Diplomamunka

A Poisson-egyenlet inverz megoldásai idegsejt áramforrássűrűségének meghatározásához agyi mikroelektróda rendszerek mérései alapján

Cserpán Dorottya

Témavezető: Dr. Somogyvári Zoltán KFKI RMKI Biofizikai Önálló Osztály

Belső konzulens: Dr. Palla Gergely

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológiai Fizika tanszék

Budapest, 2011

Tartalomjegyzék

1.	Absztrakt	3								
2.	Bevezetés									
	2.1. Az idegsejt tüzelésének folyamata	4								
	2.2. Fontos agyi rétegek áttekintése	6								
	2.3. Extracelluláris potenciálok biofizikai háttere [6]	8								
	2.4. Áramforrássűrűség	9								
	2.5. Áramforrás sűrűségek meghatározása az extracelluláris potenciálból									
	(CSD eljárás)	11								
	2.6. Agyi képalkotó módszerek	12								
	2.7. Az Alzheimer-kór	13								
	2.8. LTP	14								
3.	Az sCSD analízis									
	3.1. Az sCSD analízis elméleti háttere	16								
	3.2. Az sCSD módszer alkalmazhatósága	19								
4.	Adatfeldolgozás	20								
	4.1. Mérési adatok	20								
	4.2. Az elektróda csatornáinak helyzetmeghatározása	23								
	4.3. Mérési adatok előkészítése	23								
5.	Eredmények									
	5.1. Az összefoglaló ábrák értelmezése	33								
	5.2. Kiértékelés	35								
6.	Összefoglalás	42								
7.	Köszönetnyilvánítás	43								

1. Absztrakt

Az agy működésének és betegségeinek megértése egy intenzíven fejlődő terület, melyhez elengedhetetlen új idegrendszeri képalkotó technikák felbukkanása illetve a régebbiek továbbfejlesztése. Egyes módszerek (fMRI, PET) különböző agyterületek funkcionális szerepére mutatnak rá, mások (EEG, elektródás mérések) az idegsejtek elektromos jelenségének mérésen alapulnak. Az eddigi módszerek általában idegsejtek populációjának vagy idegsejtek kis részleteinek aktivitását vizsgálták, holott például az extracelluláris multielektródás mérésekkel akár az egyes idegsejtekben végbemenő folyamatok is tanulmányozhatóak. Eddig a szakirodalomban nem ismeretes olvan módszer, mely kísérleti adatok alapján egész idegsejtek áramforrássűrűség eloszlásait rekonstruálja. A sCSD [1] módszer extracelluláris potenciálok alapján rekonstruálja az egyes idegsejtek áramforrássűrűségének tér- és időbeli eloszlását a Poisson-egyenlet inverz megoldására alapozva. A kapott áramforrássűrűség eloszlások eddig kísérletesen nem kimutatott jelenségek vizsgálatára ad lehetőséget. Dolgozatomban ismertetem az sCSD analízis elméleti hátterét és alkalmazhatóságát, majd a mérési adatokra alkalmazva értelmezem a megfigyelhető jelenségeket. Az sCSD módszer használatához szükséges jelalakok megkeresésére, osztályozására, válogatására és előkészítésére, valamint az áramforrássűrűségek kiszámolására és a megjelenítésére egy programot készítettünk. Diplomamunkámban a program működését és az alkalmazott eljárások elméleti hátterét is bemutatom. A mérési adat az Alzheimer-kór kísérleti modelljével megbetegített egér hippokampuszából és neocortexéből származik. A mérés során LTP-s kezelést hajtottak végre mely megváltoztatja az idegsejtek kapcsolatainak erősségét főleg a tanulásban nagy szerepet játszó hippokampuszban, a kezelés előtti és utáni adatok sCSD analízissel történő elemzésével megfigyelhetőek a változások. Az sCSD módszer lehetővé teszi az idegsejtek elektomos tulajdonságainak megváltozásának kimutatását, mely által a gyógszergyártás fontos diagnosztikai eszközévé válhat.



1. ábra. Az idegsejt és a szinapszis általános felépítése [2]

2. Bevezetés

Réges-régen úgy gondolták, hogy az agy csak a koponya kipárnázására szolgál, Krotóni Alkmaión már az elme helyének tulajdonította, de Arisztotelész szerint csak a vér hűtésére szolgált. Azóta kiderült, hogy az agy a gerincesek központi idegrendszerének része, itt van a központja az érzékelésnek, megismerésnek, figyelemnek, memóriának, felelős a mozgás vezérléséért, a homeosztázis biztosításáért... De még most sem ismerjük teljesen az agy működését, hiszen rendkívül összetett rendszer.

2.1. Az idegsejt tüzelésének folyamata

Az emberi agyban körülbelül 100 milliárd idegsejt található, melyeknek átlagosan 10 ezer szinaptikus kapcsolata van. Az idegsejtek rendkívül változatos alakban jelennek meg, de alapvetően sejttestből és az abból kiinduló nyúlványokból, a dendritekből illetve axonokból állnak. Egy idegsejt tipikus felépítése a 1.ábrán látható.A bemeneti jelek összegyűjtésére szolgál a dendritfa, melyen akár mikrométerenként 2 szinaptikus bemenet is lehet. A 10-50 mikrométeres szóma segítségével az axon iniciális szegmentumon kialakult jel pedig az axonon terjed az axon terminálisig, ahol az idegsejttel szinaptikus kapcsolatban álló többi idegsejtre továbbítódik a jel neuro-



2. ábra. A) Az ábrán lévő két piramissejt látszik, fekete színűek a dendritek és a sejttest, piros színű az axon. A dendritek két csoportra oszthatóak, a sejttest elettiek az apikálisak, az az alattiak pedig a bazálisak. A sárga hátterű kör egy szinaptikus kapcsolatot mutat, piros szín jelöli a preszinaptikus sejt axonját, zöld a posztszinaptikus sejt dendritjét, a nyíl a jel terjedésének irányát jelzi. B) Külső inger (piros) hatására megváltozik a membránpotenciál, ha a depolarizáció elér egy küszöbértéket kialakul az axonon végigterjedő akciós potenciál, megváltoznak az ioncsatornák áteresztőképességei (zöld illetve kék görbe jelöli a Na⁺ illetve Ka⁺-nak megfelelő értékeket). Az áteresztőképességek változása ionáramlást eredményez a membránon keresztül (transzmembrán áram), elsőször kinyílnak a Na⁺ csatornák, ezáltal Na⁺ ionok áramlanak a sejtbe (depolarizáció), majd a megnövekedett membránpotenciál hatására kinyílnak a Ka⁺ csatornák, a sejtből kiáramló Ka⁺ ionok repolarizálják a sejtet. [3]

transzmitterek segítségével. Ezen folyamatok részletesebb megértéséhez szükséges az idegsejtben zajló elektromos jelenségek tárgyalása. Nyugalmi állapotban az idegsejt belseje és a sejten kívüli tér között körülbelül -70 mV feszültség mérhető (nyugalmi membránpotenciál), melyet a membrán két oldalán eltérő koncentrációban jelenlévő ionok okoznak (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}).

A korábban emlegetett 'jel' a membránpotenciál megváltozásának felel meg. A dendritekben ezt a megváltozást az 'jeladó' idegsejttől származó ún. neurotranszmitterek okozzák. A dendriteken bekövetkező membránpotenciál változások tovaterjednek a sejttesten keresztül, mely folyamat során összegződnek. Ha a mem-

bránpotenciál az axon iniciális szegmentumban elér egy küszöbértéket, kialakul az akciós potenciál. Ezt a jelenséget tüzelésnek is nevezik. Az akciós potenciál során a membránpotenciál +40 mV körüli értékre ugrik, majd a nyugalmi membránpotenciál alá süllyed, végül visszaáll a nyugalmi értékre. Ez a folyamat látható a 2. A) ábrán. A memránpotenciál időbeli változását az idő függvényében ábrázolva tüskeszerű jelalakot kapunk. A tüske időbeli hossza 1 ms körüli és ezután 2 ms-ig az idegsejt még nem képes ezt megismételni (refrakter szakasz) és körülbelül 20 ms-ig sokkal nagyobb küszöbérték elérése szükséges hozzá (relatív refrakter szakasz). A börsztölés az a jelenség, mikor egy idegsejt egymás után (2-10 ms-on belül) többször ismételten tüzel, majd egy ideig hallgat. A legtöbb sejt akkor börsztöl, mikor a sejt folyamatos ingerlés alatt áll. Az egyes idegsejtek tüzelése során fellépő akciós potenciálokból mintegy azok eredőjeként ún. agyhullámok alakulnak ki az agy egyes területein. Ezek frekvenciája az 1-2 Hz-től akár 100 Hz fölé is mehet, amplitúdójuk 20-80 mV. Az akciós potenciál kialakulása és terjedése önmagától passzív módon nem megy végbe, szükség van feszültségfüggő ioncsatornákra, melyek szelektíven engedik át az ionokat. A Na^+ , K^+ ioncsatornák áteresztőképességének változását az akciós potenciál alatt a 2. B) ábrán figyelhetjük meg.

2.2. Fontos agyi rétegek áttekintése

Eredményeink megértéséhez az neocortex V. és VI. rétegének, valamint a hippokampusz felépítésének és sejtjeinek ismerete szükséges, mivel a multielektróda ezen rétegekben rögzíti az extracelluláris potenciálokat.

A hippokampusz egy félhold alakú struktúra az agyban a diencephalon és a neocortex között. Két főbb részre bontható: a dentate gyrusra (DG) illetve az ammonszarvra. Ez utóbbit a CA1 (cornu Ammonis 1), a keskeny CA2 és a CA3 alrészek alkotják. A CA1 rétegei a következőek: stratum orines (so), stratum pyramidale (sp), stratum radiatum (sr) és a stratum lacunosum moleculare (slm). A dentate gyrus rétegei: molekuláris réteg (mo), stratum granulosum (sg) és polimorfikus réteg (po). A hippokampusz idegsejtjeit principális sejtekre (fősejtek) és interneuronokra oszthatjuk. A fősejtekhez a CA1 és CA3 rétegek piramissejtjei valamint a dentate gyrus szemcsesejtjei tartoznak, jellemző rájuk a gazdag dendritfa és a messzefutó axon. Az interneuronok csak a hippokampuszon belül valósítanak meg kapcsolatokat a fősejtekkel és egymással. Ugyancsak a hippokampusz része az alveus (alv), mely rétegben nem tálalhatóak sejttestek [4].



3. ábra. A hippokampusz principális sejtjei (feketék), azaz a piramissejtek (CA1, CA2, CA3) és szemcsesejtek (dentat gyrus), valamint interneuronjai (színesek) és szinaptikus idegpályái (Schaffer kollaterális (sc) a CA3 idegsejtjeiből, moha rostok (mf) a dentate gyrusból, perforáns pálya az entorhinális kéregből, fimbria pálya (fim) a középagyból és egyéb régiókból. Az idegpályák és a hippokampusz rétegeinek ismerete segítségével megállapítható az idegsejtek 'bemeneti jeleinek' eredete.) [5]

2.3. Extracelluláris potenciálok biofizikai háttere [6]

Extracelluláris potenciálnak nevezzük a sejteken kívül mérhető potenciált, melyet az előző alfejezetben említett transzmembrán áramok hoznak létre. Ez utóbbiak áramforrásoknak tekinthetőek az extracelluláris közegben (térfogati vezetési elmélet). Az **r** helyen kialakuló extracelluláris potenciál az **r**₀ helyen lévő transzmembrán áram eredményeképpen:

$$\Phi_i(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{4\pi\sigma} \frac{I_0(t)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r_0}|},\tag{1}$$

ahol σ az extracelluláris vezetőképesség, amiről feltesszük, hogy valós, skalár és homogén, Φ pedig a forrástól végtelenül távol eltűnik. A fenti egyenlet érvényessége a következő feltevéseken alapul:

1. A Maxwell egyenletek kvázisztatikus közelítésén: ez az elektromos **E** és mágneses tér B időbeli változásának elhanyagolását jelenti:

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \approx 0, \tag{2}$$

$$\nabla \times \mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{j} + \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \approx \mu_0 \mathbf{j},\tag{3}$$

ahol μ_0 a közeg mágneses permeabilitása, ϵ_0 a dielektromos állandója, **j** pedig az áramsűrűség. A fenti két képlet alapján ez a közelítés az elektromos és mágneses tér szétcsatolódását eredményezi. Így az elektromos tér az extracelluláris potenciállal kifejezve a következő képlethez vezet:

$$\mathbf{E} = -\nabla\Phi. \tag{4}$$

Az idegi aktivitásként megjelenő frekvenciákra ez a közelítés jól megalapozottnak tekinthető [7]

2. Lineáris extracelluláris közeg feltételezésén, tehát az áramsűrűség és az elektromos tér kapcsolata lineáris:

$$\mathbf{j} = \sigma \mathbf{E}.\tag{5}$$

 Az extracelluláris közeg ohmikus. A vezetőképesség képzetes részét nullának vesszük, vagyis a szövet kapacitív hatását elhanyagolható a rezisztív részéhez képest. Ez a közelítés a releváns frekvenciákra ugyancsak teljesül [8] [9]

- 4. Izotróp extracelluláris vezetőképesség. A vezetőképesség minden irányba megegyezik. Kérgi mérések alapján ez a szürkeállományra jó közelítés, a fehérállományban viszont anizotrópiát mutattak ki [8].
- 5. Frekvenciafüggetlen extracelluláris vezetőképesség. Ezen közelítés jósága még nem eldöntött, egyes tanumányok elhanyagolható frekvenciafüggést mutattak ki [8][[10], de más eredmények is vannak [11] [12].
- Az extracelluláris vezetőképesség homogenitása. A kéreg szürkeállományában ez a feltételezés megfelelőnek tekinthető [8], míg a hippokampuszban megkérdőjelezhető [13].

4 ábrán egy szimuláció eredményei látszanak, mely során az akciós potenciál hatására kialakuló extracelluláris potenciálokat vizsgáltál különböző helyein a térnek. Az 1. egyenlet 1 pontforrásra adja meg az extracelluláris potenciál értékét, a linearitás miatt N db pontforrás esetén kialakult potenciál :

$$\Phi(\mathbf{r},t) = \frac{1}{4\pi\sigma} \sum_{n=1}^{N} \frac{I_n(t)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r_n}|}.$$
(6)

A transzmembrán áramokknak teljesítenie kell Kirchhoff első törvényét, azaz a transzmemrán áramok előjeles összegének nullát kell adnia:

$$\sum_{n=1}^{N} I_n(t) = 0.$$
(7)

Ezért kompartmentális idegsejtmodell felépítésekor legalább 2 pontforrást kell használnunk. Kompartmentális sejtmodell esetén a sejtet N db részre bontjuk, a szegmensek transzmembrán áramát egy pontforrással helyettesítjük, melyet a kompartment közepébe helyezünk.

2.4. Áramforrássűrűség

Az 3.1. képlet a következő formában is írható:

$$\Phi(\mathbf{r},t) = \frac{1}{4\pi\sigma} \iiint_{V} \frac{C(\mathbf{r},t)}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}_{\mathbf{n}}|} \mathrm{d}^{3}x', \qquad (8)$$

ahol $C(\mathbf{r}, t)$ az áramforrás sűrűség:



4. ábra. A) Szimuláció az akciós potenciál hatására kialakuló extracelluláris potenciálra különböző helyein a térnek. Az akciós potenciált az apikális dendritek gerjesztésével és a bazális dendritek gátlásával érték el. Az idegsejt alakja az neocortex 5. rétegében található piramissejt modellje. A jelalakok 5 ms időablakúak, a vékony vonalasok amplitúdójának skálája 5 μV a vastagoké pedig 20 μV . B) A stimulálás hatására szomatikus membránpotenciál, a beágyazott kis ábra 5ms-os időskálán mutatja ugyanezt [14]

$$C(\mathbf{r},t) = \sum_{n=1}^{N} I_n(t)\delta^3(\mathbf{r} - \mathbf{r_n})$$
(9)

Az áramforrás sűrűség az extracelluláris közegből ki- illetve belépő áramok sűrűsége, mértékegysége A/m^3 . Az inverz probléma is felírható, vagyis az az eset, mikor az extracelluláris potenciálból szeretnénk az áramforrás sűrűséget kiszámolni. A kontinuitási egyenletet felírva:

$$\nabla \mathbf{j}_{tot} = \nabla (\sigma \mathbf{E} + \mathbf{j}_s) = 0, \tag{10}$$

ahol \mathbf{j}_s az ionok koncentrációkülönbségéből származó transzmembrán áramsűrűség. A 5. képletet felhasználva a következő kifejezéshez jutunk:

$$\sigma(\mathbf{r})\nabla\Phi(\mathbf{r},t) = -C(\mathbf{r},t),\tag{11}$$

ahol $C(\mathbf{r},t) = -\nabla \mathbf{j}_{\mathbf{s}}(\mathbf{r},t)$. Egyszerűbb alakra jutunk, ha feltesszük σ izotropitását és homogenitását:

$$\sigma \nabla^2 \Phi(\mathbf{r}, t) = -C(\mathbf{r}, t). \tag{12}$$

A 12. egyenlet a Poisson-egyenlet áramforrás sűrűségekre felírt alakja.

2.5. Áramforrás sűrűségek meghatározása az extracelluláris potenciálból (CSD eljárás)

A hagyományos CSD eljárás esetén lineáris, többcsatornás elektróda mérései alapján határozzák meg pár 10 μ m-es nagyságú idegszövet átlagos transzmembrán áramsűrűségét. Az elektródát a kéregre merőlegesen (z irány) szúrják be, a z irányba merőleges rétegekben a változás kicsi, az elektródával párhuzamos irányban viszont nagy. Emiatt x-y sík irányában az extracelluláris potenciál változását elhanyagolják, így a 12. egyenlet a következő alakra egyszerűsödik:

$$\sigma \frac{d^2 \Phi(z,t)}{dz^2} = -C(z,t). \tag{13}$$

Ez alapján az áramforrássűrűségeket a j. elektróda magasságában z_j a következő formulával közelíthetjük:

$$C(z_j) = -\sigma \frac{\Phi(z_j + h) - 2\Phi(z_j) - \Phi(z_j - h)}{h^2},$$
(14)

h az elektródák közti távolság [15].

2.6. Agyi képalkotó módszerek

A funkcionális leképező technikák két fő csoportba oszthatóak az alapján, hogy milyen fizikai mennyiséget mérnek. Az egyikbe tartoznak azok, amelyek idegsejtek elektromos jeleinek mérésén illetve stimulálásán alapulnak, ide tartozik az EEG (elektro-encefalográfia), a MEG (mágneses encefalográfia), Patch Clamp illetve MEA (multielektródás) mérések. A második csoportba azon eljárások tartoznak, melyek az idegsejtek aktivitásával összefüggő véráramlást és vérösszetételt nézik. Ide tartozik a PET (pozitron emissziós tomográfia), a SPECT (egy-foton emissziós komputer tomográfia), az fMRI (funkcionális mágneses rezonancia) és a lokális véráramlást mérő NIRS (közeli infravörös spektroszkópia) módszerek [16].

Az fMRI a vér deoxihemoglobin koncentrációját méri, mely összefügg az adott agyterület aktivitásával, kihasználva annak paramágneses tulajdonságát. Ugyancsak a lokális véráramlást méri a NIRS technika, mely a molakulakötések gerjesztésén alapul. A PET esetén különféle pozitron emittáló izotópokat használnak, melyeket a véráramba juttatva a lokális véráram, vagy az izotóppal jelölt anyag koncentrációja mérhetó. Az emittált pozitron néhány mm megtétele után annihilálódik, a keletkező fotonokat detektálják. PET-hez hasonló a rosszabb felbontású, ám olcsóbb SPECT, ahol a fotonok közvetlenül az izotóp bomlásából származnak. Az EEG a fejre helyezett elektródák segítségével méri az idegsejek csoportjainak transzmemrán áramából származó feszültségváltozást. A MEG az EEG-hez hasonló, de itt magnetométerek segítségével a transzmembrán áramoktól származó mágneses mezőt mérik. A Patch Clamp során egy adott idegsejtet szúrnak meg maximum 2-3 elektródákkal, így akár egyes ioncsatornák működése is vizsgálható, de a módszer felhasználását korlátozza, hogy jelenleg maximum 2-3 elektródával tudnak dolgozni, így az egész sejt elektromos jelenségei nem vizsgálhatóak. Az elektródás mérések során az elektródát vagy multielektródát az agy különböző területeibe szúrva az extracelluláris potenciálok mérhetőek. Általában idegsejtek csoportjainak aktivitását mérik ezzel a technikával, de különböző módszerek segítségével kiválogathatóak az egyes idegsejtek jelei is, amit az idegsejt aktivitásának vizsgálatára használtak.

A diplomamunkámban bemutatott sCSD módszer [1] lehetővé teszi multielektródával mért extracelluláris potenciálokból egyes idegsejtek áramforrás sűrűségeinek tér- és időbeli dinamikájának vizsgálatát, ezidáig nem volt olyan módszer, ami ezt lehetővé tette volna. Az sCSD módszer tér- és időbeli felbontása a mintavételezési frekvenciától és a lineáris multielektróda kontaktpontjai közti távolságától függ. Ez dolgozatban bemutatott esetben 100 μ m-eres térbeli felbontás és 1/30-ad ms időbeli

leképező eljárás	térbeli felbontás	időbeli felbontás			
PET	8-12 mm	~30- 60 s			
SPECT	3-8 mm	~ 20 s			
NIRS	~ cm	1 ms			
MEG/EEG	~ cm	1 ms			
fMRI	1-8 mm	1 s			
MEA	~ 10 um	~ ms			

5. ábra. Különböző agyi képalkotó eljárások tér- és időbeli felbontása

felbontást jelent. A 5.ábrán látható táblázatban az említett agyi képalkotó módszerek tér- és időbeli felbontásai látszanak, ez alapján egyes idegsejtek vizsgálatára legalkalmasabb a multielektródás mérés.

Habár a Patch-clamp tecknika segítségével akár egy ioncsatorna működését is vizsgálhatjuk, tehát igen kicsiny tér- és időbeli felbontás érhető el, de limitációt okoz az, hogy egy idegsejten már két üvegelektróda használata is igen nehézkes. Az extracelluláris multielektródás mérések lehetővé teszik a nagyfrekvenciás adatrögzítést nagy térbeli felbontásal, ezen méréseket használják az elektróda körüli idegsejtpopulációk aktivitásának vizsgálatára valamint egyes sejtektől aktivitásának megfigyelésére, melyet a mért adatokon látható akciós potenciálok "nyomaként" látható tüskék jeleznek.

2.7. Az Alzheimer-kór

Az Alzheimer kór súlyos idegrendszeri betegség mely szellemi hanyatlással, a gondolkodási és kognitív funkciók romlásával, magatartászavarral és biológiai leépüléssel jár. A betegség kiváltó oka nem ismert, kialakulását okozhatja immunológiai és anyagcserezavar, de a szocio-ökonómiai hatások is fontos szerepet játszhatnak. Elváltozásokat, sorvadást és idegsejt degenerációt okoz a halánték- és homloklebenyben, a hippokampuszban, valamint megfigyelték az amiloid-béta fehérje felszaporodását és összepolimerizálódását úgynevezett plakkokba. A betegség diagnosztizálása pszichometriai tesztekkel valamint különböző idegrendszeri képalkotó módszerekkel történik. pl. CT, MRI, PET. A betegség modelljét egerekben állítják



6. ábra. Az LTP illetve LTD jelenségét tanulmányozó kísérlet a mezőpotenciál amplitúdóját figyelte különböző frekvenciájú stimulálás esetén az idő függvényében. A mérést ey patkány hippokampuszának CA1-es részéből származó szeleten végezték. A mezőpotenciál erősödése a szinaptikus kapcsolatok erősödése miatt lép fel, így a kísérlettel a sejtek közötti kapcsolatok változása tanulmányozható. [17]

elő genetikai úton, melynek hatására amiloid-béta túltermelés jelenik meg. Egy ilyen módon megbetegített egér agyszelete látható egy méretarányos elektróda rajzával a 9.ábrán. A betegségre utaló amilod-béta fehérje plakkokba való feldúsulását a vörös foltok jelzik.

Dolgozatomban az Alzheimer-kór kísérleti modelljével megbetegített egéren végzett LTP kezeléses méréseket elemeztem.

2.8. LTP

A tanulást és a memóriát vizsgáló különböző kísérletek alapján ezen jelenségek létrejöttében alapvető szerepet tölt be a szinaptikus plaszticitás, vagyis a szinaptikus kapcsolatnak a változása. A hippokampuszban, neocortexben és cerebellumban sikerült kimutatni a szinaptikus plaszticitásnak az idegsejt-aktivitással való kapcsolatát. Egy ilyen kísérlet eredménye látszik a 6.ábrán, melyet egy patkány hippokampuszának CA1-es területéből származó szeletén végeztek el.

A kísérletben különböző frekvenciájú stimulálás hatására vizsgálták a szinaptikus erősség változását, aminek mérésére a mezőpotenciált, azaz idegsejtek csoportjainak aktivitásából származó potenciált használták. Az ábrán alapján összehasonlíthatjuk a kontroll-szinttel a nagy- és az alacsony frekvenciás stimulálás tranziens és hosszú távú hatását. Az 1 másodpercig taró magas frekvenciás, 100 Hz-es stimulálás hosszú távú (több 10 percig) fennmaradó erősödést okozott a szinaptikus kapcsolatokban (ún. LTP, azaz Long Time Potentiation), a hosszú ideig tartó alacsony frekvenciás (10 percig 2 Hz-es) stimulálás pedig gyengülést eredményezett (ún. LTD, vagyis Long Time Depression).

3. Az sCSD analízis

3.1. Az sCSD analízis elméleti háttere

A sCSD módszer segítségével az egyes idegsejtek áramforrássűrűség eloszlásainak, valamint az akciós potenciál kialakulásának tér- illetve időbeli dinamikája vizsgálható. A hagyományos CSD módszer ezek meghatározására nem alkalmas, tekintve hogy végtelen nagy, lamináris forráseloszlást feltételez, mely jól alkalmazható idegsejtpopulációk esetén, de nem használható egy neuronra. Ezért egy olyan modellre van szükség, mely alapján egyes idegsejtek áramforrássűrűségei is meghatározhatóak az extracelluláris potenciálokból, melyhez először az inverz problémát kell definiálni. Az inverz problémát tehát az áramforrások meghatározása jelenti esetünkben az elektródával mért potenciálokból. Azonban ez nem egy egyértelmű feladat. Korábban láttuk, hogy az extracelluláris potenciál kielégíti a Poisson-egyenletet (12), valamint, hogy N darab a transzmembrán áramokat helyettesítő pontforrás esetén az extracelluláris tér i-vel indexelt pontjában a potenciál a pontforrások súlyozott összegéből adódik. A . képlet átírásával a következő formulát kapjuk:

$$\Phi_{i}\left(\mathbf{r}_{\mathbf{i}}\right) = \frac{1}{4\pi\sigma} \sum_{j=1}^{N} \frac{I_{j}(t)}{|\mathbf{r}_{\mathbf{i}} - \mathbf{r}_{\mathbf{j}}|}$$
(15)

A fenti egyenletet a mátrixformalizmus bevezetésével a következő formába írhatjuk:

$$\Phi = \underline{T}I \tag{16}$$

ahol I az N pontforrás áramerősségét tartalmazó vektor, Φ az M mért potenciálértéket tartalmazó, T pedig az úgynevezett $M \times N$ -es transzfer mátrix, mely az egyes pontforrások által generált potenciálmintázatokat tartalmazza az elektródánál az adott közegre és forrásgeometriára. A 16. egyenlet invertálásával az inverz problémát kapjuk. Az invertálás általában végrehajtható, amennyiben a mérések száma nem kisebb a források számánál. Az sCSD egy olyan modell, mely a forrás tulajdonságaihoz illeszkedve biztosítja az inverz probléma megoldásának egyértelműségét.

Az idegsejt elektródával párhuzamos egyenes szakasszal való közelítése a számításokat nagyban leegyszerűsíti, de a kérgi neuronok alapvető tulajdonságait megőrzi, mint például a hosszúkás alakot és a piramis sejtek tipikus irányítottságát. Feltéve, hogy az extracelluláris potenciál az elektródával párhuzamos szakaszon lévő pontforrások hatására alakul ki, a transzfer mátrix adott komponense a következőképpen



7. ábra. Az elektóda és idegsejt egymáshoz képesti helyzetének sematikus rajza

írható:

$$T_{ij}(d) = \frac{1}{4\pi\sigma\sqrt{(x_j - y_i)^2 + d^2}}$$
(17)

ahol d az elektróda és a forrás közötti távolság, x_i és y_j pedig az i-edik forrás és a j-edik elektróda távol-sága (14.ába). Tehát adott elektróda és forrás alak esetén a tüske potenciálmintázata csak d-től függ:

$$\Phi(d) = T(d)I \tag{18}$$

A források és az elektródák számát egyenlőnek választva T négyzetes mátrix lesz, így az inverzmegoldás alakja a következő:

$$I(d) = T(d)^{-1}\Phi \tag{19}$$

A problémát a megfelelő d érték megtalálásával lehet egyértelművé tenni, erre a célra különböző mértékeket definiáltunk. Tudjuk, hogy az akciós potenciál kialakulásának helyén a sejtbe pozitív ionok áramolnak be, illetve negatív ionok áramolnak ki, de ezzel párhuzamosan a sejt többi részén egy ellentétes folyamat játszódik le, tehát a többi csatornán ellentétes előjelű az áramforrássűrűség, a sejtmembránon át áramló nettó áram az egész sejtre nézve 0. Az áramforrássűrűség eloszlás rekonstrukciójának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy kis távolságokra a főcsatornával szomszédos csatornákon is azonos előjelű jeleket kapunk. A távolságot növelve természetesen nő a főcsatornán (ahol legnagyobb a jel amplitúdója) lévő jel amplitúdója, a szomszé-dosoké viszont egyre csökken, majd átmegy ellentétes előjelűvé. Nagy távolságokra a szomszédos csatornákon nagy a főcsatorna jelével ellentétes értékű áramforrások alakulnak ki, majd ezek szomszédos csatornáin ezekkel ellentétes előjelű áramforrások "sok" jelentek meg egy csíkos mintázatot létrehozva, így előállítva a tüskét. Az ilyen "csíkos" megoldások biológiailag nem reálisak.

A távolság meghatározására három különböző mértéket vezettünk be:

1. Az S1 mérték az áramforrássűrűségek előjeles összegének minimalizálásán alapul. Feltesszük, hogy a főcsatornán és a mellékcsatornákon (a főcsatornán kívüli csatornák) az áramforrások ellentétes előjelűek. A mellékcsatornák és a főcsatorna tüske időtartama alatti áramforrásértékeinek (I_m és I_f) abszolút értékét külön-külön összegezzük, kivonjuk őket egymásból, majd súlyozzuk, a főcsatorna jelének amplitúdójával:

$$S1 := \frac{\sum |I_m| - \sum |I_f|}{\max I_f} \tag{20}$$

Ebben az esetben a mérték legkisebb értéke határozza meg a sejt távolságát az elektródától.

2. Az S2 mérték a "legtüskésebb" áramforrássűrűség eloszlás esetén adja a maximális értéket. A következőképpen számolható:

$$S2 := \max_{j} \frac{-I_{j}}{\sqrt{\sum_{j=1}^{N} {I_{j}}^{2}}} - \langle \frac{-I_{j}}{\sqrt{\sum_{j=1}^{N} {I_{j}}^{2}}} \rangle$$
(21)

Ahol $\langle \rangle$ az átlagot jelöli és a maximummal valamint az összegzésekkel együtt a diszkrét áramforrássűrűségeken fut végig. A fenti mérték a 0 és 1 közötti értékeket veheti fel, 0 abban az esetben, mikor a maximum és az átlag megegyezik, konstans áramforrássűrűség eloszlás esetén, maximális abban az esetben mikor egy éles csúcs ül egy sima jelen. A negatív előjelre a tüskének megfelelő negatív csúcs miatt van szükség.

3. Az S3 mérték a tüske időtartama alatt vizsgálja a főcstornán kívüli csatornákon az áramforrássűrűségek szórásának a tüske időtartamára illetve a főcstornán kapott jelalak maximumának hányadosát:

$$S3 := \frac{\mathbf{D}(I_m)}{\max I_f},\tag{22}$$

ahol **D** jelöli a szórást. Ez a mérték kis értéket ad, ha a mellékcsatornákon hasonlóak az értékek, bünteti a "csíkos" mintázatokat, valamint súlyoz a főcsatorna jelalakjának amplitúdójával. A sejt távolságának meghatározásához itt is mérték legkisebb értékét keressük.

Tehát az sCSD számolása az S2 mértéket használva (8.ábra):

1. A transzfermátrix inverzének és az áramforrássűrűségek kiszámolása a releváns távolságokra (1-200 μ m) adott lépésközökben



8. ábra. Az áramforrássűrűség eloszlás potenciáleloszlásokból való meghatározásának lépései

- 2. A maximális mértékű megoldás kiválasztása, amiből az elektróda-sejt távolsága adódik
- 3. A kapott távolságnak megfelelő áramforrássűrűség eloszlás kiválasztása

3.2. Az sCSD módszer alkalmazhatósága

A dendritek 3 μ m körüli vastagsága tipikusan kisebb, mint a megfigyelés távolsága 0-60 μ m, tehát ezen a skálán a dendritek hatásai kiátlagolódnak, az extracelluláris tér homogénnek tekinthető. A közeg dielektromos tulajdonságainak frekvenciafüggését és az elektromos tér véges terjedési sebességét elhanyagoltuk. A modell az idegsejtet egy egyenes szakasszal közelíti, mely nagy mértékű leegyszerűsítése az idegsejt morfológiájának, azonban ez az egyszerűsítés és az idegsejt elektródával párhuzamos voltának feltételezése jól alkalmazható a piramissejtekre.



9. ábra. Az elektróda helyzete az egér agyában.

4. Adatfeldolgozás

4.1. Mérési adatok

A kísérletet Hajós Mihály csoportjában (Pfizer Inc., Global Research Development, USA) végezték el az Alzheimer-kór sejt szintű elváltozásainak megfigyelése céljából. A mérést az Alzheimer kór kísérleti modelljével megbetegített egéren végezték 14030 másodpercig. A mérés során 10 másodpercenként stimulálták az idegsejteket, valamint a 4650 és 5150 másodperc közötti időben nagyfrekvenciás (300 Hz) LTP-s kezelés történt (11.ábra). A mérésekhez használt rúd alakú multielektróda 16 csatornán rögzítette a potenciálokat. Az elektróda alakját és elhelyezkedését az agyban a 9.ábrán láthatjuk, az elektróda rajzán a piros pöttyök jelölik az egyes csatornákhoz tartozó kis elektródákat, az agyban található vörös foltok pedig az amiloid- β plakkokat. Az elektróda mellett egy piramissejt sematikus rajza látható, a piros színű nyúlványok a bazális a kékek pedig az apikális dendriteket



10. ábra. A 8. csatornán rögzített extracelluláris potenciál a mérés 900. és 930. másodperce között



11. ábra. A nagyfrekvenciás LTP-s kezelés nagyobb (felső ábrarészlet) illetve kisebb (alsó ábrarészlet) időbeli felbontással. A kék keretes részletek ugyanazt a két nagyferekvenciás jelsorozatrészletet mutatják



12. ábra. Az egér neocortexének és hippokampuszának rétegei. Továbbá láthatóak az elektróda kontaktpontjai is, ez alapján megbecsülhető, hogy melyik rétegek jelei kerültek rögzítésre. Az adott réteg principális sejtjei ismertek, ami segítséget nyújt az áramforrássűrűség eloszlások értelmezésében.

jelölik. A kettő találkozásánál van a sejttest, mely a hippokampuszban található piramissejek sejttestét tartalmazó stratum pyramidale rétegben helyezkedik el, mely sötét sávként jól megfigyelhető az ábrán. A multielektróda csatornái közti távolság 100 μ m,a mintavételezési frekvencia 30 kHz volt, ezek határozzák meg az sCSD módszer tér és időbeli felbontását. Az elektróda az neocortexre merőlegesen helyezkedett el, mely az sCSD módszer alkalmazhatóságának egyik feltétele. A multielektróda lineáris alakjából következően nem alkalmas a forrás pontos térbeli meghatározására, az elektróda síkjával bezárt szög ismeretlen marad. Az elektróda behelyezéséből adódóan az agykérgi V. és VI. rétegében, valamint a hippokampusz CA1-es és dentate gyrus részeiben mért jelek kerültek rögzítésre.

A multielektróda által rögzített extracelluláris potenciál rengeteg idegsejt aktivitásának eredménye, de csupán a közelebbiek (< $60\mu V$) elektromos aktivitásának amplitúdója elég nagy ahhoz, hogy a zajból kiemelkedjenek.

4.2. Az elektróda csatornáinak helyzetmeghatározása

Az elektróda behelyezése (12.ábra és a áramforrássűrűségek elemzése alapján a csatornák helyzete megállapítható. Tudjuk, hogy az elektróda a hippokampusz illetve neocortex jeleit rögzíti. Ezenkívül két támpontunk van, az egyik az alveus, a másik pedig a CA1 és dentate gyrus határa. Az alveusba olyan csatornák esnek, melyeken nem találtunk tüskét, hiszen ebben a rétegben nincsenek sejttestek. A dentate gyrus és a CA1 határán pedig az agyhullámokban fázisugrást kell látnunk. Ezek alapján az alveusban a 12. és 13. csatorna található a CA1 és dentate gyrus határa pedig az 5. csatorna körül van. Tehát az 1-4. csatornák a dentate gyrus jeleit, az 5. és 11. közöttiek a CA1 jeleit, a 14-16 közöttiek pedig a neocortex jeleit rögzítik. A csatornák részletesebb elhelyezkedését az áramforrássűrűség eloszlások kiértékelésénél mutatom be.

4.3. Mérési adatok előkészítése

Ahhoz, hogy az sCSD analízist elvégezhessük, szükségünk van az egyes idegsejtek akciós potenciáljaiból származó mért potenciálok (tüskék) jelalakjára. Tehát külön kell választanunk a jelalakokat aszerint, hogy mely sejtektől származnak, valamint az sCSD-ben felhasznált távolságbecslő mérték zajra való érzékenysége miatt növelni kell a jel/zaj arányt. Az egyes sejtektől származó tüskék alakja jellemző az adott sejtre, ezért az adott sejtektől származó tüskéket szétválogathatjuk a jelalakok sajátosságai alapján [18]. A jelalakok sajátosságainak meghatározására principális komponens analízissel (PCA) történt. A jelalaksajátosságok meghatározása után a tüskéket modell alapú klaszterezéssel klaszterekbe rendeztük, majd az adott klaszterekbe tartozó jelalakokból kiszámoltuk a klaszterátlagot. Az így kapott klaszterátlagok már felhasználhatóak sCSD analízisre, hiszen ezekben az egyes sejtektől származó átlagolt jelalak van, melyben a jel/zaj arány már sokkal nagyobb, mint az egyes tüskékben. Bár elérhetőek tüskeválogatásra, szűrésre, klaszterezésre alkalmas programok (SpikeOMatic [19], SpikeSol [20], ezek a klaszterezést csak egy csatorna jelalakjai alapján végzik, ezért írtunk egy olyan programot, mely elvégzi a szükséges számításokat és igényeinkhez alkalmazkodik, mind az alkalmazott módszerekben, mind a megjelenítésben. Az extracelluláris potenciálok .ns5 kiterjesztésű bináris fájlban voltak tárolva, melynek nagysága 12,5 GB. Mivel számítógépeink memóriája jóval kisebb volt, így a mérési adat feldolgozása 30 másodperces szakaszonként történt.

13.ábra felső részében a 8. csatornán rögzített nyers adatból kivágott 1 s hosszúságú rész látható, ezen szembetűnő egy nagy, körülbelül 200 μ V amplitúdójú alacsonyfrekvenciás (< 300 Hz) oszcilláció. A tüskedetektáláshoz ezen oszcillációk illetve a zaj eltávolítása, azaz a nyers adat szűrése elengedhetetlen. Az áteresztési tartományt a számunkra fontos események, azaz az akciós potenciál időtartama határozta meg, mely 0,5-2 s körüli, ennél egy kicsit szélesebb, 300 Hz és 3000 Hz között áteresztő szűrőt használtunk. Ezenkívül szükséges a 10 másodpercenként alkalmazott stimuláló jelek eltávolítása is, ezért azok időponta körüli időben a szűrt adatot kinulláztuk.

A tüskék kiválogatása a mérési adatokból minden csatornán egy küszöbérték, jelen esetben minden csatornán -30 μV , segítségével történt eltárolva azt az időpontot, amikor a jel éppen a küszöb alá ment. A küszöbérték egy kompromisszumot jelent a nem detektált tüskék és a hamisan detektált zaj között. További hibát okoz a küszöbértékes tüske detektálásban a tüskék átfedésének jelensége [18].

A szűrt adatokból a küszöbérték segítségével kiválogatott tüskék különböző alakúak, a különböző alakok különböző idegsejttektől származnak. Az egyes idegsejtek által előállított akciós potenciáloktól származó jelalakok általában jellemzőek az adott sejtekre, ez alól kivételt képeznek a börsztölő, azaz sorozatban tüzelő sejtek jelalakjai (14.ábra), mert ilyenkor az akciós potenciál alakja változik, amplitúdója általában csökken. A tüske jelakakját főleg az elektródához viszonyított helyzete határozza meg, de az idegsejt morfológiája is befolyásolja. Felmerül a kérdés, hogy



idő [s]
13. ábra. A 8. csatornán rögzített nyers adat 1 másodperces része (felül), illetve

annak sáváteresztő szűrővel szűrt változata



14. ábra. A 15. csatornán megfigyelhető a börsztölés jelensége

mik azok a tulajdonságok, amik alapján a jelalakokat meg akarjuk különböztetni. A sejtek elkülönítése első körben aszerint történik, hogy melyik mérési csatornán volt a legnagyobb tüskéjének amplitúdója, vagyis milyen mélységben helyezkedik el az axondombja. Azonban több sejt is lehet ugyanabban a magasságban, tehát további jellemzők bevezetés szükséges. Ilyen tulajdonság lehetne például a tüske amplitúdója, de ez még nem elég, hiszen lehet több sejt is hasonló távolságban az elektródától, börsztölés fellépésekor pedig egy sejttől származó tüskéknek is változik az amplitúdója. Előfordulhat az is, hogy van egy kis amplitúdós tüskéjű sejt egy csatornán, a szomszédos csatorna magasságában egy nagy amplitúdós sejt, melynek jele az először említett csatornán hasonló amplitúdóval megjelenhet. Ezen példák szemléltetik, hogy a jelalakok jellemzésére valamilyen általánosabb módszer szükséges. Ugyan egyszerű megoldás lenne egy adott időablakkal kivágott tüskék (pl. 1-2 ms) mérési pontonként való összehasonlítása, de ez egy sokdimenziós problémához vezet, hiszen 1,5 ms esetén az adatpontok száma 3 csatorna esetén 135. Ezen probléma dimenziószámának redukálására alkalmas megoldás a főkomponensanalízis [18], mely a főkomponenseket veszi a tüskék jellemzésére szolgáló tulajdonságoknak és ezek súlyozott összege adja vissza a tüskéket. Egy tüske (x(t)) esetén az i. főkomponens súlyát (s_i) a következő képlet szerint kaphatjuk meg:

$$s_i = \sum_t c_i(t)x(t), \tag{23}$$

ahol a szummázás *t*-re, azaz időablakon belüli mintavételezési időpontokra megy. A főkomponensek az adattömb kovarianciamátrixának sajátvektorainak számolásával adódnak és aszerint vannak rendezve, hogy a tüskék variabilitásában mekkora szerepet játszanak, tehát az első egynéhány főkomponenssel már leírja az adat változatosságának nagy részét. A főkomponensanalízist 3 csatornára végeztük, ami azt jelenti, hogy a kiválasztott csatornáról kivágtuk a tüskét egy adott időablakkal, majd a detektált tüske jelalakja elé és mögé hozzáfűztük a felett illetve alatta lévő csatornákon az adott időablakban megjelenő jelalakokat. Ez a lépés is a különböző neuronoktól származó jelalakok jobb elkülönítését segíti elő. képletek stb.

A főkomponensanalízissel kapott komponensekből az első 6 komponenst tekintjük a tüskék tulajdonságainak, ezek alapján válogatjuk szét őket különböző csoportokba. Klaszterezés során objektumokat szeretnénk különböző csoportokba, azaz klaszterekbe válogatni a rajtuk végrehajtott több dimenziós megfigyelés alapján egy minimalizálandó veszteségfüggvény segítségével. Az n darab objektumnak jelen esetben a tüskék főkomponensekkel kifejezett alakjai felelnek meg. Klaszterezés sorén feltettük, hogy a klaszterek Gaussos eloszlásúak, majd alkalmaztuk a Gaussian Mixture Based Clustering [21] eljárást. A klaszterezés során minden klaszter Gaussos eloszlású:

$$\Phi_k(\mathbf{x}|\mu_k, \Sigma_k) = (2\pi)^{-p/2} |\Sigma_k|^{-1/2} exp\{-1/2(\mathbf{x}_i - \mu_k)^T \Sigma_k^{-1}(\mathbf{x}_i - \mu_k)\}, \qquad (24)$$

Ahol **x** az adat, k a k. klaszter jelenti. A klaszterek ellipszoid alakúak, középpontjuk a μ_k átlagok, további geometriai alakjukat a Σ_k kovarianciamátrix határozza meg. Minden kovarianciamátrix sajátértékdekompozícióval van parametrizálva a következő formában:

$$\Sigma_k = \lambda_k D_k A_k D_k^T, \tag{25}$$

ahol a D_k a sajátvektorokból álló ortogonális mátrix, A_k a diagonális mátrix elemei a Σ_k sajátértékeivel arányosak, λ_k pedig skalár.

Programomban az Mclust függvényt használtam, melynek három argumentumot kell megadni: egy mátrixot mely a megfigyeléseket tartalmazza, valamint a klaszterek minimális illetve maximális számát. A jelenlegi esetben a megfigyeléseknek a tüskéknek az első hat főkomponensre vett vetülete felel meg, a minimális klaszterszámot 3-nak, a maximálista pedig 10-nek választottam. A kovarianciamátrix főkomponenseit, a sűrűségkontúrt pedig A_k határozza meg, az ellipszoid térfogata pedig $\lambda_k^d |A_k|$ -val arányos, ahol d az adat dimenziója. Az eloszlás alakját (irány, térfogat, alak) az adat határozza meg, és megkövetelhetjük ezen jellemzők megegyezését vagy nem megegyezőségét a különböző modellekben. A különböző modellek közül kiválasztjuk a legjobbat a BIC (Bayesian Information Criterion) kritérium alapján, mely különböző paraméterszámú modellek összehasonlítására alkalmas, ehhez a maximum likelihood függvényt használja, de bevezet egy büntetést, mely a modellben szereplő paraméterek számával arányos. Ezen mérték alapján az mclust eljárás kiválasztja a legjobb modellt és klasszifikálja az elemeket. A 15-ös csatorna klaszterezése során kapott klaszterek látszanak a 15.ábrán. Ezen a csatornán egy börsztölő sejt található, a börszt első tagja a legnagyobb amplitúdójú, az utána lévőké egyre csökken. A börszt különböző tagjainak megfelelő klaszterek a 6., az 1. és az 5. az amplitúdó szerint csökkenő sorrendben, melyek az ábrán egymás mellett helyezkednek el, a kisebb amplitúdójúak kisebb értékeket vesznek fel.

Egy a komponensek klaszterezésével kapott klaszter az egy adott sejttől származó tüskéket tartalmazza, ha a klaszterezés jól működött, egy sejthez több klaszter is tartozhat pl. börsztölés során megjelenő jelalakváltozás miatt. 16.ábrán a 14. csatornán található tüskéken elvégzett klaszterezés eredményeként az egyik



A 15. csatornán detektált tüskékből álló klaszterek 2 dimenziós vetülete

15. ábra. A 15. csatorna klasztereinek első két főtengelyre vett vetülete.



16. ábra. A 10. klaszterbe tartozó első 50 tüske.

klaszterbe tartózó tüskékből az első 50 darab. Szemmel láthatóan a tüskék alakja és amplitúdója nagyon hasonló.

A klaszterezés minőségének egy egyszerű módszere az adott klaszterbe tartozó tüskék között eltelt idők (Inter Spike Interval, ISI) vizsgálata. Amennyiben kisebb időközök előfordulnak, mint a refraktori idő hossza, a klaszter nem tiszta. Ennek számszerű méréséhez a 2 ms-on illetve 10 ms-on belüli tüskék arányát vizsgáltuk.

Miután csoportosítottuk a tüskéket a hozzájuk tartozó sejt szerint, a klaszterekbe tartozó jelalakokból egy jelátlag számolható, klaszterátlagnak nevezzük az összes csatornára vett átlagot, mely az ezen klaszterbe tartozó tüskék időpontjai alapján számolható. 17.ábrán ugyanannak a klaszternek a klaszterátlaga látható, mint amibe tartozó tüskéket a 16 ábra mutat, tehát a 14-es csatornán figyelhető meg nagy amplitúdójú tüske, mely a 16 ábrán láthatóakhoz képest sokkal simább az átlagolás miatt. A szomszéd csatornákon, főleg a 15-ösön még megfigyelhető egy sokkal kisebb amplitúdójú tüske, a távoliabbokon már nem beleolvad a zajba.

Az átlagolással a zaj aránya a jelhez képest csökken. Ezen átlagolt és így sokkal zajmentesebb klaszterátlag lesz az sCSD analízis alapja. A klaszterátlagot gyakorlatilag egy tömbként is tárolható, aminek sorai a különböző csatornáknak, oszlopai a különböző mérési pontoknak felelnek meg. A klaszterátlagnak egy ilyen ábrázolása látszik a 18.ábrán, melyen a színek jelölik a jel nagyságát.

Az áramforrássűrűség eloszlás és az extracelluláris potenciálok klaszterátlagai között a transzfermátrix teremt kapcsolatot, ennek inverzével beszorozva a klaszterátlagot, megkapjuk az áramforrássűrűség eloszlást. A transzfermátrixban szerepel a sejt és az elektróda távolsága, mely ismeretlen, ezen probléma áthidalása a különböző mértékek bevezetésével történt (ld. sCSD analízis elméleti háttere).

Az sCSD módszer segítségével tehát a sejtek elektródától mért távolságát is megkapjuk, ez látszik a 19.ábra felső részén. Az ábra alsó részén az adott távolságra lévő sejtek tüskéinek amplitúdója látszik.



17. ábra. A 10. csatorna 2. klaszterének átlaga csatornánként megjelenítve 4 ms-os időablakkal. Jól megfigyelhető, hogy a jel amplitúdója a 10. csatornán a legnagyobb, a 7. és 13. csatornákon még éppen látszik egy kis jel.



18. ábra. A 10. csatorna 2. klaszterátlaga ellentétes előjellel ábrázolva nemlineáris színskálás ábrán. Ez az ábrázolásmód lehetővé teszi a lineáris skálán nem látható kis jelek megfigyelését is, valamint könnyebbé teszi az áramforrássűrűségekkel való összehasonlítását.



A klasztereknek megfelelő sejtek távolságai az elektródától



19. ábra. A sejtek elektródától mért távolsága



A klasztereknek megfelelő sejtek áramforrássűrűség amplitúdói

20. ábra. Az egyes klasztereknek megfelelő idgsejtek akciós potenciáljai során kialakuló áramforrássűrűségek amplitúdói

5. Eredmények

5.1. Az összefoglaló ábrák értelmezése

Az összefoglaló ábrákon különböző csatornák adott klaszterei esetén láthatóak az első sorban az átlagolt tüskejelalakok (klaszterátlagok) a főcsatornán illetve a két szomszédos csatornán, a második sorban az átlagolt potenciáleloszlás színkódolt ábrázolásmódban, a harmadik sorban pedig a potenciáleloszlásokból számolt áramforrássűrűség eloszlások ugyancsak színkódolva. Az átlagokat megjelenítő ábrákon a fekete szín tartozik a főcsatornához, narancssárga az eggyel alatta lévő, lila pedig az eggyel felette lévő csatornához. A színskála arcustangens alapú, mely előnye, hogy a nagy értékű kelek mellett látszanak a kis változások is, melyek számunkra fontosak lehetnek. Az áramforrássűrűség eloszlásos ábrákon a piros szín a pozitívan töltött ionok sejtbe történő beáramlásának illetve a negatívan töltött ionok sejtből történő kiáramlásának felel meg. Érdemes összevetni az áramforrássűrűség- és potenciáleloszlásos ábrákon látható mintázatokat, ennek megkönnyítése érdekében a potenciálátlagos és potenciáleloszlásos ábrákon az eddig használt konvenció ellentettjét ábrázoltuk, azaz a tüskéknek pozitív csúcsok felelnek meg. Mivel a elektromos jelek tér- és időbeli dinamikáján kívül érdemes a kezelés hatására történő változásokat is megfigyelni, a klasztereket 2 részre bontottuk, az első részbe tartoztak az ltp előtti tüskék a másodikban pedig az ltp utáni tüskék, ezeknek az első és a második oszlop felel meg. A harmadik oszlopban pedig pedig a kezelés hatására történő változás látszik, azaz az ltp utáni eloszlások és az ltp előtti eloszlások különbsége.

A negyedik sor első ábráján a bevezetett mértékek értékei látszanak a távolságok függvényében. Az S1 és S3 mértékek esetén a minimumhely határozza meg a távolságot, az S2 mérték esetén pedig a maximum. A részábrán a mérték neve utáni 'e' betű jelzi azt, hogy ezen távolságbecsléshez a klaszter ltp előtti tüskéit használtuk, 'u' betű pedig, hogy az azutánit. A mértékek úgy lettek skálázva, hogy a kapott maximális illetve minimális érték abszolútértékének maximuma egy legyen.

A sejt börsztölési tulajdonságaira és a klaszter tisztaságára is utal az ISI hisztogram, mely az egy klaszterbe tartozó tüskék között eltelt időket mutatja. A hisztogrammok 20 ms-ig mutatják az időközöket. A 2 ms-on illetve 10 ms-on belüli időközök számának (N_{2ms} és N_{10ms})aránya abban az esetben, ha véletlenszerűen, de egyenletesen oszlanak el a tüskék:

Azon esetekben, mikor 10 ms-os tüzelési időközön belül kevesebb, mint három elem volt, a hisztogrammok ábrázolására nem került sor.

					ltp előtt				ltp után				
ch	k	Ι	elott	lutan	N	N _{2ms}	N _{10ms}	N_2ms/N_10ms	Ν	N _{2ms}	N _{10ms}	N_2ms/N_10ms	amplitúdó
2	1	42	47	37	225	0	4	0	82	0	0	NA	1440
3	1	30.5	31	30	577	2	22	0.091	160	1	1	1	1149
4	1	36	44	28	104	0	1	0	39	0	0	NA	1256
5	1	30.5	38	23	191	2	5	0.4	75	0	1	0	986
6	1	45	53	37	440	6	24	0.25	90	0	3	0	1690
6	2	52	72	32	163	0	16	0	28	0	5	0	2128
7	1	17	15	19	216	6	49	0.122	579	8	60	0.133	919
7	2	13.5	14	13	711	20	135	0.148	645	5	66	0.076	485
7	3	24.5	22	27	228	19	82	0.232	42	3	8	0.375	1284
7	4	37	33	41	1749	57	368	0.155	629	11	74	0.149	1565
7	5	13	10	16	1508	77	402	0.192	108	2	25	0.08	743
8	1	34	34	34	1707	55	378	0.146	308	12	69	0.174	1931
8	2	21	26	16	1232	38	302	0.126	1221	24	164	0.146	875
8	3	35.5	38	33	200	14	77	0.182	56	3	13	0.231	2081
8	4	16	21	11	893	23	156	0.147	258	1	132	0.008	1196
8	5	23	29	17	891	20	157	0.127	424	11	39	0.282	1522
8	6	36	39	33	1199	41	260	0.158	943	8	119	0.067	1340
9	1	33.5	34	33	1715	17	139	0.122	2235	39	358	0.109	1242
9	2	21	23	19	218	5	29	0.172	104	1	12	0.083	699
9	3	21	20	22	450	2	29	0.069	4691	41	445	0.092	659
9	4	21	23	19	288	6	40	0.15	103	6	21	0.286	623
9	5	60.5	60	61	292	7	38	0.184	423	15	76	0.197	2446
9	6	31.5	29	34	520	9	72	0.125	527	7	63	0.111	1382
10	1	48.5	59	38	1728	23	209	0.11	743	6	45	0.133	2060
10	2	14	14	14	1840	12	148	0.081	1095	1	36	0.028	878
10	3	32	31	33	957	16	110	0.145	434	0	27	0	1176
10	4	17.5	15	20	308	5	50	0.1	49	0	6	0	1073
11	1	47	37	57	40	0	1	0	7	0	1	0	2542
11	2	39	41	37	36	0	0	NA	19	1	1	1	1237
11	3	12	23	1	64	0	2	0	4	0	0	NA	361
11	4	44	38	50	159	1	3	0.333	49	0	1	0	1721
11	6	50.5	35	66	119	0	3	0	3	0	0	NA	3118
14	1	8.5	9	8	91	2	31	0.065	85	3	32	0.094	314
14	2	77	150	4	218	1	51	0.02	312	0	118	0	1253
14	3	24	31	17	1410	14	240	0.058	1841	19	476	0.04	889
15	1	5.5	6	5	715	28	407	0.069	65	5	56	0.089	933
15	3	1	1	1	14	13	13	1	8	8	8	1	33
15	4	20	23	17	617	12	162	0.074	748	14	218	0.064	735
15	5	5.5	5	6	766	7	494	0.014	844	8	534	0.015	443
15	6	4.5	6	3	1	0	1	0	554	27	320	0.084	1057

21. ábra. A táblázat a különböző klaszterek ltp előtti és utáni jellemzőit mutatja. Az első oszlopban a csatornaszám (ch), a másodikban a klaszterszám (k) szerepel. A klaszterekhez tartozó sejtek ltp előtt (l_{eltt}) és után (l_{utn}) S1 mérték alapján számolt távolságát a 4. illetve 5. oszlopban találjuk, az ezek átlagaként kapott távolságot (l)a 3. oszlopban találjuk. A klaszter LTP előtti és utáni elemszámát a megfelelő "N"nel jelölt oszlopok, a 2 és 10 ms-on belül eső elemek számát az "N_{2ms}" és "N_{10ms}" nevű, ezek arányát pedig az "N_{2ms}/N_{10ms}" nevű oszlopok mutatják. A 10-nél kisebb elemszámokata piros szín, a 100-nál kisebbeket pedig a kék szín jelzi. Az utolsó oszlop az áramforrássűrűség tüskéjének egységekben mért amplitúdóját mutatja.

$$\frac{N_{2ms}}{N_{10ms}} = 0.2\tag{26}$$

Tehát elvárás az, hogy elég nagy tüskeszám esetén a klaszterekben ez az arány 0.2-nél kisebb legyen.

A főkomponensanalízist a főcsatornára és a szomszédos csatornáira végeztük, így a legelső és legutolsó csatorna jeleit nem elemeztem.

5.2. Kiértékelés

Az első négy csatorna a hippokampusz dentate gyrus tartományába esik. Az ezeken a csatornákon található tüskék amplitúdója alig haladja meg a 30 μ V-ot, azaz a detektálási küszöböt és mind egy klaszterbe esnek. Ezen réteg principális sejtjei a granuláris sejtek és az interneuronok.

Különösen érdekes a 4. csatorn 1. klasztere, itt ugyanis megfigyelhetőek a bemeneti jelek is. Ez a jelenség leginkább a 22.ábra 'Áramforrássűrűség eloszlás LTP után' című részábráján látszik az alsó négy csatornán egy világosabb színekből álló fordított 'V'első felének formájában. A bemeneti jelek a szómáig terjednek, majd az axon iniciális szegmentumon létrehozva az akciós potenciált, a dendritikus visszaterjedés figyelhető meg, ez adja a fordított 'V' másik, kicsit rövidebb ágát. 'Az áramforrássűrűség eloszlás különbsége' című ábra alapján azt mondhatjuk, hogy a bemeneti jelek erőssége az LTP hatására nőtt. Az LTP előtti tüskék alapján számolt sejttávolság kicsit nagyobb, mint az LTP utánié. A klaszter tisztaságát, jelzi, hogy egy szomszédos tüzelések közötti idő sem esik 2 ms alá. A potenciáleloszlásos ábrákon megfigyelhető a dentate gyrus és CA1 rétegek határa, mely a piros és kék területek találkozásánál van.

A 9. és 10. csatorna a stratum pyramidale jeleit rögzíti, erre utal, hogy minden csatornán található olyan klaszter, melybe tarztozó tüskék száma meghaladja az 1000-et LTP előtt és után is. A 8. csatornán is található ilyen klaszter, ám abba a 9. csatornán maximális amplitúdójú jelek tartoznak. A 10. csatorna 2. klaszterében LTP előtt és LTP után is több, mint 1000 tüske tartozik, ez meg is látszik a potenciálátlagok "simaságán". Ez a sejt valószínűleg egy CA1-es piramissejt, melynek sejtteste a stratum pyramidale-ba esik. Az áramforrássűrűség eloszlásokon jól megfigyelhetőek az akciós potenciál hatására kialakuló dendritikus visszaterjedések apikális (9. csatorna) és bazális (11.csatorna) irányba is.



22. ábra. A 4. csatorna 1. klaszterének összefoglaló ábrája. Az áramforrássűrűséges ábrákon megfigyelhetőek a dendritikus visszaterjedés mellett a bemeneti jelek is.



23. ábra. Az 10. csatorna 2. klaszterének összefoglaló ábrája. Ez a klaszter valószínűleg egy piramissejt jeleit tartalmazza.



24. ábra. Az 5. csatorna 6. klaszterének összefoglaló ábrája. Ez a klaszter egy börsztölő neocortexi piramissejt jeleit tartalmazza. Jól látszik, hogy ebben a klaszterben vannak a börszt első, azaz legnagyobb amplitúdós tagjai, hiszen a nem látszanak kisebb tüskék a nagy tüske előtt.



25. ábra. Az 5. csatorna 1. klaszterének összefoglaló ábrája. Ez a klaszter egy börsztölő neocortexi piramissejt jeleit tartalmazza. Ez a klaszter kisebb amplitúdójú jeleket tartalmaz.



26. ábra. Az 5. csatorna 5. klaszterének összefoglaló ábrája. Ez a klaszter egy börsztölő neocortexi piramissejt jeleit tartalmazza.

A 14-16. csatornák a neocortex alső rétegeiben találhatók, ahol piramissejtek jelenléte jellemző. A 15. csatornán található klaszterekhez tartozó távolságok az 1. (25.ábra), 5. (26.ábra), és 6. (24.ábra) klaszterek esetén megegyeznek, a klaszterbe tartozó jelalakok amplitúdójukban különböznek.Ezen klaszterekbe tartozó jelalakok tehát egy börsztölő sejttől származnak, így változnak a mért tüskék amplitúdói. A 15. csatorna 5. klasztere, mely valószínűleg egy neocortexi piramissejtek jeleit tartalmazza, jó példa a börsztölés bemutatására. Már a potenciálátlagokon látszanak a főcsatornán a tüske előtt és után is körülbelül 4 ms-al kisebb tüskék. Ezek a kisebb tüskék a börszt többi tagjának átlagolt verziója. A kis tüskék amplitúdója nem egyezik meg az időablak közepén lévő tüskéjével, mert nem minden esetben van a börsztben előző, illetve következő tag.A börsztölés legszembetűnőbb mutatója természeten az ISI hisztogramm, melyen mindkét esetben csúcsot találunk 4 ms körül, tehát pont akkora időkülönbségnél, mint ami a potenciáleloszlásos ábrákon a piros csúcsok között van. Az akciós potenciál a 15. csatornán alakul ki, visszaterjedés a 14. csatorna felé látszik. A távolságbecslés minden mérték esetén közelítőleg egybeesik, a hisztogrammok ltp előtt és után hasonló eloszlást mutatnak, valamint a klaszter tisztaságát jelzik azzal, hogy 2 ms-os időn belül a gyakorlatilag nincs tüske.

Az LTP kezelés hatásáról általánosan elmondható, hogy növelte a tüske előtti jeleket, azaz a sejtek populációjának kapcsolatai erősödtek.

6. Összefoglalás

Diplomamunkámban egyes idegsejtek áramforrássűrűség eloszlásainak meghatározását és értelmezését mutattam be mikroelektróda rendszer mérései alapján. Továbbá részletesen elemeztem a mérési eredmények feldolgázására és a sCSD kiszámolására írt programot.

A bevezetésben az idegsejtek felépítésének és alapvető működésének bemutatása után áttekintettem az extracelluláris potenciálok biofizikai hátterét, annak számolása során alkalmazott közelítéseket, valamint az agyi képalkotó eljárásokat, az LTP jelenségét és az Alzheimer-kórt. Bevezettem az áramforrássűrűség fogalmát, majd az annak meghatározására hagyományosan használt CSD módszert. Míg a CSD módszer csak agyi rétegek áramforrássűrűségének számolására alkalmas a mért extracelluláris potenciálokból, az sCSD analízis segítségével egyes idegsejtek áramforrás sűrűsége is kiszámolható. A távolság meghatározására különböző mértékeket vezettünk be, így a Poisson-egyenlet inverz megoldása egyértelművé vált. Az sCSD módszert alkalmaztam Alzheimer-kór kísérleti modelljével megbetegített egér neocortexében és hippokampuszában mért extracelluláris potenciálokon. A kapott áramforrássűrűség eloszlások felbontását a mintavételezési frekvencia és az elektróda kontaktpontjai közti távolság határozza meg, a használta adatokban ez 30 kHz és 100 μm volt. A különböző neocortexi és hippokampuszi idegsejtek áramforrássűrűség eloszlásain többféle jelenség is megfigyelhető, például az akciós potenciál kialakulásának helye, a dendritikus visszaterjedés, a bemeneti jelek, a börsztölés jelensége és az LTP kezelés hatása.

Ahhoz, hogy az extracelluláris potenciálokra alkalmazzuk az sCSD módszert, szükség volt az akciós potenciálok 'nyomaként' látható tüskék megkeresésére és szétválogatására a jel alakja alapján, hiszen a tüskén alapul a távolság becslésére használt mérték és az idegsejtektől származó jelek csoportosítása. A tüskék detektálása a sáváteresztő szűrővel szűrt adaton egy küszöbérték segítségével történt, a jelalak szerinti csoportosítás pedig főkomponensanalízis és modell alapú klaszterezés felhasználásával.

Az sCSD módszer tehát lehetővé teszi eddig nem megfigyelt jelenségek megfigyelésére, mely mind az idegsejtek működésének megértésében, mind a különböző kezelések (LTP, gyógyszeres) hatásának megfigyelésében fontos eredményeket jelenthet. A módszer különböző mérési adatokon való alkalmazásán kívül további célkitűzéseink között szerepel alkalmazhatóságának szimulációkkal való igazolása is.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Somogyvári Zoltánnak, a diplomamunkám megírásában nyújtott segítségét, valamint kedvességét és türelmét. Ezenkívül köszönöm Ujfalussy Balázsnak és a csoport többi tagjának az ötleteiket és támogatásukat, továbbá Kiss Tamásnak és Hajós Mihály csoportjának a mérési adatokat és segítségüket azok értelmezésében. Különösen köszönöm szüleimnek, hogy támogatták egyetemi tanulmányaimat, minden téren segítettek és hogy mellettem álltak.

Hivatkozások

- [1] Somogyvári, Z., Zalányi, L., Ulbert I., and Érdi P. *Model-based source localization* of extracellular action potentials. Journal of Neuroscience Methods. 2005.
- Schlett, K. Az idegrendszer sejtes alkotói áttekintés. http://physiology.elte.hu/eloadas/Neurofiziologia/neurofiz_I_2011_1.pdf (2011.05.31)
- [3] Ujjfalusy, B. Idegsejtek biofizikája. Harmadik rész (MI A TITKA?) 142. évf. 1. sz. 2011. január
- [4] Czéh,G., Puskár, Z. Celluláris neurobiológia. Dialóg Campus Kiadó. 303-335. o. (2001)
- [5] http://www.stanford.edu/group/maciverlab/hippocampal.html (2011.05.28.)
- [6] Pettersen K.H., Lindén H., Dale A.M., Einevoll G.T. Extracellular spikes and current-source density, Handbook of neural activity measurements, Cambridge University Press, Cambridge, UK, megjelenés alatt
- [7] Hämäläinen, M., Hari, R., Ilmoniemi, R., Knuutila, J., and Lounasmaa, O. Magnetoencephalography theory, instrumentation, and applications to noninvasive studies of the working human brain. Rev Mod Phys 65, 413-497, 1993.
- [8] Logothetis, N. K., Kayser, C., and Oeltermann, A. In vivo measurement of cortical impedance spectrum in monkeys: implications for signal propagation. Neuron 55, 809-823. 2007.
- [9] Nunez, P. L. Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG (Oxford University Press). 2006.
- [10] Nicholson, C. and Llinas, R. Field potentials in the alligator cerebellum and theory of their relationship to Purkinje cell dendritic spikes. J Neurophysiol 34, 509-531. 1971
- [11] Bedard C, Kroger H, Destexhe A. Modeling extracellular field potentials and the frequency-filtering properties of extracellular space. Biophys J 86, 1829-1842. 2004.

- [12] Gabriel, S., Lau, R. W., Gabriel, C. The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues. Phys Med Biol 41, 2271-2293. 1996
- [13] López-Aguado, L., Ibarz, J. M., and Herreras, O. Acitivity-dependent changes of tissue resisitivity in the CA1 region in vivo are layer-specific: Modulation of evoked potentials. Neuron 108, 249-262. 2001.
- [14] Mainen, Z. F. and Sejnowski, T. J. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. Nature 382, 363-366. 1996.
- [15] Nicholson, C. and Freeman, J. A. Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. J Neu rophysiol 38, 356-368. 1975.
- [16] Michael A. Arbib,2002. The Handbook of Brain Theory and Neural Networks, MIT Press, Cambridge, MA.
- [17] Dayan, P. and Abbott, L.F., Theoretical Neuroscience. Computational and Mathematical Modeling of Neural Systems, MIT Press, Cambridge, MA., 2001., 297. o.
- [18] Lewicki, M. S. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials., Network: Computation in Neural Systems, 9 (4): 53-78, 1998.
- [19] Pouzat, C. The New SpikeOMatic Tutorial. 2006. http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/physcerv/C_Pouzat/Data_folder /newSOMtutorial.pdf (2011.05.31)
- [20] Csercsa, R., Magony, A. Spike solution, 2006. http://digitus.itk.ppke.hu/magan/SpikeSol/ (2011.05.31)
- [21] Fraley, C.,Raftery, A., MCLUST: Software for Model-Based Clustering, Discriminant Analysis and Density Estimation. Technical Report 415R, Department of Statistics, University of Washington, October 2002.