

36. OTDK Biológia Szekció



**Moduláris implantátumrendszer fejlesztése és
preklinikai validációja multimodális agyaktivitás
vizsgálatokon keresztül**

Csikós Klaudia

Info-bionika mérnöki MSc

2021/22-es évfolyam

Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Kar
Természettudományi Kutatóközpont, Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai
Intézet

Témavezető

Dr. Hillier Dániel

TARTALOMJEGYZÉK

KIVONAT.....	3
BEVEZETÉS.....	4
1. MULTIMODÁLIS AGYAKTIVITÁSMÉRÉS - TECHNOLÓGIAI ÉS TUDOMÁNYOS ÁTTEKINTÉS	6
1.1. Funkcionális képkalkotó eljárások	6
1.2. Optikai képkalkotás	10
1.3. Agyi aktivitás modulációja fénygerjesztéssel	14
1.4. Multimodális aktivitásmérés és moduláció	15
1.4.1. Multimodális agyaktivitás mérés előnyei	17
1.4.2. Multimodális aktivitásmérési megközelítések nyitott kérdései	18
2. TERVEZÉS	19
2.1. Multimodális implantátum	19
2.1.1. Tudományos motiváció	19
2.1.2. Célkitűzés	19
2.1.3. Tervezési szempontok	19
2.2. Agyatlasz	22
3. MEGVALÓSÍTÁS	23
3.1. Koponya rekonstrukció	23
3.2. Krónikus interfész	23
3.2.1. Optikai szál hozzáférés	25
3.3. Modulok	25
3.3.1. Motorizált fUS	25
3.3.2. Optikai képkalkotás	27
3.4. Belső elem	27
3.5. Gyártás	28
4. EREDMÉNYEK	28
4.1. Fejlesztés	28
4.2. Validálás	29
4.2.1. fUS mérés	29
4.3. Optikai képkalkotás	33
4.4. Mélyagyi optikai mérés és stimuláció száloptika segítségével	33
4.5. Az eredmények összesített kiértékelése	34
5. ÖSSZEFOGLALÓ	35
6. JÖVŐBELI TERVEK	36
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37
IRODALOMJEGYZÉK	38

Kivonat

Hogyan épülnek fel a teljes agy aktivitásmintázatai az egyes idegsejtek belső és külső környezeti hatások által kiváltott válaszaiból? E kérdés megválaszolhatóságának kulcsa, hogy képesek legyünk hozzáférni az idegrendszer aktivitásához. Az idegtudomány ma elérhető eszköztára számos, egymást kiegészítő lehetőséget kínál az idegi hálózatok aktivációs mintázatainak a tanulmányozására és modulálására. Az egyes technikák tér- és időbeli feloldóképessége határozza meg, hogy mely technológia milyen szerveződési szinthez ad hozzáférést.

Az egyes idegsejtek és a teljes agy szerveződési szintjeinek összekapcsolása egyszerű organizmusok szintjén (például *C. elegans*, zebrahál lárva) fénymikroszkópiai módszerekkel megvalósítható. Emlősökben, különösen az ember, illetve a preklinikai modellfajok (macska, kutya, majom) esetében kevés hatékony módszer létezik, ami közelebb vihet bennünket az idegtudomány ezen alapkérdésének megválaszolásához. Emlősökben az egész agy területei között fennálló funkcionális kapcsolatok vizsgálatára jelenleg a funkcionális mágneses rezonancia képalkotás (fMRI) a legelterjedtebb eljárás. Az egyes neuronok szintjén elektródákkal az aktivitást nemcsak mérni tudjuk, de befolyásolni is. Azonban a nagy preklinikai fajokban eddig alig sikerült olyan fMRI-kompatibilis módszert alkalmazni, mellyel sejtszintű feloldással lehetne adatot gyűjteni úgy, hogy az agy egészére érvényes megállapításokat is tehessünk.

Munkám során olyan univerzális, moduláris mérési módszert fejlesztettem, mely lehetővé teszi az agyfolyamatok vizsgálatát több térbeli és időbeli skálán keresztül. Egy új képalkotási eljárást, a funkcionális ultrahang képalkotást használtam arra, hogy összekapcsolhatóvá tegyem az agy strukturális és funkcionális leírására alkalmas mérési módszereket. Kifejlesztettem egy moduláris implantátum tervezési módszert és annak működőképességét validáltam altatott és éber multimodális aktivitásmérési kísérletekben. A konstrukció lehetővé tette, hogy mezoskálás méréseket végezhessünk szabadon viselkedő állatokban az eddig bevett fMRI módszerhez képest egy nagyságrenddel jobb téridőbeli felbontással. Munkám eredménye olyan új kísérletek előtt nyitja meg az utat, melyek új alapokra helyezhetik nagy preklinikai fajok agyi folyamatainak megértését.

Bevezetés

A modern tudományos és technológiai fejlődés egyik fontos hajtóereje a természetben lejátszódó folyamatok megértésére és befolyásolására irányuló alapvető emberi szükséglet. E szükségletünk a formális gondolkodás, modell alkotás és kísérleti bizonyítások módszereivel hipotézisek felállításán és cáfolatán keresztül a körülöttünk lévő világ működését egyre mélyebben és pontosabban tárja elénk és alakítja. Ezen módszereket a biológiai rendszerek működésének megértésére az élettudomány alkalmazza, azonban az agy működésének megfigyelésére alkalmas eszközök tér- és időbeli feloldóképessége erősen korlátozza az élővilág ezen bonyolult szervének megértését. A megismerést szolgáló mérési eszközök technológiai korlátai miatt több mint egy évszázadon keresztül az idegrendszer sejt szintű strukturális és funkcionális egysége, a neuron volt a vizsgálatok tárgya, mivel a rendelkezésre álló anatómiai és fiziológiai módszerek a sejtes szinthez adtak hozzáférést, neuronokat tudtak egységként vizsgálni (Golgi festés, mikroelektrodás mérések) [2].

Az egyszerre egy neuron működésének vizsgálatán való túllépés szélesebb körben elérhető, egyszerű technológiai megoldása volt a sejtpárokból történő mérés. Ilyen kísérletek voltak az első bizonyítékai annak, hogy az egyes sejtek közti alakbeli (morfológiai) hasonlóságok funkcionális hasonlóságot is jelenthetnek. Hasonló módon, különböző agyterületeken működő neuron párok mérése jelentette a korai morfológiai módszerek után az első funkcionális módszertani lehetőséget annak feltárására, hogy milyen szabályok alapján kapcsolódnak egymáshoz az agy területei [2]. De mennyit érthetünk meg egy több millió, ember esetében több milliárd neuronból álló rendszer működéséről, ha egyszerre csak egy, esetleg kettő alkotóelem mérése lehetséges? E kérdés, azaz egyes neuronok és a teljes idegrendszer összefüggésének vizsgálata a közelmúltig egyedül a modellorganizmus viselkedése által volt vizsgálható. Az ilyen egyetlen neuron vs. teljes idegrendszer kísérleteknek leginkább alacsonyrendű organizmusokban (*C. Elegans*, *Drosophila*) és reflex-szerű neurális áramkörök (optokinetikus reflex) megértésében volt és maradt szerepe. Az egysejtes elektrofiziológiás mérési módszerekkel ellentétes technológiai pólust a teljes agy működését mérni képes funkcionális mágneses rezonanciás képalkotás (fMRI) jelenti. A módszer első sikeres bemutatása több mint harminc éve történt [1] és azóta az fMRI a teljes agy funkcionális vizsgálatának sztenderd mérőeszközzé vált emberben és makákó modellben. Azonban az fMRI mind téridőbeli felbontásban, mind a kísérletes körülményekben fellépő erős megkötések miatt – a mért egyed mozdulatlan állapotban kell maradjon hosszú ideig, illetve az erős mágneses tér a módszer más technológiákkal való kombinálhatóságát korlátozza – a teljes agy és egyes sejtek működésének összekapcsolása rendkívül nehéz maradt mind a mai napig. A két pólus – egysejt, illetve egész agy – közötti távolság áthidalására olyan megoldásra van

szükség, mely

1. képes a sejt-szintű és teljes agyi aktivitásmérések hatékony és minél közvetlenebb integrálására.
2. lehetővé teszi a modern genetikai jelölések által elérhető sejt-típus specifikus aktivitás mérést. Ez gyakorlatban fénymikroszkópiai módszerek integrálását teszi szükségessé, melyeken keresztül optikai módszerrel tudjuk a sejtek aktivitását mérni (pl. GCaMP kalcium szenzorokon keresztül) vagy modulálni (optogenetikai aktuátor proteinek, pl. Channelrhodopszin).
3. minél kevésbé korlátozza az egyed természetes viselkedését, ami a jelenleg elérhető fMRI technológia egyik alapvető korlátja.

Munkámban egy olyan új módszer dolgoztam ki és validáltam éber preklinikai fajon végzett kísérletben, mely megnyitja a lehetőséget olyan kísérletek elvégzésére, melyek a fenti három szempont mindegyikét teljesíti s így képes a különböző modalitásokból származó előnyöket kombinálni, ezáltal lefedi az idegi aktivitás eltérő léptékű folyamatait mind térben és időben.

1. Multimodális agyaktivitásmérés - technológiai és tudományos áttekintés

A bevezetésben bemutatott agyaktivitás mérésre használt két technológiai pólus – elektróda alapú mérések, illetve fMRI – között alapvető különbség, hogy elektródás mérések invazívak, a szövet topológiai, anatómiai architektúrája ronszolódik; fMRI ellenben neminvazív, de megközelíteni sem tudja az egysejt feloldást. Az elektródás mérések esetén közvetlenül nem kapcsolható össze a mért sejt aktivitásmintázata és a sejt morfológiája. Természetesen a kutatói kreativitás képes szinte minden problémára megoldást találni, jelen esetben azzal, hogy amikor mérés során a mérőpipettával betörünk a sejtbe (patch clamp technika), a mért sejtet festékkel feltölthetjük. Ilyen feltöltött sejtek agyi elhelyezkedését, illetve a rajta mért aktivitásmintázatokat fénymikroszkópiás szövettani felvételek által illeszthetjük a tágabb agyi kontextusba. Ilyen kísérletek elvégezhetőek, de annyira munkaigényesek, illetve egyetlen agyterületen belüli hálózatok feltérképezésére is már olyan sok egyed felhasználását igénylik, hogy már egérmodellben is nehéz egyes neuronokat az egész agy összefüggésébe illeszteni [2]. Nagyobb preklinikai modellekben az ilyen kísérletek csak úgy lehetnek megvalósíthatóak, hogy minden korábbinál nagyobb erőforrásokat fordítunk a kísérletekre és a folyamatok automatizálására [3].

1.1. Funkcionális képalkotó eljárások

Minden képalkotó módszer az alkalmazott fizikai elvek peremfeltételein belül képes a szövettel való kölcsönhatásra. A mérés fizikai elvi korlátai mellett a mérés beállításai (pl. a képalkotó objektív nagyítása) illetve az adatgyűjtés elektronikai és szoftveres képességei meghatározzák, hogy milyen térbeli és időbeli felbontás mellett tudunk egy adott fiziológiai folyamatot vagy anatómiai struktúrát mérni.

Az alábbi fejezetekben az idegi folyamatok mérésére használt módszereket veszem sorra, mindegyiknél kitérve arra, hogy működési elvük alapján milyen léptékben, tér-időbeli felbontásban képesek a neurális aktivitás mérésére, milyen specifikus fiziológiai folyamatokhoz, illetve szöveti struktúrákhoz férnek hozzá és milyen előnyök és limitációk jellemzik alkalmazhatóságukat.

Funkcionális mágneses rezonancia képalkotás

A funkcionális mágneses rezonancia képalkotás (fMRI) az egyik legelterjedtebb neminvazív képalkotó eljárás az orvosi diagnosztikában és az idegtudománnyal foglalkozó kutatásokban. Az fMRI abban különbözik a statikus, anatómiai MRI-től, hogy az idegi aktivitással összefüggésben lévő hemodinamikus választ méri a teljes agyra kiterjedően. A hemodinamikus változások eredhetnek valamilyen feladat által kiváltott kognitív állapotváltozásból, vagy lehetnek a nyugalmi állapotban zajló belső fiziológiai folyamatok következményei.

Az fMRI jel fiziológiai alapja, hogy az agyi véráramlás és véroxigénszint változásai szoros összefüggésben állnak az idegi aktivitással. Amikor az idegsejtek aktívak, oxigént használnak fel, melyet a vörösvértestben lévő hemoglobin szállít el a helyi kapillárisokon keresztül. A megnövekedett oxigénigényt a véráramlás intenzitásának növekedése szolgálja ki, amelynek célja a felborult oxihemoglobin és dezoxihemoglobin koncentráció helyreállítása. Ez az úgynevezett hemodinamikus válasz a neuronaktivitás felfutása után hozzávetőlegesen 1-3 másodperc késéssel jelentkezik, majd 5-6 másodperc után éri el a tetőfokot, végül visszaesik az alapszintre [4].

A megnövekedett idegi aktivitás miatt megnövekedett anyagcsereigényt a fokozott lokális agyi véráramlás (CBF – Cerebral Blood Flow) és a vér oxigenizációs koncentrációjának (BOLD - Blood Oxygen Level Dependent) a változása szolgálja ki és e két fiziológiai paraméter mérhető fMRI-vel, az idegi aktivitás indirekt mértékeiként.

A BOLD válasz eredete a dezoxihemoglobin paramágneses tulajdonságából fakad. A megnövekedett dezoxihemoglobin koncentráció mágneses szuszceptibilitás növekedést okoz, így befolyásolja a mágneses mezőt és a spin-spin relaxációs időt (T_2/T_2^*)¹ [4]. A T_2^* -re érzékeny MRI-szekvenciák, mint például az echo-planáris képalkotás (EPI), az egyik legelterjedtebb szekvenciatípus gyors dinamikájú hemodinamikus válaszok tanulmányozására, amely hozzávetőlegesen 1-3 mm térbeli és 1-3 s időbeli felbontással képes az aktivitás detektálására [5]. Az elmúlt évek tanulmányai bizonyították, hogy a mágneses térerősség növelésével és magas jel-zaj aránynál az fMRI térbeli felbontása tovább növelhető [5]. Jung és munkatársai például GRE-EPI (Gradient Recalled Echo - Echo Planar Imaging) szekvenciát alkalmazták az egér kortikokortikális és kortiko-thalamikus projekcióinak a tanulmányozására ultranagy mágneses térben (15,2 Tesla). Az eredményeiket 250 ms időbeli és $156 \times 156 \times 500 \mu\text{m}^3$ térbeli felbontással tudták kiértékelni, ami alapján előrevetítették, hogy az ultranagy felbontású fMRI használható az agy rendszerszintű hálózati elemzéséhez [6].

Fontos megjegyezni, hogy az agyi dinamika rendszerszintű megértésénél a BOLD fMRI eredmények értelmezése és felhasználása során némi óvatosságra van szükség. A rágcsálókon végzett méréseket általában altatott állapotban végzik, hogy minimalizálják a fejmozgást a szkennelés során. Az altatószer megválasztása jelentősen befolyásolhatja a mérési eredményeket, mivel az egyes anesztetikumok hatást gyakorolnak a neurális aktivitásra, az agyi metabolizmusra, a neurovaszkuláris csatolásra vagy a funkcionális konnektivitásra [7].

¹ A T_2 , valamint a T_2^* is a transzverzális relaxáció idő leírására szolgál. A különbség, hogy a T_2^* magába foglalja a makroszkópikus és mikroszkópikus mágneses tér inhomogenitásából eredő további változásokat, így rövidebb lecsengésű, mint a T_2 jel. A kettő jel statisztikai különbségéből meghatározható a BOLD válasz.

Az anesztetikumok zavaró hatásainak kiküszöbölésére fMRI protokollokat dolgoztak ki az éber állatokból történő képalkotás céljából [8]. Az eredmények azt mutatják, hogy az éber alanyokkal végzett preklinikai fMRI jelentős előrelépés a neurális aktivitás megbízhatóbb térképezésére [7], azonban a módszernek megvannak a maga korlátai. A stressz és a mozgásartifaktumok minimalizálása érdekében az állatok általában egy szoktatási tréningen vesznek részt, amely során imitálják a mérési körülményeket. Mivel azonban a szoktatási protokollok akár napokig, bizonyos esetekben hetekig is eltarthatnak, a megközelítés egyértelműen munka- és időigényesebb, mint az altatásban végzett protokollok. Továbbá a spontán mozgás és a stresszreakciók valószínűleg az akklimatizáció ellenére is jelen lesznek a képalkotás eredményeiben [9].

Funkcionális ultrahang képalkotás

A funkcionális ultrahang (functional ultrasound, fUS) ígéretes alternatívának bizonyul a mezoskálájú technikák között, amely nagy térbeli és időbeli felbontásának, valamint más eszközökkel való kombinálhatóságának köszönhetően új utakat nyitott a funkcionális agyi képalkotásban.

A fUS képalkotás a vér áramlásának változásai alapján képes közvetett módon az idegi aktivitás térbeli és időbeli dinamikájára következtetni. A módszer fiziológiai alapja a neurovaszkuláris csatolásnak nevezett mechanizmus, amely az aktivált neuronokat körülvevő erekben képes a lokális agyi véráramlás szabályozására, így kielégítve az aktív neuronok megnövekedett oxigén és tápanyag igényét [10].

A technika működésének fizikai alapjai megegyeznek a hagyományos ultrahang képalkotásban ismertekkel, amely során egy piezoelektromos transzducer ultrahangot bocsát ki a szövetbe, és a terjedés közben a szöveti struktúrák által visszavert hullámokat (echo) a transzducer visszaalakítja elektromos jelekké [11]. Az ultrahangos képalkotás funkcionális mérésekre alkalmas változata a Doppler-ultrahang. A Doppler-ultrahang a Doppler effektus alapján határozza meg a vér áramlásának irányát és áramlási sebességét [12]. Az agy idegi aktivitásával korrelált hemodinamikai válaszok feltérképezéséhez a hagyományos Doppler-ultrahang azonban nem elég érzékeny [13].

Az elmúlt években kifejlesztettek egy módszert, amely síkhullámú ultrahang kibocsátás által képes nagy képkocka-sebesség (10000 fps) mellett nagy felbontású neurovaszkuláris térképeket alkotni. Az ultragyors ultrahang képalkotásról bizonyították, hogy azzal lehetséges a nagy térbeli és időbeli felbontású, nagy érzékenységgű Doppler képalkotás [14].

A funkcionális ultrahang képalkotás azáltal valósul meg, hogy Doppler-ultrahang méréssel felvesszük a neurális aktivitás által indukált változásokat az agy vér térfogatában (CBV- cerebral blood volume) [15]. A CBV változásainak közvetett mérését más fizikai elven alapuló képalkotó

technikák is használják, úgymint az „intrinsic” optikai képalkotás (lásd lejjebb) vagy a CBV-súlyozott fMRI. Ezen képalkotó módszerek téridőbeli felbontását az idegi aktivitás és a vérellátottság változását összekapcsoló függvény, a neurovaszkuláris csatolás függvényének téridőbeli állandói meghatározzák.

A CBV válasz mérésével elérhető térbeli felbontást a kapillárisok átmérője és sűrűsége, illetve a mérésre alkalmazott fizikai elv limitálja. A fUS térbeli felbontása a kibocsátott ultrahang frekvenciájától függ, 15 MHz tartományban működő transzducer esetén kb 100 μm . Az eszköz időbeli felbontása a képmélységtől függően 0.1-0.5s között változik, mivel mélyebb penetrációnál a hanghullámnak hosszabb utat kell megtennie, ami csökkenti az adott idő alatt alkotható képek számát [13]. Az ultrahanghullámok könnyen behatolnak a lágy szövetekbe, így a kéreg alatti területek is elérhetőek a használatával. Az elérhető képmélység 30 mm-ig is terjedhet, amellyel akár az egész agyat átfogó térképet is készíthetünk a rágsálók és kisebb emlősök idegi aktivitásáról [16]. A fUS tehát egyszerre alkalmazható kisebb kérgi struktúrák, vagy akár funkcionális egységek aktivitásának a mérésére, valamint kiterjedt hálózatok aktivitásának térbeli és időbeli dinamikájának rögzítésére [13].

Az fUS képalkotást a transzlációs idegtudományban először 2011-ben alkalmazták, amikor Macé és munkatársai nagy tér-időbeli részletességgel vizsgálták a hordókéreg aktiválódását az altatott patkányokban a bajuszsálak ingerlését követően [17]. Macé egy későbbi tanulmányában az egér optokinetikus reflexe által aktiválódó agyi területeket vizsgálta éber állapotban. A kísérletek során különböző genetikai, mechanikai és farmakológiai perturbációkkal befolyásolták az optokinetikai reflex működését, amelynek célja az volt, hogy feltárják a reflexhez kapcsolódó vizuomotoros integrációban részt vevő agyi régiókat, majd funkcionális egységekbe csoportosítsák őket. Ez a tanulmány szemléletes példát ad arra, hogy a funkcionális ultrahang képalkotás kiválóan alkalmazható az egyes neuron típusok aktivitásmintázatainak és az állat viselkedésének összefüggéseinek, valamint az egyes neurontípusok és az általuk aktivált agyi területek szerveződési kérdéseinek vizsgálatára. A fUS téridőbeli felbontása, alkalmazásának egyszerűsége új területet nyitott az agy szerveződési szintjeinek rész-egész összefüggéseinek vizsgálatában [18].

A fUS-t eddig éber, fejrögzített állatokon alkalmazták, ami néhány viselkedésforma és a dinamikus idegi aktivitás egyidejű vizsgálatát közvetlenül lehetővé tette. Ezzel a tulajdonságával a fUS figyelemre méltó előnyre tett szert az fMRI-vel szemben, ahol az éber állatok mérése valószínűleg a belátható jövőben továbbra is igen nehéz marad [19].

A fUS mindezen előnyei mellett fontos megjegyezni, hogy mivel a koponya jelentősen leárnyékolja az ultrahang jelet, ezért a magas jel-zaj viszonyú fUS képalkotás érdekében a jelenlegi technológiai megoldások mellett ablakot kell nyitni az állat koponyáján [20]. Egyes

tanulmányok foglalkoztak a fUS transzkraniális alkalmazásával [21], azonban a még a vékonyított koponyacsont technika alkalmazása esetén is lényegesen rosszabb felbontást kapunk, mintha kraniotómiával a koponya egy részét műtéti úton eltávolítjuk. Várhatóan pár éven belül elérhetővé válnak a koponyacsont alá ültethető transzducerek, melyek a fUS invazivitását jelentősen csökkenthetik.

A fUS egy másik korlátja, hogy a legjobb jel-zaj viszonyt biztosító lineáris transzducerek az agynak egyszerre csak egy kétdimenziós metszetét képezik le. A teljes agyi térfogat pásztázásához szükség van a transzducer motorikus mozgatásához [18], vagy egy volumetrikus funkcionális ultrahang transzducerre, azonban az utóbbi felbontása kisebb mint a lineáris transzducereké ($\sim 300 \mu\text{m}^3$) [22].

1.2. Optikai képalkotás

A fénymikroszkópiát már évszázadok óta használják az élővilág megismerésére. A bevezetésben említett egysejt vs teljes agy térbeli skálák áthidalását a fénymikroszkópiai eljárások elméletben rendkívül egyszerűen, az optikai nagyítás változtatásán keresztül képesek megvalósítani. Gyakorlatban azonban a fénymikroszkópiai eljárások alkalmazhatóságát a fény szövetbe hatolási képessége korlátozza, a fény legjobb módszerek esetében is kb. a kéreg felső 1 mm-éig képes hozzáférni a neuronok morfológiájához vagy működésükhöz. A következőkben azon fény-alapú technológiákat mutatom be, melyek szerepet kaphatnak az általam fejlesztett multimodális interfészen keresztül az agy folyamatainak egysejttől a több cm skáláig terjedő integrációjában.

Széleslátószögű optikai képalkotás

A széleslátószögű képalkotás (wide-field imaging) olyan optikai képalkotási technikákat foglal magába, amely során a vizsgálandó minta az objektív által meghatározott teljes látótérben megvilágításra kerül. Mivel a fény hullámhossztól függően roncsolólag hathat a szövet egyes molekuláira, a széleslátószögű módszerek aktivitás mérésre az utóbbi években kezdtek különösen alkalmassá válni, mivel a jeldetektálásra használt kameratechnológia olyan fejlődésen ment keresztül, aminek köszönhetően nagyon érzékeny detektorok a korábbiaknál jóval kisebb fényintenzitást is jó jel-zaj viszonytal képesek rögzíteni [23]. Neurális aktivitásmérésre két fő széleslátószögű képalkotási módszert alkalmaznak, az „intrinsic” optikai képalkotást és a fluoreszcens képalkotást.

„Intrinsic” optikai képalkotás

Az „intrinsic” optikai (IOS - Intrinsic Optical Signal) képalkotás az fMRI és fUS bemutatásnál már említett metabolikus változások fénymikroszkópiával történő mérése alapján következtet a neurális aktivitás változásaira. Az elnevezésben az „intrinsic” jelző a technika fontos előnyére

utal: az aktivitásméréshez nem szükséges semmiféle speciális festési eljárás alkalmazása, az „intrinsic” jel forrása az idegi aktivitással összefüggő korai hemodinamikus változások, az oxidezoxi-hemoglobin koncentrációjának lokális módosulása, valamint az agyi véráramlás helyi térfogatának a növekedése, amelynek hatására az aktív idegsejtek körüli agyszövet fényabszorpciós spektruma eltolódik [24]. A módosult abszorbancia miatt az aktív területek által visszavert fény intenzitása megváltozik, ami egy érzékeny kamerával detektálható.

In vivo körülmények között a megvilágítás hullámhosszának megválasztása határozza meg, hogy az idegsejt aktivitás által kiváltott metabolikus változások milyen molekuláris komponensének változását detektáljuk „intrinsic” jelként. Például 400 és 630 nm közötti hullámhossz alkalmazásánál a domináns jelforrást a hemoglobin oxigén-telítettségi szintjének alakulása, valamint a vértérfogatban történő változás adja. Míg 630 nm feletti hullámhossznál azon aktiválást kísérő fényszórási változások dominálják a jelet, amelyek eredhetnek az ionmozgásokból, az extracelluláris tér térfogatának változásából, vagy a neurotranszmitterek felszabadulásából [25].

Az IOS képalkotást in vivo leggyakrabban a szenzoros agykérgi aktivitás térképezésére használják. Az eljárás egyik legnagyobb előnye, hogy könnyedén alkalmazható különböző fajok között [26]. Viszont a nagy térbeli felbontású funkcionális aktivitástérképek elkészítéséhez többnyire szükség van a kéreg közvetlen expozíciójára, így az eljárás kraniotómiát és nagy preklinikai fajoknál durotómiát is igényel [24]. A belső jeleken alapuló optikai képalkotás technológiai kihívása, hogy az agyszövet fényvisszaverő képességének változásai igen csekélyek, 0.1-1% között mozognak [27]. Ebből adódóan, ha a biológiai „zaj” (például anesztézia által okozott oszcillációk, légzési artefakt) nagyobb, mint a tényleges neuronális aktivitásból származó jelkomponens, akkor téves következtetésre juthatunk.

Fluoreszcens képalkotás

Az „intrinsic” képalkotással ellentétben a széles látószögű fluoreszcens mikroszkópia alapfeltétele, hogy a szövet szintetikus fluoreszcens festékekkel, vagy genetikailag kódolt fluoreszcens proteinnel legyen megjelölve. A fluoreszcens képalkotás talán a legsokoldalúbb technika az idegrendszer folyamatainak mérésére. A múlt század vége óta szintetikus fluoreszcens kalciumkötő festékek, illetve a sejtmembránfeszültség változásaival arányosan fluoreszcens feszültségfüggő (VSD – voltage sensitive dye) festékeket alkalmaztak az idegsejthálózatok aktivitásának mérésére. Mivel a fluoreszcensen kibocsátott fotonok a szövetben szóródnak, egysejt feloldás in vivo állatkísérletekben széleslátószögű mikroszkópiával nehezen megvalósítható. Ezzel a technikával az agykéreg felszínhez közeli aktivitásának (a sejtben gazdag kortikális 2/3 réteg) funkcionális térképezése lehetséges.

A VSD alkalmazása esetén az agyszövetet megfestik egy speciális festékkel, melynek molekulái az idegsejtmembrán külső felületéhez kötődnek és a membránpotenciál változásaival arányosan bocsátanak ki fluoreszcens jelet, mely milliszekundumos időbeli és kísérleti körülményektől függően szubmilliméteres térbeli pontossággal detektálható [28]. A VSD festés egyik hátránya, hogy leginkább akut kísérleti körülmények között alkalmazható, mivel a festést minden kísérlet előtt meg kellene ismételni, amiből adódóan a festés minőségétől függően csökkenhet a mérés megbízhatósága [29].

A genetikailag kódolt kalciumindikátorok megjelenése alapjaiban forgatta fel a fluoreszcens képalkotás területét. A terület egy évtized alatt egyedülálló fejlődésen ment keresztül. Ma sztenderd része az idegtudományi munkáknak, hogy a fluoreszcens jelet adó proteint kódoló DNS szekvenciát genetikai célzással az agy meghatározott sejttypusaiban, rétegeiben, régióiban vagy akár az egész agyszövetben irányítottan fejezik ki, a tudományos kérdés megválaszolásához szükséges stratégia mentén [30]. A specifikus genetikai célzást elérhetjük transzgenikus állatok tenyésztésével, vagy pedig egy olyan víruskonstrukció bejuttatásával a célszövetbe, amely a fehérje expresszáálásához szükséges genetikai információt hordozza [29]. Az AAV vírusok különösen alkalmasak erre a feladatra, hiszen a megfelelő kapszid és promóter megválasztásával akár sejttypus specifikusan is kifejezhetjük a kalciumérzékeny fehérjét, ezáltal a képalkotás során felvett jel biológiai forrását sejt-typus vagy sejt-kompartment szintre limitálhatjuk. Genetikailag célzott sejt-typus specifikus jelöléssel a neurális áramkörök komponenseinek jeleit egyenként rögzíthetjük. Bár a szintetikus festék alapú fluoreszcencia és az „intrinsic” képalkotás ma is hasznos technikák maradnak, a genetikai célozhatóság a fluoreszcens képalkotás svájci bicskájaként minden korábbinál gazdagabb lehetőséget ad a neuronhálózatok megértésére [31]. Az optikai képalkotáshoz ma leggyakrabban használt fluoreszcens fehérjecsalád az ultraérzékeny GCaMP, amely lehetővé teszi a neurális aktivitást kísérő Ca^{2+} koncentrációnövekedésnek a kimutatását. Érdekes lehetőség, ha a virális vektor hígításával ritka jelölési sűrűséget valósítunk meg a kéreg felszínhez közeli rétegeiben, akkor akár széleslátószögű módszerrel is lehetővé válhat a sejtszintű aktivitás mérés [31].

A széleslátószögű fluoreszcens képalkotásnak számos előnye mellett szembe kell nézni pár alapvető korláttal. A módszer térbeli feloldóképességét korlátozza, hogy a jel a fókuszsíkon kívülről is érkezhet, ezért általában nem képes az egyes neuronok jelének feloldására. Ha a szövetben sok sejtet jelölünk, a fókuszsíkon kívül gerjesztett fluoreszcens jel sok idegrendszeri folyamat jelét olvasztja egybe, ezzel a zajszintre lenyomva a kisebb sejtpopulációk karakterisztikus jeleit. Ez a módszer a kéreg mélyebb régióinak elérésére nem alkalmas, alkalmazott hullámhossztól függően a kéreg felszíni rétegeit érhetjük csak el (~400-500 μm). Szintén a módszer alkalmazását nehezítheti, ha a fluorofórok folyamatos gerjesztése miatt

phototoxicitás lép fel, vagy ha a fluorofór molekulák a fény hatására denaturálódnak és funkciójukat veszítik („*photobleaching*”) [32].

Kétfoton mikroszkópia

A kétfoton mikroszkópia nemlineáris gerjesztési technológiát alkalmaz a szövet fluoreszcens molekuláinak gerjesztésére. A korábban említett módszerek lineáris, azaz egyfotonos gerjesztést alkalmaznak, amelynek erős szóródása a biológiai szövetben jelentősen csökkentheti a felbontást, valamint a mélyebben fekvő kérgi rétegek célzása is komoly korlátokba ütközik [33]. A nemlineáris gerjesztés túllépi ezeket a korlátokat azáltal, hogy a fluorofór molekulában egyszerre (0,5 fs-on belül) két foton abszorbalódik, amelyek együttesen elegendő energiát adnak a molekula gerjesztéséhez. Mikor a gerjesztett molekula alapállapotba esik vissza, fény emittálódik. Mivel két kvantumban érkezik a fluoreszcens molekulát gerjesztő energia, így lehetővé válik a nagyobb hullámhosszúságú fény (700-1000 nm) használata, amely lényegesen jobban hatol át a szöveten, mint a kisebb hullámhosszúságú, de nagyobb energiájú hullámok [25]. Mivel kétfoton gerjesztés esetében a fluoreszcens emisszió valószínűsége négyzetesen függ a gerjesztés intenzitásától, a fókuszponttól távolodva kis távolságon belül már nincs akkora energiasűrűség, hogy fluoreszcens emisszió lépjen fel. A kétfoton mikroszkópia legnagyobb előnye, hogy a fókuszponton kívülről nem érkezik fluoreszcens jel a detektorokba [35].

A biológiai alkalmazásokban legszélesebb körben alkalmazott módszer a kétfoton fluoreszcens lézer-pásztázó mikroszkópia. A kétdimenziós kép egy úgynevezett pásztázó eljárással készül, amely során a gerjesztési pont gyorsan mozgó tükrök segítségével ugrál a letapogatni kívánt felületen, amelyből egy számítógépes szoftver rekonstruálja a képet.

Amennyiben olyan fluoreszcens festéket alkalmaznak a mérés során, amelynek emissziója a sejtben jelenlévő ion vagy fiziológiai hatásra megváltozik – például Ca^{2+} , membránfeszültség módosulása –, akkor a fiziológiai folyamatok valós időben lekövethetők. Ilyen módon a sejtszintű aktivitás GCaMP6f festéssel akár már $\sim 0,5 \mu\text{m}$ térbeli és $\sim 10 \text{ ms}$ időbeli felbontással vizsgálható [34].

A kétfoton pásztázó mikroszkópia jelentős előnye, hogy képes közvetlenül a sejtek normális viselkedését megjeleníteni természetes környezetükben, így remek alapot szolgáltat a stimuláció által kiváltott aktivitás, valamint a viselkedés közötti kapcsolatok sejt szintű feltárására.

A módszer hátránya, hogy a hagyományos kétfotonos mikroszkópok tervezéséből adódóan a pásztázási terület lekorlátozódik, pár száz mikron kiterjedésű terület vizsgálható csak egyszerre. Az elmúlt években több csoport is egyedi képalkotó optikák és lézeres letapogató fejek fejlesztésébe kezdett, amelynek segítségével kiterjeszthetővé vált az effektív látótér. Sofroniew

és munkatársainak a fejlesztése lehetővé tette, hogy kétfotonos gerjesztéssel GCAMP jeleket rögzítsenek egy 5 mm átmérőjű és 1 mm vastag kortikális régióból. Ezt a szomatoszenzoros, parietális és motoros agykérgi területek aktivitásának egyidejű monitorozására használták fejrögzített, viselkedő egerekben [34]. A multifoton képalkotás szabadon mozgó állatokban történő alkalmazása a közelmúltban új lendületet vett a kétfoton-mikroszkópok miniatűr változatainak kifejlesztésével. Nemrégiben Klioutchnikov és munkatársai egy fejhez rögzíthető kisméretű mikroszkóp segítségével végeztek háromfotonos gerjesztést szabadon mozgó patkányokon, amellyel 1,1 mm mélységig képesek voltak az egyes szómák és dendritek aktivitását monitorozni [35].

Fontos azonban megjegyezni, hogy a technikai fejlődések ellenére a hagyományos multifoton módszerek pontszerű letapogatási technikák, ebből adódóan korlátozza őket az adatgyűjtési sebességük, amely szorosan összefügg a fluoreszcens anyag gerjesztési tulajdonságaival, valamint a lézer impulzusával.

Fényalapú aktivitásmérés mélyagyi struktúrákban

A mélyagyi aktivitás egysejt szintű feloldására invazív módszerek alkalmazása szükséges. A klasszikus elektróda alapú megoldások mellett ma már multikontakt elektródákkal lehet sok sejt aktivitását mérni. A fénymikroszkópia előnyeinek megtartásával GRIN relay lencsék vagy multimódusú száloptikás képalkotással lehet egysejt feloldást elérni. A multimódusú szálakon keresztüli képalkotás [36] jelenleg az egyetlen technika, mely nem limitált sem az elérhető mélység, sem a genetikai célozhatóság szempontjából és a lehető legkisebb mértékben roncsolja a szövetet.

1.3. Agyi aktivitás modulációja fénygerjesztéssel

Az előzőekben bemutatott technológiák az idegi aktivitás monitorozására szolgáló eszközök, amelyek különböző térbeli skálán képesek az agy meghatározott léptékű folyamatait követni. Egy másik nagy érdeklődésre számot tartó terület olyan eszközöknek a bevezetése és fejlesztése, amelyek nemcsak a rendszer passzív megfigyelésére, hanem annak célzott manipulálására is lehetőséget kínálnak nagy térbeli és időbeli pontossággal.

Optogenetika

Az optogenetika optikai és genetikai módszerek kombinációjából született, amelyek együttes alkalmazása lehetővé teszi specifikus sejtcsoportok precíz modulálását az élő szövetben. Genetikai célzottság következtében a célzott sejtekben olyan speciális fehérjék termelődése indukálható, amelyek megfelelő hullámhosszúságú fény hatására változásokat generálnak a sejt elektromos és biokémiai állapotában [37].

Az idegrendszerek működésének vizsgálatára használható mikrobiális opszinok közé tartoznak a csatorna-rodopszinok (ChR), amelyek a sejt membránján fényérzékeny ioncsatornákat képezve képesek a fényt közvetlen ionárammá alakítani milliszekundum pontosággal [38]. A folyamat során, a ChR ioncsatornák kék fény hatására megnyílnak, majd a membránon keresztül kationionok (Na^+ , K^+) áramolnak a sejtbe. Az ionok áramlása potenciálváltozást idéz elő a membránban, ezért a sejt depolarizálódik, majd végül a sejt axonján akciós potenciálként terjed tovább. Hasonló megközelítéssel a neurális aktivitás gátolható is, például fényvezérelt ionpumpák (HR – halorodopszin) alkalmazásával, amelyek sárga fény hatására anionokat (Cl^-) engednek az intracelluláris térbe, ezzel hiperpolarizálva a sejtet [39].

A technológia nagy előnye, hogy a genetikai célzottság miatt az idegsejtek szelektív manipulációjára képes, ellentétben az elektródákkal történő stimulációnál. A módszer ezért remekül alkalmazható az egyes idegsejttípusok hálózatban betöltött szerepének a visszafejtésére deduktív következtetések által [40]. Az elmúlt évek tanulmányai bizonyították, hogy a technológia felhasználható olyan neurodegeneratív betegségek mögött húzódó folyamatok átfogóbb megértésére, mint a Parkinson- vagy az Alzheimer-kór, valamint jelentősen hozzájárulhat a kóros állapotokban szerepet játszó rendellenesen működő áramkörök szelektív manipulálásával hatékonyabb terápiák kidolgozásához [41].

1.4. Multimodális aktivitásmérés és moduláció

A szűk értelemben vett multimodális képalkotás azt a megközelítést takarja, amely jellemzően kettő vagy több különböző eszközzel felvett adathalmazt kombinál, hogy ezzel elősegítse az agy strukturális és funkcionális működésének megértését az egyes képalkotó és mérőmódszerek limitációinak kiküszöbölésével. Tágabb értelemben a multimodális képalkotás jelentheti ugyanannak az eszköznek különböző „kontraszt” beállításai mellett szerzett adatainak a fúzióját is, például a diffúziós- és funkcionális MR képek kombinálását [42]. A multimodális adatelemzés alapvető motivációja az olyan összefüggések feltárása, amelyek egyetlen modalitás használatával nem volnának megfejthetők.

Park és mtsai. munkája egyik legelegánsabb példája a multimodális adatrögzítés által megnyíló lehetőségeknek. Nagy preklinikai fajban, makákóban vizsgálták az arcfelismerésre specializált agyi régiókat kombinálva az egysejtes elektródás méréseket a teljes agyi dinamikát vizsgáló fMRI-vel [43]. Korábbi tanulmányok, amelyek mikroelektródákkal vizsgálták az arcfeldolgozásért felelős kérgi foltokban (FP - face patch) az egyes neuronok szelektivitását, megállapították, hogy az adott FP-n belül az egyes neuronok eltérő aktivitást mutatnak a különböző arcok eltérő tulajdonságaira, úgymint az identitás, arckifejezés, mozgások vagy a fejtartás szöge [44]. Ezek a megfigyelések azt sugallták, hogy egy adott FP-n belül az idegsejtek

egy vagy több kritikus jellemzőre specializálódtak, így támogatják az arcfelismerés különböző aspektusait.

Park és mtsai. vizsgálatai lehetővé tették, hogy összevessék egy meghatározható arcfelismerő régióban (anterior fundus - FP) az egyes neuronok aktivitását a teljes agyi dinamikával. Az eredményeik azt mutatták meg, hogy a korábban egy funkcionális egységként kezelt területen belül is 1 mm^3 térfogatban található idegsejtek nagyon különböző egész agyi aktivitási mintázatokkal korrelálnak a makroszkópikus skálán. A korrelációs térképek alapján egy kisebb régióon belül is több funkcionális alpopulációt tudtak meghatározni, ami új nézőpontot ad a lokális neurális populáción belüli funkcionális sokféleségről. Valamint előre vetítenek egy új megközelítést, amely szerint az egyes idegsejtek funkcióit ne a szelektivitásuk, hanem az egész agyhoz való korrelációjuk alapján osztályozzuk [43].

Egy másik kutatócsoport, széleslátószögű fluoreszcens Ca^{2+} képalkotás és fMRI szimultán használatával próbálták meg áthidalni a mezoszkópikus és mikroszkópikus képalkotás közötti szakadékot [45]. Az eljárás korántsem triviális, hiszen az MR nagy mágneses tere nem engedi meg a mágnesezhető fémek egyidejű alkalmazását, ezért egy hosszú optikai száltömböt alkalmaztak az optikai információ elvezetésére. Ez a megközelítés lehetőséget ad annak a vizsgálatára, hogy a különböző sejtpopulációk hogyan vesznek részt a funkcionális hálózatokban, viszont ez az eljárás egyelőre csak altatott állatban lehetséges és elég költséges.

Barson és mtsai. a mikroszkópikus és a mezoszkópikus kortikális aktivitás közötti kapcsolat feltérképezésére fejlesztettek ki egy mérési módszert, amely során a széles látószögű Ca^{2+} képalkotást kombinálták a kétfoton mikroszkópiával [46]. A két optikai képalkotó szimultán használatát egy derékszögű mikrop prizma beültetésével oldották meg, ami lehetővé tette, hogy az oldalirányból érkező kétfotonos gerjesztősugarak a kéreg felszínére érkezenek. Ezzel elérhetővé vált a mezoszkópos jel és a sejtes válasz kapcsolatának a feltárása, amelyre korábbi tanulmányokban csak indirekt módon következtethettek [47]. A tanulmányból kiderül, hogy a mezoszkópos jel erősen korrelál a sejtközi térből (neuropil) származó jellel, miközben az egyes sejtek csak elhanyagolható mértékben járulnak hozzá. Ezek alapján elmondható, hogy általában a mezoszkópikus jelben az axonális és dendritikus struktúrákból érkező fluoreszcencia dominál, nem pedig a felszínközeli sejtekből származó fluoreszcencia.

Xiao és mtsai. széles látómezőjű GCaMP képalkotást és sejtes elektrofiziológiát alkalmaztak egereken spontán aktivitás vizsgálatára, hogy időbeli kapcsolatokat határozzanak meg az egyes szubkortikális neuronok mikroszkópikus léptékű aktivitása és a mezoszkópikus agykérgi térképek között. Eredményeik alapján arra következtettek, hogy a szubkortikális talamikus neuronok instruktív szerepet játszanak az agykérgi aktivitásban, különösen az előrecsatoló kortikális gátlás tekintetében [48]. Ezen dinamikáknak a mélyebb megértése betekintést nyújthat

abba, hogy az agyi régiók közötti normális kapcsolatoknak a megbomlása hogyan vezethet olyan rendellenességekhez, mint az epilepszia vagy a demencia [49], [50].

Sans-Dublanc és társai a funkcionális ultrahang képalkotást kapcsolták össze az optogenetikával, amelylehetőséget teremtett az idegrendszer célzott komponenseinek a manipulálására, miközben az agy egészére kiterjedő aktivitást nyomon követték. A tanulmány során a superior colliculus (SC) négy különböző idegsejttípus-csoportját (CAMKII, NTSR, PV, GAD2) vizsgálták, amelyek fontos szerepet játszanak az orientációs és védekező viselkedés irányításában [51]. A csatorna-rodopszin (ChR) irányított kifejeződését az egyes sejttípusokban transzgenikus egérvonalak, valamint adeno- asszociált vírusok segítségével oldották meg, amely lehetőséget teremtett az egyes sejttípusok szelektív aktiválására. Így az eltérő egérvonalakban a SC optogenetikus modulációja eltérő viselkedésformákat indukált. Az indukált viselkedés nyomon követése mellett, a fUS képalkotás szimultán használatával a lokális sejttípus-specifikus aktiváció hatását az egész agyra kiterjedő hálózatok tekintetében tudták megfigyelni. Ez egyedülálló megközelítést adott az egyes sejttípusok, a teljes hálózat dinamika, valamint a viselkedés összekapcsolására.

1.4.1. Multimodális agyaktivitás mérés előnyei

A különböző skálán dolgozó képalkotó módszerek kombinációjának egyik nyilvánvaló előnye, hogy az agyi folyamatokat jobb tér-időbeli feloldással tudjuk jellemezni. Ennek egyik módja, hogy kihasználjuk az egyes eszközök tér-időbeli komplementaritását - az egyik modalitás jobb időbeli felbontását a másikmodalitás jobb térbeli felbontásával kombináljuk [52].

A megközelítés egy másik hozadéka, hogy amíg az agyi tevékenységeket az unimodális eljárások csakegyoldalúan, az adott fiziológiai jelenség (elektromágneses, metabolikus vagy vaszkuláris változásokra) korlátain belül képesek csak bemutatni, addig a multimodális módszerek képesek azokat komplexen modellezni, ezáltal átfogóbb képet kaphatunk az agy összetett fiziológiai folyamatairól.

Ezen túlmenően, a multimodális aktivitásmérésekkel részletesebb betekintést nyerhetünk az eltérő léptékű idegi folyamatokba, feltárhatjuk az egyes funkcionális egységek, valamint a teljes hálózati dinamika kapcsolatát. Újraértelmezhetjük az egyes sejtek hálózatban betöltött szerepét és új paradigmákat állíthatunk fel annak a leírására, hogy az egyes sejtek vagy sejtpopulációk aktivitása, hogyan manifesztálódik a lokális, valamint a globális áramkörüi dinamikába.

A modern genetika eszközeit felhasználva szelektíven jelölhetünk különböző régiókat, rétegeket és sejttípusokat, amelyeknek irányított manipulációja több tér és időbeli skálán végigkövetve eredményesen kiegészítheti ismereteinket arról, hogy az egyes egységek és a közöttük lévő aktív kapcsolatok hogyan járulnak hozzá a viselkedés irányításához.

A különböző modalitások egymást kiegészítő információinak a kiaknázásával feltárhatunk olyan

összefüggéseket és folyamatokat, amelyek az unimodális megközelítéssel eddig láthatatlanok voltak, és közelebb kerülhetünk az idegtudomány főbb kérdéseinek a megválaszolásához, például, ahhoz, hogy miként képesek a különböző idegsejtek, illetve azok típusai a viselkedést vagy a mentális állapotokat alakítani.

1.4.2. Multimodális aktivitásmérési megközelítések nyitott kérdései

Összességében a multimodális megközelítés jelentős előnyöket mutat a klinikai diagnózis és az idegtudományt célzó kutatások területén, azonban azoknak a tanulmányoknak a száma, amelyek valódi multimodális fúziót végeznek még mindig rendkívül csekély. Ennek részben az egyik oka, hogy a multimodális tanulmányok szélesebb körű szakértelmet igényelnek az eredmények elemzésében és értelmezésében szemben az unimodális vizsgálatokkal. Emellett a multimodális képalkotás jellemzően speciális utófeldolgozást igényel a különböző forrásokból származó adatok egyesítéséhez, hiszen az idegi aktivitás leképzésének tere jelentősen különbözhet az egyes metódusoknál [53].

Bizonyos esetekben a multimodális adathalmaz megszerzésének módja sem triviális. A noninvazív eljárások között, az fMRI kombinálhatóságát jelentősen korlátozza az erős mágneses tér, amely kizárja a standard, ferromágneses anyagokat tartalmazó elektrofiziológiai eszközök szimultán használatát [54]. Az állati modellek esetében, az invazív képalkotó eljárások speciális preparációt igényelnek. A mikro-, és mezoskálás eszközök, úgymint a multifoton mikroszkópia vagy a széles látószögű képalkotás esetében rendkívül fontos a megfelelő optikai tisztaságú kraniális ablak, amely lehetővé teszi a hosszú távú méréseket, valamint segít fenntartani az agy normális állapotát. A fUS esetében is szükség van egy olyan egyedi interfészre, amely a vizsgálni kívánt terület felett a koponyatetőt helyettesítve lehetővé teszi az ismételt, stabil képalkotást. A kísérleti gyakorlatban bevettnek számító, emlősökre szabott kraniális implantátumok többségét úgy tervezték, hogy egyetlen kísérleti módozatot, és ezért egyetlen térbeli skálát használhassanak. A penetráló mikroelektrodákhoz tervezett rendszerek nem teszik lehetővé az idegi aktivitás vizsgálatát optikai képalkotással [55]. Hasonlóképpen, az optikai képalkotásra tervezett rendszerek általában nem teszik lehetővé a többcsatornás elektrofiziológiai mérést és stimulációt [31]. Minden esetben ahhoz, hogy más modalitással hozzáférjünk ugyanahhoz a neuronpopulációhoz, meg kell változtatni a beültetett interfészt az adott implantátum-geometria mérési modalitás-specifikusága miatt.

A problémához tartozik, hogy a modellállat megválasztása is jelentősen befolyásolhatja a különböző modalitások implementálhatóságát, mivel a legtöbb optikai képalkotó módszert kisebb testű emlősökre, elsősorban rágsálókra optimalizálták. A nagyobb testű preklinikai fajok esetében szükség van a metódusok újragondolására [56].

2. Tervezés

2.1. Multimodális implantátum

A neurális hálózatok eltérő léptékű folyamatainak monitorozása és manipulálása céljából egy olyan moduláris, krónikus neurális interfészt fejlesztettem ki, amely egységes platformot képez az egyes modalitások között. A konstrukció segítségével szeretnénk feltérképezni ugyanazon neuronpopuláció lokális és globális funkcionális kapcsolatait, valamint megfigyelni a lokális perturbáció hatását a nagykiterjedésű hálózati dinamikára.

2.1.1. Tudományos motiváció

A multimodális interfészt a vizuális feldolgozás rendszerszintű feltérképezésére szeretnénk felhasználni. A látórendszer működésének megértése kulcsfontosságú, hiszen általa egyetemes képet kaphatunk a központi idegrendszer fő tevékenységéről: a külső és belső ingerekre adott válaszok dinamikus integrálásáról és koordinálásáról több térbeli és időbeli skálán keresztül.

Ebből adódóan az implantátumot egy olyan preklinikai fajra terveztem, amely - szemben a rágsálókkal - hűen modellezi az emberi vizuális rendszer főbb tulajdonságait. A macskát, mint modellfajt Hubel és Wiesel úttörő munkája [57] óta használják az éleslátás és binokuláris látás működésének és kialakulásának megértésére.

2.1.2. Célkitűzés

Céлом egy olyan alacsony profilú, krónikus implantátum megtervezése és kivitelezése, amely kísérleti igényektől függően rugalmasan átalakítható és egyedi modulokkal kiegészítve lehetővé teszi a háromdimenziós funkcionális ultrahang képalkotás, széleslátószögű optikai képalkotás, kétfoton mikroszkópia és elektródás mérés hosszútávú, aszinkron alkalmazását éber állaton. Emellett biztosítja a fent említett képalkotók és az optogenetikai manipuláció szimultán megvalósítását.

2.1.3. Tervezési szempontok

Modularitás A tervezés irányító koncepciója a modularitás volt. Az implantátumrendszer három fő komponensre osztható fel:

- 1) Krónikus interfész – amelynek kialakítása egyik oldalról illeszkedik a koponya alakjához, másik oldalról pedig rugalmas hozzáférést biztosít a kísérlet-specifikus hardverek csatlakoztatásához.
- 2) Belső kamra– amely elősegíti a szövet stabilizálását, valamint kielégíti az egyes képalkotó eljárások szövettel való kölcsönhatásának eltérő igényeit.

- 3) Modulok – amelyek biztosítják az éber és az altatott mérések stabilitását, alkalmazkodnak a képalkotók fizikai tulajdonságaikhoz, valamint a kísérleti körülményekhez.

Egyedi kialakítás A rágsálókkal ellentétben a macskák koponyaacsontjának alakja és mérete viszonylag nagy méretbeli varianciát mutat az egyedek között. A hosszútávú mérések kivitelezésének egyik fontos tényezője, hogy az implantátumnak stabilan kell a koponyához rögzülnie. A rosszul illeszkedő implantátumok nem tudnak integrálódni a csontba, meglazulhatnak vagy letörhetnek, ami hatással lehet az állatok jólétére és megzavarhatja a kísérleteket [58]. Az egyedi, „koponyára szabott” implantátum megkönnyíti a műtéti beültetést, valamint minimalizálja az implantátum és a csont közötti rést, ami csökkenti a nagy mennyiségű fogászati akril használatának szükségességét is. Ezen okokból kifolyólag az implantátum krónikusan beültetett részét az egyes macskák MR felvételei alapján szabtam egyedire, hogy ezzel támogassam a stabil rögzítést.

Kompatibilitás A multimodális képalkotás szükséges feltétele, hogy a kraniális implantátum kialakítása hozzáférést biztosítson a különböző modalitásoknak ugyanazon neuronpopulációhoz. Azonban a képalkotók fizikai tulajdonságai (mérete, mobilitása, munkatávolsága stb.) egyedi igényeket szabnak meg, amelyek jelentős korlátok közé szorítják az implantátum egyes dimenzióinak lehetséges nagyságát.

Az optikai képalkotók esetében az objektív mérete, látómezeje és munkatávolsága kritikus tényezők, amelyeket figyelembe kell venni a kraniális implantátum tervezésekor. Széles látószögű képalkotás során Navitar NMV-50M1 objektívet használunk, melynek 14,8 mm a munkatávolsága és $\sim 9 \times 9$ mm a látómezeje [59]. A kétfoton mikroszkópia méréseknél Olympus XLPLN10XSVM típusú objektívet alkalmazunk, amely 8 mm munkatávolsággal rendelkezik [60]. Mindkét objektív esetében tehát minimális a szövet és az objektív közötti távolság, ami felülről korlátozza a krónikus kamra mélységi kiterjedését, valamint kizárják más képalkotó eszközök szimultán használatát.

A fUS képalkotást tekintve a módszer egyik kiemelkedő előnye a transzducer fej kompakt jellegéből adódik, amely a koponyához rögzítve megteremti az éber, viselkedő állaton történő mérés lehetőségét. A módszert patkányon [61] és makákón [62] korábban már demonstrálták, azonban a fix pozícióban rögzített lineáris transzducer az agy egy-egy keresztmetszetét tudja csak feltárni, a volumetrikus méréshez más megközelítés szükséges. Brunner és mtsai. nemrégiben két megoldást is publikáltak a fUS háromdimenziós kiterjesztésére. A kutatócsoport kifejlesztett egy egyedi gyártású volumetrikus transzducer fejet, amely képes az agyaktivitás háromdimenziós lekövetésére fejrögzített, éber állaton, viszont a módszer hátránya, hogy rosszabb térbeli felbontással ($\sim 300 \text{ mm}^3$) dolgozik, mint a lineáris párja [63]. Egy másik lehetséges megoldás a

transzducer lineáris mozgása a feltárni kívánt terület felett. Brunner és mtsai. egy motorizált kar segítségével valósították meg ezt a koncepciót [22], miközben az egér feje rögzítve volt. A célom egy olyan motorikus megoldás megvalósítása volt, amely természetes viselkedés közben képes az idegi aktivitás mezoszkópikus, háromdimenziós tanulmányozására.

Stabilitás A stabil képalkotás kritikus fontosságú a mérés eredményességét tekintve, hiszen a mozgásból eredő műtermékek jelentős komplikációkat okozhatnak a kinyert adatokban, amely inkonzisztens eredményekhez és téves következtetésekhez vezethetnek. Az artefaktok származhatnak az állat akaratlagos vagy akaratlan (légzés, szívverés) mozgásaiból. A mozgásból eredő artefaktokat minimalizálhatjuk anesztetikumok alkalmazásával, fejrögzítéssel, szövetstabilizációval, mozgáskorrekciós algoritmusok implementálásával vagy a képalkotó koponyához történő stabil rögzítésével.

Az általunk használt optikai képalkotó rendszerek nem teszik lehetővé a szabadon mozgó állatok vizsgálatát, ezért egy olyan fejrögzítési rendszeren dolgoztam, amely stabilitást biztosít a mérések alatt, kompatibilis a krónikus implantátummal és az objektívekkel, valamint lehetővé teszi az éber állattal való kísérleteket.

A fUS esetében a mozgásból eredő műtermékek nemcsak a jel elmosódásához, hanem téves aktivációs mintázatokhoz is vezethetnek, hiszen a Doppler képalkotás alapja a transzducer helyzetéhez képest a vörösvérsejtek relatív elmozdulásának kvantifikálása, és ezáltal a vér térfogatváltozásainak lekövetése. A fUS képalkotást támogató modulnak megoldást kell nyújtania a mozgási műtermékek kiküszöbölésére.

Biokompatibilitás A beültetett implantátum fenntarthatósága szorosan összefügg a választott anyaggal és beültetési technikával. A megfelelő biokompatibilis anyagok felhasználásával minimálisra csökkenthető a negatív szöveti válasz, miközben az implantátum hosszútávon teljesíteni tudja funkcióját. Az elmúlt években egyre nagyobb teret nyertek a 3D nyomtatással előállítható biokompatibilis implantátumok, például a specializált fotopolimerből, poliamidból, poli(éter-éter- ketonból) vagy titániumból készült kamrák, amelyek amellelt, hogy elősegítik a csontba való integrálódást és minimalizálják a „kilökődés” kockázatát, kiváló felületi geometriát biztosítanak, amely növeli a kísérletek sikerességét [64].

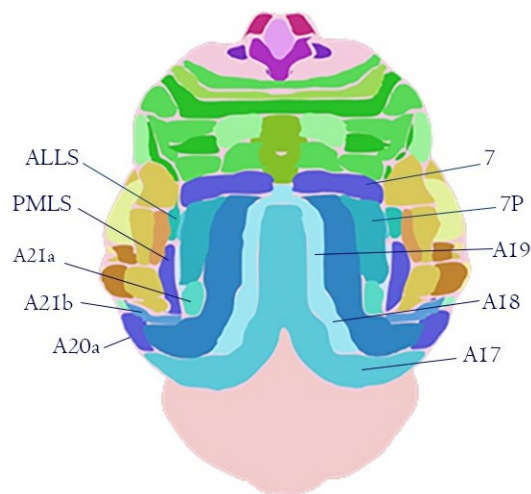
Modellezés A 3D modellezésre és tervezésre használt szoftverek két nagyobb csoportba sorolhatóak: a mérnöki célokra optimalizált 3D környezet, amellyel precízen tudunk parametrizálható modelleket készíteni (SolidWorks), míg más programok alkalmasabbak a komplex, naturalisztikus megjelenésű objektumok létrehozására és kezelésre (Autodesk 3Ds Max). Az előbbivel hatékonyan tudunk egyszerű geometriájú implantátumelemeket létrehozni, míg az utóbbi alkalmasabb a koponya alakját lekövető krónikus implantátum megtervezéséhez, a beültetés háromdimenziós szimulációjára és a műtéti tervek megalkotására. A két szoftver

egymást kiegészítő előnyeit használtam ki a modellek megalkotásakor és a műtéti tervek elkészítésekor.

Prototípusizálás A 3D nyomtatás technológia lehetővé teszi, hogy könnyen és gyorsan alkothassunk egyedi, komplex modelleket. A technológiával költséghatékonyan gyárthatunk prototípusokat, valamint modellezhetjük a műtéti folyamatokat, ezáltal csökkentetjük a műtéti eljárás időtartamát és a tesztelesek költségeit. A prototípusokat és a macska koponya modelljét 3D nyomtatással öntöttem formába, hogy az egyes elemek inkompetenciái még a műtét előtt javításra kerülhessenek.

2.2. Agyatlasz

Az agyatlaszok alapvető szerepet játszanak az agyon belül az egyes régiók azonosításában, valamint lehetőséget biztosítanak a különböző vizsgálatokból származó adatoknak a közös koordinátarendszerbe való transzformálásának. Stolzberg és mtsai. nemrégiben bemutatták a macska agykérgének szegmentált háromdimenziós modelljét (1.ábra) [65], amely kiegészítve a szubkortikális területek kétdimenziós atlaszaival megfelelő kiindulási alapot biztosítottak a vizuális rendszer régióinak a meghatározásához, valamint segítettek az implantátum méretének és formájának az optimalizálásában.



1. ábra - A „Atlas” volumetrikus agyatlasz kétdimenziós vetülete az axiális síkban. A kék szín árnyalataival jelölt területek a vizuális kéreg régióit reprezentálják: ALLS - Anterolateral lateral suprasylvian kéreg, PMLS - Posteromedial lateral suprasylvian kéreg, A21a vizuális terület, A21b vizuális terület, A20a vizuális terület, 7-es vizuális terület, 7p – 7-es vizuális terület posterior része, A19 vizuális terület, A18 vizuális terület, A17 vizuális terület. Ábra forrása: [65]

3. Megvalósítás

3.1. Koponya rekonstrukció

Az egyedi, koponyára szabott implantátum elkészítéséhez a macskák 3 Tesla-s MRI berendezéssel (Siemens MAGNETOM Prisma) készített volumetrikus felvételeit használtam fel. Alapvetően az MRI, a komputertomográfiával összehasonlítva gyengébb kontrasztot mutat a koponyacsontra és ideálisabb módszer a lágy szövetek vizsgálatára, azonban egy olyan T1 VIBE szekvenciát fejlesztettünk, amellyel a koponya szubmilliméteres ($\sim 0,6$ mm) pontossággal elkülöníthetővé vált a többi szövetből. Az általunk fejlesztett szekvencia így lényegesen egyszerűbbé teszi a tervezés folyamatát, mivel nem szükséges két képalkotó eljárás igénybevétele az implantátum tervezéséhez.

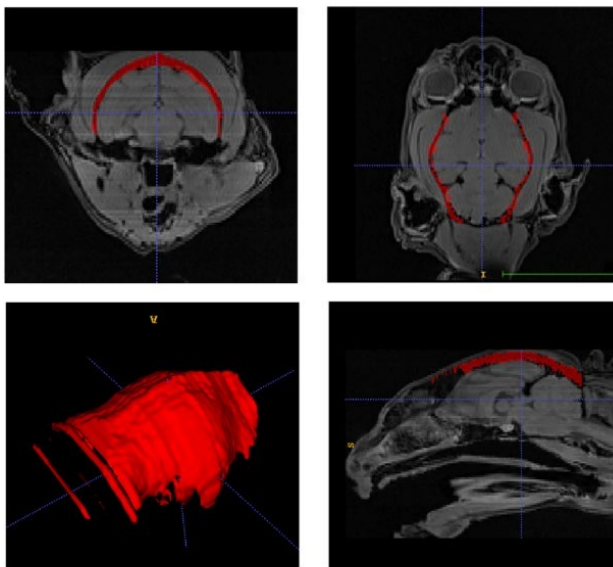
Az MR felvételekből származó DICOM képeket az ITK-SNAP 3.8. programba importáltam, majd a szoftver segítségével fél-automata szegmentálást végeztem a koponya 3D modelljének a létrehozásához (2. ábra).

A modellt STereoLithography (STL) formátumba exportáltam, amely alkalmas háromdimenziós objektumok felületi geometriájának leírására egy derékszögű koordináta-rendszerben, így számos 3D modellező szoftvercsomaggal kompatibilis. A koponya minél pontosabb térbeli rekonstrukciójára más szoftvereket is kipróbáltam (MITK, 3DSlicer), azonban ez az eljárás bizonyult a leghatékonyabbnak.

3.2. Krónikus interfész

A krónikus implantátum megtervezéséhez az Autodesk 3Ds Max modellező szoftvert használtam fel. Első lépésként a programban a három merőleges tengely mentén síkfelületeket helyeztem el, majd ezekre „feszítettem rá” a PNG formátumban exportált MR képeket, amely segítette a koponyadarab pozicionálását a háromdimenziós térben.

Referenciaként használtam egy standard macska koponya modellt, valamint a Catlas kérgi atlaszt.



2. ábra A macska MR felvételének koronális, axiális és szagittális metszete az ITK SNAP program képmegjelenítőjén. A piros terület jelzi a szegmentált koponyarészt, amelynek 3D modellje a bal alsó szegmensben látható.

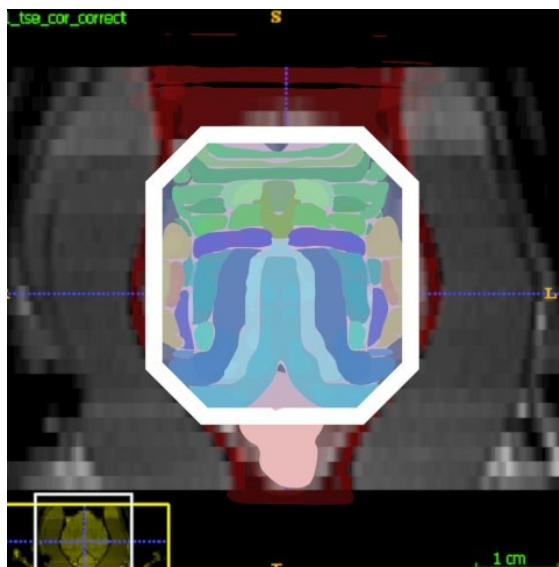
A háromdimenziós kérgi atlasz MR felvételekhez való illesztésével sikerült meghatározni a vizuális kéreg elhelyezkedését, és ezáltal kijelölni a kraniális implantátum határvonalait, valamint a kraniotómia helyét (3.ábra). Az implantátum alakjának tervezésekor a látótér maximalizálása és az implantátum stabil rögzítésének a megőrzése között kompromisszumot kellett kötnünk.

A koponya alakjának lekövetésére a Conform és Relax beépített függvényeket használtam, amelyek segítségével a koponyaextraktum alakja modellezhető szabadformájú poligonhálókkal. A poligonhálónak ezután térfogatot adtam a Shell módosító eszközzel, ilyen módon a koponya alakját kivághatjuk más objektumokból (Boolean - Subtract).

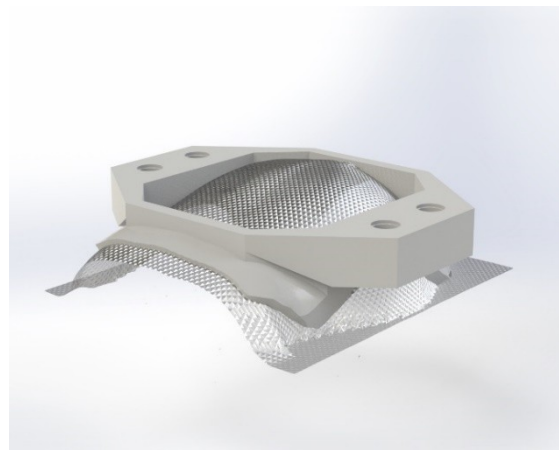
Ez a módszer gyors és egyszerű megoldást nyújt a koponya komplex alakjára szabott implantátum modellezésére. A krónikus implantátumot emellett kiegészíttem egy „szoknya” résszel, ami a ragasztási felület növelését, és a fogászati csavarokkal történő rögzítést segíti elő.

Ezt követően tértem át a SolidWorks 3D környezetbe, ahol hatékonyan tudtam a koponyára igazított modellre az egyszerűbb geometriájú formákat illeszteni.

A könnyű beültetethetőség céljából az implantátum kiterjedését oldalirányban minimálisra csökkentettem. Az oldalsó szárnyakon lyukakat alakítottam ki a kiegészítő modulok csatlakoztatásához szükséges menetes betéteknek. (4.ábra).



3. ábra - Felülnézeti kép az axiális MR metszetről a 3Ds Max programban. Az illesztett 3D koponyarész és a Catlas volumetrikus kérgi atlasz térbeli kapcsolatával optimalizáltam a krónikus implantátum falának külső és belső határvonalait.



4. ábra - A krónikus interfész modell és a szabadformájú poligonháló reprezentációja SolidWorks környezetben

3.2.1. Optikai szál hozzáférés

Az optogenetikai módszerekkel történő perturbáció szimultán kivitelezésére egy könnyedén hozzáférhető portot alakítottam ki a krónikus interfész oldalán (5.ábra). Ezzel a megközelítéssel egyszerre tudunk kortikális vagy szubkortikális területeket fokálisan manipulálni, miközben figyelemmel kísérhetjük a teljes vizuális kérgen az indukált aktivitást.



5. ábra - A 3D koponyamodel és az optikai szálak laterális penetrációját támogató krónikus implantátum SolidWorks környezetben

3.3. Modulok

3.3.1. Motorizált fUS

A fUS képalkotás háromdimenziós kiterjesztésére egy olyan modult terveztem, amely léptetőmotorokkal felszerelve alkalmas szabadon mozgó alanyok idegi aktivitásának térbeli leképezésére. A modul tervezésének meghatározó szempontjai a szkennelhető terület maximalizálása mellett a konstrukció méretének és súlyának minimalizálása, valamint a stabil képalkotás megteremtése volt.

A motor kiválasztása mindhárom szempontból kritikus tényező. A léptetőmotorok ideális jelöltek lehetnek erre a feladatra, hiszen a motor fő feladata nem a folyamatos forgás, hanem meghatározott szögelfordulással történő lépések végrehajtása egy tengely mentén. A Nanotec NEMA 8 (LA201S06- B-TDBA) motorja az egyik legkisebb jelenleg elérhető léptetőmotor, amely 5 μ m/lépés felbontással, valamint 20 mm x 20 mm x 33 mm kiterjedéssel rendelkezik és a tömege mindössze 54 g [66].

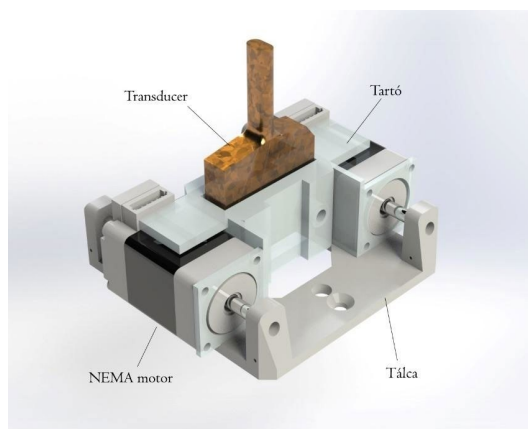
A motorok precíz irányítására egy összekapcsolt Arduino Uno R3 mikrokontrollert és egy Arduino Motor Shield Rev3 táblát használtunk. A motorok mozgásának programozására az AccelStepperkönyvtárt alkalmaztuk, amelynek példaprogramjai könnyedén saját igényeinkre

szabhatóak, az alkalmazott hardver teljesítményét közben optimalizálva [67].

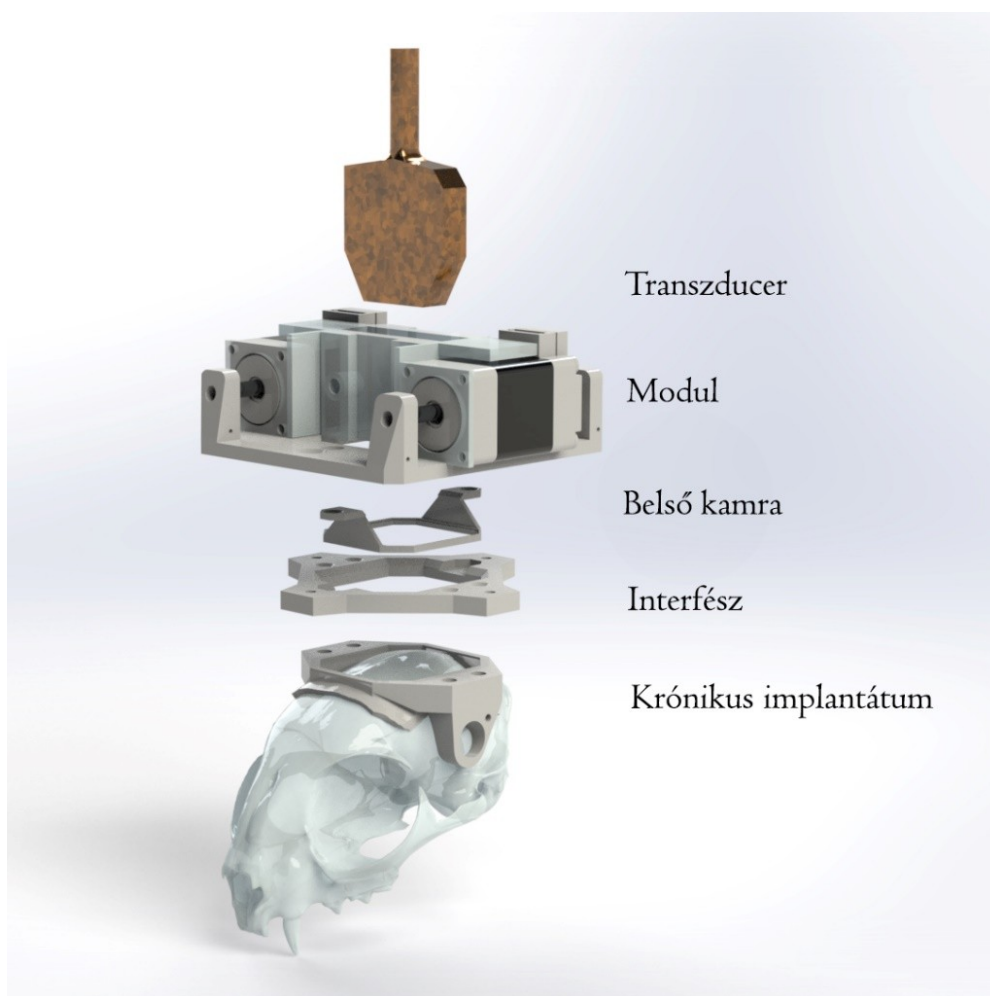
A motorizált modul három fő részből áll: tálca, tartó, valamint a két párhuzamosan elrendezett NEMA 8 motor, ahogy azt a 6. ábra mutatja.

A modell csatlakoztatása a krónikus elemhez egy köztes interfész beiktatásával történik. A tengelyszimmetrikus tervezés lehetővé teszi a szaggitális és koronális szeletek szkennelését is, így

mindkét irányban egy 18,5 x 15,9 mm-es terület tapogatható le. A motorokkal együtt a teljes konstrukciótömege 150 g, amely kevesebb, mint a macskák átlagos testtömegének 5%-a.



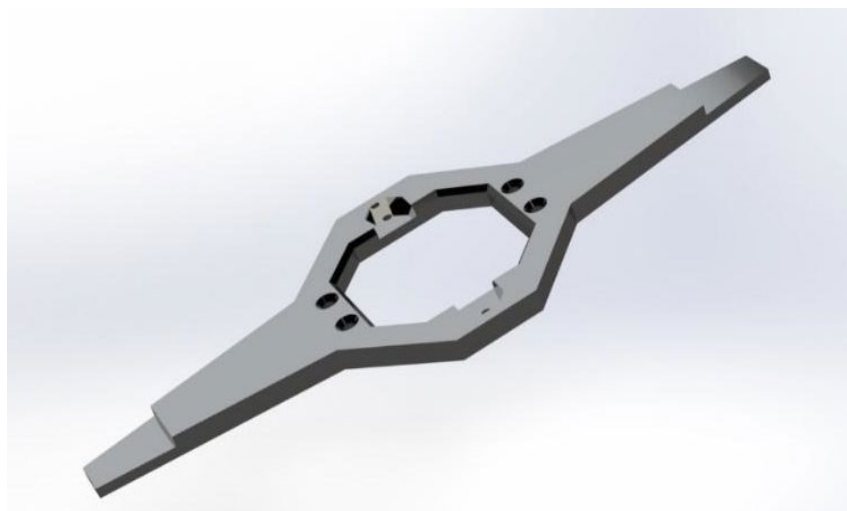
6. ábra - Motorizált fUS modul tervének háromdimenziós modellje



1. ábra - A motorikus fUS implantátumrendszer összeszerelési sorrendjének reprezentációja (SolidWorks)

3.3.2. Optikai képalkotás

Az optikai képalkotás esetében a modul tervezésének meghatározó szempontjai az objektív és a szövet közötti távolság minimalizálása, valamint a fejrögzítés mikrométeres stabilitásának a biztosítása. A modul négy darab csavarral rögzíthető a krónikus implantátumhoz, annak érdekében, hogy a rögzítéssel járó mechanikai feszültséget a krónikus kamrán keresztül a koponya nagyobb felületén el tudjuk oszlatni. A modul maximális vastagsága 4 mm. A mélyesztések a kamra két oldalán lehetővé teszik a belső elem rögzítését, amely így beleolvad a rögzítő modul síkjába. Az oldalsó szárnyak Thorlabs elemekkel rögzíthetőek (8.ábra).



8. ábra - Az optikai képalkotást támogató modul 3D modellje (SolidWorks)

3.4. Belső elem

A magas jel-zaj arányú mérések kivitelezéséhez a szövetből kilépő fény vagy hanghullámoknak lehetőleg veszteség nélkül kell az objektívhez, illetve a transzducer aktív felületéhez érkeznie. Az optikai méréseknél legtöbb esetben a feltárt agyfelszínt egy fedőüveggel zárják miután az agy közötti réseket agarózzal vagy szilikonnal töltötték ki. Ez a megközelítés azonban az optikai minőség fokozatos romlásával jár, valamint korlátozza a hozzáférést a szövetekhez a beültetés után, amellet, hogy nemkívánatos nyomást gyakorolhat a kérgi szövetre, amely így megzavarhatja a cerebrospinális folyadék szabályozását és a koponyán belüli nyomás szintjét [68]. Ugyanakkor az is igaz, hogy az agy fiziológiai pulzálása stabilizálható, ha enyhe mechanikai nyomást gyakorlunk a szövetre [56].

Ezen okokból kifolyólag olyan belső elemeket terveztem, amelyek rugalmasan cserélhetőek a különböző mérések között, és amely az adott modulhoz rögzítve finom nyomást tud gyakorolni az agyra a mérések ideje alatt. Mivel az agyfelszín és a rögzítési felület pontos távolsága nehézkesen meghatározható paraméter, ezért különböző mélységű szövetstabilizáló belső elemeket

készítettem 500 μm -es lépésközökkel. A belső elemhez polimetil-pentén (PMP) fóliát ragasztottam, mivel ennek a könnyű, funkcionális polimernek szövetszerű akusztikai impedanciája van, amely lehetővé teszi az ultrahanghullámok torzítatlan terjedését [69]. Emellett, kiváló optikai tisztaságot biztosít, és az elaszticitása is megfelelő [70].

A belső elem flexibilitásának további előnye, hogy hozzáférhetőséget biztosít farmakológiai szerek, vírusok szövetbe juttatásához, valamint az optogenetikai mérés és stimuláció kivitelezését is lehetővé teszi a vizuális kéreg legtöbb pontján.

3.5. Gyártás

A megtervezett elemeket a Formlabs Form 2 asztali SLA nyomtató segítségével öntöttem formába. Az első prototípusoknál a krónikus implantátum elkészítéséhez BioMed Amber gyantát használtunk, amelynek kiválasztásában a meghatározó tényező az anyag biokompatibilitása volt. Azonban az elkészült elemek terhelés hatására hamar eltörtek, valamint az anyag áttetszőségéből adódan az optikai mérésekhez sem ideálisak. A Formlabs egy másik termékének, a Rigid 10K-nak a mechanikai tulajdonságai (rigiditás, szakítószilárdság) jóval túlmutatnak a hasonló kategóriájú gyantákon, így az ebből az anyagból legyártott implantátumok nagyobb mechanikai stressz hatására is megőrzik szerkezeti integritásukat. Ezen indokból az implantátumrendszer egyes elemeit Rigid 10K gyantából nyomtattam ki. A biokompatibilitási problémák áthidalására a nyomtatott elemek oldalát a műtét közben Palacos csontcementtel vontuk be, így a bőr és a szövetek hozzá tudtak tapadni a krónikus implantátum oldalához.

A stabilitási problémák elkerülése végett az optikai képalkotáshoz használt modult, valamint a motorikus elemhez szükséges köztes interfészt CNC megmunkálással is elkészítettük. Az elemeket alumíniumötvözetből (EN AW-6061) gyártattuk le, amelyet kifejezetten nagy terhelésű szerkezetek gyártására szoktak alkalmazni, mindamellett, hogy jóval könnyebbek, mint a hasonló célokra felhasznált rozsdamentes acélötvözetek.

4. Eredmények

4.1. Fejlesztés

A moduláris multimodális implantátum kifejlesztését megelőzte olyan modellek elkészítése és kipróbálása, amelyek specifikusan a funkcionális ultrahang vagy az optikai képalkotást támogatták. Ezeknek a modelleknek a tesztelése közben szerzett tapasztalatokra épült a végső design.

A fejlesztési folyamat legelső lépése az elkészített prototípusok kipróbálása volt a 3D koponya modellen. A tesztelések során - többek között - megvizsgáltuk a Palacos cement adhézión képességeit a kinyomtatott elemeken, validáltuk a széleslátószögű objektív hozzáférhetőségét a szövethez egy speciális koponyamodell segítségével, valamint teszteltük a fUS mérési protokollal szinkronizált motorikus modul működését (9.ábra).



9. ábra - A fejlesztési folyamat egy-egy lépése. Bal oldali kép: A Palacos csontcementtel és fogászati csavarokkal rögzített implantátum a 3D nyomtatott koponyamodellen. Középső kép: A fejrögzítő rendszer tesztelése széles látószögű képalkotással. Jobb oldali kép: A motorikus modul tesztje az összeszerelést követően.

4.2. Validálás

Az implantátumrendszer működésének végső próbája az élő állaton való aktivitásmérések elvégzése volt. A kísérletek során vizuális stimulációs protokollokat alkalmaztunk, amelyek szinkronizálása az adott képalkotási módszerrel lehetővé tette a kiváltott idegi aktivitás időben és térben való lekövetését.

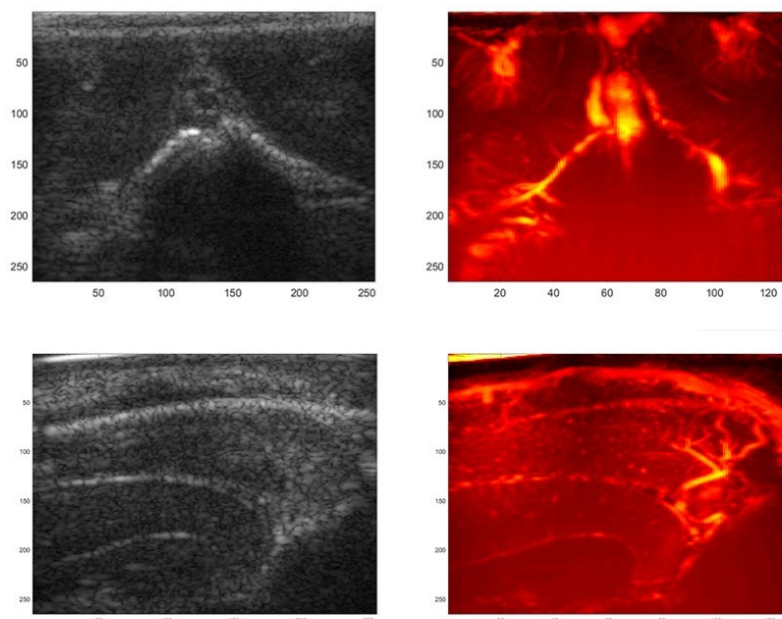
4.2.1. fUS mérés

A fUS mérés előkészítésekor a krónikus implantátumhoz előbb az interfészt csatlakoztattuk, majd az agyfelszín egyenletlenségeit 2%-os, alacsony olvadáspontú agarózzal töltöttük ki. Az interfész mélyesztett felületére csavaroztuk a megfelelő mélységű belső elemet, ezáltal a szövetet hatékonyan stabilizálni tudtuk. Ezután szereltük fel a motorikus modult, amelyhez előzetesen a transzducert rögzítettük.

Az agy szaggitális és koronális keresztmetszete

Az implantátum tengelyszimmetrikus tervezése lehetővé tette mérések kivitelezését mind szaggitális, mind koronális síkok mentén. A 10. ábrán látható képeket az úgynevezett Bmode és μ Doppler eljárásokhasználatával készítettük. A Bmode funkció alkalmas morfológiai képek valós idejű megjelenítéséhez, ezáltal segíti a mérések előtti navigációt az agyban, míg a μ Doppler képek által ellenőrizhetjük a transzducer rögzítésének stabilitását a stimulációs protokoll megkezdése

előtt.



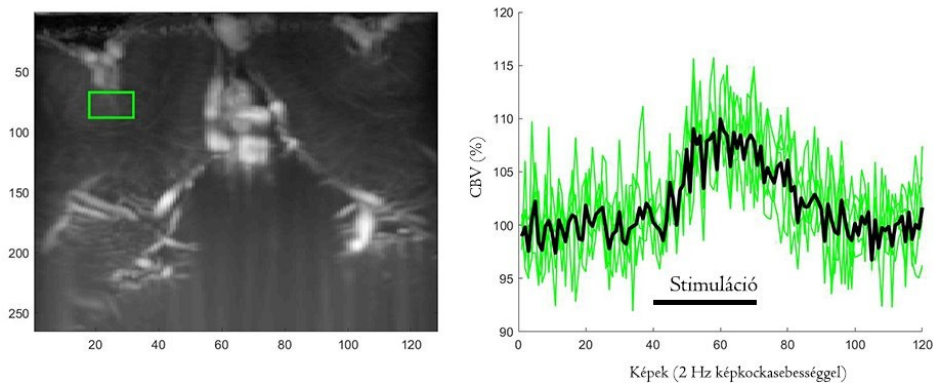
10. ábra - A macska agy koronális (felső sor) és szaggitális (alsó sor) síkjában készült Bmode (bal oldal), illetve μ Doppler (jobb oldal) felvétel.

Agyi aktivitásmérés éber és altatott állatban

Az éber és altatott méréseknél a következő stimulációs protokollt alkalmaztuk. A stimuláció első 20 másodpercében szürke képernyő jelent meg az állat előtt, ezáltal meg tudtuk határozni a mért aktivitás alapszintjét, majd a következő 16 másodpercben fekete és fehér csíkok váltakozva úsztak át a teljes képernyőn meghatározott irányban, végül 24 másodpercig egyenletes szürke kép következett. Egy teljes protokoll alatt az oszlopok iránya négyszer változott meg (90° , 180° , 270° , 360°), így ingerelve a vizuális kéreg orientáció- és irány szelektív neuronjait. Minden protokollt ötször hajtottunk végre egy adott szeleten a jel-zaj arány növelése érdekében.

Altatás alatt (Alfaxalone 5mg/kg/h) végrehajtott, koronális síkból történő mérés részeredményét a 11. ábra szemlélteti. A jobb oldali függvény azt a CBV változást ábrázolja az idő függvényében, amely a bal oldali Doppler képen látható zölden bekeretezett agyi régióból származik.

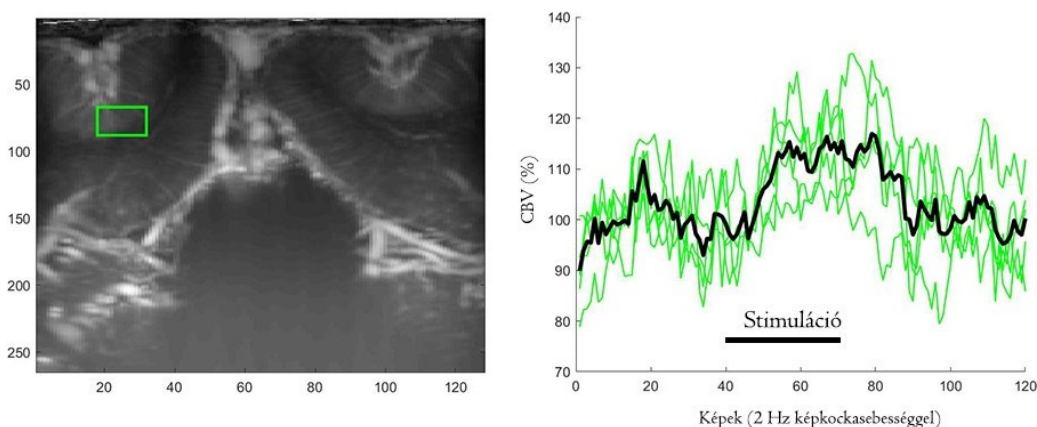
90°-os stimulációs irányhoz tartozó aktivitás



11. ábra - Vizuális stimulációval kiváltott aktivitás mérés eredménye altatott állatban. A bal oldali képen bekeretezett régióban a CBV százalékos változásait a jobb oldali grafikon szemlélteti. A 90°-os irányhoz tartozórelatív CBV értékeket 5 mérés eredményének az átlagolásával kaptuk (fekete görbe). A zöld görbék reprezentálják az egyes ismétléseket. A stimuláció hosszát a fekete vízszintes csík mutatja.

A protokollt éber állapotban is megismételtük, amelynek eredményét a 12. ábra mutatja. A jobb oldali ábrán jól látszik, hogy megközelítőleg 15%-os intenzitásbeli növekedés jellemezte az éber méréseket, míg anesztézia alatt kisebb kiváltott növekedést és nagyobb zajszintet mértünk.

90°-os stimulációs irányhoz tartozó aktivitás



12. ábra - Vizuális stimulációval kiváltott aktivitás mérésének az eredménye éber állatban. A kísérlet körülményei megegyeztek az altatott mérésnél ismertetettekkel.

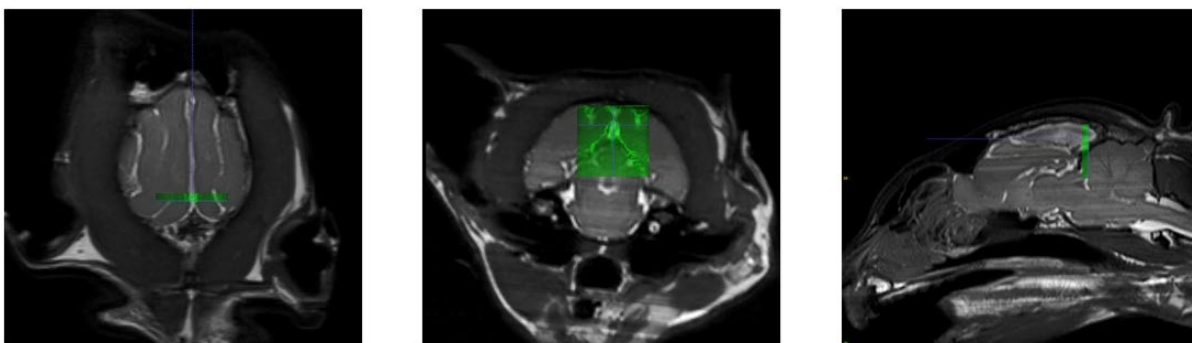
Háromdimenziós fUS képalkotás

Az agyi aktivitás háromdimenziós leképezéséhez a stimulációs protokollt az agy több egymást követő szeletén ismételtük meg. A szeletek közötti lépésközt a macska protonszűrő-súlyozott MR felvételeinek voxelmérete (~0,47 mm) szerint határoztuk meg.

Manuális regisztráció

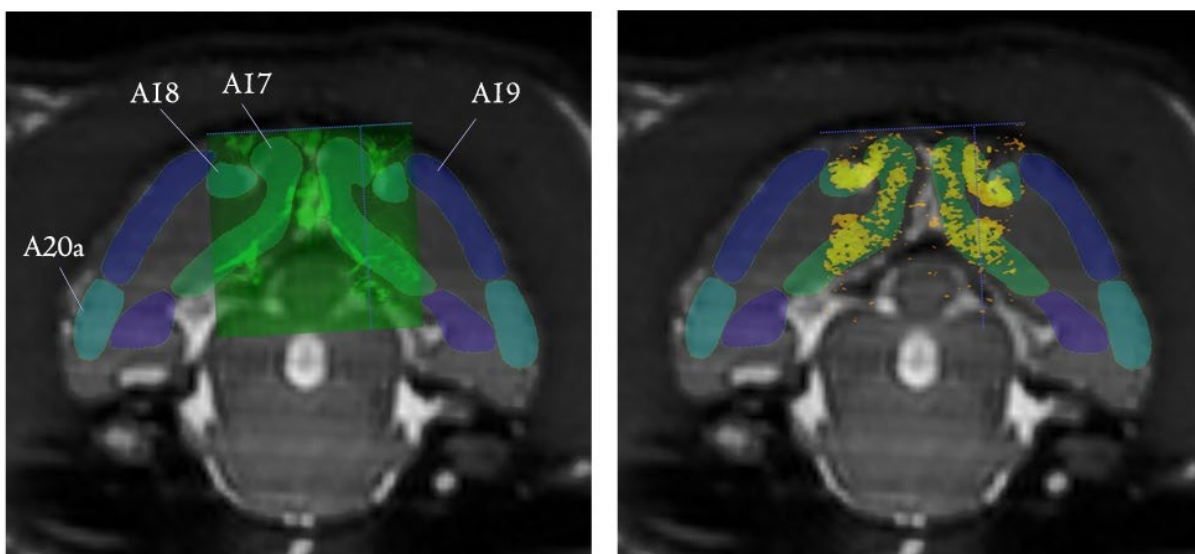
Annak érdekében, hogy az egyes szeleteken mért aktivitást a megfelelő agyi régióhoz, illetve teljes agyi koordinátájához rendelhessük, az aktivitási térképeket regisztrálnunk kellett előbb az MR képekkel, majd a Catlas volumetrikus agyatlasszal. A fUS rendszer saját szoftvere egy .mat kiterjesztésű fájlba menti a mért adatokat. Az idődimenzió mentén átlagolt mérési eredményeket

kétdimenziós mátrixokká alakítottam, majd az egy-egy szelethez tartozó mátrixokat behelyeztem egy háromdimenziós tömbbe, és NIfTI formátumban exportáltam őket egy egyszerű MATLAB kód segítségével. Ilyen módon az MR és a fUS felvételeket az ITK-SNAP programban manuálisan regisztrálni tudtam egymáshoz. A 13. ábrán a fentebb bemutatott négy agyszeletből készített 16 mm x 15,9 mm x 1,88 mm méretű tömb látható az axiális, koronális és szagittális síkokban.



13. ábra - A macska proton-sűrűség MR felvételének manuális regisztrációja a volumetrikus fUS ultrahang tömbbel. A tömb négy egymást követő koronális szeletet tartalmaz. Az illesztés az agyi tekervények (gyrus) és barázdák (sulcus), valamint az agykamrák alakjának a lekövetésével készült az ITK SNAP programban.

Ezt követte a Catlas regisztrációja az illesztett MR-fUS képekhez, majd az aktivitási mintázat rávetítése a rétegekre. A 14. ábra ismerteti a vizuális kéreg szegmentált területeit az agy egy koronális keresztmetszetén. A jobb oldali ábrán a sárga pontok jelölik az egy teljes stimulációs protokoll alatt indukált aktivitást, amely szemléletesen prezentálja, hogy az általunk mért aktivitás főként az A17 és A18-as régiókból érkezett, amely a vizuális feldolgozás első két állomása a macska neokortexében.

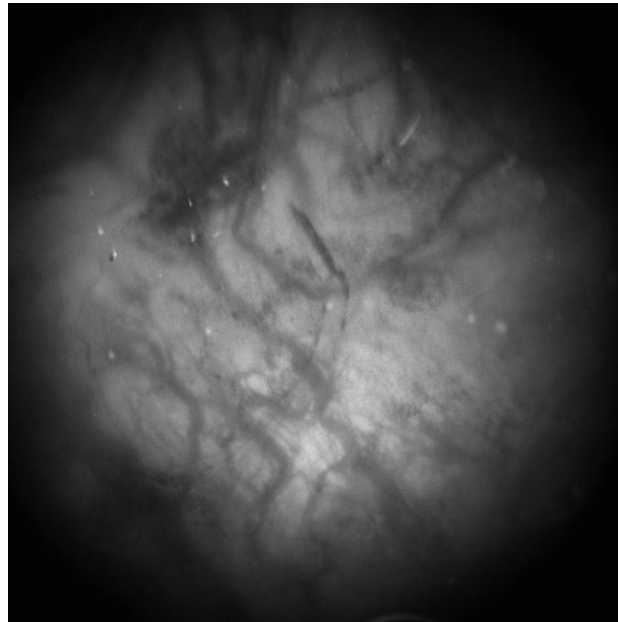


14. ábra - Az aktivitási mintázat hozzárendelése a szegmentált agyterületekhez. Bal oldali kép: Catlas agykérgi atlasz regisztrálása az MR-fUS képekkel. Jobb oldali kép: az egyes fUS szeletekhez tartozó aktivitási mintázat (sárgával jelölt voxelek) rávetítése a korábban illesztett rétegekre (MRI-fUS-Catlas).

4.3. Optikai képalkotás

Az optikai képalkotás támogatására a fejrögzítő modult használtuk, amelynek kompatibilitását eredményesen validáltuk a Navitar NMV-50M1 objektívvel. A 15. ábra szemlélteti a feltárt agyfelszín 9 mm x 9 mm-es területét másfélszeres nagyításban, éber állapotban.

A következő hónapokban tervezzük az első optikai aktivitásméréseket. Kétfoton mérésekkel lehetővé tesszük a sejtszintű felbontás és a mezoszkopikus agyi aktivitás fúzióját.

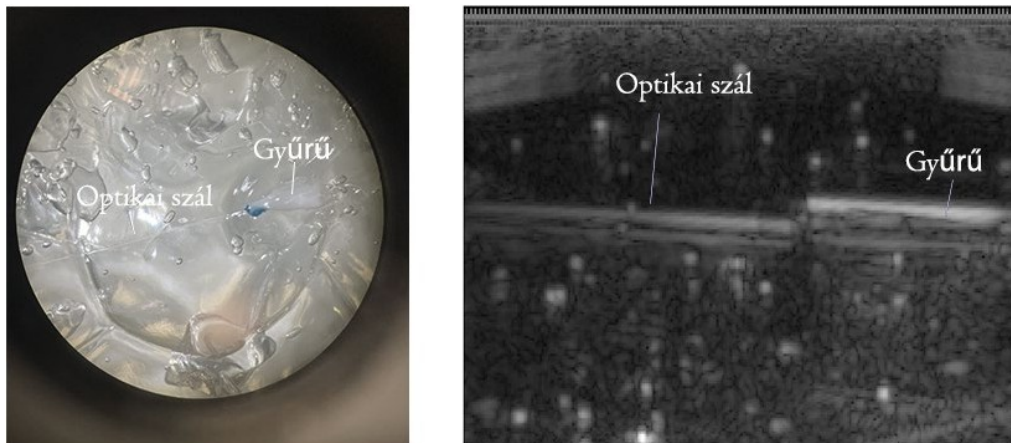


15. ábra - A széles látószögű képalkotó sCMOS kamerával (Teledyne Photometrics Prime BSI Express) készült kép a feltárt agyfelszínről a Navitar NMV-50M1 objektíven keresztül, éber állapotban.

4.4. Mélyagyi optikai mérés és stimuláció száloptika segítségével

Neuron áramkörök komponenseinek identifikációja mélyebb kortikális és szubkortikális területeken optikai szálon keresztül valósítható meg. Az optikai szál célterülethez való juttatásakor elsősorban a referencia agyatlaszokra támaszkodunk. A pontos célzás támogatásához beültetés közben fUS képalkotással folyamatosan monitorozzuk a szál szövetben való haladását a célstruktúra felé. Mindez különösen szubkortikális területek célzásánál szükséges, hiszen a beültetés közben az optikai szál elhajolhat, vagy a nagyobb anatómiai variancia miatt előfordulhat, hogy nem a megfelelő agyi struktúrába találunk. A módszer elsődleges validációjaként megnéztem, hogy a jelenleg használt legvékonyabb optikai szál vizualizálható-e

ultrahanggal. A 16. ábra bal oldalán egy ultrahangzselében fekvő 50 μm -es optikai szál látható 1,63-szoros felbontásban, a jobb oldalon pedig az ultrahang Bmode- ban készült felvételét láthatjuk. A vékony optikai szál nagy kontraszttal követhető a fUS képen, vagyis a fUS nemcsak kompatibilis a száloptikás stimulációval éber állatban, hanem hasznos lehet a száloptikás



16. ábra - Ultrahang zselébe mártott 50 μm -es optikai szál képe fénymikroszkóp alatt (bal oldali kép), valamint ultrahang képalkotással vizsgálva (jobb oldali kép).

kísérletek műtéti fázisában is.

4.5. Az eredmények összesített kiértékelése

Az eredmények alapján elmondható, hogy a létrehozott moduláris implantátumrendszer alkalmas a multimodális agyaktivitás mérések kivitelezésére. A kifejlesztett tervezési és gyártási módszer segítségével gyorsan és költséghatékonyan tudtunk egyedire szabott implantátumokat létrehozni, amelyek nagyban segítették a műtéti beültetést és a stabil rögzítést. Az eljárást három macskán sikeresen validálni tudtuk, mindhárom állaton nagyon hasonló jel-zaj viszonyt mérve vizuális stimuláció közben.

A fUS képalkotással mezoskálás méréseket végeztünk el éber, szabadon mozgó állaton a koronális és szaggitális sík mentén 16 mm mélységig. A motorikus modullal a kétdimenziós fUS képalkotást ki tudtuk terjeszteni a harmadik dimenzióra.

A mikroskálán történő mérésekhez validáltuk a szövethez való optikai hozzáférést széles látószögű képalkotó rendszer segítségével. A multimodális implantátumrendszert optikai szál beültetésével kompatibilissé tettem és demonstráltam a szálbeültetés fUS képalkotással való támogathatóságát.

5. Összefoglaló

A dolgozatomban egy olyan moduláris implantátumrendszer fejlesztését és validálását mutattam be, amely lehetőséget teremt az agyi folyamatok vizsgálatára több térbeli és időbeli skálán keresztül.

A technológiai és tudományos áttekintésben sorra vettem azokat a funkcionális mérőeszközöket, amelyek az agy eltérő léptékű aktivitási mintázatait képesek lekövetni, és egyúttal felvázoltam ezeknek a technikáknak a meghatározó limitációit. A multimodális megközelítést alkalmazó tanulmányok áttekintésével bemutattam azokat az előnyöket, amelyekkel az egyes eszközök korlátai áthidalhatóvá válhatnak.

A multimodális agyi aktivitásvizsgálat támogatására egy olyan moduláris mérési módszert fejlesztettem, mely lehetőséget nyújthat a nagyobb testű preklinai fajok neurális aktivitásának lekövetésére az egyes sejtektől egészen a kiterjedt idegi hálózatokig. A létrehozott implantátumrendszer működőképességét validáltam altatott és éber multimodális aktivitásmérési kísérletekben.

A konstrukció lehetővé tette, hogy mezoskálás méréseket végezhessünk szabadon viselkedő állatokban az eddig bevett fMRI módszerhez képest egy nagyságrenddel jobb téridőbeli felbontással. A fUS képalkotás segítségével összekapcsoltam az agy strukturális és funkcionális leírására alkalmas mérési módszereket, így azonosítani tudtuk a stimuláció által kiváltott neurális válasz eredetét.

6. Jövőbeli tervek

A következő periódusban a multimodális implantátumrendszer lehetséges alkalmazásait szeretnénk teljeskörűen kihasználni.

Az optikai módszerek, valamint a genetikai célzással szelektíven jelölő GCaMP kalcium szenzorok bevonásával a vizuális rendszer funkcionális kapcsolatainak mikroszkopikus és mezoszkopikus kapcsolatainak feltérképezését tűztük ki célul. Ezen vállalkozásban az optogenetikai eszközök jelentős szerepet játszhatnak, hiszen az idegsejtípusok szelektív gerjesztésével vagy gátlásával lényeges bővíthetnek ismereteink az egyes típusok hálózatban betöltött szerepéről.

A mezoszkopikus skálán a funkcionális ultrahangot alkalmazzuk, hogy a kéreg felszínére korlátozódó optikai képalkotást a mélyebben fekvő régiókra is kiterjesszük. A kortikális és szubkortikális régiók közötti kapcsolatok dinamikájának vizsgálatával szeretnénk betekintést nyerni olyan fejlődési rendellenességeknek az idegi hátterébe, mint például az tompalátás [71].

A motorizált fUS-t felhasználjuk, hogy a teljes kraniális ablak szkennelésével egy háromdimenziós térképet készítsünk az agyi érhálózatról. Terveink szerint ezt a térképet alkalmazzuk az angiográfiás MR felvételek és az aktivitási térképek pontosabb, automatizált illesztésére.

Emellett, figyelembe véve a multimodális képalkotás egyre nagyobb népszerűségét, szeretném megosztani a parametrizálható, 3D design fájlokat és a pontos eljárást a nagyobb tudományos közösséggel.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Dr. Hillier Dánielnek, aki időt, energiát és fáradságot nem kímélve segítette a munkámat és aki nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönetet mondok Vidnyánszky Zoltánnak, illetve Homolya Istvánnak, hogy lehetővé tették az MR felvételek elkészítését, valamint Alan Urbannak, Dries Kilnek és Gabriel Montaldonak, akik nélkülözhetetlen támogatást nyújtottak a fUS kísérletek elvégzéséhez. Külön köszönet illeti a kutatócsoport tagjait, külön kiemelve Horváth Domonkost, Julio Loerát, Petik Ábelt, Gintner Kingát és Spitzer Klaudiát, akik tapasztalataikkal, ötleteikkel nagyban hozzájárultak a munkámhoz. Továbbá szeretném megköszönni Márton Gergelynek és Ulbert Istvánnak a pártfogását. Emellett hálás vagyok az Új Nemzeti Kiválósági Programnak, hogy ösztöndíj-támogatásukkal elősegítették ennek a munkának a létrejöttét.

Irodalomjegyzék

- [1] S. Ogawa, T. M. Lee, A. S. Nayak, and P. Glynn, 'Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields', *Magn. Reson. Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 68–78, Apr. 1990, doi: 10.1002/mrm.1910140108.
- [2] P. Osten and T. W. Margrie, 'Mapping brain circuitry with a light microscope', *Nat. Methods*, vol. 10, no. 6, pp. 515–523, Jun. 2013, doi: 10.1038/nmeth.2477.
- [3] 'A high-throughput neurohistological pipeline for brain-wide mesoscale connectivity mapping of the common marmoset | eLife'. <https://elifesciences.org/articles/40042> (accessed Nov. 07, 2021).
- [4] J. M. Soares *et al.*, 'A Hitchhiker's Guide to Functional Magnetic Resonance Imaging', *Front. Neurosci.*, vol. 10, p. 515, 2016, doi: 10.3389/fnins.2016.00515.
- [5] J. C. Gore, 'Principles and practice of functional MRI of the human brain', *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 1, pp. 4–9, Jul. 2003, doi: 10.1172/JCI19010.
- [6] W. B. Jung, G. H. Im, H. Jiang, and S.-G. Kim, 'Early fMRI responses to somatosensory and optogenetic stimulation reflect neural information flow', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, no. 11, p. e2023265118, Mar. 2021, doi: 10.1073/pnas.2023265118.
- [7] Y.-R. Gao *et al.*, 'Time to wake up: Studying neurovascular coupling and brain-wide circuit function in the un-anesthetized animal', *NeuroImage*, vol. 153, pp. 382–398, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.11.069.
- [8] J. A. King *et al.*, 'Procedure for minimizing stress for fMRI studies in conscious rats', *J. Neurosci. Methods*, vol. 148, no. 2, pp. 154–160, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.jneumeth.2005.04.011.
- [9] J. Paasonen, P. Stenroos, R. A. Salo, V. Kiviniemi, and O. Gröhn, 'Functional connectivity under six anesthesia protocols and the awake condition in rat brain', *NeuroImage*, vol. 172, pp. 9–20, May 2018, doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.01.014.
- [10] G. Krishnamoorthy-Natarajan and M. Koide, 'Chapter Eleven - BK Channels in the Vascular System', in *International Review of Neurobiology*, vol. 128, C. Contet, Ed. Academic Press, 2016, pp. 401–438. doi: 10.1016/bs.irn.2016.03.017.
- [11] Péter B., 'az Orvosi Laboratóriumi és Képzőképző Diagnosztikai Analitikus alapszak hallgatói részére', p. 340.
- [12] R. Moorthy, 'DOPPLER ULTRASOUND', *Med. J. Armed Forces India*, vol. 58, no. 1, pp. 1–2, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0377-1237(02)80001-6.
- [13] E. Mace, G. Montaldo, B. Osmanski, I. Cohen, M. Fink, and M. Tanter, 'Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles', *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 60, no. 3, pp. 492–506, Mar. 2013, doi: 10.1109/TUFFC.2013.2592.
- [14] M. Tanter and M. Fink, 'Ultrafast imaging in biomedical ultrasound', *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 61, no. 1, pp. 102–119, 0 2014, doi: 10.1109/TUFFC.2014.6689779.
- [15] E. Macé, G. Montaldo, I. Cohen, M. Baulac, M. Fink, and M. Tanter, 'Functional ultrasound imaging of the brain', *Nat. Methods*, vol. 8, no. 8, pp. 662–664, Aug. 2011, doi: 10.1038/nmeth.1641.
- [16] C. Demeñé *et al.*, 'Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns', *Sci. Transl. Med.*, vol. 9, p. eaah6756, Oct. 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aah6756.
- [17] E. Macé, G. Montaldo, I. Cohen, M. Baulac, M. Fink, and M. Tanter, 'Functional ultrasound imaging of the brain', *Nat. Methods*, vol. 8, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2011, doi: 10.1038/nmeth.1641.
- [18] É. Macé *et al.*, 'Whole-Brain Functional Ultrasound Imaging Reveals Brain Modules for Visuomotor Integration', *Neuron*, vol. 100, no. 5, pp. 1241–1251.e7, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.031.
- [19] T. N. A. Dinh, W. B. Jung, H.-J. Shim, and S.-G. Kim, 'Characteristics of fMRI responses to visual stimulation in anesthetized vs. awake mice', *NeuroImage*, vol. 226, p. 117542, 0 2021, doi: 10.1016/j.neuroimage.2020.117542.
- [20] G. Pinton, J.-F. Aubry, E. Bossy, M. Muller, M. Pernot, and M. Tanter, 'Attenuation, scattering, and absorption of ultrasound in the skull bone', *Med. Phys.*, vol. 39, no. 1, pp. 299–307, 0 2012, doi: 10.1118/1.3668316.
- [21] C. Errico, B.-F. Osmanski, S. Pezet, O. Couture, Z. Lenkei, and M. Tanter, 'Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler', *Neuroimage*, vol. 124, no. Pt A, pp. 752–761, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.09.037.
- [22] C. Brunner, M. Grillet, A. Urban, B. Roska, G. Montaldo, and E. Macé, 'Whole-brain functional ultrasound imaging in awake head-fixed mice', *Nat. Protoc.*, vol. 16, no. 7, pp. 3547–3571, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41596-021-00548-8.
- [23] Y. Ma *et al.*, 'Wide-field optical mapping of neural activity and brain haemodynamics: considerations and novel approaches', *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 371, no. 1705, p. 20150360, Oct. 2016, doi: 10.1098/rstb.2015.0360.

- [24] R. D. Frostig, E. E. Lieke, D. Y. Ts'o, and A. Grinvald, 'Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 16, pp. 6082–6086, Aug. 1990.
- [25] K. Sato, T. Nariai, Y. Momose-Sato, and K. Kamino, 'Intraoperative intrinsic optical imaging of human somatosensory cortex during neurosurgical operations', *Neurophotonics*, vol. 4, no. 3, p. 031205, Jul. 2017, doi: 10.1117/1.NPh.4.3.031205.
- [26] A. Grinvald, E. Lieke, R. D. Frostig, C. D. Gilbert, and T. N. Wiesel, 'Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals', *Nature*, vol. 324, no. 6095, pp. 361–364, Nov. 1986, doi: 10.1038/324361a0.
- [27] K. A. Morone, J. S. Neimat, A. W. Roe, and R. M. Friedman, 'Review of functional and clinical relevance of intrinsic signal optical imaging in human brain mapping', *Neurophotonics*, vol. 4, no. 3, p. 031220, Jul. 2017, doi: 10.1117/1.NPh.4.3.031220.
- [28] 'VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics | Nature Reviews Neuroscience'. <https://www.nature.com/articles/nrn1536> (accessed Oct. 31, 2021).
- [29] D. J. O'Shea *et al.*, 'The need for calcium imaging in nonhuman primates: New motor neuroscience and brain-machine interfaces', *Exp. Neurol.*, vol. 287, pp. 437–451, 0 2017, doi: 10.1016/j.expneurol.2016.08.003.
- [30] T.-W. Chen *et al.*, 'Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity', *Nature*, vol. 499, no. 7458, pp. 295–300, Jul. 2013, doi: 10.1038/nature12354.
- [31] E. Seidemann *et al.*, 'Calcium imaging with genetically encoded indicators in behaving primates', *eLife*, vol. 5, p. e16178, doi: 10.7554/eLife.16178.
- [32] M. Markicevic, I. Savvateev, C. Grimm, and V. Zerbi, 'Emerging imaging methods to study whole-brain function in rodent models', *Transl. Psychiatry*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41398-021-01575-5.
- [33] F. Helmchen and W. Denk, 'Deep tissue two-photon microscopy', *Nat. Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 932–940, Dec. 2005, doi: 10.1038/nmeth818.
- [34] N. J. Sofroniew, D. Flickinger, J. King, and K. Svoboda, 'A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for in vivo imaging', *eLife*, vol. 5, p. e14472, Jun. 2016, doi: 10.7554/eLife.14472.
- [35] 'Three-photon head-mounted microscope for imaging deep cortical layers in freely moving rats | Nature Methods'. <https://www.nature.com/articles/s41592-020-0817-9> (accessed Nov. 04, 2021).
- [36] M. Plöschner, T. Tyc, and T. Čížmár, 'Seeing through chaos in multimode fibres', *Nat. Photonics*, vol. 9, no. 8, pp. 529–535, Aug. 2015, doi: 10.1038/nphoton.2015.112.
- [37] C. Lee, A. Lavoie, J. Liu, S. X. Chen, and B. Liu, 'Light Up the Brain: The Application of Optogenetics in Cell-Type Specific Dissection of Mouse Brain Circuits', *Front. Neural Circuits*, vol. 14, p. 18, 2020, doi: 10.3389/fncir.2020.00018.
- [38] 'Molecular Tools and Approaches for Optogenetics'. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3529099/> (accessed Nov. 30, 2020).
- [39] S. Zhao *et al.*, 'Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity', *Brain Cell Biol.*, vol. 36, no. 1–4, pp. 141–154, Aug. 2008, doi: 10.1007/s11068-008-9034-7.
- [40] P. Mahmoudi, H. Veladi, and F. G. Pakdel, 'c Applications in Neurobiology', *J. Med. Signals Sens.*, vol. 7, no. 2, pp. 71–79, 2017.
- [41] K. T. Vann and Z.-G. Xiong, 'Optogenetics for neurodegenerative diseases', *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, Apr. 2016.
- [42] D. Zhu *et al.*, 'Fusing DTI and fMRI Data: A Survey of Methods and Applications', *NeuroImage*, vol. 102 Pt 1, pp. 184–191, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.09.071.
- [43] S. H. Park, B. E. Russ, D. B. T. McMahon, K. W. Koyano, R. A. Berman, and D. A. Leopold, 'Functional subpopulations of neurons in a macaque face patch revealed by single-unit fMRI mapping', *Neuron*, vol. 95, no. 4, pp. 971–981.e5, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.014.
- [44] M. E. Hasselmo, E. T. Rolls, and G. C. Baylis, 'The role of expression and identity in the face-selective responses of neurons in the temporal visual cortex of the monkey', *Behav. Brain Res.*, vol. 32, no. 3, pp. 203–218, Apr. 1989, doi: 10.1016/S0166-4328(89)80054-3.
- [45] E. M. Lake *et al.*, 'Spanning spatiotemporal scales with simultaneous mesoscopic Ca²⁺ imaging and functional MRI', Nov. 2018, doi: 10.1101/464305.
- [46] D. Barson *et al.*, 'Simultaneous mesoscopic and two-photon imaging of neuronal activity in cortical circuits', *Nat. Methods*, vol. 17, no. 1, pp. 107–113, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41592-019-0625-2.
- [47] W. E. Allen *et al.*, 'Global Representations of Goal-Directed Behavior in Distinct Cell Types of Mouse Neocortex', *Neuron*, vol. 94, no. 4, pp. 891–907.e6, May 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.04.017.

- [48] A. Stroh *et al.*, ‘Making Waves: Initiation and Propagation of Corticothalamic Ca²⁺ Waves In Vivo’, *Neuron*, vol. 77, no. 6, pp. 1136–1150, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.031.
- [49] J. T. Paz *et al.*, ‘Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury’, *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 1, pp. 64–70, Jan. 2013, doi: 10.1038/nn.3269.
- [50] M. A. Busche *et al.*, ‘Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer’s disease models’, *Nat. Neurosci.*, vol. 18, no. 11, pp. 1623–1630, Nov. 2015, doi: 10.1038/nn.4137.
- [51] A. Sans-Dublanc *et al.*, ‘Brain-wide mapping of neural activity mediating collicular-dependent behaviors’, *bioRxiv*, p. 2020.08.09.242875, Aug. 2020, doi: 10.1101/2020.08.09.242875.
- [52] K. Uludağ and A. Roebroeck, ‘General overview on the merits of multimodal neuroimaging data fusion’, *NeuroImage*, vol. 102, pp. 3–10, 0 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.05.018.
- [53] V. D. Calhoun and J. Sui, ‘Multimodal Fusion of Brain Imaging Data: A Key to Finding the Missing Link(s) in Complex Mental Illness’, *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging*, vol.1, no. 3, pp. 230–244, May 2016, doi: 10.1016/j.bpsc.2015.12.005.
- [54] R. F. Ahmad, A. S. Malik, N. Kamel, and F. Reza, ‘EEG-fMRI combination for better understanding of brain functions: Pros and cons’, in *2015 IEEE International Conference on Signal and Image Processing Applications (ICSIPA)*, Oct. 2015, pp. 278–281. doi: 10.1109/ICSIPA.2015.7412204.
- [55] N. M. Dotson, S. J. Hoffman, B. Goodell, and C. M. Gray, ‘A Large-Scale Semi-Chronic Microdrive Recording System for Non-Human Primates’, *Neuron*, vol. 96, no. 4, pp. 769–782.e2, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.050.
- [56] E. Trautmann *et al.*, ‘Dendritic calcium signals in rhesus macaque motor cortex drive an optical brain-computer interface’, *Nat. Commun.*, vol. 12, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-23884-5.
- [57] D. H. Hubel and T. N. Wiesel, ‘Receptive fields of single neurones in the cat’s striate cortex’, *J. Physiol.*, vol. 148, no. 3, pp. 574–591, Oct. 1959.
- [58] J. M. Johnston *et al.*, ‘Recent refinements to cranial implants for rhesus macaques (*Macaca mulatta*)’, *Lab Anim.*, vol. 45, no. 5, pp. 180–186, May 2016, doi: 10.1038/labani.997.
- [59] ‘1" Format Lenses - Navitar MachineVision Lenses’, *Navitar*.
<https://navitar.com/products/imaging-optics/low-magnification-video/navitar-machine-vision/nmv-1/> (accessed Nov. 09, 2021).
- [60] ‘XLPLN-MP/XLSLPLN-MP | Multiphoton Excitation Dedicated Objectives | Olympus LS’.
<https://www.olympus-lifescience.com/en/objectives/multiphoton/> (accessed Nov. 09, 2021).
- [61] A. Urban, C. Dussaux, G. Martel, C. Brunner, E. Mace, and G. Montaldo, ‘Real-time imaging of brain activity in freely moving rats using functional ultrasound’, *Nat. Methods*, vol. 12, no. 9, pp.873–878, Sep. 2015, doi: 10.1038/nmeth.3482.
- [62] A. Dizeux *et al.*, ‘Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates’, *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 1400, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09349-w.
- [63] C. Brunner *et al.*, ‘A Platform for Brain-wide Volumetric Functional Ultrasound Imaging and Analysis of Circuit Dynamics in Awake Mice’, *Neuron*, vol. 108, no. 5, pp. 861–875.e7, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.neuron.2020.09.020.
- [64] X. Chen, J. K. Possel, C. Wacogne, A. F. van Ham, P. C. Klink, and P. R. Roelfsema, ‘3D printing and modelling of customized implants and surgical guides for non-human primates’, *J. Neurosci. Methods*, vol. 286, pp. 38–55, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.05.013.
- [65] D. Stolzberg, C. Wong, B. E. Butler, and S. G. Lomber, ‘Atlas: An magnetic resonance imaging-based three-dimensional cortical atlas and tissue probability maps for the domestic cat (*Felis catus*)’, *J. Comp. Neurol.*, vol. 525, no. 15, pp. 3190–3206, 2017, doi: 10.1002/cne.24271.
- [66] ‘LA201S06-B-TDBA - Non-captive linear actuator –… | NANOTEC’.
<https://en.nanotec.com/products/2603-la201s06-b-tdba> (accessed Nov. 10, 2021).
- [67] ‘Stepper with Arduino Motor Shield Rev3 Tutorial (4 Examples)’, *Makerguides.com*, Mar. 27, 2019.
<https://www.makerguides.com/arduino-motor-shield-stepper-motor-tutorial/> (accessed Nov. 10, 2021).
- [68] C. Heo *et al.*, ‘A soft, transparent, freely accessible cranial window for chronic imaging and electrophysiology’, *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, Art. no. 1, Jun. 2016, doi: 10.1038/srep27818.
- [69] L.-A. Sieu *et al.*, ‘EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats’, *Nat. Methods*, vol. 12, no. 9, Art. no. 9, Sep. 2015, doi: 10.1038/nmeth.3506.
- [70] ‘TPX® polymethylpentene (PMP): A Novel Polymer Now Available in Small Quantities | Goodfellow’.
<http://www.goodfellow.com/corporate/news/UK/Feb-2011/tpx-feb2011.htm> (accessed Nov. 30, 2020).
- [71] E. Bui Quoc and C. Milleret, ‘Origins of strabismus and loss of binocular vision’, *Front. Integr. Neurosci.*, vol. 8, p. 71, Sep. 2014, doi: 10.3389/fnint.2014.00071.