



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar
Elektronikus Eszközök tanszék

Polimer alapú flexibilis mikroelektród-rendszer fejlesztése

OTDK DOLGOZAT

Készítette
Orbán Gábor

Konzulens
Márton Gergely MTA TTK MFA
Dr. Juhász László BME EET

2014. december 24.

Tartalomjegyzék

Kivonat	3
Abstract	4
1. Motiváció és célok	5
2. Bevezetés	7
2.1. Neurofiziológiai módszerek	7
2.1.1. Elektroenkefalográfia	7
2.1.2. Elektrokortikográfia	8
2.1.3. Idegszövetbe implantált elektródok	9
2.2. MEMS neurális szenzorok	10
2.2.1. Szilícium alapú multielektródok	10
2.2.2. Polimer elektródok	11
2.3. Polimerek	12
3. Anyagok és módszerek	13
3.1. Tervezési koncepciók	13
3.2. Layout tervezés	14
3.3. Rétegstruktúra megválasztása	16
3.4. Mikrotechnológiai megmunkálás	17
3.5. Rétegvastagság-vizsgálat	20
3.6. A mikroelektród-rendszer összeállítása	20
3.7. <i>In vitro</i> validálás - impedancia mérés, csökkentés	21
3.8. <i>In vivo</i> validálás - eszköz karakterizálása	23
4. Eredmények és diszkusszió	26
4.1. A mikromegmunkált komponensek és az összeszerelt eszköz	26

4.2. Az eredeti és a csökkentett impedancia <i>in vitro</i>	31
4.3. <i>In vivo</i> kísérleti eredmények	32
5. További lehetőségek	35
6. Összefoglalás	36
7. Köszönetnyilvánítás	37
Ábrák jegyzéke	38
Irodalomjegyzék	46

Kivonat

Mikro-elektromechanikus rendszerek (MEMS) technológiájával megmunkálható polimerek alkalmazása szigetelő réteggként lehetővé teszi olyan flexibilis mikroelektród-rendszerek létrehozását, melyek kiváló biokompatibilitásuk révén felhasználhatóak különböző neurofiziológiai vizsgálatok eszközeiként.

Az agykéreg felszínére simuló fóliaelektródokkal, ún. elektrokortikográfokkal (ECoG) helyi mezőpotenciálok mérhetőek nagy felbontással, az agyszövetbe implantált szenzorok segítségével pedig sejten kívüli (extracelluláris) jelek detektálhatóak, beleértve az eszköz környezetében lévő idegsejtek (neuronok) akciós potenciáljait, ún. egysejt aktivitásokat. A helyi mezőpotenciálok vizsgálata felhasználható a klinikumban epilepszia diagnosztizálására, illetve az agyban lévő epileptikus gócpontok lokalizációjára. A gócpontok műtéti úton történő eltávolításával az esetek nagy százalékában megszüntethető a betegség, az érzékelők alkalmazásával pedig minimalizálható a szükséges lézió mértéke.

Dolgozatomban egy, az MTA TTK Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet Mikrotechnológiai Osztályán elkészített, polimer alapú, flexibilis mikroelektród-rendszer fejlesztését mutatom be. Céлом egy kombinált szenzorstruktúra létrehozása volt, ami két fő részből áll: egy túszerű elektród-tömbből az extracelluláris jelek méréséhez, valamint annak tengelyére merőlegesen rögzített, mikroelektródokkal felszerelt lapkából az agyfelszíni vizsgálathoz.

A dolgozat első részében az agy elektromos aktivitásának biológiai hátterét és annak mérési lehetőségeit ismertetem. A második részben a felhasznált anyagok tulajdonságait és az elektródrendszer tervezési folyamatát mutatom be, majd a mikrotechnológiai műveletek lépéseit prezentálom, köztük poliimid és SU-8 rétegek megmunkálását és platinamintázat kialakítását lift-off technológiával. A harmadik részben az eszköz validálására térek ki, mely magában foglalja a fiziológiás sóoldatban elvégzett (*in vitro*) elektromos impedancia spektroszkópiai (EIS) méréseket, valamint patkány agykéregben végzett funkcionális (*in vivo*) tesztek.

Abstract

Utilization of polymer insulator layers, which can be processed by microelectromechanical system (MEMS) technology, makes the realization of flexible microelectrode arrays possible. These systems are suitable devices for neurophysiological measurements because of their excellent biocompatibility.

It is possible to measure local field potential changes with high resolution using foil electrodes placed onto the surface of the cerebral cortex. With sensors implanted into the extracellular space of the brain, unit activities, i.e. action potentials of the neurons nearby the sensor can be detected. In the clinics, local field potential measurements can be employed for epilepsy diagnosis and epileptic focus localization. By surgically removing the foci, the illness can be cured. With the utilization of the sensors, the extent of the necessary lesion can be minimized.

I present the development of a polymer-based flexible microelectrode system, fabricated at the Institute for Technical Physics and Materials Science, RCNS, HAS. My goal was to create a combined sensor structure consisting of two main components: a needle-like microelectrode array for the measurement of extracellular signals and a sheet-like array attached perpendicularly to the axis of the needle for recording electrocorticographic (ECoG) signals from the brain surface.

In the first part of the thesis I'm reviewing the biological background of neural activities and their measurement methods. In the second part I'm presenting the properties of the applied materials, the design of the electrode system and the steps of the microtechnological process flow, including fabrication of polyimide and SU-8 layers and platinum lift-off technology. Finally, I'm demonstrating the validation of the assembled devices with *in vitro* electrochemical impedance spectroscopic (EIS) measurements in physiological saline and with *in vivo* functionality tests, performed in rat neocortex.

1. fejezet

Motiváció és célok

Az idegrendszer elemi egységei, a neuronok közti információáramlás során létrejövő transzmembrán-áramok [1], valamint a sejtek közötti (extracelluláris) tér véges konduktanciájának [2] eredményeképpen az idegszövetben potenciálkülönbségek alakulnak ki, melyek elektródokkal mérhetők. Ezen potenciálkülönbség-mérések lehetővé teszik az egyes agyterületekhez köthető funkciók, neurális kapcsolatok feltérképezését [3, 4], valamint különböző idegrendszeri betegségek, például epilepszia [5], autizmus [6] diagnosztizálását, kiváltó okainak megismerését.

A potenciálváltozások detektálhatóak a fejbőrre, az agyfelszínre vagy a szövetbe helyezett elektródokkal. Utóbbi két esetben jobb térbeli és időbeli felbontás valósítható meg [7], ötvözésük pedig lehetővé teheti, hogy egyidejűleg legyenek regisztrálhatóak az agyhullámok agyfelszín síkjával párhuzamos fluktuációja és a szövetben zajló folyamatok mélységi varianciája. A szöveten belül érzékelhetőek akár környező idegsejtek akciós potenciáljai (ún. "egysejt" aktivitások). Ilyen jellegű, szimultán neurofiziológiai mérést már többen megvalósítottak kisállatok [8], valamint epilepsziás páciensek agyában [9, 10], azonban a mélységi mérést fém vezeték elektródokkal végezték, melyek kevésbé precíz kialakításúak a MEMS technológiával készült eszközökhöz képest.

A szövettel érintkező, vagy abba implantált eszközök esetében lényeges szempont az alkalmazott anyagok biokompatibilitása [11]. Előnyös továbbá, ha az eszköz az agyszövethez hasonlóan rugalmas, mivel így követni tudja annak pulzálását, finom mozgásait, ezáltal kisebb károsodást okoz [12].

Célom olyan szenzorrendszer létrehozása volt,

- mely segítségével egyidejűleg valósítható meg helyi mezőpotenciál-mérés az agyfelszínen, valamint egysejt aktivitások mérése a felszín alatti extracelluláris térben,

- minden szövettel érintkező elemében biokompatibilis, továbbá előnyösen flexibilis,
- az extracelluláris térbe ültethető komponensének vastagsága $30\text{ }\mu\text{m}$ alatti,
- az érzékelőpontok nagy pontossággal, reprodukálható módon vannak kialakítva.

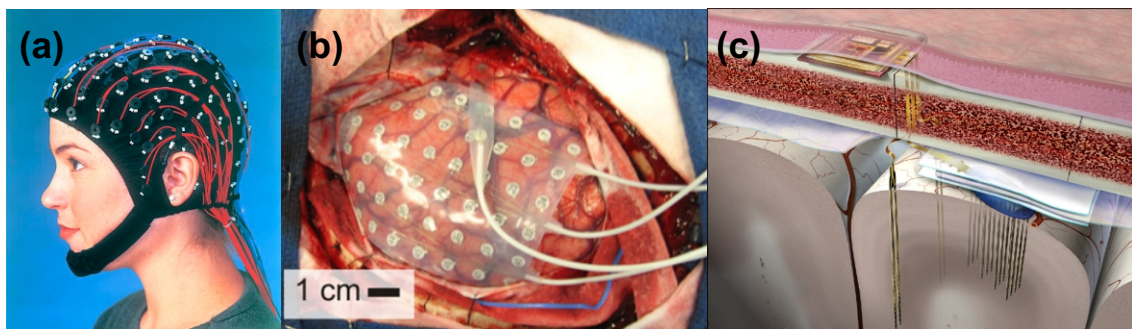
Ez olyan MEMS technológiai sor fejlesztését tette szükségessé, mely mikromegmunkálható polimereket alkalmaz.

2. fejezet

Bevezetés

2.1. Neurofiziológiai módszerek

Az idegsejtek (neuronok) sejtmembránjaikon szabályozott módon átfolyó ionáramok formájában képesek jelfeldolgozásra, ingerületetek továbbítására. Az ionáramok a sejtek közötti (extracelluláris) térben ún. volumenvezetéssel terjednek [13], elektromos potenciálkülönbségeket létrehozva az idegszöveten belül [14] és kívül, például a fejbőrön [15]. Az alábbiakban azokat a legelterjedtebben használatos neurofiziológiai módszereket foglalom össze, melyekkel ezek a potenciálkülönbségek mérhetőek. Az 1. ábra három ilyen módszert szemléltet.



2.1. ábra. Neurofiziológiai módszerek. (a) Elektroencefalográfia [16] (EEG), (b) elektrokortikográfia [17] (ECoG), (c) szövetbe implantált extracelluláris elektródok [18]

2.1.1. Elektroencefalográfia

Az elektroencefalográfiás (EEG) jelek mérése során a fejbőrre helyezett elektródok segítségével mérhető az agykéreg (cortex cerebri) neuronpopulációinak aktivitása. A

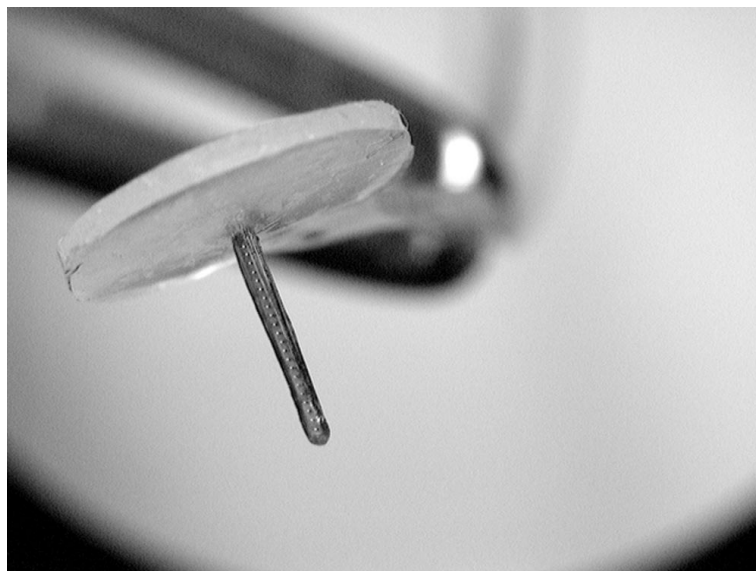
mérési módszer legfőbb előnye non-invazivitása mellett, hogy ezredmásodperces pontossággal képes követni az agyban lejátszódó elektromos potenciálváltozásokat [19]. Az EEG hátránya rossz térbeli felbontása, mivel a fejbőrön megjelenő jelek jellemzően nagyszámú idegsejt szinkronizált, összegzett aktivitásának eredménye [20]. A forrásanalízis nehézségét az inverz probléma jelenti: a gömbszerű test felszínén mért potenciálértékeknek végtelenül sok, a gömb belsejében indukálódó forrásmintázat feleltethető meg, így az EEG jelekből elvileg sem lehet tökéletesen visszafejteni az azokat generáló aktivitások térbeli eloszlását [21]. A módszer további hátránya a koponya szigetelő hatásából adódó zaj és a jelek torzítottsága. Mindezek ellenére a módszert igen elterjedten alkalmazzák idegtudományos kísérletekben [22], továbbá a klinikumban diagnosztikai [23, 5], sőt terápiás célokra [24]. Az EEG egy újabb felhasználási területe az agy-gép interfészek (brain-computer interfaces – BCI) létrehozása, melyek segítségével kommunikációs képességeikben korlátozott vagy végtagprotézisek használatára szoruló páciensek életminősége javítható [25, 26].

2.1.2. Elektrokortikográfia

Az elektrokortikográfiás (ECoG) mérések során az agyfelszínre helyezett elektródokkal mérhető a neuronok elektromos aktivitása [27]. Előnye, hogy az EEG-hez képest a koponya szigetelő hatásának kiküszöbölése révén sokkal jobb jel/zaj viszony és térbeli felbontás érhető el [28], hátránya azonban az invazivitása, ami miatt csak orvosilag különösen indokolt esetben alkalmazható. Az ECoG kiválóan alkalmazható idegtudományos kísérletekben különböző agykérgi területek funkcióinak meghatározására, azok egymással való kapcsolatának feltérképezésére [29]. A módszer egyik legelterjedtebb klinikai felhasználása az epilepsziát okozó gócpontok lokalizációja [30]. Az epilepszia krónikus idegrendszeri betegség, kiváltó oka egyes neuroncsoportok gátlóhatás alól felszabaduló ingerületvezetése, amitől bizonyos agyterületeket túlműködés jellemez [6]. A betegség a gócpontok műtéti úton történő eltávolításával az esetek többségében tünetmentessé tehető [31], ehhez azonban szükség van az epileptogén zónák lehető legpontosabb körülhatárolására. Az EEG-hez hasonlóan az ECoG is ígéretes módszer agy-gép interfészek fejlesztéséhez, mind a végtagprotézisek vezérlését [32], mind pedig a kommunikációs képességek bővítését tekintve [33].

2.1.3. Idegszövetbe implantált elektródok

A szövetbe implantált elektródok túlnyomó többsége az extracelluláris térbe kerül beültetésre és segítségével rendkívül jó (akár 10 - 100 μm) felbontással monitorozható az idegi aktivitás. Ezek az elektródok lehetővé teszik a környezetükben található neuronok akciós potenciáljainak, ún. egysejt aktivitásoknak, továbbá kisebb neuroncsoportok soksejt aktivitásainak érzékelését, ezért az extracelluláris elektródokkal mért jelek információtartalma jóval magasabb pl. az ECoG által szolgáltatott jelekhez képest, ezért ezek a szenzorok még inkább megfelelőek lesznek agy-gép interfészek számára. A klinikumban implantált elektródokat nem csupán érzékelőként, hanem beavatkozóként is használnak, példa erre a mélyagyi ingerlés mellyel a Parkinson-kór akár tünetmentessé tehető [34]. Implantált elektródok az epilepsziasebészet eszköztárában is megjelentek. A 2.2 ábrán látható eszköz poliimid szigetelésű, 24 db platina-irídium vékonyhuzalból, kézi munkával készített szenzor, melyet formája miatt rajzszög multi-elektrodnak neveznek. Az elektródsor egy 3 mm hosszú és 350 μm széles tűszerű testen helyezkedik el. A tű egy 1 cm átmérőjű, 300 μm vastag szilikongumi korongra rögzül, mely az agy felszínére illeszkedve elősegíti a szenzor mechanikai stabilitását a mérések során. A szenzort sikeresen használták epilepsziában szenvedő páciensek agykérgében mezőpotenciálok, valamint egysejt és soksejt aktivitások mérésére [35].



2.2. ábra. *Idegszövetbe ültethető rajzszög multielektroód [35]*

2.2. MEMS neurális szenzorok

A mikro-elektromechanikai rendszerek (microelectromechanical system, MEMS) technológiája a félvezetőipar eszköztárát tömbi mikromegmunkálással ("bulk micromachining") kibővítve kisméretű és nagyfokú integritással rendelkező szenzorok kialakítását teszi lehetővé [36]. Ezek a rendszerek megtalálhatóak például a gépjármű, mezőgazdasági és egyéb ipari gépekben vezérlő és érzékelő eszközökként, a számítástechnikában, gyógyszeriparban, vagy az orvostudományban [37]. Az in vivo neurofiziológiában használt érzékelők esetében előnyös a nagy elektródsűrűség, valamint kritikus az eszközök kis mérete, ezért egyre elterjedtebben kerülnek alkalmazásra a MEMS technológiával létrehozott neurális szenzorok. A technológia további előnye a reprodukálhatóság és a kihozatal.

2.2.1. Szilícium alapú multielektrodok

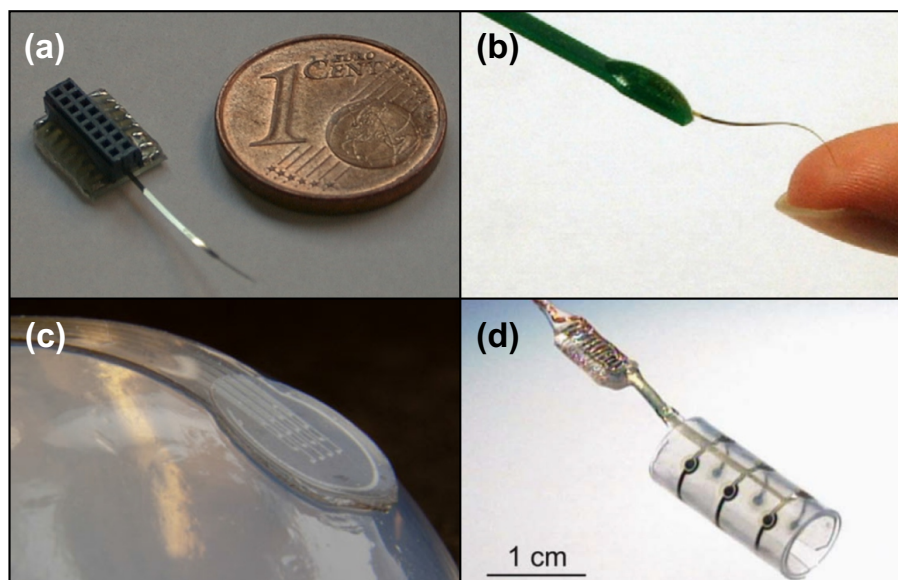
A szilícium alapú, idegszövetbe implantálható szenzorok két legelterjedtebben használt típusa a Michigan és Utah multielektrod. A Michigani Egyetem kutatói által kifejlesztett szenzorokat szilícium egykristályból alakítják ki. Az elektródok hordozójának geometriáját egy bórral adalékolt réteg definiálja, mely gátolja a Si marását, így módon a szilíciumon belüli bórdiffúzió által limitált, 30 μm vastagságú planár struktúrát eredményez. A mikro-elektrodokat még a marás előtt, egy titán/irídium rétegből, lift-off technológiával alakítják ki. A Utahi Egyetemen kifejlesztett multielektrod [38] egy 4,2 mm $\times$ 4,2 mm területű négyzet alakú üveg/szilícium kompozit alappal rendelkezik. Az alapból annak síkjára merőlegesen 10 $\times$ 10 db, hozzávetőlegesen 1,5 mm hosszú elektródszár áll ki, melyeket az egykristály szilícium fűrészelésével és nedves kémiai marásával alakítanak ki. A szárazakat platínával borítják, azt követően poliimiddel vagy parilén-C-vel szigetelik, majd a szigetelést a száraz hegyénél eltávolítják. A Michigan szenzorokkal ellentétben a Utah érzékelők kontaktusai az implantáció irányára merőleges síkban helyezkednek el.

Ezekén kívül számos egyéb módszerrel gyártottak neurális multielektrodokat, pl. SOI (silicon-on-insulator) szubsztrátok felhasználásával [39] vagy mély reaktív ionmarás (deep reactive ion etching) alkalmazásával [40].

A szilícium alapú agyi elektródok hátránya azok merevsége, mivel az agyi szövetek mozgását az elektród nem képes lekövetni, ami heves immunreakciók kiváltását eredményezheti [11]. Ez az idegtudósok számára közismert probléma fordította figyelmünket polimer alapú eszközök fejlesztése felé.

2.2.2. Polimer elektródok

Polimernek azokat a kémiai vegyületeket nevezzük, amelyek nagyszámú, egy vagy többfajta, azonos típusú atomcsoportból, úgynevezett monomer egységből épülnek fel és ezeket az építő elemeket primer kémiai kötések kapcsolják össze [41]. A polimer alapú MEMS multielektrodok fő előnye azok rugalmassága, ami kedvező a lágy agyszövetben történő alkalmazás esetében. A rugalmas implantátumok ugyanis követni tudják az agy apró mozgásait és pulzálását, kevesebb zavart okozva ezzel környezetükben [12].



2.3. ábra. Szövetbe implantálható flexibilis multielektrodok (a)[42],(b) [43], agyfelszínen mérő mikroelektrod-mátrix (c) [44], mandzsetta multielektrod perifériás idegek jeleinek mérésére (d) [12]

Flexibilis, polimer alapú mikroelektrodok beültethetőek a központi idegrendszerbe [44, 45, 46, 47] vagy a perifériás idegrendszer rostjaiba [45, 48]. Az implantátumok a szilícium alapú extracelluláris elektrodokhoz hasonlóan alkalmasak helyi mezőpotenciál és egysejt aktivitás mérésére. Számos *in vivo* mérés esetében nem szükséges az elektrodok idegszövetbe történő ültetése, elegendő annak felszínével való elektromos kapcsolat kialakítása, ami szintén egyszerűbben megvalósítható rugalmas eszközökkel. Erre a célra szolgálnak például a mandzsetta elektrodok, amelyek perifériás idegrostokra húzhatóak [49], továbbá a retina implantátumok, melyekkel *retinitis pigmentosa*-ban szenvedő páciensek vizuális funkciókra tehetnek szert [50], illetve a már említett ECoG elektrodok, melyek az agykérgen mérik a potenciálváltozásokat [43].

2.3. Polimerek

Mikrotechnológiai alapanyagként számos biokompatibilis polimer áll rendelkezésre neurális mikroelektródok szigetelőanyagként való alkalmazására, melyek közül a három leggyakrabban alkalmazott a poliimid, SU-8 és a parilén-C.

A poliimid leggyakoribb felhasználása az elektronikai technológiában szigetelő anyagként vagy passziváló réteggént történik, megvédi az áramköröket olyan nem kívánt hatásoktól, mint a nedvesség által okozott korrózió vagy fizikai sérülés. Az elektrofiziológiában alkalmazzák mind a perifériás, mind a központi idegrendszer jeleinek mérésére szolgáló eszközök fejlesztésénél, például a mandzsetta és ECoG elektródoknál [51, 52]. Szubsztrátra történő felpörgetését követően, hőkezelés alkalmazásával imidizáció megy végbe, melynek eredménye a kész réteg. Rajzolat kialakítás általában száraz marással történik. Újabban kifejlesztettek UV fénnel mintázható poliimideket is [53].

A SU-8 egy epoxi alapú negatív fotoreziszt. Fő felhasználási területe a mikrofluidikai rendszerek, ugyanis a lakkból nagy oldalfal-arányú (aspect ratio) alakzatok hozhatók létre. Sűrűn térhálós szerkezete biztosítja mechanikai stabilitását, továbbá ellenálló kémiai hatások és sugárzások ellen. Megmunkálása egyszerűbb, mint a poliimid, mivel UV fénnel litografálható [54].

A parilén számos kémiai gőzfázisból leválasztható poli(p-xililén) polimer gyűjtőneve, melyek hőre lágyulnak, lineárisak, nem térhálósak és szemkristályosak. Leginkább nagyon alacsony nedvességmegkötése és jó szigetelése miatt alkalmazzák. Tipikus rétegvastagsága néhány száz nanométertől pár mikrométerig terjed, felhasználástól és kialakításától függően [55]. A parilén-C [poli(dikloro-p-xililén)] a legnépszerűbb orvosi biológiában alkalmazott parilén típus [56].

3. fejezet

Anyagok és módszerek

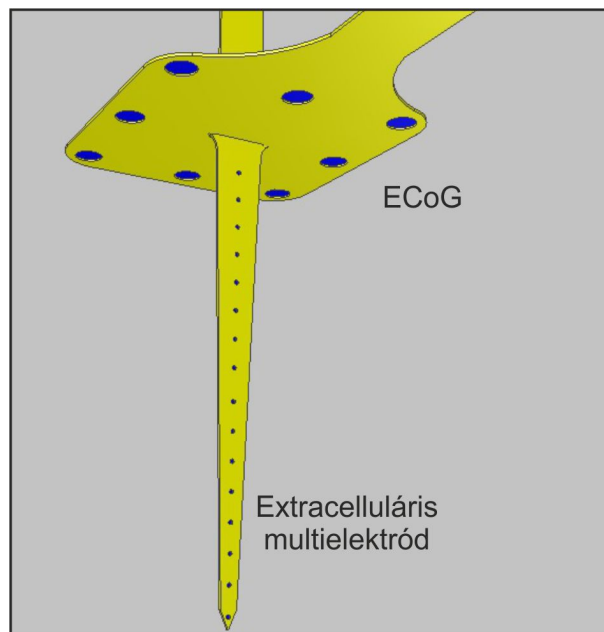
3.1. Tervezési koncepciók

A dolgozatomban bemutatott szenzorrendszer a rajzszög multielektrod [35] koncepcióját fejleszti tovább, az Országos Klinikai Idegtudományi Intézet munkatársai által meghatározott szempontok alapján. Az új elképzelés szerint a mechanikai szilárdságot biztosító korongot ECoG agyi jeleket rögzítő mikroelektrod-tömbbel váltjuk ki, egy eszközben kihasználva az implantált elektrodok és az agyfelszínen mérő eszközök előnyeit. A korábban kézzel készített szárat egy polimer alapú MEMS elemmel helyettesítjük, biztosítva ezzel a nagyfokú precizitást és reprodukálhatóságot, valamint jobb mechanikai kompatibilitást elérve ezzel a szenzor és az agyszövet között.

Az így megvalósítandó szenzorrendszer lekerekített sarkú négyzet alakú ECoG komponense 8 relatíve nagy, 200 μm átmérőjű kör alakú kontaktus felületet tartalmaz a helyi mezőpotenciálok mérésére. A négyzet méretének kellően nagyoknak kell lennie az implantált komponens mechanikai rögzítéséhez, az elektrodjai méretének megválasztásakor pedig az egymáshoz viszonyított elhelyezésiüket, az ECoG komponens felületének nagyságát és az impedanciájuk felülettől való függését kellett figyelembe venni, mivel az agyfelszínen történő helyi mezőpotenciál méréshez szinte bármekkora méretű elektrod megfelel. Mindezeket figyelembe véve a 200 μm -es átmérő megfelelő választásnak bizonyult, ahogy azt dolgozatomban a 3.7 és a 3.8 fejezetben mérésekkel igazolom. A tűhegy formájú extracelluláris komponens 16 kisebb, 30 μm átmérőjű kontaktusfelülettel készül a szöveten belüli akciós potenciálok mérésére. Ezek méretének megválasztásakor figyelembe kellett venni, hogy ha túl kicsi az elektrod mérete, nehéz vele az egysejt aktivitás detektálása, a túl nagy méretű elektrodok esetén pedig jelentős mértékű zaj terheli a mérést. Utóbbi abból adódik, hogy az extracelluláris elektrod a tőle maximum 100 μm távolságban elhelyez-

kedő neuronok akciós potenciáljait képes detektálni. Ilyen távolságban általában 4-5, de maximum 10 neuron található, ezek potenciáljainak mérésére tapasztalati úton megfelelő méretválasztás a 30 μm -es elektródok átmérő. A tűhegy hosszát az *in vivo* méréskor kiválasztott agyterület vastagságához igazítottuk, ahogy azt a 3.8 fejezetben bővebben is kifejtem. A tűhegy formájú komponens továbbá el van látva két, a komponensek közti mechanikai csatolást elősegítő karral, a tű két oldalán.

Ezzel a kialakítással egyszerre mérhetünk helyi mezőpotenciálokat és alkothatunk 3D képet a feltérképezni kívánt agyterületről, mindemellett javítva a korábbi mérési rendszerek időbeli felbontásán. Az elektródok jeleit a csatlakozóig egy, a kezelhetőséget megkönnyítő, íves vezetékrendszer továbbítja. A szenzorok által mért jeleket közös Preci-Dip (Preci-Dip, Delémont, Switzerland) csatlakozón vezetjük az erősítőn keresztül a számítógépbe, feldolgozás és analízis céljából. Az elektródrendszer koncepciója a 3.1 ábrán látható.



3.1. ábra. Illusztráció az elektródrendszer koncepciójáról

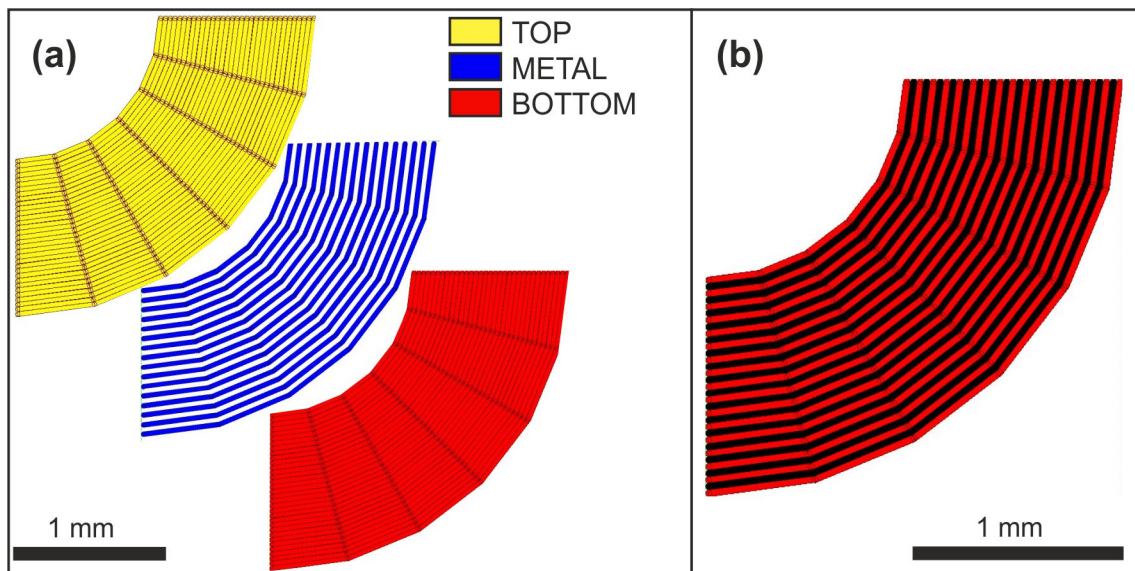
3.2. Layout tervezés

A szenzorok layoutjának tervezése a CleWin LAYOUT EDITOR szoftver 4.3.7.0 verziójával történt. A tervezőszoftver script írási lehetőséggel rendelkezik, az előre elkészített programkód alapján generál layout tervet. Ennek előnye, hogy parametrikusan tervezhető vele az ábra, így az utólagos változtatások könnyen eszközölhetők,

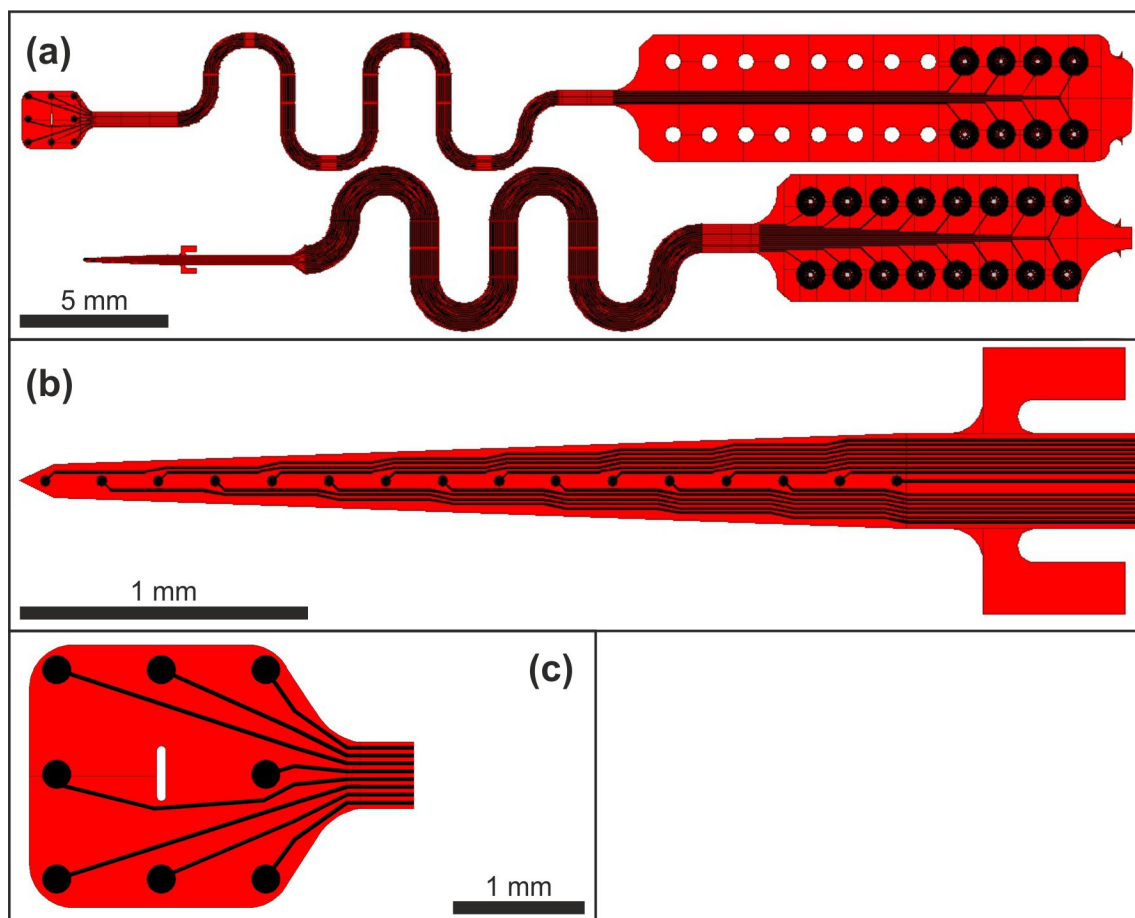
például a vezető csatornák száma. A szenzorokat alkotó nagyobb elemeket külön-külön terveztem meg, majd azokból felépítettem a layout tervet. Ilyenek a párhuzamos jelvezetékeket adó 0° -os, 90° -os és a 180° -os elemek, vagy a tűhegy-formájú alkotóelem. A szenzor állandó, változtatást biztosan nem igénylő részei script írás nélkül, kézi tervezéssel is megvalósíthatóak, ilyen például az általunk használt, *in vivo* kísérletek esetén alkalmazott technológiával kompatibilis csatlakozó fizikai mérete.

A megtervezett struktúra három rétegből épül fel: egy fém réteg, ami a jelek detektálására és a csatlakozóra juttatására szolgál, valamint egy alsó és egy felső szigetelő hordozó réteg. A szigetelő rétegek rajzolata az elektromos csatlakozás helyein tér el, ahol a felső réteg nyitott, lehetővé téve ezzel az elektromos kapcsolatot a fém és a szövet, illetve a fém és a csatlakozó között. Az alsó hordozó ezeken a helyeken szigetelő, egybefüggő felületet alkot.

A leíró script a kezdeti paraméterek megadása után először a fém réteg rajzolatát készíti el, majd az alsó és felső hordozó réteget. A tervezés során a LUA programnyelv matematikai függvényeit használtam. A layout terv részlete és egésze a 3.2 és 3.3 ábrán látható. Az így elkészített és az egyedileg meg-rajzolt elemek felhasználásával készült el az ECoG és a tűhegy alakú komponens layout terve. Az eszköz layoutja, a dolgozatomhoz nem kapcsolódó azonos rétegszerkezetű MEMS eszközökkel együtt került integrálásra 5 inch-es maszkokon.



3.2. ábra. A layout három rétegének különálló (a) és egymásra illesztett (b) képe



3.3. ábra. Layout terv: az ECoG komponens (a, felső), annak szenzorrégiója (c), az extracelluláris komponens (a, alsó) és annak szenzorrégiója (b)

3.3. Rétegstruktúra megválasztása

A gyártás elindítása előtt meg kell határozni az elkészítendő rétegstruktúrát alkotó anyagokat. Az MTA TTK MFA eszközparkjában megtalálhatóak a poliimid és a SU-8 megmunkálásához szükséges lakkcentrifuga és reaktív ionmaró berendezések, a parilén-C leválasztásához szükséges speciális reaktor azonban nem. A SU-8 lakkok ára jóval kedvezőbb, mint a fotolitografálható poliimideké, ezért SU-8-cal és hagyományos poliimiddel dolgoztam. A megfelelő struktúra kiválasztására több kísérletet is végeztünk ezek kombinálásával.

Kezdetben a prototípus elektródot PI/PI (alsó és felső) hordozóval készítettük el. A szilíciumra történő poliimid vékonyréteg leválasztás és megmunkálás nagy pontossággal elvégezhető, reprodukálható és jó kihozatalú eredményez. Az így elkészült szenzorok azonban nem rendelkeztek megfelelő tartással a használhatósághoz, nehézkes volt az alkal-

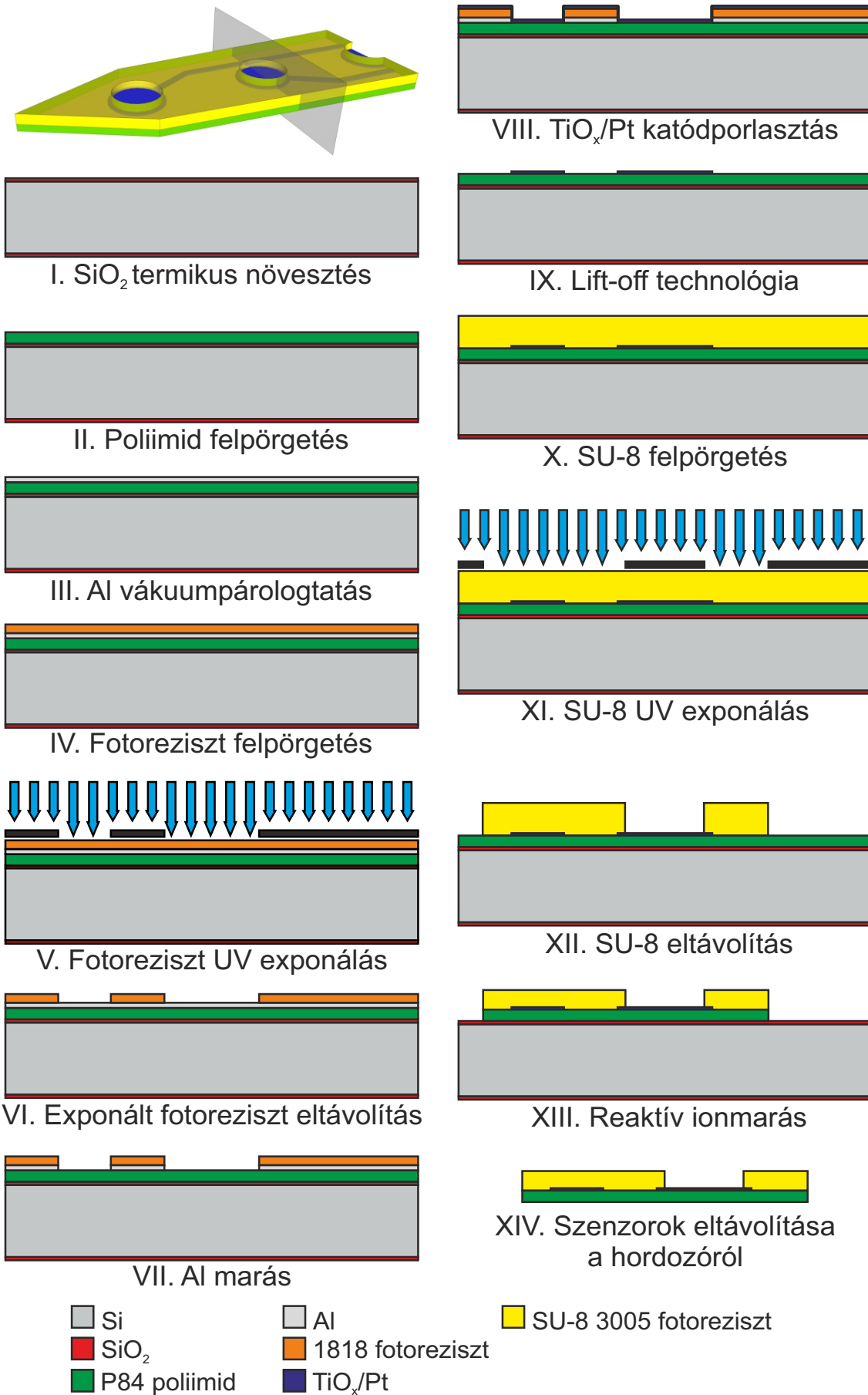
mazásuk. A következő kísérlet a SU-8/SU-8 hordozójú szenzor volt, melynek előnye volt a megfelelő merevsége, könnyen kezelhetőnek bizonyult az alkalmazása során. A nehézséget a SU-8 szilícium szeletről történő eltávolítása okozta. Ehhez a technológiai lépéshez általában alkalmaznak egy áldozati réteget, amelyet kémiai úton eltávolítva a SiO_2 és a SU-8 réteg közül, a SU-8 réteg eltávolítható. Ez a technológia azonban nem kompatibilis az általunk használt fémzési eljárással, így áldozati réteg nélkül alakítottuk ki a SU-8/SU-8 rétegszerkezetet. Ebben az esetben a szenzorok szeletről történő eltávolítása alacsony kihozatalú volt. Az eddigi tapasztalatok alapján alakítottuk ki a polimerek számunkra előnyös tulajdonságait kombinálva, a PI/SU-8 rétegszerkezetet.

A poliimid jó tapadást biztosít a SiO_2 -hoz a gyártás során, és könnyen eltávolíthatóvá teszi a szenzorokat a szeletről, míg a SU-8 könnyen megmunkálható és kellő tartását biztosít a szenzoroknak az alkalmazás során. A hordozók közti biokompatibilis vezető fémréteget a titán-oxid/platina (TiO_x/Pt) struktúra alkotja, ahol a titán-oxid szerepe a megfelelő tapadás biztosítása a poliimid réteghez.

3.4. Mikrotechnológiai megmunkálás

A technológiai lépéssor a 3.4 ábrán látható. A szenzorokat 4 inch átmérőjű szilícium szeleten alakítottuk ki. A megmunkálási folyamat első lépéseként 1 μm vastag termikusan növesztett SiO_2 réteget alakítottunk ki, atmoszférikus nyomáson 1150°C-on 140 perc alatt. Ezt követően 3,5 μm vastag P84 típusú poliimid (Evonik Industries, Essen, Germany) réteget pörgettünk fel a szelet egyik oldalára. A poliimid beégetése 300°C-on, 60 perc alatt történt. A következő technológiai lépés egy 500 nm vastag alumínium réteg felvitele vákuumpárolgatással, majd arra egy 1,8 μm vastag Microposit 1818 (Dow Electronic Materials, Newark, DE, USA) típusú fotoreziszt került felpörgetésre. Az alumínium jelen esetben egy áldozati réteget alkot, melyre a fémzés mintázatát kialakító lift-off technológiai lépés miatt van szükség. Mivel az alkalmazott Microposit pozitív fotoreziszt, a megvilágított helyeken válik oldhatóvá, ezért a korábban elkészített fém réteg layout mintázata alapján úgy készült el az itt felhasznált maszk, hogy ahova fém réteget terveztünk, onnan eltávolításra került a fotoreziszt. A lakkot a maszkon keresztül exponáltuk, majd az alumíniumot nedves kémiai marással ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{HNO}_3$ 70:20:30:32:20) mintáztuk meg. A fémzés felvitelének első lépéseként katódporlasztással 15 nm TiO_x réteg került a poliimldre a megfelelő tapadás elérése érdekében, majd arra leválasztásra került 270 nm Pt. A TiO_x/Pt mintázatát ún. "lift-off" technológiával alakítottuk ki: a réteg alatt lévő Al és fotoreziszt lemarásával csak azokon a területe-

ken maradt fémezés, ahonnan az előző lépésben eltávolítottuk az Al-t. A felső szigetelőréteg kialakításához 20 μm vastag, 3005 típusú SU-8 (Micro Chem Corporation, Newton, MA, USA) felpörgetése következett, amit 150 °C-on 30 perc alatt égettünk be. Mivel a SU-8 negatív fotoreziszt, a réteg mintázata kialakítható a réteg UV megvilágításával és előhívásával. A réteg mintázata azonos az alsó hordozó rétegével, azzal a különbséggel, hogy a csatlakozó tűskéinek helyein és az elektródok felszíneinél eltávolításra kerül a SU-8. A SU-8 réteg mintázatának a poliimid rétegre történő átvitele reaktív ionmarással (RIE) történt. A marás során oxigén (O_2) és tetrafluormetán (CF_4) plazma 1:1-es arányú keverékével maródtak a rétegek, 120 sccm áramlási sebesség, 10 perc időtartam és a plazma és a szelet közti 90 V potenciálkülönbség paraméterek mellett. Ezalatt a SU-8 réteg mintázata került átvitelre a poliimid rétegre. A marást addig végeztük, amíg a poliimid réteg teljesen lemaródott. A marás során a SU-8 réteg is maródott, kisebb mértékben. A platina maszkoló anyagként funkcionált, megvédve ezzel az alatta található poliimid réteget. Végül a MEMS struktúrákat csipesz segítségével eltávolítottam a szeletekről.

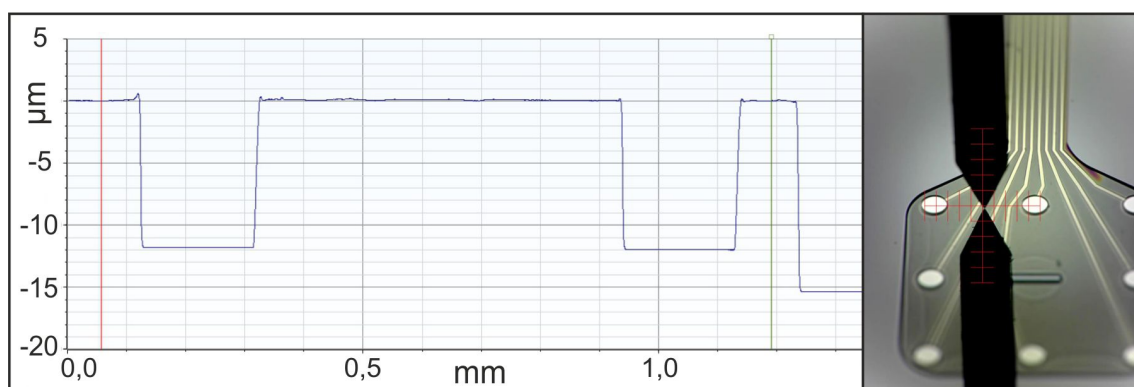


3.4. ábra. MEMS technológiai megmunkálás

3.5. Rétegvastagság-vizsgálat

Az elkészült szeleten megvizsgáltam az egyes rétegvastagságokat Bruker DektakXT profilométerrel, ellenőrizve ezzel a reaktív ionmarás paramétereinek sikeres beállítását. A 3.4 ábra XIII. részábráján látható, hogy a reaktív ionmarás a poliimid rétegen kívül a SU-8 réteget is elvékonyította, továbbá tudjuk, hogy a SiO_2 vastagságát is csökkentette. A szeleten lévő rétegstruktúra alapján két vastagságot tudunk mérni: a poliimid, a SU-8 és a SiO_2 lemart vastagságának összegét, valamint a poliimid, a titán-oxid/platina és a SiO_2 lemart vastagságának összegét. A komponensek eltávolítása után mérhető lett egy harmadik vastagság, a SiO_2 bemaródásának mértéke. A három vastagság mérése, és a TiO_x/Pt vastagságának ismeretéből már kiszámítható a poliimid és a SU-8 rétegek mikrotechnológiai megmunkálás utáni vastagsága.

Egy, a profilométerrel készített részeredmény látható a 3.5 ábrán. A vastagságmérés a SU-8 rétegen kezdődik, így az található a 0 μm -es tengelynél. A grafikonon a völgyek a kontaktus felületek feletti területeket mutatják, melyekből kiszámítható a reaktív ionmarás utáni SU-8 réteg vastagsága.



3.5. ábra. Profilométerrel készített vastagság vizsgálat részeredménye grafikonon, és a mérés közben készült fénykép

3.6. A mikroelektród-rendszer összeállítása

A rendszer összeállítása mikroszkóp alatt, csipeszekkel történt, ezt szemlélteti a 3.6 ábra. A szenzorok komponenseinek összeillesztése érdekében a rögzítésükhöz három, 1 mm vastag üveg lemezt használtam fel. Két lemez tartotta helyén az ECoG komponenst, a csatlakozó felőli részét, és attól kezdve az egész szenzort, egészen a vezetékezéshez legközelebb eső három elektróddal bezárólag. A harmadik lemez alulról támasztotta meg

a szenzor területből a csatlakozótól távolabb eső három ECoG elektródot, tehát a szenzor terület két középső elektródját és a köztük lévő lyukat egyik oldalról sem takarta üveg, ahogy az (a) és (b) képeken látható. Az ECoG komponens ilyen módon történő mechanikai rögzítése kellően stabilnak bizonyult az extracelluláris szenzor tűhegy alakú érzékelő területének és szárának az ECoG szenzorrégió közepén lévő nyílásba helyezéséhez, ez látható a (c) részábrán. Az összeillesztés végezetéül a szár két oldalán elhelyezkedő kar mechanikai kontaktusba került az ECoG komponenssel. Ekkor az alsó két üveglemez közti hézagot addig csökkentettem, amíg kellő mechanikai stabilitást adtak a tű alakú szenzor-nak a komponensek összeragasztása esetén. A két szenzorkomponens egymáshoz történő rögzítése érdekében egy csepp epoxi gyantát alkalmaztam, ami a harmadik üveg lemez feletti ECoG területre került felhelyezésre, a komponensek találkozásánál, azok alsó oldali hordozójára, elkerülve vele az elektródokat, a (d) részábra szerint.

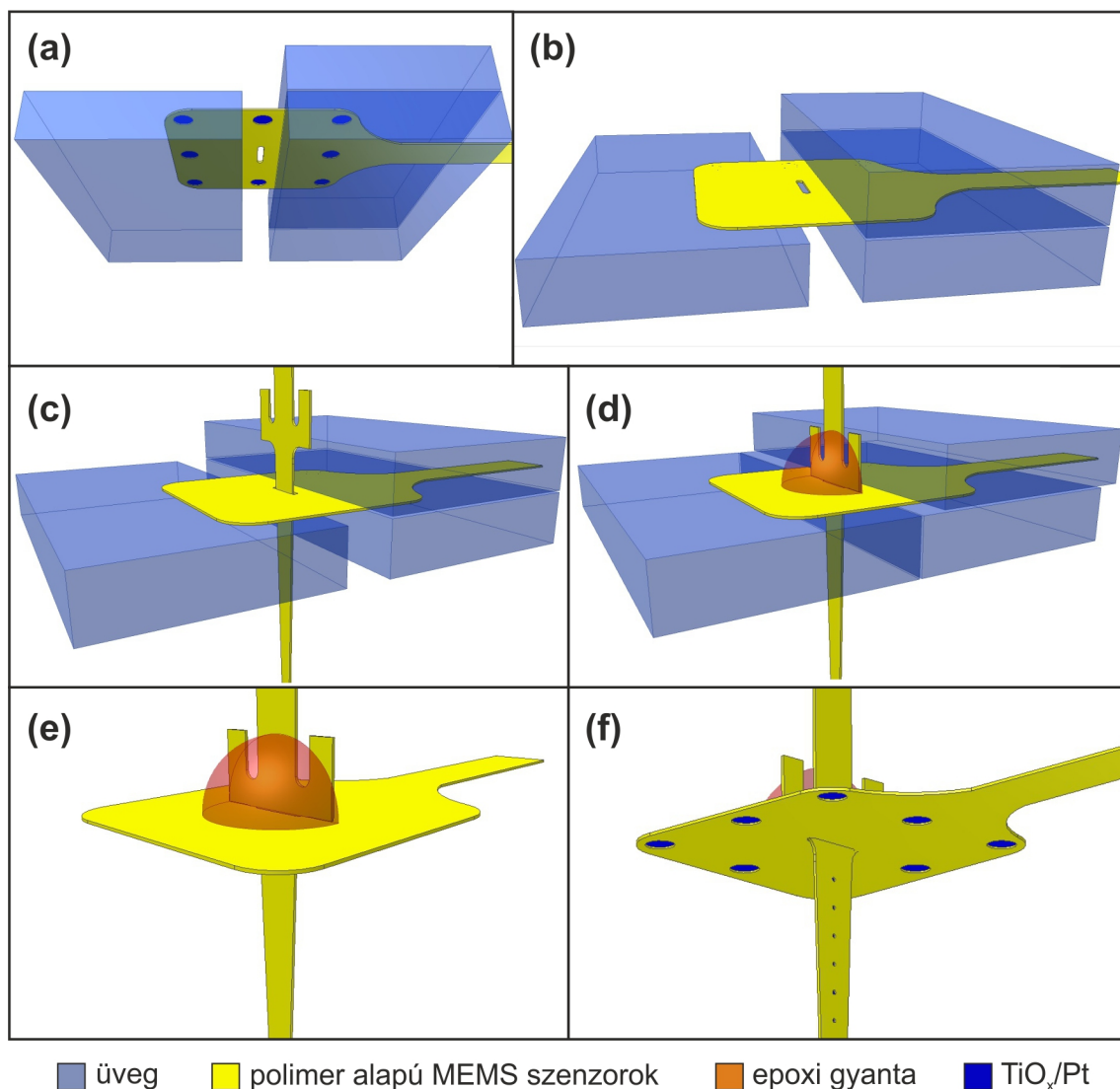
A gyanta megszáradása után, utolsó lépésben az eszközök csatlakozóit szereltem fel. A Preci-Dip csatlakozó tűskéi a szenzorok csatlakozó felületén kialakított lyukakba lettek ültetve, majd az elektromos kapcsolat biztosítása érdekében forrasztott kötéseket alakítottam ki, a mechanikai rögzítést epoxi gyanta szolgáltatta.

3.7. *In vitro* validálás - impedancia mérés, csökkentés

A kontaktusfelületek impedanciájának karakterizálásához elektrokémiai impedancia spektroszkópiát (EIS) alkalmaztam. Referenciának ezüst-ezüstklorid (Ag/AgCl) elektródot, ellenelektródnak pedig egy relatív nagy felületű platina vezetéket használtam. A közvetítő anyag fiziológiás sóoldat (0,9% sűrűségű NaCl) volt. A szenzort az oldatba helyezve, az elektródok és a referencia között 25 mV effektív értékű szinuszos mérőfeszültséget hoztam létre, amihez a Reference 600 (Gamry Instruments, PA, USA) mérőműszert használtam feszültség szabályozónak. A mérés szabályozására, az impedanciaértékek gyűjtésére és azok analizálására a Gamry Framework 6.02 és az Echem Analyst 6.02 szoftverek álltak rendelkezésemre. A méréseket Faraday-kalitkában végeztem.

Az extracelluláris elektródok impedanciája a 100 k Ω -os, míg az ECoG elektródok esetén ugyanez az érték a 10 k Ω -os nagyságrendbe esik. A jelentős impedanciakülönbség a kontaktus felületek méretbeli különbségéből adódik.

Az ECoG szenzor kontaktusainak impedanciája alkalmas lehet agyi jelek mérésére, az extracelluláris elektródok esetén azonban az ekkora impedanciájú kontaktusokon történő agyi jelek elvezetését jelentős mértékű zaj terhelné. Az 50 Hz frekvenciájú hálózati feszültség és a körülöttünk lévő nagyfrekvenciás eszközök zaja egyaránt zavarként je-



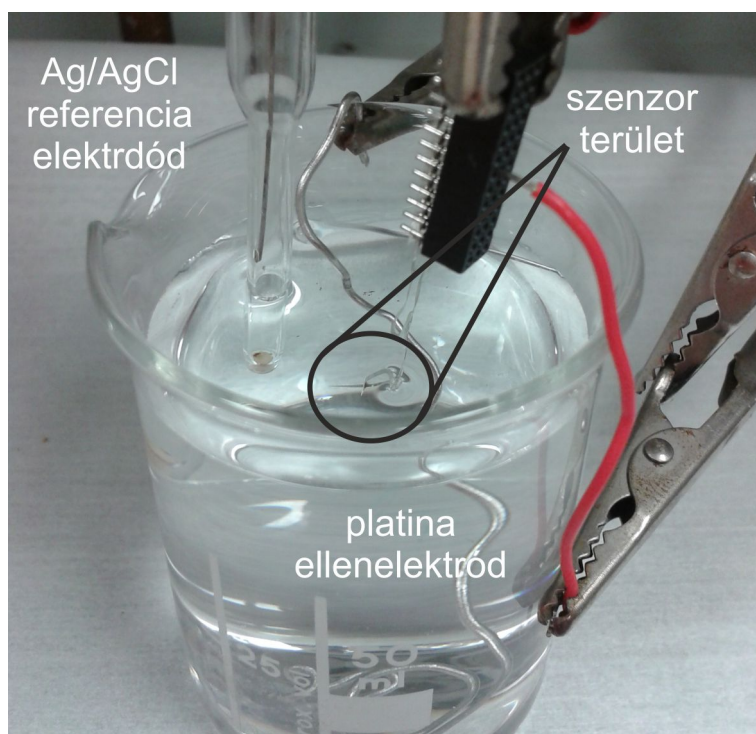
3.6. ábra. Az összeállítás menete: az üveg lemezekkel rögzített ECoG komponens nézete alulról (a) és felülről (b), extracelluláris komponens helyére pozicionálása (c), epoxi gyanta felvitele (d), lemezek eltávolítása (e)(f).

lenik meg a mérés során. A jobb jel-zaj viszony eléréséhez az extracelluláris kontaktusok impedanciáit csökkenteni kellett.

Az impedanciacsökkentéséhez a kontaktusok felületét növeltem, azáltal hogy egy nagy fajlagos felületű platinaréteget választottam le. Az így kapott platinázott platina (Pt/Pt) rétegek tartóssága már korábban tesztelésre került szilícium mikroelektródok esetében [57].

Faraday-kalitkában egy háromelektrodos mérési elrendezést állítottam össze: platina-tetraklorid oldatba ($\text{PtCl}_4 \times 2\text{HCl} \times 6\text{H}_2\text{O}$) helyeztem a kontaktusfelületeket, referencia elektródnak ismét Ag/AgCl, ellenelektrodnak pedig platina elektródot használtam.

A leválasztás a korábban használt Reference 600 műszerrel történt, az extracelluláris elektródok és a referencia közé 100 mV potenciálkülönbséget beállítva, 10 perc időtartam alatt. A leválasztás után a kontaktusok impedanciái 10 k Ω nagyságrendűek lettek, így megfelelő zajszűrés mellett lehetővé téve a szenzorstruktúra elektródjainak *in vivo* karakterizálását.



3.7. ábra. Háromelektrodos mérési elrendezés

3.8. *In vivo* validálás - eszköz karakterizálása

A szenzorrendszer funkcionális karakterizálásához patkány nagygyban elektrofi-
ziológias mérést végeztünk, az MTA TTK Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet
Összehasonlító Pszichofiziológia csoport műtőjében.

Összesen 5 Wistar patkány agyi jeleit mértük, az állatok a mérés során ketamin-
xilazin oldat felhasználásával lettek érzéstelenítve és altatva. A műtéti beavatkozás előtt
a 37,5 mg/ml ketamin és 5 mg/ml xilazin összetételű oldatból 0,2 ml / 100 g testsúly
arányban kaptak a 270 – 400 g súlyú állatok altatás és érzéstelenítés céljából az [58]
alapján. A mérések előkészítéséhez az állatok feje sztereotaxiás célzó berendezésbe került
rögzítésre, amely a beültetés során rögzíti az állatot és segít a beültetési hely pozíciójának
pontos meghatározásában.

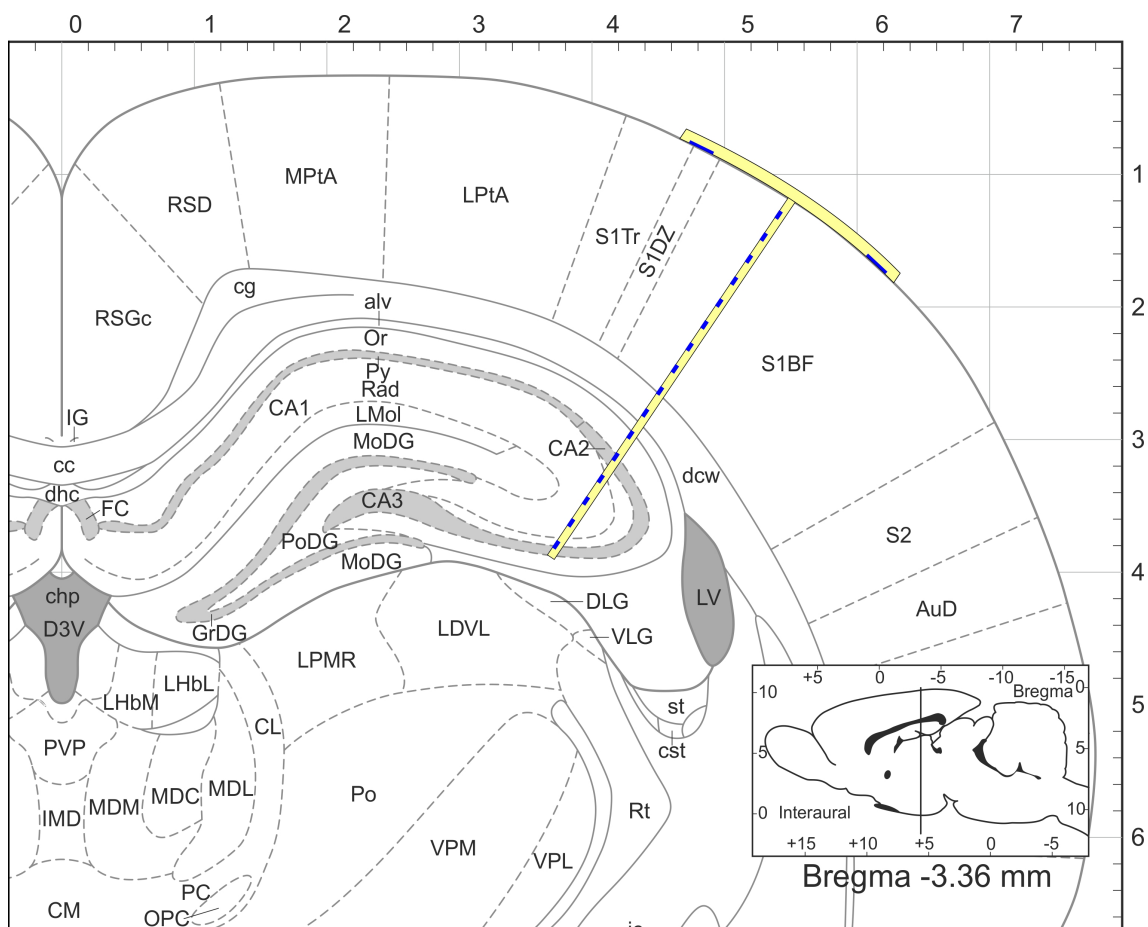
Az állatok tartása és a velük való bánásmód megfelelt az Európai Tanács 2010. szeptember 22-én meghozott (2010/63/EU) irányelveinek (tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó törvények és rendeletek az EU tagállamaiban), az 1998. évi XXVIII. törvénynek (állatok védelméről és kíméletéről), valamint a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont állatok védelmére és tartására vonatkozó szabályzatainak.

A műtéti beavatkozás során a tájékozódást segítő célzórendszer három dimenzióban, 10 μ m pontossággal állítható karját a koponya varratok egyik metszéspontjára, az ún. bregmára pozícionáltuk. A patkány agyatlaszok ezt a pontot tekintik origónak, ettől a ponttól számítják a távolságot a fej állása szerint hosszanti (anteroposterior – AP) és oldalirányban (mediolateral – ML).

A műtéti beavatkozás kezdetén a koponyát a referenciapontként használt bregmához képest (-1,0 mm) – (-0,6 mm) AP és (2,0 mm) – (7,0 mm) ML által meghatározott területen felnyitottuk. A mikroelektrod-rendszer implantálásának célterülete, merőlegesen implantálva az agyfelszínhez képest a -3,36 mm AP, 5,5 mm ML pont volt, ami lehetővé tette számunkra lamináris jelek mérését a barrel cortexben, beleérve a hippocampusba, ahogy a 3.8 ábra mutatja. [59]A barrel cortex a szomatoszenzoros agykéregben található agyterület, és a tapintással kapcsolatos ingerületek feldolgozását végzi. Az egyik legnagyobb agyterület a patkány agykérgében, valamint könnyen hozzáférhető, ezért ezt választottuk implantálási célterületnek. Az extracelluláris komponens hosszát úgy határoztuk meg, hogy biztosan átérjen az agykérgen, beleérve az alatta található hippocampusba. A hippocampus a térbeli tájékozódásért [60, 61] és a memória működéséért felelős agyterület [62].

A célterület felett a kemény agyhártyát (dura mater) bemetszettük a simább implantáció érdekében. A pontos beültetéshez a szenzorrendszert a sztereotaxiás célzó karjára erősítettük, és a kar valamint csipesz segítségével a célterületen keresztül az agyszövetbe szúrtuk.

A jelek rögzítése 20 kHz-es mintavételi frekvenciával, egy 32 csatornás Intan RDH 2000 erősítő rendszerrel (Intan Technologies LLC., Los Angeles, CA, USA) történt, USB 2.0 porton csatlakoztatva azt a számítógépre.



3.8. ábra. A beültetési célterület

4. fejezet

Eredmények és diszkusszió

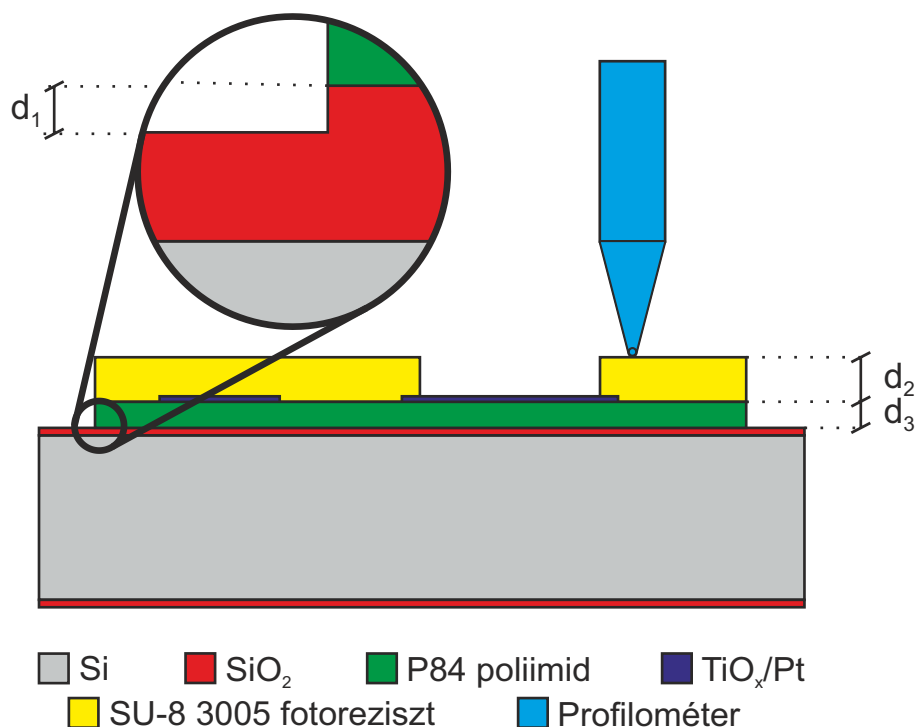
4.1. A mikromegmunkált komponensek és az összeszerelt eszköz

A szilícium szeleten végzett mikrotechnológiai megmunkálás sikeres volt, a megfelelően megválasztott rétegstruktúra és technológiai lépéssor eredményeként a megtervezett mikroelektródok jó (90% fölötti) kihozattal készültek el. A megmunkálási folyamat végére ért szeleteken profilométeres vastagságmérés segítségével megvizsgáltam a mintákat, validálva az eszközök rétegstruktúráját alkotó egyes elemek vastagságát, ellenőrizve ezzel a reaktív ionmarás paramétereinek megfelelő beállítását.

A poliimid (d_3) és SU-8 (d_2) réteg vastagságának kiszámításához megmértem a SiO_2 reaktív ionmarás miatti vastagság csökkenését (d_1), a poliimid és TiO_x/Pt valamint a poliimid és a SU-8 rétegek együttes vastagságát, melyek a 4.1 ábrán láthatók.

A poliimid és SU-8 réteg együttes vastagságának megállapításához 20 mérést végeztem, melyek alapján az átlagos PI+SU-8 réteg vastagsága $15,63 \mu\text{m}$ és az eredmények szórása $1,33 \mu\text{m}$. Hasonlóan, a PI+ TiO_x/Pt átlagos vastagsága $3,49 \mu\text{m}$, a mért értékek szórása $0,14 \mu\text{m}$. Mivel a 20 végzett mérés a SiO_2 már ionmarás utáni vastagságához képest történt, ezért a marás által eltávolított vastagságot hozzáadtam az átlagolt vastagság értékekhez. A SiO_2 beamaródásának meghatározására, a szeletről eltávolított mikroelektródok kontúrjánál végeztem elszórtan a szeleten 24 mérést, ahol az ionmart SiO_2 és az ionmarás ellen védett SiO_2 határa található. Átlagolva a mért értékeket elmondható, hogy az $1 \mu\text{m}$ vastag SiO_2 rétegből $d_1 = 77,49 \text{ nm}$ maródik le (a mért adatok szórása $26,67 \text{ nm}$). Tudjuk, hogy a katódporlasztott TiO_x/Pt vastagsága 285 nm , így a poliimid réteg vastagsága a mért PI + TiO_x/Pt vastagságból:

$$d_3 = 3,49 - 0,285 = 3,21 \mu\text{m} \quad (4.1)$$



4.1. ábra. Profilométerrel vizsgált rétegvastagságok

Ennek felhasználásával a SU-8 réteg RIE utáni vastagsága:

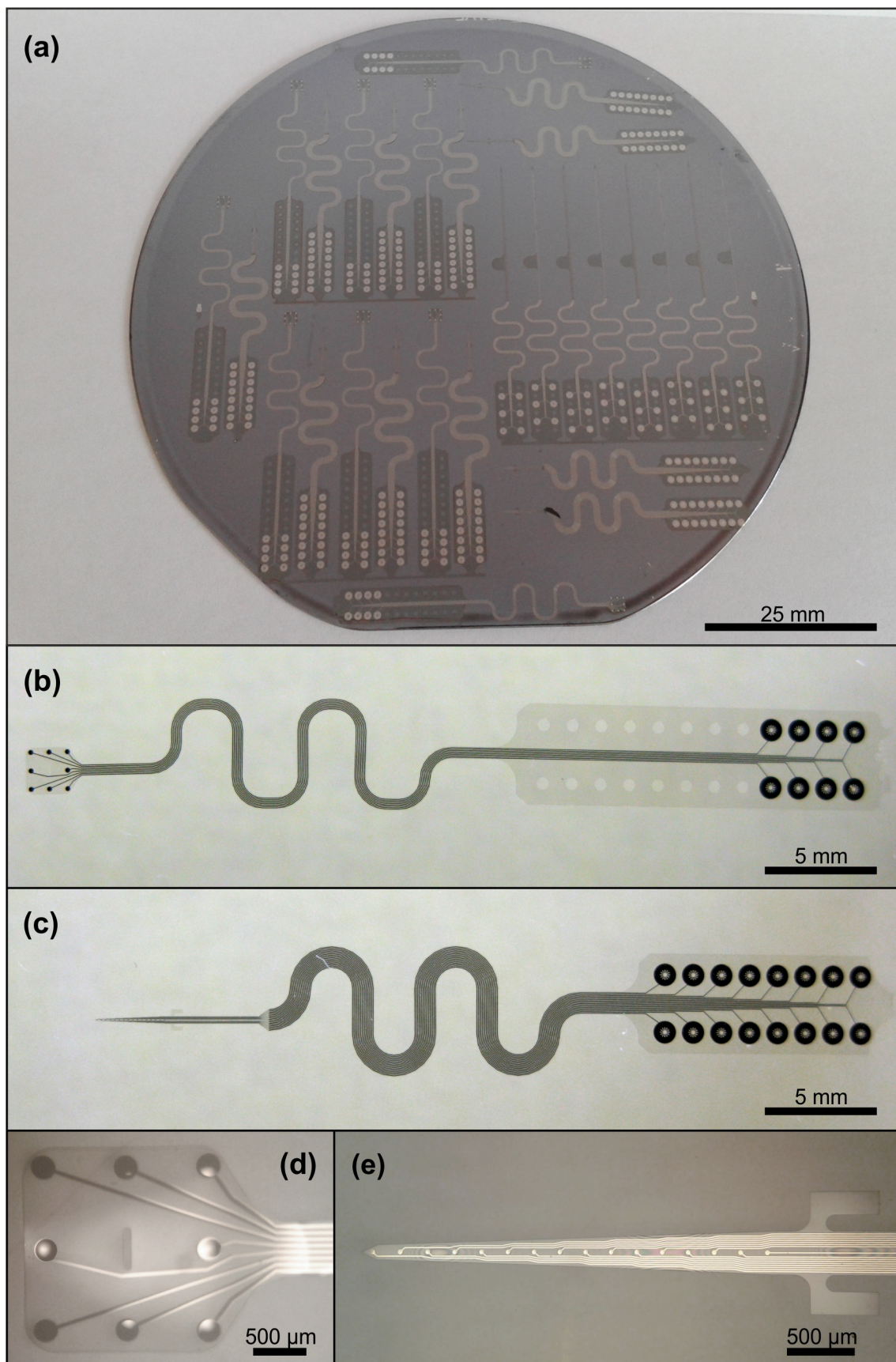
$$d_2 = 15,63 - 3,21 = 12,42 \text{ } \mu\text{m} \quad (4.2)$$

A rétegvastagságok meghatározása után azt mondhatom, hogy a technológiai lépéssort záró reaktív ionmarás eredményeként megfelelő vastagságú SU-8 réteg marad a poliimid felett, a SiO₂ csak kis mértékben maródik le, de a poliimid teljesen eltávolodott a nem kívánt helyekről. A reaktív ionmarás paramétereinek beállítása sikeres volt, a szenzorok vastagsága megfelel a korábban meghatározott szempontoknak.

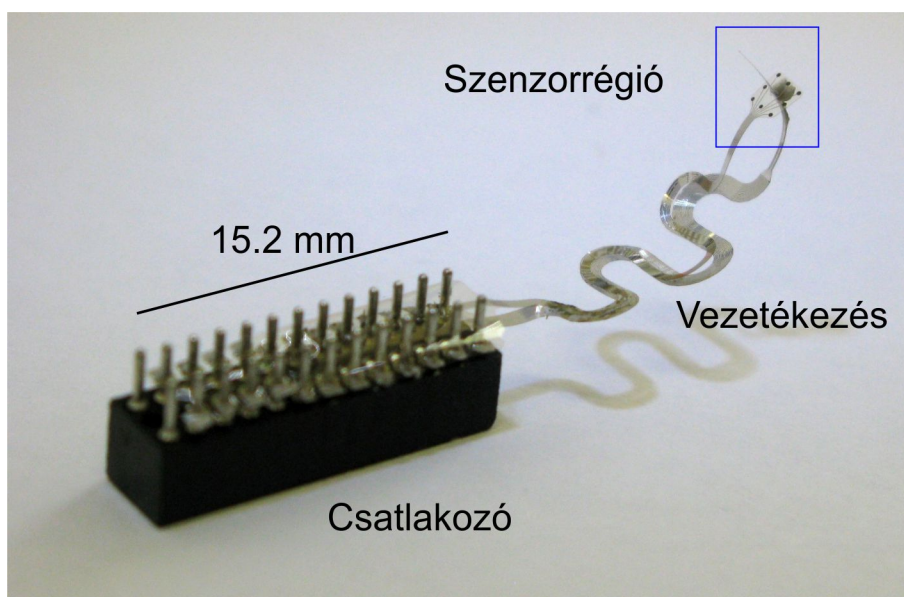
Az mikrotechnológiai lépéssor végére ért szeptet és az arról eltávolított komponensek láthatóak a 4.2 ábrán, a csatlakozóval ellátott és egymáshoz rögzített szenzorokról valamint az elektródokat tartalmazó felnagyított szenzor területekről készült képek a 4.3 és a 4.4 ábrán láthatóak. A mikrotechnológiai és összeszerelési folyamatok eredményeként, a szenzorrendszer geometriája összhangban van az általunk előre eltervezettel. Összesen 5 db ilyen eszközt készítettem és teszteltem. Az extracelluláris elektródokat tartalmazó szár rögzítése az ECoG komponenshez megfelelőnek bizonyult, a kapcsolat minden esetben sértetlen maradt az *in vitro* és az *in vivo* tesztek során. A hasonlóan flexibilis, ívekkel ellátott vezetékezés mechanikusan elválasztja a szenzorrégiót és a csatlakozót.

A vezetékezés mechanikai megbízhatósága is megfelelő volt, csak extrém húzóerő esetén történt szakadás.

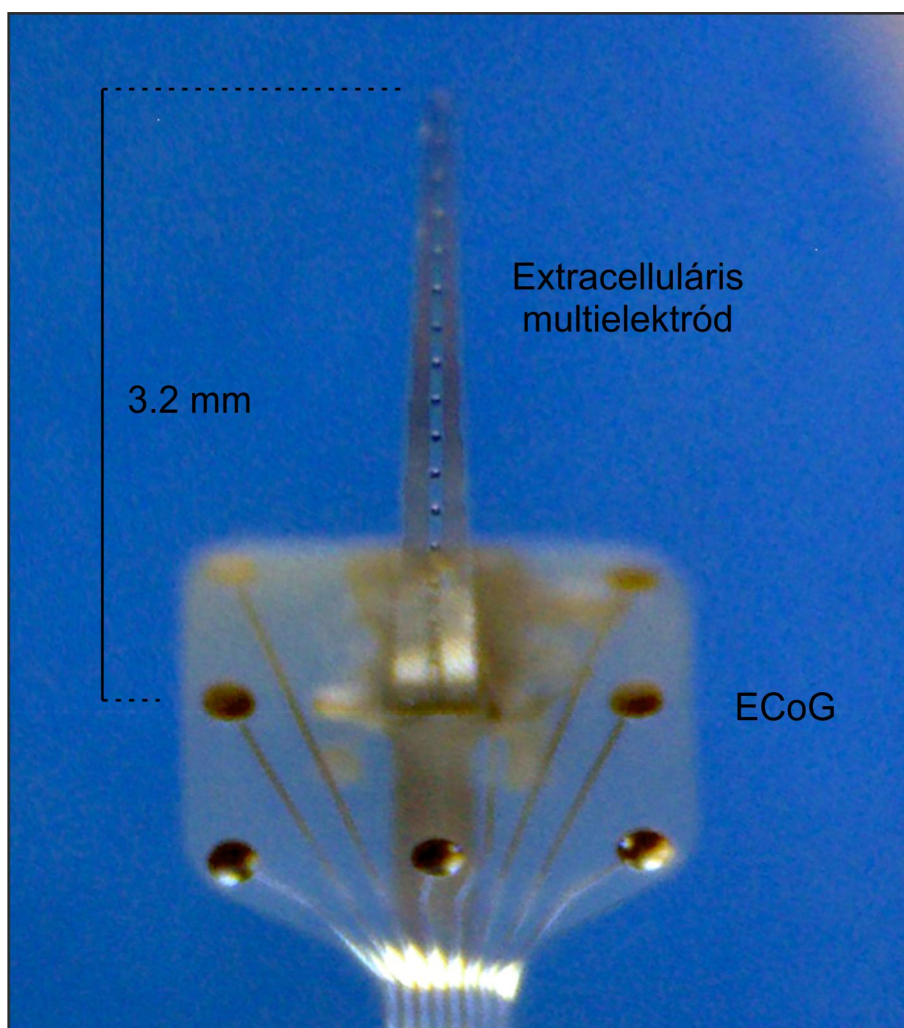
Összegezve a tapasztalatokat megállapíthatom, ezek a rugalmas eszközök nem igényelnek annyi óvatosságot és gondoskodást a használatuk során, mint a ridegebb, szilícium alapú extracelluláris mikroelektród-tömbök.



4.2. ábra. A MEMS technológiai lépéssor végére ért szelet (a), a hordozóról eltávolított ECoG komponens (b) és annak szenzorrégiója (d), a hordozóról eltávolított extracelluláris komponens (c) és annak szenzorrégiója (e)



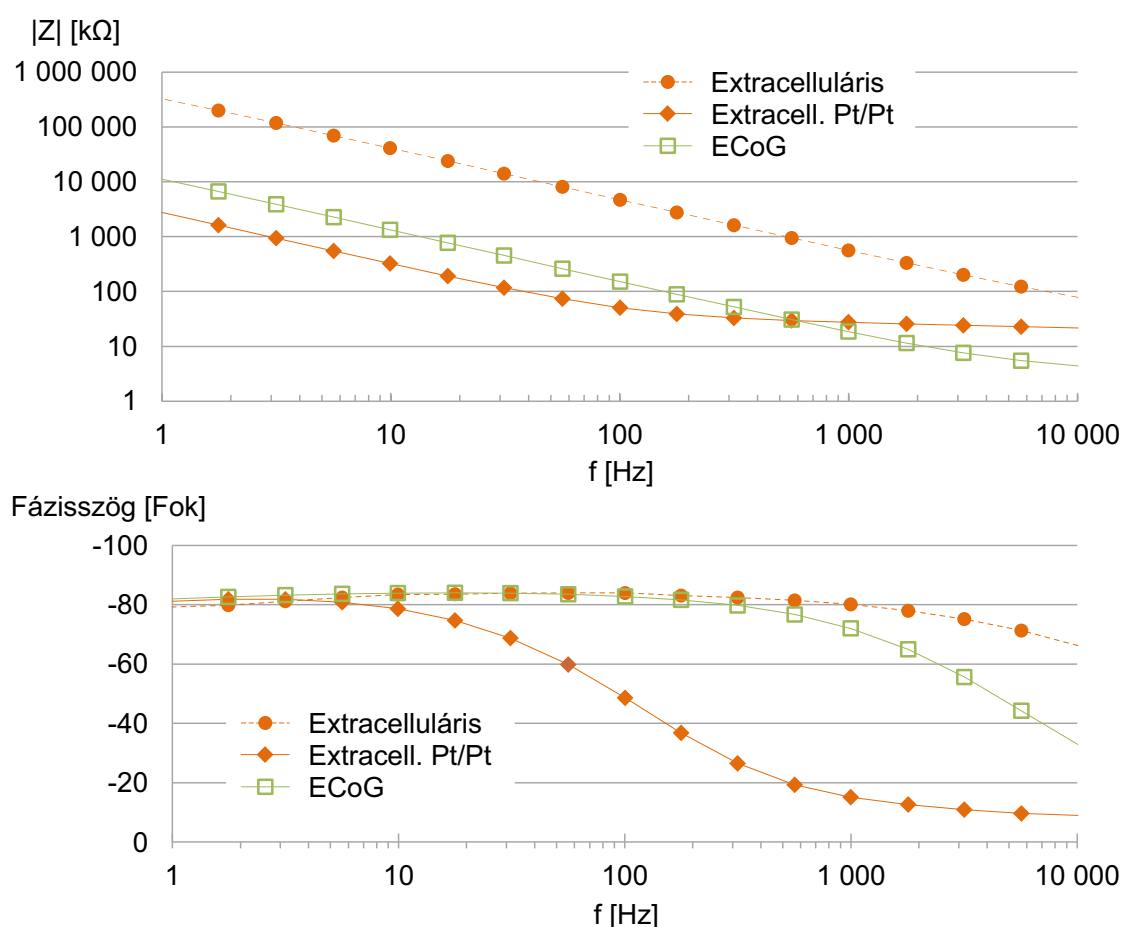
4.3. ábra. Az összeillesztett és csatlakozóval ellátott mikroelektrod-rendszer



4.4. ábra. A szenzorrégió, mely tartalmaz egy 16-csatornás extracelluláris multielektrodot és egy 8-csatornás ECoG komponenst

4.2. Az eredeti és a csökkentett impedancia *in vitro*

Egy eszközzel végzett *in vitro* impedanciamérések átlageredményei láthatóak a 4.5 ábrán. A $707\ \mu\text{m}^2$ geometriai területű extracelluláris, porlasztott platina elektródok esetében az impedancia abszolút értékének átlagára és a hozzá tartozó szórásra 1 kHz-en $559,5 \pm 148,4\ \text{k}\Omega$ adódott. A kedvezőbb jel-zaj viszony érdekében úgy döntöttem, csökkentem ezeket az értékeket. Elektrolitikus platinaréteg leválasztással kapott magas durvasági tényezőjű Pt/Pt réteget kaptam, megnövelve az elektródok felületét. Az így kapott átlagos impedanciaértékek és szórások 1 kHz-en $27,6 \pm 8\ \text{k}\Omega$ -ra csökkentek.

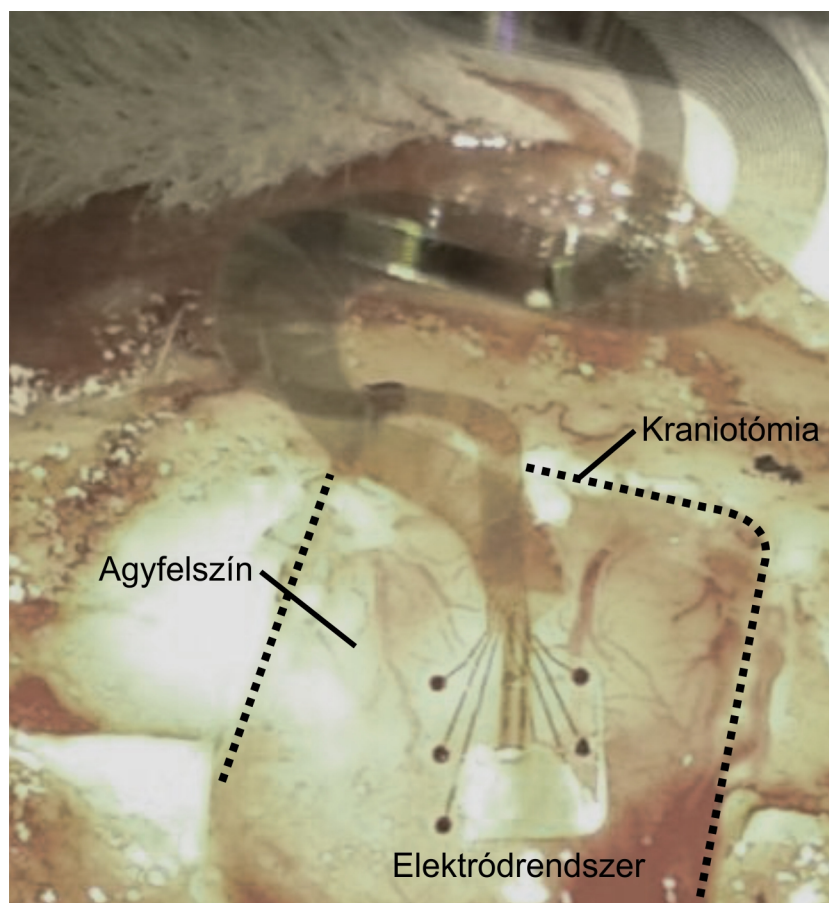


4.5. ábra. Eredeti és csökkentett impedancia és fázis értékek

Ahogy az várható volt, a sokkal nagyobb, $3140\ \mu\text{m}^2$ felületű ECoG elektródok esetében jóval alacsonyabb impedanciaértéket, 1 kHz-en átlagosan $18,6 \pm 0,5\ \text{k}\Omega$ -ot kaptam. Mivel az ECoG elektródokkal egysejt aktivitásokat nem, csak helyi mezőpotenciált terveztem regisztrálni, ezért ezeket az impedanciaértékeket elegendően alacsonynak találtam és nem alkalmaztam elektrolitikus platina leválasztást a felület növelése érdekében.

4.3. *In vivo* kísérleti eredmények

A kisállatokon végzett *in vivo* beültetés közben az eszközök könnyen kezelhetőek voltak, nem károsodtak. A dura matert átböktve mind az öt esetben sikeres implantációt hajtottunk végre. Az eszköz csatlakozóját az előerősítőbe kötve a helyi mezőpotenciál-változások, egysejt és soksejt aktivitások rögzítése sikeresen megtörtént.



4.6. ábra. Agyszövetbe implantált és agyfelszínen mérő szenzorrendszer

A rögzített hullámformákból látható egy részlet a 4.7 ábrán. Az 1-8-as számú csatornák jelölik az ECoG komponens elektródjai által észlelt helyi mezőpotenciálokat, és a 9-24-es számú csatornák felelnek meg az extracelluláris szenzor jeleinek. Lassú, 1-1,5 Hz-es oszcilláció figyelhető meg az összes csatornán, ami jellemző az alkalmazott ketamin-xilazin anesztéziára [63, 64].

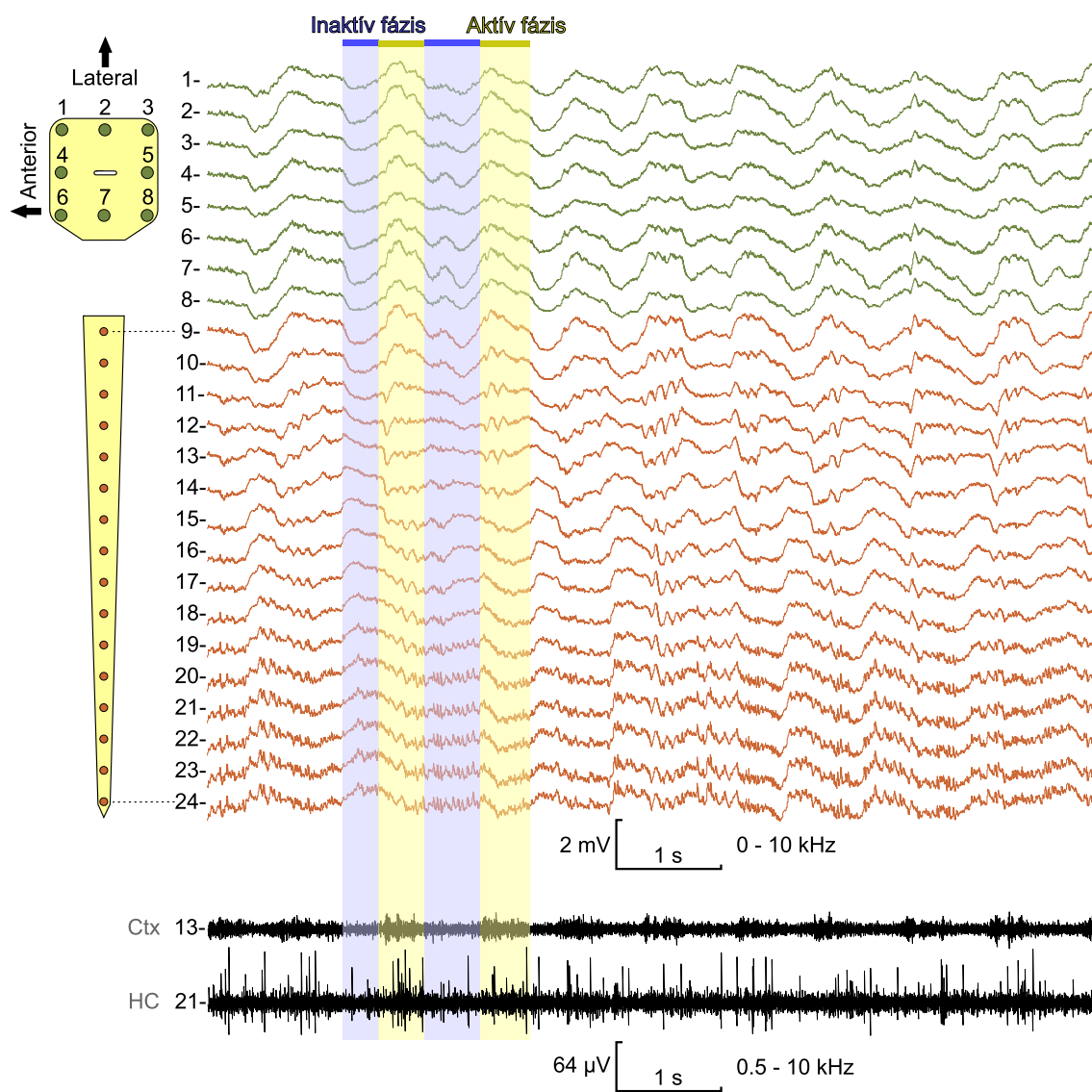
Az oszcilláció periódusa felosztható két alternáló állapotra. Az aktív fázis alatt a neuronok sejtmembránjai depolarizáltak és időegység alatt nagyszámú akciós potenciált (spike-ot) generálnak. Ezeket inaktív fázisok váltják, amikor a membránok hiperpolarizáltak,

minek hatására a sejtaktivitás lecsökken [65, 65].

Az helyi mezőpotenciálnak pozitív csúcsa van aktív fázis alatt az agyfelszínen és a kéreg külső rétegeiben, míg a mélyebb rétegekben a hullám polaritása a felszíni jelekhez képest fordított. Ez a jelenség megfigyelhető az ECoG csatornákon és az implantált komponens 9-18 csatornáin. Emellett emelkedett aktivitás is megfigyelhető az oszcillációénál magasabb frekvenciatartományban a 19-24 csatornákon. Ez azt igazolja, hogy az implantációs tervnek megfelelően az extracelluláris multielektrodot alkotó szár vége beleér az ilyen jellegű aktivitást generáló hippocampuszba.

A szomszédos sejtek egysejt aktivitásának megjelenítésére felülráteresztő szűrést alkalmaztunk a mért jeleken, 500 Hz-es vágási frekvenciával. Az orvosbiológiában az akciók potenciálok keresésénél gyakori az 500 Hz -es vágási frekvencia alkalmazása, ezért ettől nem térünk el a mérések során. Mivel a helyi mezőpotenciálok maximum 300 Hz frekvencián jelennek meg, így azok eltávolítja az így megválasztott szűrő. A cortexben nagy intenzitású soksejt aktivitás figyelhető meg az aktív fázisokon belül. A hippocampuszban az egysejt aktivitás nem követi szorosan az oszcillációt, ami megfelel az elvárásainknak, mivel a lassú oszcilláció generátorai a kérgi (neocortikális) és a thalamikus sejtek [66].

A felvételeket követően a szenzorokat eltávolítottuk az agyból és megtisztítottuk őket. 10-15 percig áztattuk őket 10 mg/ml Terg-A-Zyme (Alconox Inc., White Plains, NY, USA) vizes oldatban. Ez idő alatt és utána 3-4 alkalommal eltávolítottuk a szenzorokat az oldatból és desztillált vízzel lemostuk őket. A tisztítási folyamat után nem maradt nyoma rajtuk szerves anyagnak.



4.7. ábra. In vivo rögzített hullámformák

5. fejezet

További lehetőségek

Az eszközt az Országos Klinikai Idegtudományi Intézet munkatársaival együttműködésben, Nemzeti Agykutatás Projekt keretében fejlesztettük. Távlati célunk a szenzor humán alkalmazása. Ennek egyik előfeltétele az eszköz kisállatokba történő krónikus beültetése, hogy képet kaphassunk beültetés által kiváltott immunreakciókról és az elektródok hosszú távú stabilitásáról. Ezt a kísérletsorozatot a sikeres akut beültetések nyomán szintén az MTA TTK Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetben fogjuk végezni.

Az idő rövidsége miatt nem volt módom a szenzorrendszer három dimenziós jel-forrásforrás-lokalizációs képességeit validálni, ehhez a jövőben további *in vitro* és *in vivo* méréseket fogok végezni agaróz gélben és patkányban. A Pt/Pt vezető réteg mellett tervben van más impedancia csökkentő módszerek vizsgálata is, például az irídium/irídium-oxid vezető réteg alkalmazása.

A technológia elvileg lehetővé teszi többszárú extracelluláris multielektrod-struktúra kialakítását, alkalmassá téve a rendszert a szövet nagyobb térfogatának monitorozására.

A MEMS technológia eszköztára lehetőségeket biztosít speciális funkciók integrálására. Mikrofluidikai csatornák korábban kialakításra kerültek az MTA TTK MFA szilícium alapú neurális érzékelőkben és lehetőség van hasonló, többfunkciós, polimer alapú szenzorok fejlesztésére, adhézíós kötés segítségével. Különböző törésmutatójú polimerek alkalmazásával hullámvezető integrálható az eszközre, alkalmassá téve azt optogenetikai kísérletekben való felhasználásra.

6. fejezet

Összefoglalás

Irodalmi kutatómunkám eredménye alapján azt mondhatom, hogy tudomásom szerint az ebben a munkában bemutatott eszköz az első polimer alapú, flexibilis szenzorrendszer, ami egy extracelluláris és egy ahhoz integrált agyfelszíni mikroelektrod-tömbből áll. Az alkalmazott mikrotechnológiai megmunkálási eljárások lehetővé tették precízen és reprodukálhatóan kivitelezni a megtervezett multielektrodot, egy továbbfejlesztett verzióját a rajzszög elektrodnak, amelyet már sikeresen alkalmaztak lamináris jelek rögzítésére humán agykéregben.

Az új eszközt karakterizáltuk *in vitro*, fiziológias sóoldatban és *in vivo*, patkány központi idegrendszerében, bizonyítva annak funkcionális működését. Az *in vitro* eredmények azt mutatják a porlasztott platina elektrodok impedancia értékeit illetően, hogy elektroli-tikus platina leválasztással elérhető az impedanciák nagyságának 1 kHz-en az eredeti érték 4,8 %-ra, míg alacsonyabb frekvenciákon 2 nagyságrenddel alacsonyabbra való csökkenése. Az *in vivo* felvételek során az ECoG és az extracelluláris elektrodokon is sikeresen rögzítettünk helyi mezőpotenciálokat, melyek az elvárt, a beültetési célterületnek és az alkalmazott anesztéziának megfelelő lassú hullámú oszcillációt mutattak, továbbá az implantált komponens egysejt aktivitások detektálására is alkalmasnak bizonyult.

A szenzorrendszert prezentáltuk szeptember 7-10 között a EUROSENSORS 2014 konferencián az olaszországi Bresciában, valamint november 20-22 között a Magyar Idegsebészeti társaság és a Magyar Neuroonkológiai Társaság Innováció az Idegsebészetben című 2014. évi Nemzeti Kongresszusán.

7. fejezet

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni konzulensem, Márton Gergely áldozatos és segítőkész munkáját, mellyel lehetővé tette dolgozatom létrejöttét. Köszönöm Kiss Marcellnek a dokumentumszerkesztésében és lektorálásában nyújtott segítségét. Köszönöm tanszéki konzulensem, Dr. Juhász László segítségét a dolgozat elkészítésében. Szeretném megköszönni az MTA TTK MFA tisztatéri személyzetének és kutatóinak, Payer Károlynének, Nagy Attilának, Csarnai Tibornak, Ferencz Jánosnak, Lőrincz Andrásnak, Hodován Róbertnek, Dr. Fürjes Péternek, Dr. Pongrácz Anitának és Dr. Battistig Gábornak a támogatást. Továbbá köszönöm az MTA TTK KPI munkatársainak, Fiáth Richárdnak, Kottra Péternek és Dr. Ulbert Istvánnak a segítséget az *in vivo* kísérletekhez.

Ábrák jegyzéke

2.1. Neurofiziológiai módszerek. (a) Elektroenkefalográfia [16] (EEG), (b) elektrokortikográfia [17] (ECoG), (c) szövetbe implantált extracelluláris elektródok [18]	7
2.2. Idegszövetbe ültethető rajzszög multielektród [35]	9
2.3. Szövetbe implantálható flexibilis multielektródok (a)[42],(b) [43], agyfelszínen mérő mikroelektród-mátrix (c) [44], mandzsetta multielektród perifériás idegek jeleinek mérésére (d) [12]	11
3.1. Illusztráció az elektródrendszer koncepciójáról	14
3.2. A layout három rétegének különálló (a) és egymásra illesztett (b) képe . .	15
3.3. Layout terv: az ECoG komponens (a, felső), annak szenzorrégiója (c), az extracelluláris komponens (a, alsó) és annak szenzorrégiója (b)	16
3.4. MEMS technológiai megmunkálás	19
3.5. Profilométerrel készített vastagság vizsgálat részeredménye grafikonon, és a mérés közben készült fénykép	20
3.6. Az összeállítás menete: az üveg lemezekkel rögzített ECoG komponens nézete alulról (a) és felülről (b), extracelluláris komponens helyére pozicionálása (c), epoxi gyanta felvitele (d), lemezek eltávolítása (e)(f). . .	22
3.7. Háromelektródos mérési elrendezés	23
3.8. A beültetési célterület	25
4.1. Profilométerrel vizsgált rétegvastagságok	27
4.2. A MEMS technológiai lépéssor végére ért szelet (a), a hordozóról eltávolított ECoG komponens (b) és annak szenzorrégiója (d), a hordozóról eltávolított extracelluláris komponens (c) és annak szenzorrégiója (e) . . .	29
4.3. Az összeillesztett és csatlakozóval ellátott mikroelektród-rendszer	30
4.4. A szenzorrégió, mely tartalmaz egy 16-csatornás extracelluláris multielektródot és egy 8-csatornás ECoG komponenst	30

4.5.	Eredeti és csökkentett impedancia és fázis értékek	31
4.6.	Agyszövetbe implantált és agyfelszínen mérő szenzorrendszer	32
4.7.	<i>In vivo</i> rögzített hullámformák	34

Irodalomjegyzék

- [1] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.*, 117(4):500–544, 1952. PMCID: PMC1392413.
- [2] T. Goto, R. Hatanaka, T. Ogawa, A. Sumiyoshi, J. Riera, and R. Kawashima. An evaluation of the conductivity profile in the somatosensory barrel cortex of wistar rats. *J Neurophysiol*, 104(6):3388–412, 2010. Using Smart Source Parsing Dec; doi: 10.1152/jn.00122.2010. Epub 2010 Sep 1.
- [3] H. Gelbard-Sagiv, R. Mukamel, M. Harel, R. Malach, and I. Fried. Internally generated reactivation of single neurons in human hippocampus during free recall. *Science*, 322(5898):96–101, 2008. Using Smart Source Parsing Oct 3; doi: 10.1126/science.1164685. Epub 2008 Sep 4.
- [4] H. Liu, N. Tanaka, S. Stufflebeam, S. Ahlfors, and M. Hamalainen. Functional mapping with simultaneous meg and eeg. *J Vis Exp*, 14(40):1668, 2010.
- [5] S. J. Smith. Eeg in the diagnosis, classification, and management of patients with epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76(2):ii2–7, 2005. Using Smart Source Parsing Jun;Suppl.
- [6] L. M. Oberman, E. M. Hubbard, J. P. McCleery, E. L. Altschuler, V. S. Ramachandran, and J. A. Pineda. Eeg evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. *Brain Res Cogn Brain Res*, 24(2):190–8, 2005. Using Smart Source Parsing Jul.
- [7] Andrew B. Schwartz, X. Tracy Cui, Douglas J Weber, and Daniel W. Moran. Brain-controlled interfaces: Movement restoration with neural prosthetics. *Neuron*, 52(1):205–220, 2006.

- [8] H. Toda, T. Suzuki, H. Sawahata, K. Majima, Y. Kamitani, and I. Hasegawa. Simultaneous recording of ecog and intracortical neuronal activity using a flexible multichannel electrode-mesh in visual cortex. *NeuroImage*, 54(1):203–12, 2011. Using Smart Source Parsing Jan 1; doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.08.003. Epub 2010 Aug 7.
- [9] T. Matsuo, K. Kawai, T. Uno, N. Kunii, N. Miyakawa, K. Usami, K. Kawasaki, I. Hasegawa, and N. Saito. Simultaneous recording of single-neuron activities and broad-area intracranial electroencephalography: electrode design and implantation procedure. *Neurosurgery*, 73(2 Suppl Operative):146–54, 2013. Using Smart Source Parsing Dec; doi: 10.1227/01.neu.0000430327.48387.e1.
- [10] I. Ulbert, G. Heit, J. Madsen, G. Karmos, and E. Halgren. Laminar analysis of human neocortical interictal spike generation and propagation: current source density and multiunit analysis in vivo. *Epilepsia*, 4:48–56, 2004. Using Smart Source Parsing 45 Suppl.
- [11] Vadim S. Polikov, Patrick A. Tresco, and William M. Reichert. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *Journal of Neuroscience Methods*, 148(1):1 – 18, 2005.
- [12] T.; Stieglitz T Hassler, C.; Boretius. Polymers for neural implants. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 49(1):18–33, 2011.
- [13] Attila Fonyo. *Az orvosi élettan tankönyve*. Medicina Kiadó, 1999.
- [14] C. Nicholson and J. A. Freeman. Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *J Neurophysiol*, 38(2):356–68, 1975. Using Smart Source Parsing Mar.
- [15] M. Teplan. Fundamentals of eeg measurement. *Measurement Science review*, 2(2):2002, 2002.
- [16] <http://www.medicalexpo.com/prod/compumedics-neuroscan/electroencephalography-caps-79144-501556.html>.
- [17] Sharma M Szrama N Roland J Freudenberg Z Solis J Breshears J Schalk G Leuthardt EC, Gaona C. Using the electrocorticographic speech network to control a brain-computer interface in humans. *Journal of Neural Engineering*, 8(3):036004, 2011.

- [18] K. D. Wise, A. M. Sodagar, Yao Ying, M. N. Gulari, G. E. Perlin, and K. Najafi. Microelectrodes, microelectronics, and implantable neural microsystems. *Proceedings of the IEEE*, 96(7):1184–1202, 2008.
- [19] B Keri, Sz.; Gulyas. *Elektrofiziológiai módszerek a kognitív idegtudományban*. Osiris Kiadó, 2003.
- [20] F.L. Niedermeyer, E.; da Silva. *Electroencephalography. Basic principles, clinical applications, and related fields*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [21] Tracey; Muscat Joseph; Camilleri Kenneth P.; Fabri Simon G.; Zervakis Michalis; Xanthopoulos Petros; Sakkalis Vangelis; Vanrumste Bart Grech, Roberta; Cassar. Review on solving the inverse problem in eeg source analysis. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, 5(25):1743–0003, 2008. PMID: 18990257.
- [22] Wolfgang Klimesch. Eeg alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Research Reviews*, 29(2–3):169–195, 1999.
- [23] Sheng-Fu Liang, Hsu-Chuan Wang, and Wan-Lin Chang. Combination of eeg complexity and spectral analysis for epilepsy diagnosis and seizure detection. *EURASIP Journal on Advances in Signal Processing*, 2010:62, 2010.
- [24] M. B. Sterman. Basic concepts and clinical findings in the treatment of seizure disorders with eeg operant conditioning. *Clin Electroencephalogr*, 31(1):45–55, 2000. Using Smart Source Parsing Jan.
- [25] Jonathan R Wolpaw, Niels Birbaumer, Dennis J McFarland, Gert Pfurtscheller, and Theresa M Vaughan. Brain-computer interfaces for communication and control. *Clinical Neurophysiology*, 113(6):767 – 791, 2002.
- [26] C. Neuper, G. R. Müller, A. Kübler, N. Birbaumer, and G. Pfurtscheller. Clinical application of an eeg-based brain computer interface: a case study in a patient with severe motor impairment. *Clinical Neurophysiology*, 114(3):399–409, 2003.
- [27] Conrado; Oostenveld Robert; Fries Pascal; Stieglitz Thomas Rubehn, Birthe; Bosman. A mems-based flexible multichannel ecog-electrode array. *Journal of Neural Engineering*, 6(3):036003, 2009.
- [28] A. K. Engel, C. K. Moll, I. Fried, and G. A. Ojemann. Invasive recordings from the human brain: clinical insights and beyond. *Nat Rev Neurosci*, 6(1):35–47, 2005. Using Smart Source Parsing Jan.

- [29] M. S. Jones and D. S. Barth. Spatiotemporal organization of fast (>200 Hz) electrical oscillations in rat vibrissa/barrel cortex. *J Neurophysiol*, 82(3):1599–609, 1999. Using Smart Source Parsing Sep.
- [30] H. Sugano, H. Shimizu, and S. Sunaga. Efficacy of intraoperative electrocorticography for assessing seizure outcomes in intractable epilepsy patients with temporal-lobe-mass lesions. *Seizure*, 16(2):120–7, 2007. Using Smart Source Parsing Mar; Epub 2006 Dec 8.
- [31] S.; Geyer J.R.; Keles G.E.; Ojemann G.A. Berger, M.S.; Ghatan. Seizure outcome in children with hemispheric tumors and associated intractable epilepsy: The role of tumor removal combined with seizure foci resection. *Pediatric Neurosurgery*, 17(4):185–91, 1991-1992. PMID: 1822132.
- [32] R. Scherer, S. P. Zanos, K. J. Miller, R. P. Rao, and J. G. Ojemann. Classification of contralateral and ipsilateral finger movements for electrocorticographic brain-computer interfaces. *Neurosurg Focus*, 27(1):E12, 2009.
- [33] V. G. Kanas, I. Mporas, H. L. Benz, K. N. Sgarbas, A. Bezerianos, and N. E. Crone. Joint spatial-spectral feature space clustering for speech activity detection from ecog signals. *IEEE Trans Biomed Eng*, 61(4):1241–50, 2014. Using Smart Source Parsing Apr; doi: 10.1109/TBME.2014.2298897.
- [34] J.W. Perlmutter, J.S.; Mink. Deep brain stimulation. *Annual Review of Neuroscience*, 29:229–257, 2006. PMID: 16776585.
- [35] Istvan Ulbert, Eric Halgren, Gary Heit, and George Karmos. Multiple microelectrode-recording system for human intracortical applications. *Journal of Neuroscience Methods*, 106(1):69 – 79, 2001.
- [36] Sergey Edward Lyshevski. *Nano- and Microelectromechanical Systems*. CRC Press, 2000. ISBN 0-8493-0916-6.
- [37] Mohamed Gad-el Hak. *The MEMS Handbook*. CRC Press, 2001. ISBN 0-8493-0077-0.
- [38] K. E. Jones, P. K. Campbell, and R. A. Normann. A glass/silicon composite intracortical electrode array. *Ann Biomed Eng*, 20(4):423–37, 1992. Using Smart Source Parsing.

- [39] Peter Norlin, Maria Kindlundh, Aliette Mouroux, Ken Yoshida, and Ulrich G Hofmann. A 32-site neural recording probe fabricated by drier of soi substrates. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 12(4):414, 2002.
- [40] G. Marton, Z. Fekete, R. Fiath, P. Baracska, I. Ulbert, G. Juhasz, G. Battistig, and A. Pongracz. In vivo measurements with robust silicon-based multielectrode arrays with extreme shaft lengths. *Sensors Journal, IEEE*, 13(9):3263–3269, 2013.
- [41] Endrene Borbely. *Szakmai Kémia III. Műanyagok fizikája és kémiája, műanyagok feldolgozása*. KMF Sokszorosító, 1992. ISBN 9637160.
- [42] Tanila H Djupsund K. Cheung KC, Renaud P. Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis. *Biosens Bioelectron*, 22(8):1783–1790, 2007.
- [43] P.; Wolley A.J.; Otto K.J.; Ziaie B. Ochoa, M.; Wei. A hybrid pdms-parylene subdural multi-electrode array. *Biomed Microdevices*, 15(3):437–443, 2013.
- [44] You-Yin Chen, Hsin-Yi Lai, Sheng-Huang Lin, Chien-Wen Cho, Wen-Hung Chao, Chia-Hsin Liao, Siny Tsang, Yi-Fan Chen, and Si-Yue Lin. Design and fabrication of a polyimide-based microelectrode array: Application in neural recording and repeatable electrolytic lesion in rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 182(1):6 – 16, 2009.
- [45] B J Kim, J T W Kuo, S A Hara, C D Lee, L Yu, C A Gutierrez, T Q Hoang, V Pikov, and E Meng. 3d parylene sheath neural probe for chronic recordings. *Journal of Neural Engineering*, 10(4):045002, 2013.
- [46] K.C. Cheung. Implantable microscale neural interfaces. *Biomed Microdevices*, 9(6):923–938, 2007.
- [47] Andre Mercanzini, Karen Cheung, Derek L. Buhl, Marc Boers, Anne Maillard, Philippe Colin, Jean-Charles Bensadoun, Arnaud Bertsch, and Philippe Renaud. Demonstration of cortical recording using novel flexible polymer neural probes. *Sensors and Actuators A: Physical*, 143(1):90 – 96, 2008. Micromechanics Section of Sensors and Actuators (SAMM), based on contributions revised from the Technical Digest of the {IEEE} 20th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2007) {MEMS} 2007 {IEEE} 20th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems.

- [48] Tim Boretius, Jordi Badia, Aran Pascual-Font, Martin Schuettler, Xavier Navarro, Ken Yoshida, and Thomas Stieglitz. A transverse intrafascicular multichannel electrode (time) to interface with the peripheral nerve. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(1):62 – 69, 2010.
- [49] H.r.; Schuettler M.; Meyer J.U. Stieglitz, T.; Beutel. Micromachined, polyimide-based devices for flexible neural interfaces. *Biomedical Microdevices*, 2(4):293–294, 2000.
- [50] G. J. Chader, J. Weiland, and M. S. Humayun. Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis. *Prog Brain Res*, 175:317–32, 2009. Using Smart Source Parsing doi: 10.1016/S0079-6123(09)17522-2.
- [51] David S.; Pivin David P.; Williams Justin C.; Vetter Rio J.; Kipke Daryl R. Rousche, Patrick J.; Pellinen. Flexible polyimide-based intracortical electrode arrays with bioactive capability. *IEEE Trans. Biomed. Eng*, 48(3):361–371, 2001.
- [52] Der-Jang Liaw, Kung-Li Wang, Ying-Chi Huang, Kueir-Rarn Lee, Juin-Yih Lai, and Chang-Sik Ha. Advanced polyimide materials: Syntheses, physical properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 37(7):907 – 974, 2012. Topical Issue on Polymer Synthesis.
- [53] Sami Myllymaa, Katja Myllymaa, Hannu Korhonen, Mikko J. Lammi, Virpi Tiitu, and Reijo Lappalainen. Surface characterization and in vitro biocompatibility assessment of photosensitive polyimide films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(2):505 – 511, 2010.
- [54] B.; Zhu J.; Ding G.; Zhao X.; Yang C.; Chen D. Liu, J.; Cai. Process research of high aspect ratio microstructure using su-8 resist. *Microsystem Technologies*, 10(4):265–268, 2004.
- [55] T.M. Fortin, J. B.; Lu. Mass spectrometry study during the vapor deposition of poly-para-xylylene thin films. *Journal of Vacuum Science and Technology*, 18(5):2459, 2000.
- [56] Cristian I.; Putyera Karol Schwarz, James A.; Contescu. *Dekker encyclopedia of nanoscience and nanotechnology, Volume 1*. CRC Press, 2004. ISBN 978-0-8247-5047-3.

- [57] I.; Fekete Z.; Ulbert I.; Pongracz A. Marton, G.; Bakos. Durability of high surface area platinum deposits on microelectrode arrays for acute neural recordings. *J Mater Sci Mater Med*, 25(3):931–940, 2014.
- [58] Laszlo Grand, Anita Pongracz, Eva Vazsonyi, Gergely Marton, Dorottya Guban, Richard Fiath, Balint Peter Kerekes, Gyorgy Karmos, Istvan Ulbert, and Gabor Battistig. A novel multisite silicon probe for high quality laminar neural recordings. *Sensors and Actuators A: Physical*, 166(1):14 – 21, 2011.
- [59] C. Paxinos, G.; Watson. *The rat brain in stereotaxic coordinates: compact sixth edition*. Academic Press, 2009.
- [60] J. O’Keefe and J. Dostrovsky. The hippocampus as a spatial map. preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1):171 – 175, 1971.
- [61] Torkel Hafting; Marianne Fyhn; Sturla Molden; May-Britt Moser; Edvard I. Moser. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, (436):801–806, August 11 2005.
- [62] Brian Young Michael Bunsey Howard Eichenbaum, Geoffrey Schoenbaum. Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:13500–13507, November 1996.
- [63] A.; Amzica F. Steriade, M.; Nunez. A novel slow (<1 hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci*, 13(8):3252–3265, 1993.
- [64] P.; Bower J.M. Fontanini, A.; Spano. Ketamine-xylazine-induced slow (<1.5 hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration. *J Neurosci*, 23(22):7993–8001, 2003.
- [65] S Chauvette, S Crochet, M Volgushev, and I Timofeev. Properties of slow oscillation during slow-wave sleep and anesthesia in cats. *The Journal of Neuroscience*, 31(5):14998–5008, 2011-10-19 00:00:00.0.
- [66] S.W. Crunelli, V.; Hughes. The slow (<1 hz) rhythm of non-rem sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nat Neurosci*, 12(1):9–17, 2010.