

微观脑电刺激驱动的单位活动

Stimulus Driven Single Unit Activity From Micro-Electrocorticography

John Hermiz¹, Lorraine Hossain², Ezequiel M. Arneodo³

¹*Department of Electrical and Computer Engineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, United States,*

²*Department of Materials Science and Engineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, United States,*

³*Biocircuits Institute, University of California, San Diego, La Jolla, CA, United States*

Accepted: 14 January 2020 by frontiers in Neuroscience

(translated by zang jie)

摘要：对神经活动的高保真测量可以使我们对诸如交流，听觉和语言之类的复杂行为的神经基础的理解有所进步，对于开发能够解决由于疾病或伤害而导致这些能力受损的神经假体至关重要。我们开发了一种新颖的高分辨率薄膜微电皮层照相术（micro-ECOG）阵列，该阵列可对鸣禽的神经活动进行高保真表面测量，而鸣禽是研究语音行为的成熟动物模型。使用此设备，我们提供了表面记录的单个单元响应的感官诱发调制的第一个演示。我们建立了在麻醉的欧洲starlings的感觉运动核HVC（专有名称）表面上的微型ECOG电极，其能够始终感测到单个单位的活动，并验证了在表面和深度同时记录的单个单位中的相关发放。结果为从皮质下结构表面进行高保真记录提供了平台，这将加速神经生理学研究以及新型电极阵列和神经假体的开发。

关键词：脑电图；脑机接口；神经接口；鸟鸣；动作电位

1、引言

鸣鸟（Oscines）是研究言语和听觉过程的神经基础的重要动物模型，因为它们的歌曲与人类的言语和语言具有许多共同的特征（Brainard 和 Doupe, 2002; Nottebohm, 2005; Bolhuis 和 Gahr, 2006; Pfenning 等人, 2014）。像人类的语音一样，鸟鸣是一种博学的行为，可以具有复杂的时间和成分结构。此外，鸣鸟的声音产生和声音解剖学的生物力学与人类和一些非人类的灵长类动物相似

（Titze, 1988; Gardner 等, 2001; Takahashi 等, 2015）。高分辨率和高保真的神经活动观察使我们对神经回路如何引起这些复杂的声音行为的理解取得了进展。这种对神经活动的看法还可以对鸣鸟进行脑机接口研究，从而为患有言语和运动障碍的个体快速开发和验证皮质驱动的言语假体原型提供了一条途径。

最近，微米级皮层照相技术（micro-ECoG）成为记录和刺激大脑的有前途的工具。考虑到这些电极不需要穿透大脑，它们提供了实现广泛空间覆盖的能力，同时又将脑组织的扰动降至最低。电极制造中的技术创新催生了薄膜电极，该薄膜电极进一步减少了这些电极阵列所占据的体积，并导致电极紧密贴合大脑表面（Khodagholy 等人, 2011, 2015, 2016; Ganji 等人, 2018）。用于构建这些设备的平面制造工艺允许以任意配置和微米级任意接触几何形状排列的高密度电极阵列。随着接触直径减小到 10s 微米，这些阵列可以进行焦点记录，但也会导致更大的阻抗，因此，增加的测量噪声可能会降低感知神经信号的能力

（Lempkaetal, 2011）。幸运的是，电极材料和涂层的进步改善了这些设备的电性能，从而可以在不影响记录生理信号的能力的情况下缩小触点尺寸。一种很有前途的涂层是聚（3,4-乙二氧基噻吩）——聚（苯乙烯磺酸盐）（PEDOT: PSS），一种有机聚合物，可以旋铸到电极上以大大降低阻抗，增强电极记录神经活动和增强神经活动的能力。刺激大脑（Khodagholy 等人, 2011; Ganji 等人, 2017a, b, 2018）。

微型脑皮层造影术可以补充其他神经接口技术，例如穿透电极阵列（PEA）。例如，穿透性的层状小腿型探针提供了出色的分辨率，并通常用于神经生理学研究中（例如 Fukushima 等人, 2015; Kozlov 和 Gentner, 2016; Vyssotski 等人, 2016），但缺乏广泛的空间覆盖范围。这些 PEA 可以在不同深度进行空间采样，可以与微 ECoG 电极阵列结合使用，该电极阵列在大脑表面具有广泛的覆盖范围，从而获得对神经动力学以及在该区域感应到的局部场电位的生理起源的新见解。表面（Suzuki 和 Larkum, 2017 年; Konerding 等人, 2018 年）。Micro-ECoG 还可以提供高空间分辨率。例如，从人皮层植入的亚毫米间距微型 ECoG 设备记录的 70-110Hz 频带内的集成信号功率比来自更粗间隔的网格的记录提供了更多有关大脑状态的信息（Hermiz 等人, 2018）。临床和啮齿动物实验的演示提供

了概念证明，即微型 ECoG 设备具有从皮质表面记录单个单位活性的潜力（Khodagholi 等人，2015，2016）。

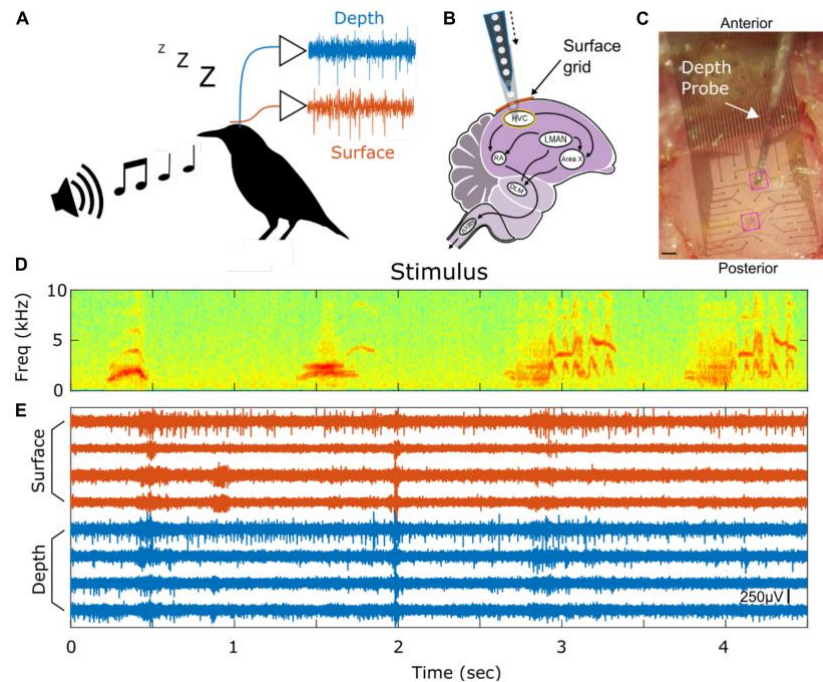


图 1 实验范式和示例峰值活动。(A) 听觉刺激被呈现给麻醉的 Starlings，同时从表面（红色）和深度（蓝色）探针同时记录细胞外电压波形。(B) 将微型 ECoG 表面阵列放置在 HVC 上，并将 PEA 深度探头插入 HVC。如鸣禽电路示意图所示，HVC 在人声产生途径的顶部（HVC，用作专有名称；RA，是前健壮核；IMAN，是前鼻窦顶外侧核细胞核；X 区，用作专有名称；DLM，背外侧内侧丘脑；nXIIIts 第 12 颅神经的气管囊膜分割）。(C) 放置在 HVC 顶部的表面网格的图片，以及通过表面网格渗透到大脑中的深度探针。粉色矩形突出显示的是可插入深度探头的两个孔。比例尺为 200 μm 。(D) 刺激声谱图，显示了鸟鸣歌曲的一小部分。(E) 来自 4 个表面（红色）和 4 个深度（蓝色）电极的八个高通滤波时间序列，显示了同时记录的尖峰活动。振幅比例尺为 250 μV ，位于图的右下方。听觉刺激的发作。

在这里，我们将 PEDOT:PSS 涂层的微 ECoG 阵列植入麻醉的欧洲鸟（*Sturnus vulgaris*，图 1A）的运动前核 HVC（用作专有名称）上，并观察到强烈，可靠的尖峰反应，大概与单个神经元有关。为了验证我们正在从 HVC 的表面感觉到单个单位的活动（SUA），我们向受试对象展示了强大的听觉刺激，即鸟叫声（BOS），已知它会引起许多 HVC 神经元的强烈反应（George 等等人，2005a, b），同时从层状 PEAs 植入同时在微型 ECoG 阵列下方的 HVC 中进行记录（图 1B, C）。该记录配置使得能够对距表面记录部位约 150 μm 至 2mm 的神经单元进行常规深度记录。通过 BOS 的显示，可以可靠地并以相关的方式同时驱动同时记录表面和深度的 SUA（图 1D, E）。

2、材料和方法

2.1 探针

micro-ECOG 电极阵列是在 UC San Diego 的 nano3 设施中使用与 Ganji 等人所述 (2018) 相似的微细加工技术制造的。并总结在补充图 S3 中。该阵列由一个 $2.9\ \mu\text{m}$ 薄的 ParyleneC 衬底, 金互连和涂有 PEDOT: PSS 的电极组成, 总厚度约为 $4.2\text{-}5\ \mu\text{m}$ 。电极的直径为 $20\ \mu\text{m}$, 并排列在由 32 个电极组成的网格中, 间距为 $200\ \mu\text{m}$, 如图 1C 和补充图 S3B 所示。如在盐水浴中测得, 功能电极通常在 1kHz 时具有约 75kQ 的阻抗。阻抗大于 500kQ 的电极被认为不起作用。表面探针有两个方孔, 可将穿透深度的探针插入表面电极之间 (图 1C)。

深度探针是由 NeuroNexus (美国密歇根州安阿伯市) 制造的可商购的硅柄。在整个实验中使用以下三种形式之一: 间距为 50im 的 16 位探针 (A1x16-5mm-50-177-A16) (鸟形 b114, b1061), 带有三列电极的 32 位探针与电极交错排列间距为 25im (A1x32-Poly3-5mm-25s-177-A32) (鸟 b1047) 和 32 位探针, 电极线性阵列间隔为 20im (A1x32-Edge-5mm-20_177-A32) (鸟类 b1107、1067、1159)。16 和 32 位探针的接触面积为 177im²。如在盐水浴中测量的, 功能电极阻抗通常为 1-2MQ。

2.2 受试者选择和刺激产生

外科手术和行为程序已由 UCSD 机构动物护理和使用委员会 (IACUC) 审查和批准。在麻醉的欧洲 starlings 上进行了急性实验, 这些八哥通常重 55-102 克, 长 21.6 厘米。为了诱发唱歌, 将睾丸激素植入皮下。通过用丙酸睾丸酮固体 (Sigma Aldrich T1875-5G) 填充一部分硅胶管 (硅橡胶管 508-009) 并在其末端用厚的强力胶密封, 来制备 1-3mm 的小球。用异氟烷麻醉动物, 并将小球通过剪刀和钝器通过小孔植入皮肤下。然后通过缝线将孔关闭。

将动物单独安置在隔声室中, 在该隔声室中通过连接到前置放大器 (ART Tube MP) 的麦克风 (Earthworks M30) 连续记录音频, 以 48kHz 采样并通过 PC 声卡使用内置的自定义软件将其数字化 ALSA 库。使用 Python 编写的自定义软件, 从一天的录制开始, 每晚都会自动监视歌曲回响的存在。选择了在植入后的 10 天内, 每天会开始唱歌数十次至数百次的鸟类。

对于选择的每只鸟, 都会选择几回合自己的歌曲 (BOS), 每只鸟大约 40-60s。提出的刺激包括以下内容: (1) BOS; (2) BOS 反向播放 (REV), 其中单个音节的时间结构和整体音节顺序颠倒了, 但总体频谱与 BOS 相同; (3) 来自特定成人 (CON) 的歌曲。每个选择刺激的几次 (30-60) 演示以从 7-15s 之间的伪随机均匀分布中选取的间隔进行呈现, 在会话中以伪随机顺序进行。

2.3 手术准备

在电生理记录的前一天或当天进行准备手术。用异氟烷麻醉动物（Baxter Healthcare）。将鸟固定在立体定位设备中，并沿中线解剖头皮。然后用牙胶将定制的金属固定销钉固定在鸟头骨的尾部。

在记录的那天，用 20 至 30 μ l 等分试样以 20% 的剂量将 20% 氨基甲酸酯（总量为 60-100 升；Sigma，圣路易斯，密苏里州，美国）麻醉动物。最小间隔。将该鸟放在一个消音室中，并通过头部固定销固定其头部。

2.4 电生理学

根据立体定向坐标，在 HVC 上进行开颅和硬膜切开术。窗口的中心在横向 2.5 毫米处，并且足够大以适合表面微 ECoG 阵列。吸除 HVC 顶部的海马。为了确保表面阵列和组织之间的紧密接触，通过抽吸从脑表面去除脑脊髓液。然后使用微操纵器（NarishigeMO-10）将表面阵列放置在大脑顶部，然后将深度探针通过两个通孔之一缓慢降低到大脑中。使用了大脑的两个半球；只要该程序明显损伤了脑组织，该部位就不再用于实验。

使用相同的数据采集系统（来自美国加利福尼亚州洛杉矶的 Intan Technologies 的 Intan RHD 2000）同时进行了来自表面阵列和深度探头的电生理记录。Intan RHD 2000 USB 控制器已连接到与深度探头相连的 RHD 2116 或 RHD 2132 探头；将一个单独的 RHD 2164 探头连接到表面探头上。以下适配器板用于将探头连接到 Intan 探头上：用于表面探头的定制 Flex 适配器（Hermiz 等人，2016）和 Plexon（达拉斯，德克萨斯州，美国）用于深度探头的 N2TA32-HST/32V 适配器。记录以 20kHz 或 30kHz 采样，并使用 OpenEphysGUI（Siegle 等人，2017）或 Intan 提供的 RHD2000 软件获取数据。使用默认的 Intan 滤波器设置，并将截止频率设置为 0.01Hz 和 7.5kHz 进行数据采集。

可以使用在单板计算机（SBC）（BeagleboneBlack）上运行的 Python 编写的软件来播放刺激音。通过在 SBC 和 OpenEphys 记录软件之间使用 ZMQ 库传递数字触发针和/或消息，可以实现与记录系统的同步以及以后对刺激的元数据的识别。为了在记录中实现高精度的刺激发作检测，刺激是立体声的，其中一个通道包含 1-5kHz 的波形，该波形由 Intan 系统以与神经数据相同的采样率记录。（该软件可从 https://github.com/zekearneodo/ephysflow/tree/master/rig_tools 获得）。

2.5 尖峰排序和单位表征

所有记录都转换为 KWD 格式，这是基于 HDF5 的神经数据数据模型。使用以 Python 编写的自定义软件（可从 <https://github.com/zekearneodo/intan2kwik> 获得的软件）将以 Intan 记录软件 RHD 格式记录的数据转换为 KWD。OpenEphys 软件直接提供 KWD 支持。为了可视化高频活动，使用截止频率为 300Hz 的三阶 Butterworth 滤波器对原始记录进行高通滤波，以实现向前和向后的高通滤波，以创建无相位失真的清晰截止，并存储为单独的 KWD 文件。使用 KiloSort

（Pachitariu et al., 2016）进行穗分类。在主要 KiloSort 算法将峰值分配给群集之后，使用了 KiloSort 软件中包括的事后合并算法。通过使用 Phy（Rossant 等人，2016）和自定义 Matlab 脚本检查尖峰片段，相关图和主成分空间来手动验证聚类。穗状花序簇被标记为单个单元（SUA），多单元（MUA），噪声或伪影-对于所有分析，均剔除了噪声和伪影簇。如果尖峰波形的子采样显示的是动作电位波形的典型特征，并且该集群中的所有尖峰都没有大量的不应期违反（例如，从 0 到 0 几乎没有尖峰），则认为该群集为 SUA。尖峰后 2 毫秒）。如果峰值波形类似于动作电位波形，但具有大量的不应期违反，则将群集视为 MUA。补充图 S4 中提供了每个群集标签的示例。

表 1 单个单元表征和统计

	Surface (n = 23)	Depth (n = 46)	P-Value	Test
<i>Duration</i>	0.167 ms	0.5 ms	5.0e-6	Rank sum
<i>Spike Rate</i>	1.95 Hz	1.52 Hz	0.41	Rank sum
<i>Amplitude</i>	53.4 μ V	107.3 μ V	4.3e-5	Rank sum
<i>Trough/Peak</i>	-0.65	-0.32	7.0e-8	Rank sum
<i>Symmetry</i>	-0.73	-0.13	1.9e-4	Rank sum
<i>Bursts or Not</i>	14/23 = 61%	34/46 = 74%	0.27	Chi-square

在所有单个单元上计算了总计尖峰波形和时序统计数据（表 1）。每个统计信息的定义如下：“持续时间”是峰谷间隔；“峰值率”是发生的峰值数除以秒数；“幅度”是最大值减去最小值平均波形；“波谷/峰值”是波谷与峰值之比；“对称”是表征波形中心附近波形形状的相似性；“爆裂或否”表征单元是否倾向于在时间是由时间间隔参数决定的，如先前研究的“材料和方法”部分所述，该参数专注于刻画尖峰间隔和神经元活动的爆发（Selinger 等，2007）。准确地讲，void 参数的定义为 $1 - g(\text{minimum}) / \sqrt{g(\text{peak1}) * (g(\text{peak2}))}$ ，其中 $g(\cdot)$ 是对数 ISI 的分布。

2.6 互相关分析

计算深度和表面峰值之间的交叉相关图。交叉相关图是通过计算在 5 毫秒仓中神经元 X（深度单位）之后或之前从神经元 Y（表面单位）发射的次数（从 100 到 100 毫秒的滞后时间）来计算的。交叉相关图仅针对基线期（无听觉刺激）或针对基线和听觉刺激期进行计算。

通过使用 SPIKE 距离来表征 SUA 之间的穗活动相似性(Kreuz 等人, 2013)。SPIKE 距离是一种无参数方法, 它使用来自两个峰值序列的峰值之间的相对定时来确定它们的相似性。此距离度量范围为 0 到 1。零表示相同或同步的尖峰序列, 而较大的距离表示不相似或越来越不同步的尖峰序列。该方法使用了比较尖峰序列之间的长时和短时关系, 因此适用于包括基线和听觉刺激周期在内的连续时间段。

2.7 刺激诱发反应的分析

对于基于刺激的分析, 尖峰计数是在 5ms 区间内计算的。通过获取所有试验的平均值, 然后使用 5 阶移动平均值滤波器进行平滑, 可以计算出平均峰值计数的平滑估计值。通过使用希尔伯特 (Hilbert) 变换, 低通滤波, 然后下采样至 200Hz 以匹配 5ms 合并峰值活动的采样率, 估计听觉刺激的幅度包络。

通过使用互相关估计听觉刺激和神经反应之间的延迟。也就是说, 对于小于 200ms 的延迟, 计算了平均平滑后的尖峰计数与听觉刺激的幅度包络之间的互相关性-假定大于 200ms 的延迟在生理上的相关性较小。确定峰值 (绝对值) 滞后为延迟, 并且听觉刺激向前移动此量, 以使神经反应和听觉刺激一致。

我们决定将分析重点放在对刺激的初始反应上, 因为它产生了最大, 最可靠的神经反应。通过手动检查刺激声谱图可以发现第一个声音的开始。在发病之前 200 毫秒和发病之后 300 毫秒被视为感兴趣的窗口, 在该窗口上计算后续指标。

皮尔逊相关性是在平均峰值计数和听觉刺激包络之间计算的。由于每次跑步最多对受试者播放 2 个听觉刺激, 因此考虑产生较高相关性的听觉刺激。 $p > 0.01$ (经 Bonferroni 校正) 的相关被认为是虚假的, 不包括在所提供的分析中。同样, 仅考虑与听觉刺激显着相关的效应大小和神经反应滞后。

为了量化响应的大小, 我们计算了一个称为效应大小的度量。效应大小的定义为: $(\mu_{\text{peak}} - \mu_{\text{base}}) / \delta_{\text{base}}$, 其中 μ_{peak} 是关于峰值响应的 50ms 窗口中 5ms 仓中的平均尖峰计数。基本段是刺激显示之前持续 1s 的基线窗口中 5ms 仓中的平均尖峰计数。最后, δ_{base} 是基线窗口中尖峰计数的标准偏差。

除非另有说明, 否则所有分析均使用定制的 Matlab 软件 (美国马萨诸塞州纳提克市) 进行。

3、结果

我们记录了研究的所有六个受试者中表面探针的神经活动。具体而言，在六名受试者中的五名中，检测到单单位活性（SUA），而在所有受试者中均检测到多单位活性（MUA）（有关 SUA 和 MUA 的定义，请参见“材料和方法”一节和补充材料，以及例子）。为了验证假定的表面记录 SUA，对波形形状和峰值统计进行了评估，证明了与 SUA 一致的特性。显示表面记录的 SUA 与深度记录的 SUA 相关。表面记录的 SUA 还可以通过听觉刺激的存在来持续进行调制，其方式与深度记录的 SUA 相似。

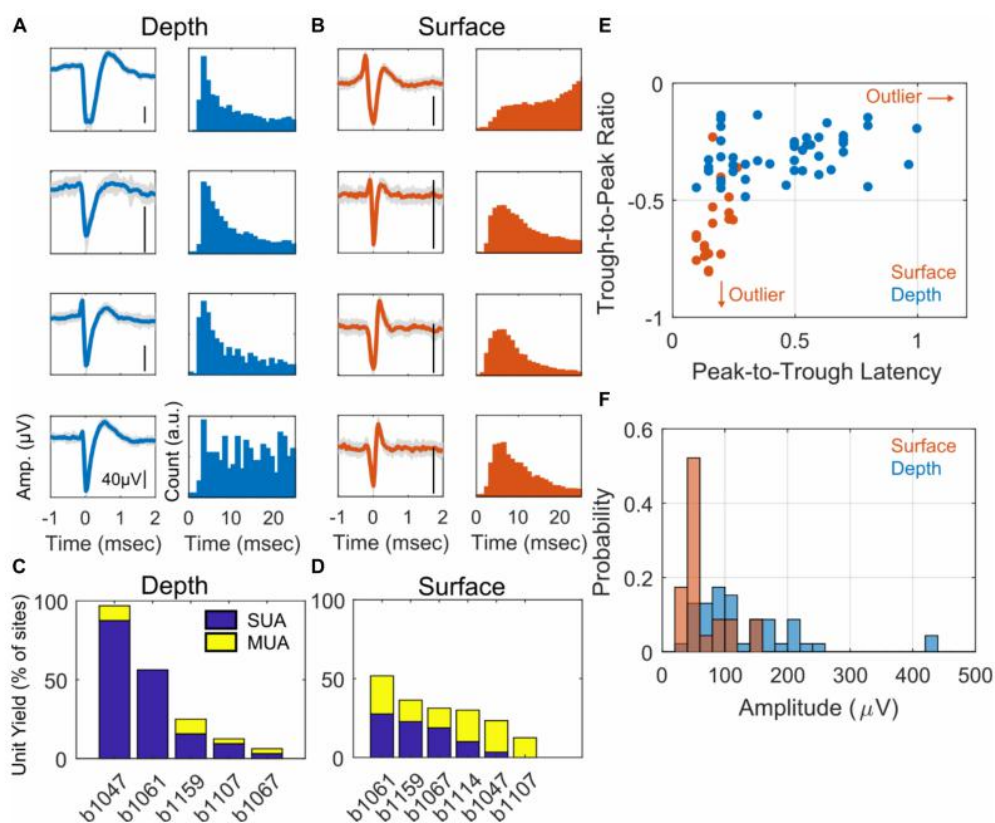


图 2 单位特征。四个深度记录 (A) 和四个表面记录 (B) 单位电压波形以及各自的峰值间隔 (ISI) 直方图的示例。波形是对 50 个均匀采样的尖峰事件求平均的。y 刻度条指示幅度为 $40\mu\text{V}$ 。(C) 深度 (C) 和表面 (D) 阵列的单位产量，以触点总数的百分比表示。堆叠的条形图显示了每个受试者的单单位 (SUA) 和多单位 (MUA) 的百分比。(E) 散点图显示了分别从表面 (红色) 和深度数组 (蓝色) 记录的所有假定神经元 (单位) 的谷峰比与峰谷间隔。红色箭头表示从表面 SUA 沿箭头指向的偏远样本。(F) 以 W 为单位的表面 (红色) 和深度 (蓝色) 单个单位幅度的直方图

3.1 深度和表面记录的单位波形特性比较

在深度和表面探针上检测到的 SUA 的示例以及它们各自的峰值间隔 (ISI) 显示在图 2A, B 中。请注意，ISI 直方图与不应期的存在是一致的，正如我们期望的单个神经元隔离一样。单位产量定义为存在 SUA (或 MUA) 的通道数除以

功能电极的总数（图 2C, D）；表面和深度单位的平均 SUA 产量分别为 13.7 和 28.7%。深度和表面尖峰波形趋于相对于基于形状的特征（例如持续时间以及相对谷值和峰值幅度）有所不同。在分析中，峰定义为波形中的最小点（初始去极化），波谷为出现在峰之后的最大点。此外，持续时间或峰谷延迟时间被定义为峰谷之间的时间。通常，相对于波谷，深度尖峰比表面尖峰具有更长的持续时间和更大的峰。如图 2E 所示，这在整个深度和表面 SUA 数据集中都是一致的。在图形的左下部，有一个清晰的表面 SUA 簇，而深度 SUA 则在图形的上部。此外，深度单位比表面单位更可能具有更大的振幅（图 2F）。计算深度和表面 SUA 的其他峰值统计量，并将其汇总在表 1 中。尽管深度和表面 SUA 的持续时间不同，但深度和表面 SUA 之间的波形特征（持续时间，幅度，波谷/峰值，对称性）明显不同（ $p < 0.01$ ）。深度单位与先前报道的深度 SUA 的持续时间范围为 0.18-0.85ms 一致（George 等，2005b）。相比之下，在这种麻醉的实验环境中，深度和表面单位之间的峰状特征（峰状速率和爆发）没有显著差异。

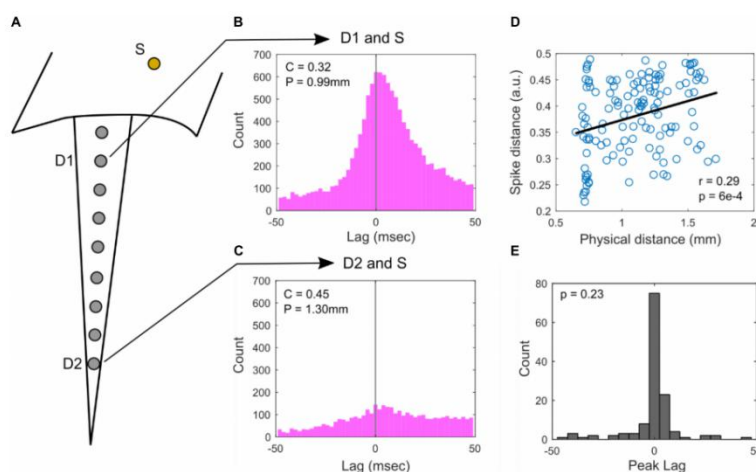


图 3 互相关图。（A）电极位置的图示：表面（S），浅层深度电极（D1）和深层深度电极（D2）。在这些电极上检测到 SUA，并在（B）和（C）中计算其相关图。（B）S 和 D1 的互相关，显示高共现率。峰值距离 C 和物理距离 P 相对较低。（C）S 和 D2 的互相关，显示较低的共现率。峰值距离 C 和物理距离 P 相对较高。（D）所有表面和深度 SUA 对的总体分析，比较尖峰距离与物理距离。皮尔逊相关系数为 $r = 0.29$ （ $p = 6e-4$, $n = 131$, Student's t 分布）。（E）峰值滞后的直方图似乎呈正偏；但是，分布没有明显偏离 0，表明表面和深度单位之间没有显著的正或负滞后（ $p = 0.23$, $n = 131$, 秩和检验）。

3.2 表面 SUA 与深度 SUA 的相关性

在图 3 中总结了跨深度图和表面记录的单个单元对之间的互相关图的基线和听觉刺激周期的分析。图 3A 说明了如何在深度电极和表面电极之间形成对。在图 3B, C 中示出了单个表面电极与两个不同深度的电极之间的示例互相关图。

在图 3D 中, 将计算出的深度和表面尖峰光栅对的 SPIKE 距离与记录相应单元的电极之间的物理距离作图。从该图可以看出, 从中检测到 SUA 的最近表面和深度电极至少相距 $600\ \mu\text{m}$ 。因此, 极不可能从同一神经元记录任何一对表面和深度电极。SPIKE 距离度量 (Kreuz 等人, 2013) 与物理距离之间在统计上具有显著正相关。对于相同的尖峰列, SPIKE 距离为 0, 并且该度量增加到值 1, 表示两个完整的同步尖峰列。因此, 正相关关系表明, 随着深度和表面单位所在的电极之间的距离增加, 其栅格趋向于变得不那么同步 (另请参见补充图 S2C 中仅在基线期间的补充分析)。峰值滞后值的直方图似乎呈正偏, 表明深度单位可能倾向于先于表面单位。但是, 分布没有明显偏离 0ms, 表明在表面和深度单位之间没有显著的平均滞后 (图 3E, 对于仅在基线期间的分析, 也请参见补充图 S2D)。

3.3 听觉刺激驱动的假定表面 SUA 和深度 SUA 的调制

从深度和表面阵列记录的 SUA 受听觉刺激的调节。从深度和表面单个单元进行的这种调制的示例可以在图 4A-D 中看到。在图 4A-C 中, 将单个听觉刺激表示的频谱图 (在该示例中为鸟自己的歌曲) 与每个单元的时间平滑的试验平均尖峰频率一起绘制。深度和表面记录单位的尖峰速率似乎都受到刺激特征的调节, 特别是在刺激开始时。图 4C, D 放大以突出显示刺激的前 4.5s。面板 C 是刺激的频谱图, 其刺激幅度包络线绘制在频谱图的顶部。面板 D 显示了尖峰光栅图, 顶部是平均尖峰率。在这里, 可以观察到由于初始声音而产生的强烈响应, 以及在 3s 处与鸟鸣声中较复杂的声音元素对齐的较小响应。当这种复杂的声音元素的变体在 4s 左右再次出现时, 它会引起较小的响应。HVC 神经元对自然听觉刺激特别是 BOS 的反应在多种鸣禽物种中得到了很好的记录 (George 等, 2005a; Hermiz 等, 2016; Siegle 等, 2017)。以前有关八哥的报道表明, 来自 BOS 的单个音节和同种歌曲会引起听觉反应, 且特异性不同 (George 等, 2005a, b)。众所周知, 至少在其他物种中, HVC 听觉反应可以长期整合, 并且对歌曲元素的特定时间 (和和声) 组合敏感 (Margoliash, 1986; Margoliash 和 Fortune, 1992)。

作为确定所记录的 SUA 是否受听觉刺激调节的简单测试, 我们表征了在较长的刺激间间隔 (7-12s) 之后, 在没有刺激出现的情况下, 每种刺激在初始发作时的反应。通过首先计算平均峰值计数与以刺激发作为中心的 500ms 窗口内刺激幅度振幅包络之间的皮尔逊相关性, 可以量化初始 SUA 反应 (校正神经反应的延迟后, 请参见“材料和方法”一节)。方法)。如果相关性的关联 $p > 0.01$ (Bonferroni 校正), 则认为它们是虚假的。为了量化响应的幅度, 计算 SUA 的效应大小度量, 其响应与刺激显著相关。效应大小量度捕获峰响应窗口和基线

窗口之间的峰活动差异，并通过基线峰活动的变化进行归一化（有关详细定义，请参见“材料和方法”一节）。最后，针对深度和表面计算听觉刺激和尖峰活动之间的滞后。深度和表面相关性的直方图在图 4E 中。深度和表面单位的相关值分布似乎相似。假设检验还表明，在这些数据点的约束范围内，相关值的分布没有显著差异（ $n_{\text{sur}}=11$, $n_{\text{dep}}=23$ ）。这些统计数据汇总在补充表 S1 中。

4、讨论

提出了从鸣鸟的大脑感觉运动区域的表面记录的刺激调制的 SUA。推定的表面记录神经元的平均尖峰速率在刺激表现期间显示出明显的增加，特别是在歌曲刺激开始时。总体而言，大约一半的深度和表面单个单元与刺激初始阶段的幅度包络显著相关。表面 SUA 的刺激相关值与深度 SUA 相当，并且未发现效果大小的显著差异。

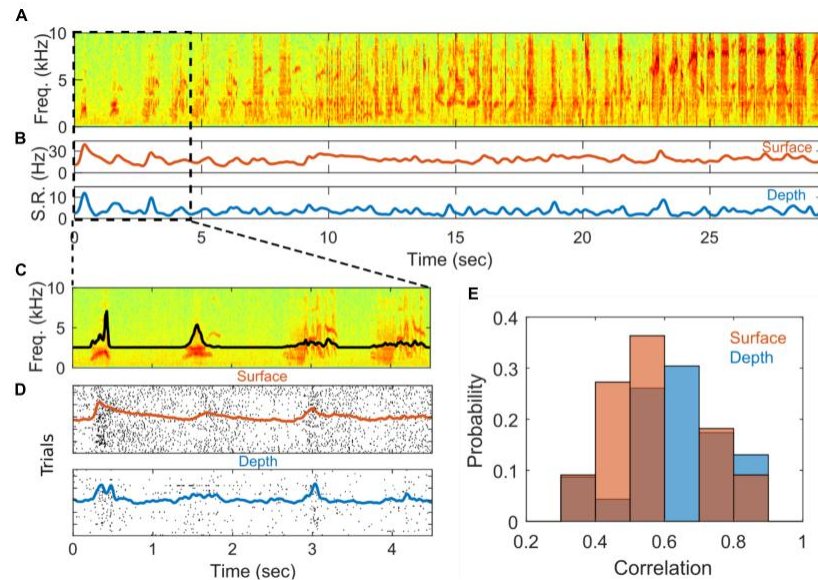


图 4 刺激驱动的反应。(A) 在电生理记录过程中呈现的刺激 (BirdS 自己的歌曲) 的示例频谱图。(B) 从表面 (红色) 和深度 (蓝色) 阵列记录的单个单位的平均平滑峰值速率。平均尖峰率使用 5 点高斯窗口进行平滑，标准偏差为 0.4。(C) 放大 (A) 的前 4.5 秒。黑线显示了刺激的幅度包络线。(D) 尖峰栅格图，显示了 (B) 中表面 (红色) 和深度 (蓝色) SUA 的 54 个连续刺激显示中每个单个尖峰事件的时间。红线和蓝线分别表示针对表面和深度单位的，在刺激表示中平均的平滑峰值速率。使用 30 点高斯窗口 (标准偏差为 0.4) 对尖峰频率进行平滑处理。(E) 深度 (蓝色) 和表面 (红色) 的相关值的分布，这些值与听觉刺激的发作显著相关。

栅格互相关分析未指示表面和深度单位之间的特定相对时间偏差。但是，尖峰栅格相似性分析表明，如果深度记录的 SUA 和表面记录的 SUA 如果记录在物理上更靠近的电极上，则趋向于更加相似。由于此研究中的表面单位记录位置距

离最接近的深度位置至少 600 μm ，因此这种相似性不太可能是从深度电极和表面电极记录相同神经单元的结果。总体而言，对刺激特性和非刺激特性的尖峰特性分析表明，表面单位和深度单位的响应特性相似。

表面记录的 SUA 波形特性似乎与深度记录的 SUA 波形特性不同。特别是，表面 SUA 的峰谷潜伏期明显短于深度 SUA（图 2）。此外，表面和深度 SUA 之间的波峰幅度比和绝对幅度似乎有显著差异（图 2E, F 和表 1）。一种可能是这些差异是由于深度和表面记录之间的过滤特性不匹配所致。由于使用了相同的放大器从表面和深度进行记录，因此，如果存在这种差异，则可能由物理电极-大脑界面的电气特性来驱动。另一种可能性是表面和深度记录有偏差，以对不同的细胞类型或细胞上的不同位置（或两者）进行采样。波形形状的差异可以用偏向的细胞类型和位置假设来解释（Buzsaki 等，2012）。HVC 包含几种类型的神经元，包括针对弓形（RA）和基底神经节核区域 X 的健壮核的多类投射神经元，以及在 HVC 内局部投射的多个中间神经元（Rossant 等人，2016）。这些不同的神经元类型具有不同的形态（Benezraetal.，2018），但其空间分布的异质性（如果有的话）仍大部分未被解析。先前的报道表明，一组具有更长或爆发反应趋势的细胞集中在 HVC 的腹侧部分（George 等，2005a），这与我们对高破裂率的测量结果一致。用穿透探针记录的细胞。对我们的表面电极中用于检测特定神经元类型或其投影的偏压的更详细的了解仍然是未来工作的主题。在哺乳动物的大脑中，皮层神经元的组织和形态已得到更好的表征，并且有可能设计出针对特定细胞类别的电极。

低表面积和低阻抗电极接触，以及阵列与大脑表面的整合性，是从大脑表面记录推定动作电位活动的重要特征，如本研究和先前的哺乳动物研究所证明

（Khodagholy 等，2015、2016）。在一项模型研究（Hill 等人，2018）中，评估了用于记录大鼠皮质表面动作电位的关键特征，相对于较大的电极，较小的电极表面积有助于保持动作电位振幅。然而，当给定材料的电极的表面积减小时，阻抗将增加，因此，热记录噪声也将增加。因此，至关重要的是要用允许与大脑表面形成低阻抗电接口的材料制造小表面积的电极接触。我们注意到，在以前的哺乳动物研究中，我们的电极表面积是电极表面积的三倍以上（Khodagholy 等人，2015，2016）。相对于大鼠先前的皮质记录，这可能导致我们具有单单位和/或多单位活性的电极的较低可变的产量（图 2D）[如 Khodagholy 等人的补充表 S1 所述，产量为 55-93%。（2015）]。但是，人类录音的收率（27-37%）（Khodagholy 等人，2015）更接近我们的收率。这些产量及其可变性可能是由于电极设计以外的多种因素引起的，包括物种差异以及手术和记录程序的细节。例如，在动物醒

着和表现的时候进行啮齿动物的记录。而八哥录音及其人类录音是在麻醉下进行的，可能会影响神经突增的可能性。

电极阵列的保形性对于记录质量也很重要。根据建模研究(Hill 等人, 2018), 神经元细胞体(在大鼠制备中)必须在 $100\mu\text{m}^2$ 电极接触的 $1\mu\text{m}$ 之内(我们的电极具有 $314\mu\text{m}^2$ 的表面积), 这应减少距离要求)。此外, 如果电极距离皮层表面较远, 并且在电极接触下具有大脑脊髓液(CSF), 则可能会导致分流, 从而使动作电位记录变得模糊。建模研究(Hille et al., 2018)还表明, 电极周围电极阵列基板的保形绝缘对于解决动作电位也可能很重要。表面绝缘有效地反射了自然导电 CSF 界面上不存在的电荷。因此, 绝缘可以有效地增强相对于热噪声的动作电位信号。先前的一项大鼠研究(Tsytsarev 等人, 2006)建议可以从大脑表面记录多单位活性, 但没有证明类似单单位的活性。在那项研究中, 将 50 毫米直径的微丝阵列带到了皮层表面。在当前研究中, 相对于电极而言, 除了更大的表面积之外, 那些微线电极还具有更高的阻抗, 并且缺乏薄膜电极阵列的平面绝缘。微线束的这些设计特征可能导致信号质量降低, 从而掩盖了单个单元的活动。微米和纳米级的电极特性为将来提高记录质量提供了途径。例如, 可以将用于体外记录制剂的平面阵列中的电极修改为具有 3D 蘑菇状形状, 从而与细胞膜更紧密地接触并获得更高的信噪比记录(例如 Spira 等人, 2018 年)。用于体内表面记录的电极阵列可以采用类似的设计策略来提高组织接触的质量和可重复性。

虽然目前的研究是急性的, 但薄膜微 ECoG 制剂已被用于多天清醒的慢性记录, 表现为小型动物模型(包括小鼠(例如, Jonak 等人, 2018))和大鼠(例如, Insanally 等, 2016)。在当前的急性研究中使用电极阵列进行的慢性研究将需要额外的设备和手术技术开发以及寿命测试。这种发展将允许对单元活动进行更深入的研究, 以评估自由行为和歌曲创作过程中的稳定性和响应特性。

总而言之, 我们证明了在 4-5 毫米薄的 ParyleneC 基底上涂有 PEDOT: PSS 的微型 ECoG 电极阵列在麻醉的欧洲八哥中可感知 HVC 上方的单个单元的能力。在六个受试者中有五个发现了这些单一单元, 平均产率为 13.7%。对于表面和深度单个单元, 在听觉刺激开始时观察到刺突活性增加。对于表面和深度, 大约一半的单个单位与听觉刺激的发作显着相关。这些结果再现并扩展了一个重要发现, 那就是可以从大脑表面感知单个单元, 并且可以通过感官相关刺激来调节其活动。通过对表面记录单元的刺激驱动响应进行的首次展示, 这项研究的结果增强了人们的信心, 即这些单元确实是单个神经元, 而微 ECoG 是观察高保真神经活动的有效工具。此外, 通过演示歌手手中的这些功能, 我们提供了一种新的范例来研究语音和语言的神经基础, 并为皮质驱动的语音假体提供了开发平台。

数据可用性声明

可根据要求向通讯作者提供为此研究生成的数据集。

道德声明

该动物研究由 UCSD 机构动物护理和使用委员会审查并批准。

作者贡献

JH 进行了数据分析，并辅助了数据收集仪器，并共同撰写了手稿。LH 制造并表征了微型 ECoG 器件，并参与了电极放置和数据收集。EA 参与了实验的设计，建立了实验装置，领导了数据收集，为数据处理/分析提供了有用的工具，并为手稿提供了输入。MG 参与了微 ECoG 器件的制造和表征。NR 促进了与仪器和新颖设备使用相关的实验设计方面。NV 为同时进行表面/深度记录实验的概念做出了贡献。EH 为神经生理学分析提供了指导。TG 指导实验设计和数据收集方法，并撰写了手稿。SD 帮助构思和设计了实验，并监督了微型 ECG 器件的制造和表征。VG 监督数据分析，指导实验设计和数据收集方法，并共同撰写手稿。

资金

这项工作得到了卡夫里脑智研究所（IRG # 2016-004），圣地亚哥加州大学脑活动图谱中心，海军研究办公室，皮尤拉丁美洲生物学医学科学研究所（EA）的支持，加州大学总统办公室（UCOP）多个校园研究计划和计划（MRPI）编号 MR-15-328909，以及美国国家科学基金会（National Science Foundation），获得的证书编号为 ECCS-1743694，ECCS-1351980，CMMI-1728497 和 NIH NIDCD R01DC018446。

补充材料

可以在以下网址在线找到本文的补充材料：

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.00055/full#supplementary-material>

6、参考文献

- [1] Benezra, S. E., Narayanan, R. T., Egger, R., Oberlaender, M., and Long, M. A. (2018). Morphological characterization of HVC projection neurons in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Neurol.* 526, 1673-1689. doi: 10.1002/cne.24437
- [2] Brainard, M. S., and Doupe, A. J. (2002). What songbirds teach us about learning. *Nature* 417, 351-358. doi: 10.1038/417351a

- [3] Bolhuis, J. J., and Gahr, M. (2006). Neural mechanisms of birdsong memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:nrn1904.
- [4] Buzsaki, G., Anastassiou, C. A., and Christof, K. (2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 407-420. doi: 10.1038/nrn3241
- [5] Fukushima, M., Rauske, P. L., and Margoliash, D. (2015). Temporal and rate code analysis of responses to low-frequency components in the bird's own song by song system neurons. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 201, 1103-1114. doi: 10.1007/s00359-015-1037-0
- [6] Ganji, M., Elthakeb, A. T., Tanaka, A., Gilja, V., Halgren, E., and Dayeh, S. A. (2017a). Scaling Effects on the Electrochemical Performance of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene (PEDOT), Au, and Pt for Electrocorticography Recording. *Adv. Funct. Mater.* 27:1703018. doi: 10.1002/adfm.201703018
- [7] Ganji, M., Kaestner, E., Hermiz, J., Rogers, N., Tanaka, A., Cleary, D., et al. (2018). Development and translation of PEDOT: PSS microelectrodes for intraoperative monitoring. *Adv. Funct. Mater.* 28:1700232. doi: 10.1002/adfm.201700232
- [8] Ganji, M., Tanaka, A., Gilja, V., Halgren, E., and Dayeh, S. A. (2017b). Scaling effects on the electrochemical stimulation performance of Au, Pt, and PEDOT: PSS electrocorticography arrays. *Adv. Funct. Mater.* 27:1703019. doi: 10.1002/adfm.201703019
- [9] Gardner, T., Cecchi, G., Magnasco, M., Laje, R., and Mindlin, G. B. (2001). Simple motor gestures for birdsongs. *Phys. Rev. Lett.* 87:208101.
- [10] George, I., Cousillas, H., Richard, J.-P., and Hausberger, M. (2005a). Auditory responses in the HVC of anesthetized starlings. *Brain Res.* 1047, 245-260. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.047
- [11] George, I., Cousillas, H., Richard, J. P., and Hausberger, M. (2005b). New insights into the auditory processing of communicative signals in the HVC of awake songbirds. *Neuroscience* 136, 1-14. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.001
- [12] Hermiz, J., Rogers, N., Kaestner, E., Ganji, M., Cleary, D., Snider, J., et al. (2016). A Clinic Compatible, Open Source Electrophysiology System. Orlando: IEEE EMBC.
- [13] Hermiz, J., Rogers, N., Kaestner, E., Ganji, M., Cleary, D. R., Carter, B. S., et al. (2018). Sub-millimeter ECoG pitch in human enables higher fidelity cognitive neural state estimation. *NeuroImage* 176, 454-464. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.04.027

- [14] Hill, M., Rios, E., Sudhakar, S. K., Roossien, D. H., Caldwell, C., Cai, D., et al. (2018). Quantitative simulation of extracellular single unit recording from the surface of cortex. *J. Neural. Eng.* 15:056007. doi: 10.1088/1741-2552/aacdb8
- [15] Insanally, M., Trumpis, M., Wang, C., Chiang, C. H., Woods, V., Palopoli-Trojani, K., et al. (2016). A low-cost, multiplexed iECoG system for high-density recordings in freely moving rodents. *J. Neural. Eng.* 13, 026030-26030. doi: 10.1088/1741-2560/13/2/026030
- [16] Jonak, C. R., Lovelace, J. W., Ethell, I. M., Razak, K. A., and Binder, D. K. (2018). Reusable multielectrode array technique for electroencephalography in awake freely moving mice. *Front. Integr. Neurosci.* 26:53. doi: 10.3389/fnint.2018.00053
- [17] Khodagholy, D., Doublet, T., Gurfinkel, M., Quilichini, P., Ismailova, E., Leleux, P., et al. (2011). Highly conformable conducting polymer electrodes for in vivo recordings. *Adv. Mater.* 23, H268-H272.
- [18] Khodagholy, D., Gelinias, J. N., Thesen, T., Doyle, W., Devinsky, O., Malliaras, G., et al. (2015). NeuroGrid: recording action potentials from the surface of the brain. *Nat. Neurosci.* 18, 310-315. doi: 10.1038/nn.3905
- [19] Khodagholy, D., Gelinias, J. N., Zhao, Z., Yeh, M., Long, M., Greenlee, J. D., et al. (2016). Organic electronics for high-resolution electrocorticography of the human brain. *Sci. Adv.* 2:e1601027. doi: 10.1126/sciadv.1601027
- [20] Konerding, W. S., Froriep, U. P., Kral, A., and Baumhoff, P. (2018). New thin- film surface electrode array enables brain mapping with high spatial acuity in rodents. *Sci. Rep.* 8:3825. doi: 10.1038/s41598-018-22051-z
- [21] Kozlov, A. S., and Gentner, T. Q. (2016). Central auditory neurons have composite receptive fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 1441-1446. doi: 10.1073/pnas.1506903113
- [22] Kreuz, T., Chicharro, D., Houghton, C., Andrzejak, R. G., and Mormann, F. (2013). Monitoring spike train synchrony. *J. Neurophysiol.* 109, 1457. doi: 10.1152/jn.00873.2012
- [23] Lempka, S. F., Johnson, M. D., Moffitt, M. A., Otto, K. J., Kipke, D. R., and McIntyre, C. C. (2011). Theoretical analysis of intracortical microelectrode recordings. *J. Neural. Eng.* 8:045006. doi: 10.1088/1741-2560/8/4/045006
- [24] Margoliash, D. (1986). Preference for autogenous song by auditory neurons in a song system nucleus of the white-crowned sparrow. *J. Neurosci.* 6, 1643-1661. doi: 10.1523/jneurosci.06-06-01643.1986
- [25] Margoliash, D., and Fortune, E. S. (1992). Temporal and harmonic combinationsensitive neurons in the zebra finch's HVC. *J. Neurosci.* 12, 4309-4326. doi: 10.1523/jneurosci.12-11-04309.1992

- [26] Nottebohm, F. (2005). The neural basis of birdsong. *PLoS Biol.* 3:e164. doi: 10.1371/journal.pbio.0030164
- [27] Pachitariu, M., Steinmetz, N., Kadir, S., Carandini, M., and Harris, K. (2016). “Fast and accurate spike sorting of high-channel count probes with KiloSort” in *Advances in Neural Information Processing Systems*. 29 Annual Conference on Neural Information Processing Systems, (Barcelona).
- [28] Pfenning, A. R., Hara, E., Whitney, O., Rivas, M. V., Wang, R., Roulhac, P. L., et al. (2014). Convergent transcriptional specializations in the brains of humans and song-learning birds. *Science* 346:1256846. doi: 10.1126/science.1256846
- [29] Rossant, C., Kadir, S. N., Goodman, D. F. M., Schulman, J., Hunter, M. L. D., Saleem, A. B., et al. (2016). Spike sorting for large, dense electrode arrays. *Nat. Neurosci.* 19,634-641. doi: 10.1038/nn.4268
- [30] Selinger, J. V., Kulagina, N. V., O'Shaughnessy, T. J., Ma, W., and Pancrazio, J. J. (2007). Methods for characterizing interspike intervals and identifying bursts in neuronal activity. *J. Neurosci. Methods* 162, 64-71. doi: 10.1016/j.jneumeth. 2006.12.003
- [31] Siegle, J. H., Lopez, A. C., Patel, Y. A., Abramov, K., Ohayon, S., and Voigts, J. (2017). Open Ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. *J. Neural Eng.* 14:045003. doi: 10.1088/1741-2552/aa5eea
- [32] Spira, M. E., Shmoel, N., and Huang, S. M. (2018). Multisite attenuated intracellular recordings by extracellular multielectrode arrays, a perspective. *Front. Neurosci.* 10:212. doi: 10.1038/ncomms6241
- [33] Suzuki, M., and Larkum, M. E. (2017). Dendritic calcium spikes are clearly detectable at the cortical surface. *Nat. Commun.* 8:276. doi: 10.1038/s41467- 017-00282-4
- [34] Takahashi, D. Y., Fenley, A. R., Teramoto, Y., Narayanan, D. Z., Borjon, J. I., Holmes, P., et al. (2015). LANGUAGE DEVELOPMENT. The developmental dynamics of marmoset monkey vocal production. *Science* 349, 734-738. doi: 10.1126/science.aab1058
- [35] Titze, I. R. (1988). The physics of small-amplitude oscillation of the vocal folds. *J. the Acoust. Soc. Am.* 83, 1536-1552. doi: 10.1121/1.395910
- [36] Tsytarev, V., Taketani, M., Schottler, F., Tanaka, S., and Hara, M. (2006). A new planar multielectrode array: recording from a rat auditory cortex. *J. Neural. Eng.* 3, 293-298. doi: 10.1088/1741-2560/3/4/006
- [37] Vyssotski, A. L., Stepien, A. E., Keller, G. B., and Hahnloser, R. H. (2016). A neural code that is isometric to vocal output and correlates with its sensory consequences. *PLoS Biol.* 14:e2000317. doi: 10.1371/journal.pbio.2000317

利益冲突: JH 目前受 Vorso Corp. 雇用。VG 持有 Neuralink, Corp. 和 Paradromics, Inc. 的股份, 目前为 Paradromics, Inc. 提供咨询。

其余作者宣称: 该研究是在没有任何商业或金融关系的情况下进行的, 这些商业或金融关系可以被解释为潜在的利益冲突。

版权所有©2020 Hermiz, Hossain, Arneodo, Ganji, Rogers, Vahidi, Halgren, Gentner, Dayeh 和 Gilja。这是根据知识共享署名许可 (CC BY) 条款分发的开放获取文章。 允许在其他论坛中使用, 分发或复制, 但要遵循公认的学术惯例, 但要注明原始作者和版权所有, 并引用本期刊的原始出版物。禁止使用, 分发或复制不符合这些条款的内容。