

System do wielokanałowej rejestracji elektrycznej aktywności tkanki nerwowej In Vivo z użyciem matryc mikroelektrod

Streszczenie. W artykule opisano system do wielokanałowej rejestracji elektrycznej aktywności tkanki nerwowej In Vivo z użyciem matrycy mikroelektrod. System został oparty na dedykowanym scalonym układzie kondycjonującym. Przedstawiono specyfikę sygnałów neuronowych, metodę ich rejestracji z wykorzystaniem matrycy mikroelektrod, wymagania stawiane systemowi rejestrującemu oraz budowę samego systemu. Szczególną uwagę poświęcono metodom redukcji zakłóceń generowanych przez cyfrową część systemu. Artykuł zawiera również wyniki neurobiologicznych eksperymentów in-vivo zarejestrowane z użyciem opisywanego systemu.

Abstract. The article describes a system for multi-channel recording of electrical activity of nerve tissue In Vivo by using microelectrode arrays. Specificity of neural signals, the method of registration by using microelectrode arrays, requirements for acquisition system and the system itself are presented. Particular attention is given to methods of reduction of noise generated by the digital part of the system. The article also presents results of in-vivo recording realized by the presented system. (**System for multi-channel recording of electrical activity of nerve tissue In Vivo by microelectrode array usage**).

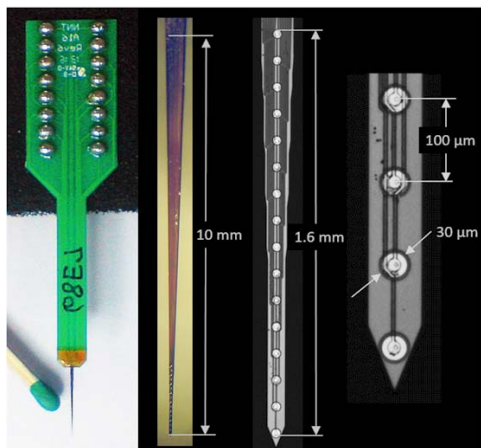
Słowa kluczowe: układ scalony, sygnały neuronowe, tkanka nerwowa, akwizycja sygnałów, kondycjonowanie sygnałów.

Keywords: integrated circuit, neural signals, nerve tissue, signal acquisition, signal conditioning.

doi:10.12915/pe.2014.05.42

Wstęp

Badanie aktywności elektrycznej tkanki nerwowej a w szczególności mózgu oprócz waloru poznawczego ma również aspekt praktyczny. Dzięki postępowi w technologii BIOMEMS (z ang. biomedical microelectromechanical systems) możliwa stała się jednoczesna rejestracja elektrycznej aktywności tkanki nerwowej z kilkudziesięciu lub nawet kilkuset punktów. Rejestracja ta odbywa się za pomocą matryc mikroelektrod (z ang. microelectrode arrays, MEA). Wyróżnia się dwa główne rodzaje MEA, a mianowicie płaskie i penetrujące (Rys. 1), odpowiadające dwóm różnym technikom pomiarowym, tzn. In Vitro i In Vivo.



Rys. 1 Penetracyjna matryca mikroelektrod firmy NeuroNexus

W metodzie In Vitro tkanka nerwowa jest hodowana lub umieszczana, po wcześniejszym wypreparowaniu z mózgu, na płaskiej MEA [1]. Z kolei w metodzie In Vivo penetrująca MEA wprowadzana jest bezpośrednio do mózgu zwierzęcia. Zaletą tej metody jest pomiar elektrycznej aktywności tkanki nerwowej w jej naturalnych warunkach. Pozwala ona również, w odróżnieniu od metody In Vitro na rejestracje chroniczne (długotrwałe) na swobodnie poruszającym się zwierzęciu.

Sygnały neuronowe

Rozróżnia się dwa główne rodzaje sygnałów neuronowych. Pierwsze to potencjały czynnościowe (ang. Action Potentials, AP), czyli sygnały generowane przez

pojedyncze neurony. Mają one postać impulsu składającego się z dwóch faz o przeciwnych polaryzacjach. Pierwsza faza, o ujemnej polaryzacji trwa zwykle 0.5 ms, druga, o dodatniej polaryzacji trwa zwykle 1.5 ms. Częstotliwość AP nie przekracza zwykle 100 Hz. Maksymalna amplituda AP nie przekracza zwykle 1 mV. Minimalna amplituda AP rejestrowanych za pomocą mikroelektrod i odróżnialnych od szumów jest uwarunkowana głównie przez szumy własne elektrody, szumy środowiska biologicznego i wzmacniaczy, i wynosi ok. 50 μ V. Druga grupa sygnałów neuronowych to potencjały polowe (ang. Local Field Potentials, LFP). Są one sumarycznym efektem aktywności tysięcy komórek w obszarze o promieniu ok. 200 – 500 μ m wokół elektrody. Amplituda LFP może dochodzić nawet do kilku mV a zakres częstotliwości rozciąga się od wartości poniżej 1Hz do 100Hz [2, 3].

Kondycjonowanie sygnałów neuronowych

Ze względu na swoją specyfikę sygnały AP i LFP zarejestrowane za pomocą MEA wymagają zastosowania układów kondycjonujących. W pierwszej kolejności od sygnału z mikroelektrody musi zostać odjęte napięcie offsetu, które powstaje na styku elektroda-tkanka. Jego wartość może wynosić nawet kilkaset mV, co może doprowadzić do nasycenia wzmacniacza. Układ kondycjonujący powinien zapewniać co najmniej 100-krotne wzmocnienie sygnału tak aby dopasować jego amplitudę do zakresu wejściowego typowego przetwornika A/C. Dodatkowo impedancja wejściowa układu powinna kilkakrotnie przekraczać impedancję mikroelektrod, która wynosi zwykle ok. 1 M Ω . Pasma przepustowe układu powinny pozwalać na rejestrację zarówno AP jak i LFP, czyli powinny rozciągać się od dziesiątych części Hz do kilku kHz. Ponadto rejestracje z użyciem MEA wymagają układów kondycjonujących składających się z przynajmniej kilkudziesięciu kanałów o jak najbardziej powtarzalnych parametrach (impedancja wejściowa, wzmocnienie, pasmo przepustowe).

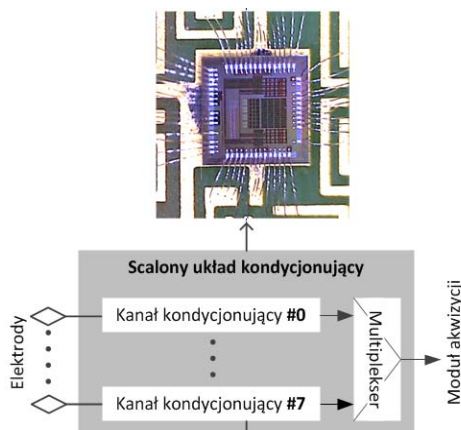
Scalone układy kondycjonujące

Układ kondycjonujący spełniający opisane wymagania może być stosunkowo łatwo zbudowany z elementów dyskretnych dla MEA składających się z kilkunastu mikroelektrod. Jednakże podobne podejście w przypadku

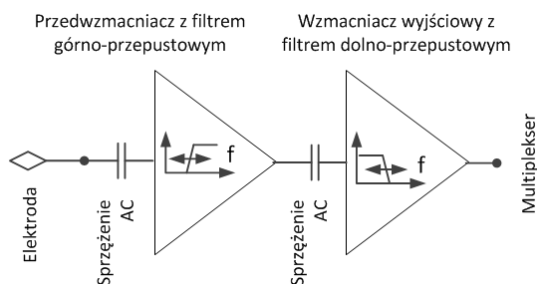
MEA zawierających dziesiątki lub nawet setki mikroelektrod jest niepraktyczne z powodu rozmiarów układu kondycjonującego. Naturalnym rozwiązaniem tej kwestii jest zatem zastosowanie układów scalonych typu ASIC (z ang. Application Specific Integrated Circuit) zbudowanych w oparciu o submikronowe technologie VLSI (z ang. Very Large Scale Integration). Pozwalają one na jednej strukturze krzemowej, o rozmiarach rzędu kilkunastu do kilkudziesięciu milimetrów kwadratowych, zmieścić obwody elektroniczne zdolne do kondycjonowania sygnałów neuronowych z kilkudziesięciu mikroelektrod [4,5]. Co więcej, otwierają one drogę do budowy systemów pozwalających na wielokanałową rejestrację bezprzewodową [6].

Scalony układ kondycjonujący

Podstawowe założenia dotyczące układu kondycjonującego zostały przedstawione uprzednio. Wykonany w technologii scalonej VLSI układ kondycjonujący składa się z ośmiu kanałów kondycjonujących oraz multiplexera analogowego [7] (Rys. 2). Zadaniem multiplexera jest ograniczenie do jednej liczby linii wychodzących z układu. Pojedynczy kanał kondycjonujący (Rys. 3) składa się z układu odcięcia składowej stałej sygnału (sprężenie AC), niskosumownego przedwzmacniacza pełniącego jednocześnie rolę filtra pasmowego, oraz dwóch wzmacniaczy wyjściowych odpowiednio dla sygnałów AP i LFP [3]. Wzmacniacze te pełnią również funkcje filtrów odpowiednio górno i dolnoprzepustowych. W przedstawionym systemie wykorzystuje się tylko wzmacniacz z sygnałów AP.



Rys. 2 Schemat blokowy oraz zdjęcie scalonego układu kondycjonującego



Rys. 3 Schemat blokowy pojedynczego kanału kondycjonującego

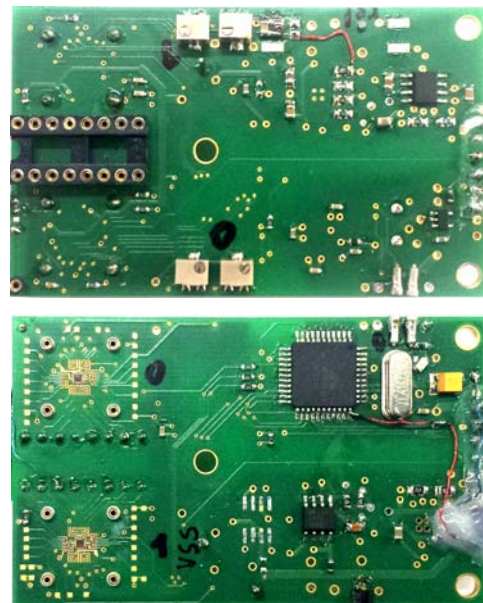
Impedancja wejściowa przedwzmacniacza dla częstotliwości 1 kHz wynosi ok. 16 M Ω a wzmacnienie napięciowe ok 50 V/V. Dolna częstotliwość odcięcia może być ustawiana cyfrowo w zakresie od 0.1Hz do 50Hz. Co ważne wspomniane ustawienia są indywidualne dla każdego kanału kondycjonującego, co pozwala

zminimalizować rozrzuty dolnej częstotliwości odcięcia. Wartość górnej częstotliwości odcięcia jest wspólna dla wszystkich kanałów i jest ustalana za pomocą zewnętrznego rezystora. Zadaniem sprężenia AC pomiędzy wzmacniaczami jest odcięcie składowej stałej sygnału z przedwzmacniacza, która mogłaby prowadzić do nasycenia wzmacniacza wyjściowego. Zadaniem wzmacniacza wyjściowego jest dopasowanie amplitudy sygnału do zakresu pomiarowego przetwornika A/C. Wzmacniacz pozwala na ustawienie wzmacnienia ok. 4 V/V odpowiedniego dla sygnałów LFP i ok. 10 V/V odpowiedniego dla sygnałów AP.

Moduł kondycjonujący

Architektura

Zadaniem modułu kondycjonującego (Rys. 4 i 10) jest kondycjonowanie sygnałów rejestrowanych za pomocą 16-o elektrodowej matrycy elektrod. Moduł składa się z dwóch opisanych wyżej scalonych układów kondycjonujących wraz z układami zasilającymi (dwa niskosumne stabilizatory napięcia typu LDO) oraz z kontrolera modułu (mikrokontrolera) wraz z układem zasilającym (stabilizator napięcia typu LDO).

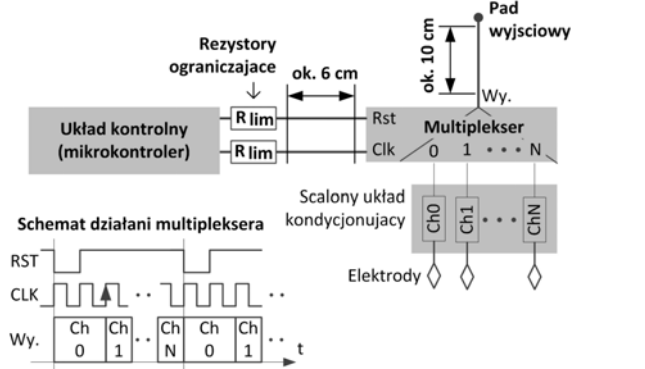


Rys. 4 Zdjęcia modułu kondycjonującego. Na zdjęciu górnym po lewej stronie widoczne jest gniazdo do podłączenia elektrody penetracyjnej. Na zdjęciu dolnym po lewej stronie widoczne są dwa scalone układy kondycjonujące, zaś w prawym górnym rogu kontroler modułu, w prawym dolnym rogu układy zasilające scalonych układów kondycjonujących.

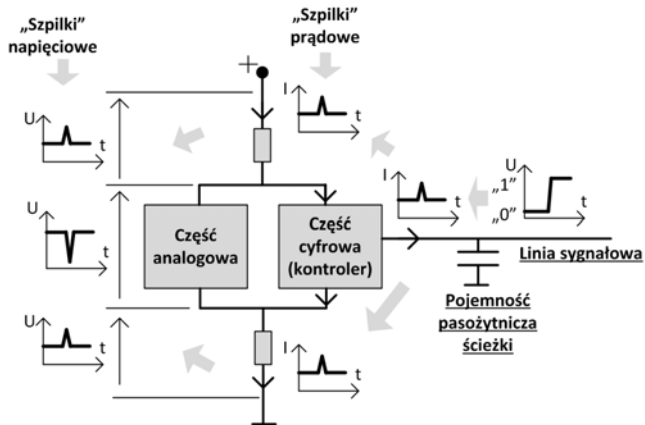
Redukcja zakłóceń

Jedną z podstawowych kwestii, która musiała zostać rozwiązana podczas projektowania systemu, była kwestia ograniczenia wpływu zakłóceń generowanych przez układ kontrolny na rejestrowane sygnały. Należy pamiętać, że szumy własne układu kondycjonującego są rzędu kilku μ V a co za tym idzie brak odpowiedniej profilaktyki przeciwzakłóceńowej może prowadzić do znacznej degradacji współczynnika SNR (z ang. Signal to Noise Ratio) sygnału. Jak już wspomniano głównym źródłem zakłóceń w module może stać się układ kontrolny. Jednym z jego zadań jest generowanie sygnału zegara dla multiplexera oraz programowanie układów scalonych na potrzeby konkretnego eksperymentu. Sygnał ten powodują przełączanie wyjścia multiplexera między kolejnymi kanałami (Rys. 5). W związku z tym, że wspomniany sygnał jest sygnałem cyfrowym to jego zbrocza prowadzą do

powstawania impulsowych zakłóceń na liniach zasilających kontrolera (Rys. 6). Wynikają one z istnienia pojemności pasozytniczych między ścieżką prowadzącą sygnał a ścieżkami zasilającymi. Zakłócenia te przenoszą się następnie na zasilanie scalonych układów kondycjonujących a stamtąd przedostają się do analogowych kanałów układów scalonych tym samym degradując SNR.

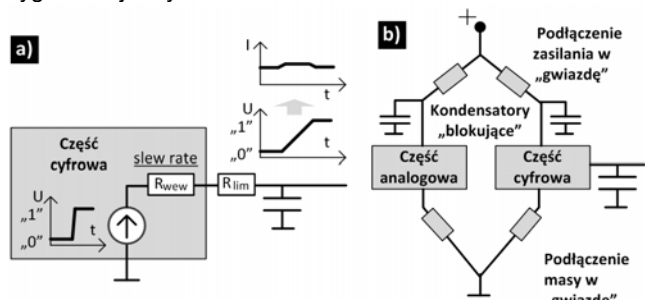


Rys. 5 Schemat sterowania multiplexerem scalonego układu kondycjonującego.



Rys. 6 Poglądowy schemat powstawania i propagacji zakłóceń cyfrowych.

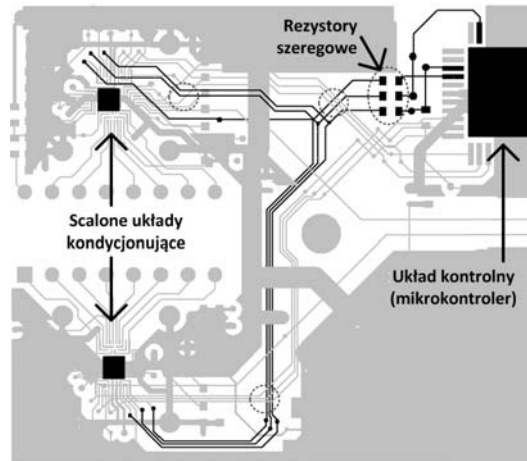
W celu minimalizacji powyższych efektów zastosowano pięć uzupełniających się metod ograniczenia zakłóceń wprowadzanych przez część cyfrową systemu. Pierwsza metoda (Rys. 7a) polega na zmniejszeniu amplitudy zakłóceń poprzez zwiększenie czasu narastania zbocza zegara. Zrealizowane jest to dzięki wstawieniu do linii sygnałowej rezystora



Rys. 7 a) Organicznie amplitudy zakłóceń poprzez zastosowanie rezystorów ograniczających amplitudę prądu. b) Ograniczenie propagacji zakłóceń cyfrowych poprzez odpowiednie prowadzenia linii zasilających oraz zastosowanie kondensatorów blokujących.

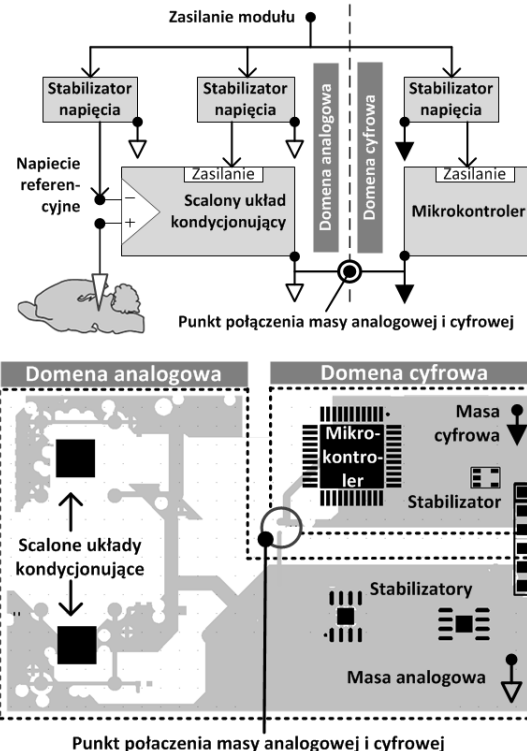
ograniczającego wartość prądu płynącego przez te linie tym samym zmniejszając tzw. „slew rate” wyjścia mikrokontrolera sterującego linią. Wartość rezystancji dobrano tak, aby pozwalała na generowanie sygnału o częstotliwości koniecznej do rejestracji sygnałów neuronowych z wymaganą częstotliwością próbkowania.

Druga metoda (Rys. 7b) polega na prowadzeniu linii zasilających kontrolera i scalonych układów kondycjonujących w sposób ograniczający do minimum długość ścieżek wspólnych dla obu zasilaiń. Z kolei trzecia metoda (Rys. 7b) polega na podłączeniu do linii zasilających mikrokontrolera, możliwie blisko wyprowadzeń, tzw. kondensatorów blokujących. Są to kondensatory o stosunkowo niskiej rezystancji szeregowej i małej pojemności. Ich zadaniem jest dostarczenie zasilania w momencie wystąpienia chwilowego zwiększenia poboru mocy (przełączenia sygnałów wyjściowych obciążonych dużymi pojemnościami pasozytniczymi). Czwarta metoda (Rys. 8) polega na takim prowadzeniu linii sterujących multiplexerem (w tym zegara) na obwodzie drukowanym by do minimum ograniczyć wartość pojemności pasozytniczych oraz przesłuchów do innych linii.

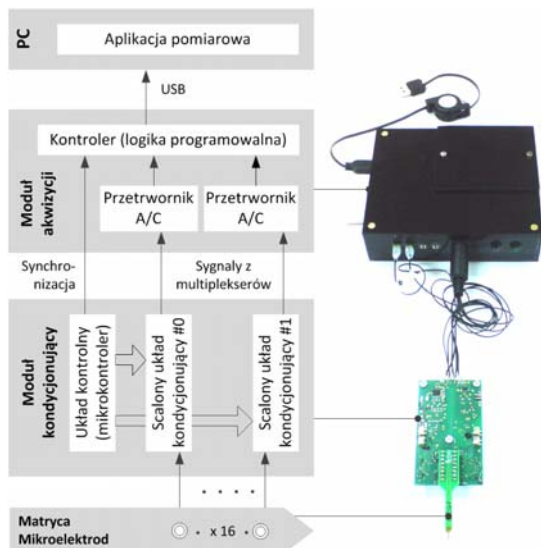


Rys. 8 Prowadzenie linii z sygnałami sterującymi multiplexerem w sposób ograniczający wartość pojemności pasozytniczych i przesłuchu do innych linii.

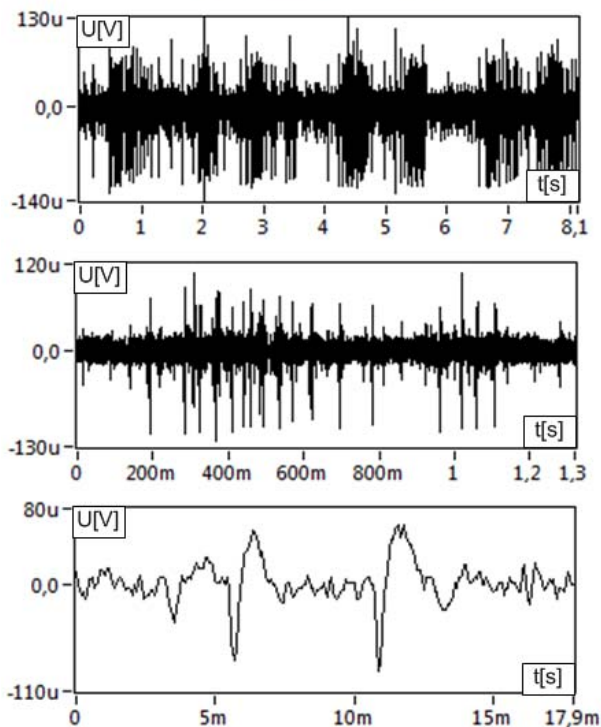
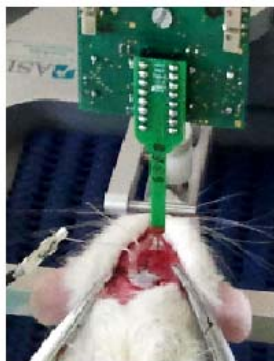
Piąta metoda polega na separacji masy części analogowej układu (układy kondycjonujące) od części cyfrowej (układ kontrolny). Szczegóły jej implementacji pokazano na rys. 9.



Rys. 9 Ograniczenie propagacji zakłóceń z układu kontrolnego poprzez separację masy cyfrowej i analogowej.



Rys. 10 Schemat blokowy oraz zdjęcie systemu do wielokanałowej rejestracji elektrycznej aktywności tkanki nerwowej z użyciem matrycy mikroelektrod.



Rys. 11 Pomiary testowe potencjałów czynnościowych z hipokampa szczura laboratoryjnego. Poszczególne przebiegi przedstawiają ten sam sygnał w różnych skalach czasowych

System pomiarowy

Kompletny system pomiarowy (Rys. 10) składa się z: Modułu kondycjonującego, Modułu akwizycji i Aplikacji pomiarowej. Zadaniem Modułu akwizycji jest zamiana rejestrowanych sygnałów neurobiologicznych z postaci analogowej na cyfrową oraz transmisja danych pomiarowych do Aplikacji Pomiarowej. Zadaniem aplikacji Pomiarowej jest prezentacja i archiwizacja pomiarów.

Testy systemu

W celu weryfikacji działania systemu przeprowadzono rejestrację potencjałów czynnościowych z części mózgu zwanej hipokamperem będącego pod narkozą szczura rasy Wistar (Rys. 11). Jakość rejestrowanych sygnałów (kształt i poziom szumów) jest porównywalna z jakością sygnałów rejestrowanych za pomocą komercyjnych systemów opartych na elementach dyskretnych. Poziom wejściowych szumów własnych systemu nie przekracza kilku μV_{RMS} .

Podsumowanie

W artykule przedstawiono projekt 16-o kanałowego systemu dedykowanego do eksperymentów in-vivo. Poruszone zostały istotne problemy związane z projektowaniem takich systemów (m.in. potrzeba budowy analogowo-cyfrowych systemów mieszanych i artefakty z tego wynikające) oraz przedstawione zostały metody minimalizujące wpływ części kontrolnej na analogową część kondycjonującą systemu. Dzięki zaprojektowanemu systemowi przeprowadzono eksperymenty in-vivo, których wyniki również zostały zaprezentowane.

Autorzy pragną podziękować Tomasz Błasiakowi z Zakładu Neurofizjologii i Chronobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

LITERATURA

- [1] Żołądź M., A system for 256-channel in vitro recording of the electrophysiological activity of brain tissue, *Metrology and Measurement Systems*, 20 (2013), nr.3, 371–384
- [2] Paul L. Nunez, Srinivasan R. (2006) *Electric Fields Of The Brain*. Oxford University Press Inc.; New York; ISBN: 0-19-505038-X.
- [3] Matt C., Shieh, J., (2010) *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press
- [4] Kmon P., Żołądź M., Gryboś P., Szczyciel R., Wielokanałowy system do rejestracji sygnałów neurobiologicznych metodami in vitro i in vivo, *Przegląd Elektrotechniczny*, 86 (2010), nr.9, 67–71
- [5] Gryboś P., Kmon P., Żołądź M., Szczyciel R., Kachel M., Lewandowski M., Błasiak T., 64 channel neural recording amplifier with tunable bandwidth in 180 nm CMOS technology, *Metrology and Measurement Systems*, 18 (2011), nr.4, 631–643
- [6] Żołądź M., Szczyciel R., Otfinowski P., Gryboś P., Integrated control unit for wireless recording of brain activity, MIXDES 2011: mixed design of integrated circuits and systems : 18th international conference : Gliwice, Poland, 16–18 June, 2011
- [7] Żołądź M., Analogowy multiplexer w technologii CMOS 180 nm do obsługi sieci neuronowych, *Przegląd Elektrotechniczny*, 68 (2010), nr.11, 256–259

Autorzy: dr Mirosław Żołądź, AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Katedra Metrologii i Elektroniki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, E-mail: zoladz@agh.edu.pl; dr Piotr Kmon, AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Katedra Metrologii i Elektroniki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, E-mail: kmon@agh.edu.pl; mgr inż. Jacek Rauza, AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Katedra Metrologii i Elektroniki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, E-mail: rauza@agh.edu.pl; prof. Paweł Gryboś, AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Katedra Metrologii i Elektroniki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, E-mail: pgrybos@agh.edu.pl