerszkennelés előtt, alatt és után is nyomonkövethetők a jelamplitúdó, hullámforma és autokorrelogramok alapján.

A klaszterezett egysejt aktivitások nyomon követhetőek maradtak a lézerszkennelési periódus előtt és után egy iteratív szűrés algoritmus alkalmazását követően (az algoritmus más kollégákkal való együttműködésben került kifejlesztésre). Rámutattam ugyanakkor arra is, hogy néhány esetben a lézerszkennelésből eredő fotoelektromos műtermék hatással lehet a pásztázott sejtek tüzelési dinamikájára is (feltehetően a keletkező fotoelektromos áramok közvetett gerjesztése által).

A III. Téziscsoportra vonatkozó publikáció: **[III]**.

4. Az eredmények alkalmazása és jövőbeli tervek

A disszertációban tárgyalt mindhárom kísérleti probléma kifejezetten alkalmazás-orientált, még akkor is, ha a megvalósításuk jelenlegi stádiuma eltérő. Kezdeként bemutattam és teszteltem egy szilícium alapú sokcsatornás, tűskével penetráló multielektrodát. Noha a jelenlegi szár kialakítás jelentős javulást mutatott a *in vitro* felvételek során, érthetően nem hosszú távú elvezetésekre optimalizált. A jövőbeni fejlesztések célba vehetik ezen eszközök továbbfejlesztését akut és krónikus *in vivo* alkalmazásokban, kisebb módosítások révén. További lehetséges jövőbeli alkalmazás a különböző szövetminták, pl. poszt-operatív humán *in vitro* metszetek vizsgálata ugyanezen elektrodákkal. A tűskés elektróda méretei széles tartományban változtathatóak, és a leghosszabb változat (100 μm kontaktus felosztással felszerelt) már elég nagy területet fed le ahhoz, hogy alkalmazható legyen humán neokortikális szeleteken és több rétegen átívelő struktúrákon.

A második téziscsoportot illetően több potenciálisan együttműködő kutató jelezte érdeklődését a kolokalizált és szimultán intra- és extracelluláris elvezetéseket morfológiákkal együtt tartalmazó adatbázisom használatára. Ahogy a tézisekben említettem, az intracellulárisan megfogott sejtek nem minden esetben voltak azonnal láthatóak a nyers extracelluláris csatornákon, ezzel megakadályozva az egysejt klaszterező algoritmusokon való alkalmazást. Ezekben az esetekben a tüzelés időpontjában vett átlagok kiszámítása volt az egyetlen módszer az intra- és extracelluláris jelek összehasonlítására. A tanulmány lehetséges folytatásaként célom az lesz, hogy még közelebb kerüljek a sejtekhez a szilícium elektródával, a mérési összeállítás és az előkészítési folyamatok további optimalizálása révén, és ennek eredményeként további sejtek rögzítése történhessen meg kellően nagy jelamplitúdókkal. Arra is törekszem, hogy minél több interneuront rögzítsek a validációs adatkészlet szélesebb alkalmazhatóságának érdekében. A szimultán kísérleti protokoll hasonlóképp alkalmazható más régiókban, mint például neokortex vagy humán poszt-operatív szeleteken is.

A létrehozott adatkészlet első kollaborációs alkalmazása már a tézisek keretében megtörtént. Megmutattuk, hogy az extracelluláris elvezetések az idegsejtek morfológiájával kombinálva felhasználhatóak a sejten található azon áramforrás-sűrűségek becslésére, melyek kialakítják a mért extracelluláris potenciált. Az egyszerű szomatikus patch-clamp mérésekkel ellentétben így az egész sejt morfológiára kiterjedten vagyunk képesek sejten belüli információhoz jutni, nem csupán az egyetlen mérési ponton. Az új megközelítés tovább mozdíthatja a szakterületet azért, hogy új kísérletes ablakot nyit meg a sejtek információfeldolgozására, lehetővé téve ezzel globális megfi-

gyelésüket, amely korábban csak pontszerűen volt lehetséges. Ez elméleti oldalról ugyanolyan fontos lehet, hiszen az elméleti paradigmák az alapján születnek, hogy mit tudunk kinyerni a rendelkezésre álló mérésekből. Mivel mostantól kísérletileg megvalósítható a releváns adatok kimérése az itt bemutatott protokoll segítségével, bízom benne, hogy ezek az adatok felhasználhatók a jövőben további biofizikai membránmodellek testreszabására, valamint új felfedezéseknek is utat mutatnak, egy koherens képet biztosítva az idegsejten végbemenő globális szinaptikus változásokról.

Végül kísérletes megoldást javasoltam a fotoelektromos artefaktok vizsgálatára és kiküszöbölésére kolokalizált két-foton képalkotás és extracelluláris szilícium elektródás mérések során. Ez a tanulmány megmutatta, hogy még két-foton lézerszkennelés közben is betekintést nyerhetünk az extracelluláris aktivitásokba. Ugyanakkor feltételezhetően a fotoelektromos hatás által kiváltott modulációkat is találtam bizonyos sejtek tüzelési viselkedésében, amelyek az egyidejű szkennelés nemkívánatos következményei. További vizsgálatok szükségesek a lézer által generált elektromos műtermékek közvetett stimulációs hatásának feloldására. A szűrési algoritmus alkalmazását illetően hasznos lenne továbbá egy automatizált és robusztus szoftver kifejlesztése, amely ezáltal függetleníthető az éppen alkalmazott szilícium elektróda típusától és alkalmazható más elrendezésre vagy eltérő csatornaszámra is. A legnagyobb kihívás azonban a fluoreszcensen aktív (vagyis "villogó") sejtek és az extracellulárisan detektált tüzelések közötti összefüggések és ok-okozati szerepek felkutatása lenne, mely a tématerület nagy kihívása. A szimultán és multimodális mérések eredményei végső soron új szempontokat adhatnak a jövőbeli neurális interfészek megtervezéséhez is.

5. A szerző tézisekhez kapcsolódó publikációi

Referált nemzetközi szakfolyóirat publikációk

- I. D. Cserpán, D. Meszéna, L. Wittner, K. Tóth, I. Ulbert, Z. Somogyvári and D. Wójcik. Revealing the distribution of transmembrane currents along the dendritic tree of a neuron with known morphology from extracellular recordings. *eLIFE*, 6:e29384, 2017. (IF: 7.73, Q1/D1) DOI: 10.7554/eLife.29384
- II. D. Meszéna, B. P. Kerekes, I. Pál, G. Orbán, R. Fiáth, T. Holzhammer, P. Ruther, I. Ulbert and G. Márton. A silicon-based spiky probe providing improved cell accessibility for in vitro brain slice recordings. *SENSORS & ACTUATORS B – CHEM*, 297C, 126649, 2019. (IF: 6.39, Q1/D1) DOI: 10.1016/j.snb.2019.126649
- III. G. Orbán, D. Meszéna, K. R. Tasnády, I. Ulbert and G. Márton. Method for spike detection from microelectrode array recordings contaminated by artifacts of simultaneous two-photon imaging. *PLOS ONE*, 14(8): e0221510, 2019. (IF: 2.78, Q1) DOI: 10.1371/journal.pone.0221510

A szerző egyéb publikációi

Kéziratok és beküldés alatt álló munkák

- R. Fiáth, D. Meszéna, M. Boda, P. Barthó, P. Ruther and I. Ulbert. Recording site placement on planar silicon-based probes affects neural signal quality: edge sites enhance acute recording performance. *SCIENTIFIC REPORTS*, 2020. (IF: 4.01, Q1/D1) (*Under review*) (Preprint on *BioRxiv*) DOI: 10.1101/2020.06.01.127308
- G. Dimitriadis, J. P. Neto, A. Aarts, [...] G. Marton, D. Meszéna, S. Mitra, [...] B. Raducanu, P. Ruther, T. Schroeder, W. Singer, P. Tiesinga, I. Ulbert, S. Wang, M. Welkenhuysen, A. R. Kampff. Why not record from every channel with a CMOS scanning probe? *PNAS*, 2020. (IF: 9.58, Q1/D1) (*Under review*) (Preprint on *BioRxiv*) DOI: 10.1101/275818

- T. Marek, G. Orbán, D. Meszéna, G. Márton, I. Ulbert, G. Mészáros and Zs. Keresztes. Optimization Aspects of Electrodeposition of Photoluminescent Conductive Polymer Layer onto Neural Microelectrode Arrays. **MATERIALS CHEMISTRY AND PHYSICS**, 2020. (IF: 2.78, Q2) (*Under review*)

Referált nemzetközi szakfolyóirat publikációk

- G. Márton, E. Z. Tóth, L. Wittner, R. Fiáth, D. Pinke, G. Orbán, D. Meszéna, I. Pál, E. L. Győri, Z. Bereczki, Á. Kandrács, K. T. Hofer, A. Pongrácz, I. Ulbert and K. Tóth. The neural tissue around SU-8 implants: a quantitative *in vivo* biocompatibility study. **MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C**, 112C, 110870, 2020. (IF: 4.96, Q1/D1) DOI: 10.1016/j.snb.2019.126649
- A. Zátonyi, G. Orbán, R. Modi, G. Márton, D. Meszéna, I. Ulbert, A. Pongrácz, M. Ecker, W. E. Voit, A. Joshi-Imre, and Z. Fekete. A softening laminar electrode for recording single unit activity from the rat hippocampus. **SCIENTIFIC REPORTS**, vol. 9, no. 1, p. 2321, 2019. (IF: 4.12, Q1/D1) DOI: 10.1038/s41598-019-39835-6

Szabadalom

- I. Ulbert, G. Márton, D. Meszéna, B.P. Kerekes, G. Orbán, K.R. Tasnády, D. Pinke. A design of an ionic conductance-based multielectrode system for mitigating photoelectric artefacts. Hungarian Patent Application (pending), *Registration number: 45B01FEF1C, File number: P 17 00527, Date: 15th December 2017.*

Válogatott előadások és poszter prezentációk

- D. Meszéna, G. Orbán, K. R. Tasnády, I. Ulbert and G. Márton. Towards co-localised microelectrode array recordings and two-photon microscopy. *Hun-Doc 2020*, Szeged, Hungary, 2020. (Invited talk)
- Z. Somogyvári, D. Meszéna, D. Cserpán, L. Wittner and I. Ulbert. Spatio-temporal membrane potential and resistive current reconstruction from parallel multielectrode array and intracellular measurements in single neurons. 10th *IBRO World Congress of Neuroscience*, Daegu, Korea, 2019. (Poster)
- R. Fiáth, D. Meszéna, Mihály Boda and I. Ulbert. Impact of the recording site location on the recording performance of silicon probes in acute experiments. *FENS Regional Meeting*, Belgrade, Serbia, 2019. (Poster)

- E. Z. Tóth, D. Meszéna, A Duplecz, D.Pálfi, K. Tóth, L. Erőss, A. Bagó, D. Fabó, I. Ulbert and L. Wittner. Back-propagating action potentials in human neocortical pyramidal cells and interneurons: A preliminary study. *Gordon Research Conference: Dendrites*, Ventura, CA, US, 2019. (Poster)
- D. Meszéna, I. Pál, B. P. Kerekes, G. Marton, K. Tóth, L. Wittner, Z. Somogyvári and I Ulbert. Simultaneous intra- and linear extracellular recordings with corresponding morphology: towards a ground-truth data for multichannel electrodes. *SfN Neuroscience 2018*, San Diego, CA, US 2018. (Poster)
- K. Tóth, E. Z. Tóth, L. Wittner, R. Fiáth, D. Meszéna, I. Pál, E. L. Győri, D. Pinke, Z. Bereczki, G. Orbán, A. Pongrácz, I. Ulbert and G. Márton. Biocompatibility of the SU-8 in the central nervous system. *SfN Neuroscience 2018*, San Diego, CA, US 2018. (Poster)
- G. Orbán, T. Marek, D. Meszéna, B. P. Kerekes, K. R. Tasnády, I. Ulbert, G. Mézszáros, Zs. Keresztes, G. Márton. Fluorescent conductive polymer coating on implanted microelectrodes for visualization under two-photon microscopes. 11th *FENS Forum of Neuroscience*, Berlin, Germany, 2018. (Poster)
- D. Meszéna, B. P. Kerekes, I. Pál, T. Holzhammer, P. Ruther, I. Ulbert and G. Márton. A novel, silicon-based spiky probe providing improved cell accessibility for in vitro brain slice recordings. *Gordon Research Conference: Neuro-electronic Interfaces*, Galveston, Texas, US, 2018. (Poster)
- D. Cserpán, D. Meszéna, L. Wittner, K. Tóth, I. Ulbert, Z. Somogyvári and D. Wójcik. Revealing the Distribution of Transmembrane Currents along the Dendritic Tree of a Neuron with Known Morphology from Extracellular Recordings. 2nd *Nencki Symposium*, Warsaw, Poland, 2017. (Poster)
- I Pál, KT. Hofer, B. P. Kerekes, K. Tóth, B. Rózsa, D. Meszéna and I. Ulbert. Modulation of interictal-like and spontaneous population activity by microsurgical intervention in rat brain slices, 10th *Forum of Neuroscience*, Copenhagen, Denmark, 2016. (Poster)
- D. Meszéna and I. Ulbert. Simultaneously recorded multimodal signals in the hippocampal CA1 region, in vitro. *EMBO Practical Course in Advanced Optical Microscopy*, Marine Biological Association, Plymouth, United Kingdom, 2016. (Poster)
- D. Meszéna, E. Lakatos, G. Szederkényi. Sensitivity analysis and parameter estimation of a human blood glucose regulatory system model. In.: *Proceedings of the 11th International Workshop on Computational Systems Biology*, TISCIP 64, pp. 28, Lisbon, Portugal, 2014. (Talk)

- E. Lakatos, D. Meszéna, G. Szederkényi. Identifiability analysis and improved parameter estimation of a human blood glucose control system model. *LECTURE NOTES IN COMPUTER SCIENCE*, A. Gupta and T.A. Henzinger (Eds.): CMSB 2013, LNBI 8130 Springer, pp. 248-249, 2013. (Talk) (IF: 1.12, Q2), DOI: 10.1007/978-3-642-40708-6
- L. Négyessy, J. Minich, D. Meszéna, A. Buzás, B. Jákli, M. Bányai, E. Procyk, P. Barone, F. Bazsó. From Neuronal Communication to the Flow of Information in the Cerebral Cortex. 11th *Digital Speech and Image Processing*, Kovacica, Serbia, 2012. (Talk)

A PPKE ITK Doktori Iskola éves kiadványában

- D. Meszéna. Towards a better understanding of intra- and extracellular neural signals and their relationships. in *PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics, Pázmány Péter Catholic University* – 2017. G. Prószéky, P. Szolgay Eds. Budapest: Pázmány University ePress, 2017, pp 27–27.
- D. Meszéna. Targeted simultaneous recordings on rat hippocampal CA1 cells, in vitro. in *PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics, Pázmány Péter Catholic University* – 2016. G. Prószéky, P. Szolgay Eds. Budapest: Pázmány University ePress, 2016, pp 69–71.
- D. Meszéna. Using two-photon imaging combined with simultaneous recordings to validate CSD analysis. in *PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics, Pázmány Péter Catholic University* – 2015. G. Prószéky, P. Szolgay Eds. Budapest: Pázmány University ePress, 2015, pp 81–84.

Hivatkozások

- [1] Gyorgy Buzsaki, Costas A Anastassiou, and Christof Koch. The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature reviews neuroscience*, 13(6):407, 2012.
- [2] Kenneth D Harris, Rodrigo Quian Quiroga, Jeremy Freeman, and Spencer L Smith. Improving data quality in neuronal population recordings. *Nature neuroscience*, 19(9):1165, 2016.
- [3] Marie Engelene J Obien, Kosmas Deligkaris, Torsten Bullmann, Douglas J Bakkum, and Urs Frey. Revealing neuronal function through micro-electrode array recordings. *Frontiers in neuroscience*, 8:423, 2015.
- [4] Darrell A Henze, Zolt Borhegyi, Jozsef Csicsvari, Akira Mamiya, Kenneth D Harris, and Gyorgy Buzsaki. Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus in vivo. *Journal of neurophysiology*, 84(1):390-400, 2000.
- [5] Woodrow L Shew, Timothy Bellay, and Dietmar Plenz. Simultaneous multi-electrode array recording and two-photon calcium imaging of neural activity. *Journal of neuroscience methods*, 192(1):75-82, 2010.
- [6] Brian D Allen, Caroline Moore-Kochlacs, Jacob G Bernstein, Justin P Kinney, Jorg Scholvin, Luis F Seoane, Chris Chronopoulos, Charlie Laman-tia, Suhasa B Kodandaramaiah, Max Tegmark, et al. Automated in vivo patch-clamp evaluation of extracellular multielectrode array spike recording capability. *Journal of neurophysiology*, 120(5):2182-2200, 2018.
- [7] Zoltan Somogyvari, Laszlo Zalanyi, Istvan Ulbert, and Peter Erdi. Model-based source localization of extracellular action potentials. *Journal of neuroscience methods*, 147(2):126-137, 2005.
- [8] Zoltan Somogyvari, Dorottya Cserpan, Istvan Ulbert, and Peter Erdi. Localization of single-cell current sources based on extracellular potential patterns: the spike CSD method. *European Journal of neuroscience*, 36(10):3299-3313, 2012.
- [9] Gaute T Einevoll, Christoph Kayser, Nikos K Logothetis, and Stefano Panzeri. Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nature reviews neuroscience*, 14(11):770, 2013.