

Mirosław ŻOŁĄDŹ¹, Piotr KMON¹, Jacek RAUZA¹, Paweł GRYBOŚ¹, Tomasz KOWALCZYK²¹ AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KATEDRA METROLOGII I ELEKTRONIKI, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków² UNIwersytet Łódzki, KATEDRA NEUROBIOLOGII, UNIwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź**System do wielokanałowej rejestracji *in vitro* potencjałów polowych i czynnościowych z wykorzystaniem płaskiej matrycy mikroelektrod****Dr mgr inż. Mirosław ŻOŁĄDŹ**

Absolwent wydziału Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Elektroniki Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie oraz Advanced Learning and Research Institute (ALARI), Uniwersytetu Lugano (Szwajcaria). Doktoryzował się w roku 2006 na katedrze Elektroniki. Obecnie jest pracownikiem katedry Metrologii na stanowisku adiunkta. W pracy zawodowej zajmuje się projektowaniem układów scalonych oraz systemów pomiarowych do wielokanałowej rejestracji aktywności żywych sieci neuronowych.

e-mail: zoladz@agh.edu.pl

**Prof. dr hab. Inż. Paweł GRYBOŚ**

Absolwent wydziału Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Elektroniki Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Autor ponad 150-ciu publikacji. Obecnie jest pracownikiem katedry Metrologii i Elektroniki na stanowisku profesora. W pracy zawodowej zajmuje się projektowaniem specjalizowanych układów scalonych.

e-mail: grybos@agh.edu.pl

**Dr inż. Piotr KMON**

Ukończył studia na Wydziale Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Elektroniki w 2007 r. Tytuł doktorski uzyskał w 2012 r. broniąc pracy dotyczącej wielokanałowych scalonych układów elektronicznych dedykowanych do eksperymentów neurobiologicznych. W swoich pracach zajmuje się wykorzystywaniem nowoczesnych technologii produkcji układów scalonych do zastosowań w eksperymentach biologicznych.

e-mail: kmon@agh.edu.pl

**Dr Tomasz KOWALCZYK**

Absolwent Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego. Stopień magistra otrzymał w roku 1998. Od roku 1999 zatrudniony na stanowisku asystenta a następnie, po uzyskaniu stopnia Doktora Nauk Biologicznych, na stanowisku adiunkta w Katedrze Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego. W działalności naukowej zajmuje się badaniem zjawisk leżących u podstaw procesów oscylacyjnych i synchronizacyjnych zachodzących w korze limbicznej ssaków w warunkach pozaustrojowych (*in vitro*).

e-mail: tokowal@biol.uni.lodz.pl

**Mgr inż. Jacek RAUZA**

Absolwent wydziału Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Elektroniki Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Obecnie doktorant na tymże wydziale. Zajmuje się projektowaniem systemów pomiarowych do wielokanałowej rejestracji aktywności żywych sieci neuronowych.

e-mail: rauza@agh.edu.pl



move freely (chronic neural recording). In the *in vitro* method previously extracted piece of brain tissue is arranged on a matrix of electrodes (Fig. 2) placed in a container of liquid with a suitable composition and temperature. The *in vitro* method allows direct injection of chemicals and is more accurate than the method for *in vivo* determination of the signal origin. The paper presents a system for *in vitro* recording of neural signals by using a planar array of 256 electrodes (16x16). The system consists of a life-support system (temperature, nutrient fluid) (Fig. 3) and a recording system. The recording system is based on a specially designed integrated circuit fabricated in CMOS 0.18 μm technology [4]. Initial tests confirmed that the system is capable of recording both field and action potentials.

Keywords: neural recording, multipoint recording systems, integrated circuits, VLSI, microelectrodes array.

Streszczenie

Jednoczesna wielopunktowa rejestracja potencjałów czynnościowych i polowych jest kluczem do zrozumienia mechanizmów działania mózgu [1]. Postęp w technologiach mikroobróbki oraz produkcji układów scalonych o dużym stopniu integracji pozwoliły na budowę systemów umożliwiających rejestrację aktywności mózgu z kilkuset punktów. W pracy zaprezentowano system pomiarowy do rejestracji *in vitro* sygnałów neuronowych przy pomocy płaskiej matrycy elektrod ostrzowych o rozmiarze 16 na 16 elektrod.

Słowa kluczowe: Pomiar neurobiologiczne, wielokanałowe systemy pomiarowe, zintegrowane układy scalone, VLSI, matryce mikroelektrod.

A system for *in vitro* multichannel recording of field and action potentials using planar array of microelectrodes**Abstract**

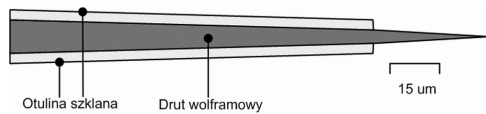
Simultaneous multi-point recording of activity of living neural networks is the key to understanding the mechanisms of the brain operation [1]. Advances in micromachining technology and production of integrated circuits with a high degree of integration made it possible to build systems capable of recording brain activity of electrode arrays containing up to several hundred points [2]. Neural signal recording methods can be divided into *in vivo* and *in vitro*. *In vivo* method consists in introducing the electrode into the brain through a hole in the skull. The animal under anesthesia may be mounted in the holder (acute neural recording) or can

1. Metody rejestracji sygnałów neuronowych

Metody rejestracji sygnałów neuronowych można podzielić na *in vivo* i *in vitro*. W metodzie *in vivo* elektroda wprowadzana jest do mózgu zwierzęcia przez przygotowany uprzednio otwór w czaszce. Zwierze może być pod narkozą zamocowane w uchwycie (tzw. pomiary „ostre”) lub może poruszać się swobodnie (pomiary „chroniczne”). W metodzie *in vitro* elektroda przykładana jest do wypreparowanego wcześniej skrawka tkanki mózgowej umieszczonego w pojemniku z płynem o odpowiednim składzie i temperaturze. Metoda *in vivo* ma tę zaletę w porównaniu do *in vitro*, że tkanka mózgowa znajduje się w swoich naturalnych warunkach i nie wymaga specjalnych zabiegów do utrzymania jej przy życiu. Metoda *in vitro* pozwala na bezpośrednie podawanie substancji chemicznych oraz na dokładniejsze niż w przypadku metody *in vivo* ustalenie miejsca rejestracji sygnału.

2. Matryce mikroelektrod

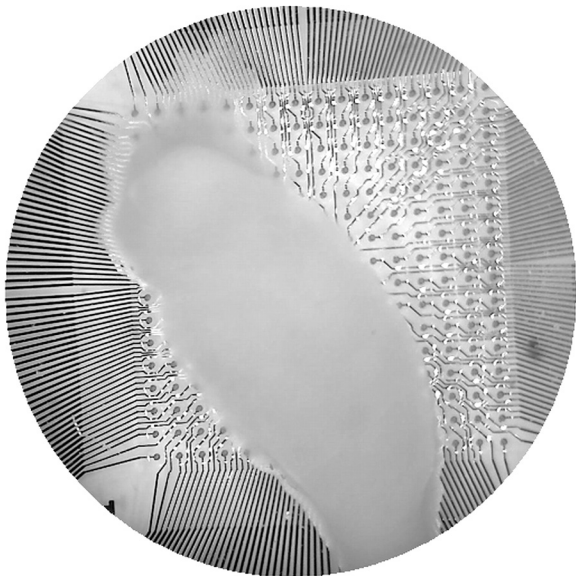
Podstawowym narzędziem do pomiarów wewnętrznej aktywności mózgu jest elektroda wolframowa w szklanej otulinie (rys. 1).



Rys. 1. Przekrój mikroelektrody szklanej
Fig. 1. Glass microelectrode cross section

Średnica końcówki pomiarowej elektrody (ostrza) wynosi zwykle około kilku mikrometrów a impedancja nie przekracza zwykle $1M\Omega$ dla częstotliwości 1kHz. Rejestracja sygnałów jednocześnie z więcej niż jednej elektrod jest utrudniona ze względu na znaczne rozmiary całej elektrody oraz konieczność mocowania każdej elektrody na specjalnym mikromanipulatorze.

Wraz z postępem technik mikroobróbki opartych na fotolitografii trawieniu anizotropowym, możliwym stało się wytwarzanie płaskich matryc mikroelektrod [2, 3]. Typowa matryca (rys. 2) umieszczona jest na szklanej płytce i składa się z elektrod połączonych ścieżkami z wyprowadzeniami znajdującymi się na krawędziach płytki.



Rys. 2. Matryca mikroelektrod 5mm x 5mm z nałożonym skrawkiem tkanki mózgowej

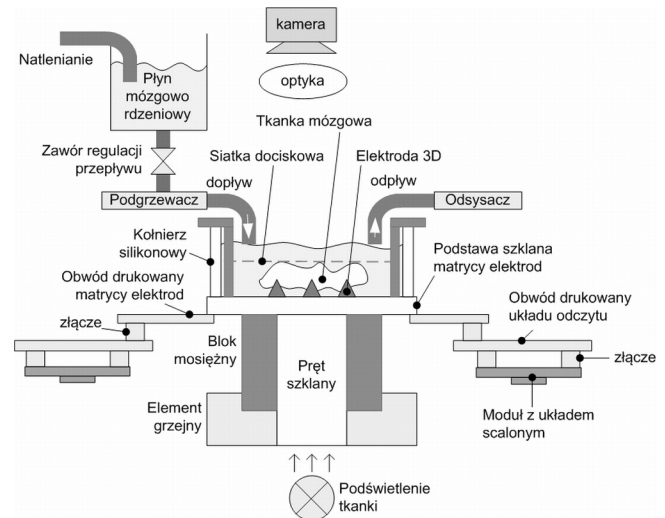
Fig. 2. Microelectrodes matrix (5mm x 5mm) with piece of brain tissue

Elektrody wykonane są z azotku tytanu i mają kształt cienkiego krążka o średnicy $40\mu m$. Wykonane z tytanu i pokryte azotkiem krzemu (izolacja) ścieżki doprowadzają sygnał z elektrod do wyprowadzeń. Płytkę z matrycą elektrod zamontowaną jest na obwodzie drukowanym pozwalającym na połączenie jej z elektroniką pomiarową.

Ze względu na kształt elektrody dzielimy na płaskie i 3D. Elektrody płaskie mają, jak już wspomniano, kształt płaskiego krążka i używane są do rejestracji sygnałów z sieci neuronowej wychodzącej na matrycy. Elektrody 3D mają kształt ostrza i używane są do rejestracji sygnałów ze skrawka tkanki mózgowej umieszczonego na elektrodzie. Wspomniany kształt pozwala elektrodzie wnikać w tkankę co jest o tyle ważne, że podczas przygotowania skrawka neurony na jego powierzchni zostają zniszczone.

3. System pomiarowy

W poniższych rozdziałach opisany zostanie system pomiarowy do rejestracji sygnałów neuronowych z płaskiej matrycy zawierającej 256 elektrod 3D (rys. 3).



Rys. 3. Schemat systemu pomiarowego do rejestracji sygnałów neuronowych z wykorzystaniem płaskiej matrycy mikroelektrod

Fig. 3. Diagram of the measuring system for recording neuronal signals using a planar array of microelectrodes

3.1. System podtrzymania życia

Skrawek formacji hipokampa o grubości $500\mu m$ umieszczony jest na matrycy elektrod a następnie dociśnięty za pomocą nylonowej siatki. Utrzymanie przy życiu skrawków tkanki mózgowej wymaga dostarczania im odpowiednio natlenionego sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (o odpowiednim składzie jonowym oraz zawartości substancji odżywczych) oraz utrzymanie ich w temperaturze 35 stopni Celsjusza ± 0.25 stopnia. Płyn dostarczany jest grawitacyjnie poprzez zawór do regulacji przepływu oraz podgrzewacz do pojemnika, którego dno stanowi podstawa szklana matrycy elektrod a ścianki boczne kolnierz silikonowy. Zużyty płyn jest odsysany za pomocą rurki umieszczonej po drugiej stronie pojemnika. Odpowiednia temperatura skrawka utrzymywana jest poprzez podgrzewanie od spodu szklanej płytki, na której umieszczona jest matryca. Płytkę podgrzewana jest przez element grzewczy za pośrednictwem mosiężnego bloku. Pomaga on w stabilizacji temperatury i równomiernym rozproszaniu ciepła. Poprawna interpretacja zmierzonych sygnałów wymaga ustalenia miejsca na tkance, z którego zostały zebrane. W tym celu nad matrycą elektrod umieszczono kamerę wraz z optyką zapewniającą odpowiednie powiększenie (elektrody umieszczone są w kwadracie 5 na 5 milimetrów). Tkanka podświetlana jest od spodu poprzez szklany pręt umieszczony w otworze wydrążonym w mosiężnym bloku. Obwód drukowany elektrody łączy się za pomocą specjalnego złącza z obwodem drukowanym elektroniki odczytu do której podpięte są moduły z układami scalonymi, których opis znajduje się w dalszej części artykułu.

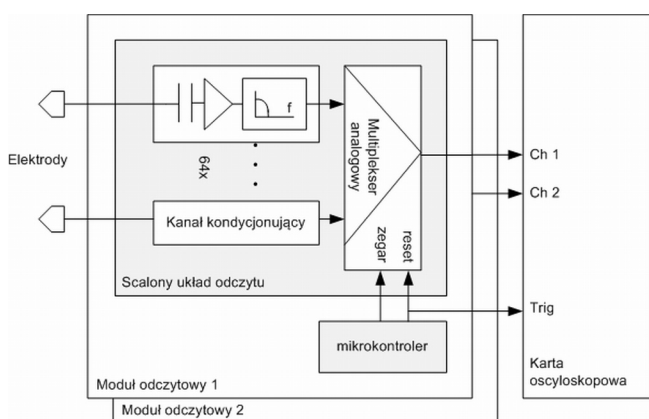
3.2. Wielokanałowy scalony układ kondycjonowania

Omówione w poprzednim rozdziale matryce mikroelektrod pozwalają na pomiar sygnałów z przestrzeni międzykomórkowej. Z tego względu amplitudy rejestrowanych napięć wynoszą nierzadko niewiele powyżej $100\mu V$. Dodatkowo impedancja samych elektrod osiąga zwykle wartości setek kiloomów. Do rejestracji pojedynczych sygnałów (elektrody szklane) używa się wzmacniaczy zbudowanych z elementów dyskretnych. Jednoczesna rejestracja sygnałów z matrycy zawierających dziesiątki a nawet setki elektrod wymaga użycia dedykowanych układów scalonych wielkiej skali integracji. Zastosowany w prezentowanym systemie pomiarowym układ scalony [4] zawiera 64 kanały kondycjonowania, których zadaniem jest wzmocnienie i przefiltrowanie sygnału. W celu odcięcia napięcia offsetu występującego zazwyczaj na

złącza elektroda tkanka na wejściu wzmacniacza zastosowano sprzężenie pojemnościowe. Wyjścia wzmacniaczy podłączone zostało do multiplexera analogowego co pozwoliło ograniczyć do minimum liczbę przewodów koniecznych do współpracy układu scalonego z układem akwizycji. Multiplexer sterowany jest sygnałami resetu i zegara. Sygnał resetu powoduje podłączenie wyjścia multiplexera do pierwszego kanału kondycjonującego. Każde zbocze opadające sygnału zegara powoduje podłączenie wyjścia multiplexera do wyjść kolejnych kanałów.

3.3. Układ akwizycji

Sygnały rejestrowane z żywej tkanki mózgowej dzielimy na potencjały polowe i czynnościowe. Potencjały polowe są to napięcia generowane przez pracujące synchronicznie grupy neuronów. Mają one częstotliwość rzędu dziesiątek Hz. Potencjały czynnościowe mają postać impulsów o szerokości ok. 0.5 milisekundy i częstotliwościach powtarzania dochodzących do 100Hz. Prawidłowe odwzorowanie zarejestrowanych potencjałów czynnościowych wymaga próbkowania sygnału z częstotliwością 20kHz i minimum 8-bitową rozdzielczością. Schemat układu akwizycji pokazano na rysunku 4. W obecnej wersji układ składa się z dwóch scalonych układów odczytu, z których każdy zawiera 64 kanały kondycjonowania oraz jeden multiplexer analogowy. Sygnał resetu i zegara dla multiplexera generowany jest przez mikrokontroler. Za przetwarzanie sygnałów do postaci cyfrowej odpowiada dwukanałowa karta oscyloskopowa. Częstotliwość taktowania multiplexera wynosi 2MHz. Częstotliwość próbkowania karty oscyloskopowej wynosi 20kS/s. Daje to 10 próbek na jeden kanał. Część próbek rejestrowana w czasie przełączania się multiplexera z poprzedniego kanału (stan nieustalony) jest odrzucana. Pozostałe próbki są uśredniane. Karta synchronizowana jest z multiplexersiem sygnałem resetu (wejście „trig”).

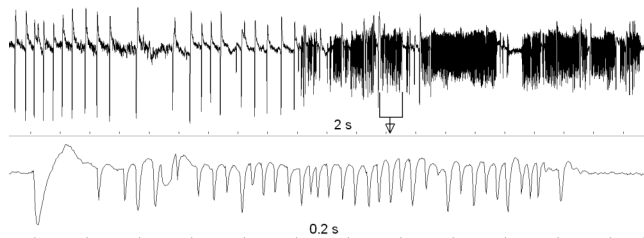


Rys. 4. Schemat blokowy układu do akwizycji sygnałów neuronowych z wykorzystaniem wielokanałowych scalonych układów odczytu

Fig. 4. Block diagram of the neural signal acquisition system using a multichannel integrated circuits for neural signal recording

4. Wstępne wyniki pomiarów

W celu przetestowania systemu zarejestrowano aktywność skrawków formacji hipokampa o grubości 500µm. Na rysunku 5 pokazano fragment zapisu aktywności polowej wywołanej roztworem 50µm karbacholu (agonista receptorów cholinergicznym) w płynie mózgowo rdzeniowym. Na górnym panelu widoczne pojedyncze wyładowania epileptyczne, które w dalszej części zapisu ulegają synchronizacji w aktywność rytmiczną (rytm theta - widoczny na dolnym panelu).

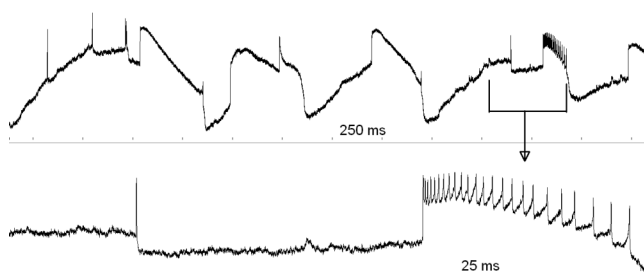


Rys. 5. Fragment zapisu aktywności polowej skrawka formacji hipokampa

Fig. 5. Fragment of the field activity of the hippocampus slice

Na rysunku 6 pokazano fragment zapisu aktywności pojedynczych neuronów towarzyszącej rejestrowanym polowo wyładowaniom epileptycznym wywołanym roztworem 50µm karbacholu w skrawkach formacji hipokampa (górny panel).

Na dolnym panelu pokazano serię potencjałów czynnościowych wygenerowanych przez pojedynczy neuron na szczycie rejestrowanego polowo wyładowania epileptycznego.



Rys. 6. Fragment zapisu aktywności pojedynczych neuronów skrawka formacji hipokampa

Fig. 6. Fragment of the activity of single neurons of hippocampal formation slice

5. Podsumowanie

W pracy opisano system do rejestracji aktywności elektrycznej tkanki mózgowej z matrycy mikroelektrod z wykorzystaniem scalonych układów odczytu. Złożoność systemu wynika zarówno ze specyfiki (małe amplitudy sygnałów, duże impedancje elektrod) oraz dużej ilości sygnałów jak i z konieczności utrzymania przy życiu fragmentu tkanki mózgowej. Rezultaty wstępnych pomiarów pokazują, że opisane wyżej problemy zostały rozwiązane w stopniu pozwalającym na wielopunktową rejestrację sygnałów o jakości zbliżonej do przeprowadzanych dotąd za pomocą elektrod szklanych rejestracji jednopunktowych.

6. Literatura

- [1] Litke A.M., Chichilnisky E.J., Dąbrowski W., Grillo A., Gryboś P., Kachiguine S., Rahman M., Taylor G.: Large scale imaging of retinal output activity. Nucl. Instr. and Meth., vol. 501, 2002, pp. 298-307.
- [2] Oka H., Shimono K., Ogawa R., Sugihara H., Taka-tenji M.: A new planar multielectrode array for extracellular re-cording application to hippocampal acute slice. J. Neurosci. Meth., vol. 93, 1999, pp. 61-67.
- [3] Jimbo Y., Robinson H.P.C.: Propagation of spontaneous synchronized activity in cortical slice cultures recorded by planar electrode arrays. Bioelectrochemistry, vol. 51, 2000, pp. 107-115.
- [4] Grybos P., Kmon P., Zoladz M., Szczygiel R., Kachel M., Lewandowski M., Blasiak T.: 64 Channel Neural Recording Amplifier with Tunable Bandwidth in 180 nm CMOS Technology, Metrol. Meas. Syst., Vol. XVIII (2011), No. 4.

otrzymano / received: 16.01.2012

przyjęto do druku / accepted: 02.03.2012

artykuł recenzowany / revised paper