

Az izoflurán anesztézia hatása a retina és a vizuális kéreg közti csatlotságra

TDK dolgozat
XXXI. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Albert Zsófia
Biológus MSc II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Juhász Gábor



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Biológiai Intézet
Proteomikai Csoport

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
1. BEVEZETÉS.....	4
1.1 AZ AGYKÉREG GAMMA OSZCILLATORIKUS AKTIVITÁSA	5
1.2 OSZCILLÁCIÓS POTENCIÁLOK (OP) A RETINÁN.....	6
1.3 AZ ANESZTÉZIA HATÁSA AZ AGY MŰKÖDÉSÉRE	8
2. CÉLKITŰZÉSEK	10
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	10
3.1 A KÍSÉRLETI ÁLLATOK BEMŰTÉSE	10
3.2 AZ EEG ÉS ERG ELVEZETÉSE ÉS REGISZTRÁLÁSA	12
3.3 AZ ADATOK KIÉRTÉKELÉSE	13
4. EREDMÉNYEK	14
5. DISZKUSSZIÓ.....	22
6. ÖSSZEFOGLALÁS	23
7. SUMMARY.....	23
IRODALOMJEGYZÉK	24
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	27
NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ	28

Rövidítésjegyzék

ACSF	–	artificial cerebrospinal fluid, mesterséges agyfolyadék
BIS	–	bispectral index szenzor
EEG	–	elektroenkefalográfia, elektroenkefalogram
EMG	–	elektromiogram
ERG	–	elektroretinogram
FFT	–	Fast Fourier Transform, gyors Fourier-transzformáció
fMRI	–	functional Magnetic Resonance Imaging, funkcionális mágneses rezonancia vizsgálat
GABA	–	gamma amino-vajsav
LED	–	Light Emitting Diode, világító dióda
MRI	–	Magnetic Resonance Imaging, mágneses rezonancián alapuló képalkotó eljárás
NMDA	–	N-metil-D-aszpartát
OP	–	oszcillációs potenciál
PET	–	pozitronemissziós tomográfia
SFR	–	single flash response, egyedi inger által kiváltott válasz
SPECT	–	Single photon emission computed tomography
SPRD	–	Sprague-Dawley
SSR	–	steady state response, folytonos ingerléssel kiváltott válasz
TTX	–	tetrodotoxin
V1	–	primer látókéreg
VEP	–	visual evoked potential, vizuális kiváltott válasz

1. Bevezetés

Mai elképzeléseink szerint a komplex agyi folyamatok és működési zavarok az egyes agyterületek közti összecsatolódás dinamikus változásai révén jönnek létre (*Paik és mtsai., 2009*). A képalkotó eljárások (fMRI, PET, SPECT) kutatási és diagnosztikai sikerei kellően bizonyították, hogy egy-egy konkrét agyi folyamathoz karakterisztikus, magas és alacsony aktivitású agyterületi mintázatok tartoznak. A nagy múltú visszatekintő EEG technika az elektródok és az erősítő csatornák számának nagyfokú növelésével igazolta, hogy az ún. „EEG-mapping”, azaz a magas és alacsony teljesítményű EEG-t generáló agyterületek térképei - hasonlóan a képalkotó eljárásokhoz - funkcionális, dinamikus csatoltságot mutatnak, amelyet diagnosztikai és kutatási célokra egyaránt használni lehet (*Sumiyoshi és mtsai., 2012*). Az agyi területek közötti összeköttetésnek tehát van egy anatómiai szubsztrátja, ami aktuálisan egy adott mértékben aktiválódik és köt össze bizonyos agyterületeket. Ez megjelenik a lokális EEG (EEG mapping), a sejtm metabolizmus (PET, SPECT) és a vérátáramlás szintjén is (MRI, fMRI). A képalkotó eljárások segítségével, beleértve az EEG-mappinget is, különböző csatoltsági mintázatok lehet mérni azonos funkcionális helyzetben (*Buzsáki és Wang, 2012*). Az elektromos jeleken, azaz az EEG-n alapuló csatoltsági térkép erősen függ az EEG hullámok magas frekvenciájú, gamma aktivitásának lokális amplitúdójától (*Jehle és mtsai., 2009*). Mindezek alapján ma a gamma amplitúdót a csatoltság, illetve az éber állapotban létrejövő, távoli agyterületek közti szinkronitás mértékének tartják.

A csatoltság, az ún. konnektóm kutatása az aneszteziológiában haladt előre legjobban, hiszen hamar nyilvánvalóvá vált, hogy altatásban az egyes agyterületek közti kapcsolatok átrendeződnek (*Heinke és Koelsch, 2005*). A narkózisban tehát az agyi tudatos funkciók azért alakulnak át, vagy függesztődnek fel, mert az adott működésben résztvevő agyterületek közötti funkcionális kapcsolat átalakul.

Gyakorlati szempontból a vizuális rendszer viselkedése a narkózis során igen fontos. A tudatos percepció megszűnése az altatásban lényeges indikátor, mert a műtéti, lehetségesen legfelületesebb narkózis elérése szempontjából ez evidensen fontos. Nem ritka, hogy a betegek egy része vizuális élményekről számol be a felébredés után a műtét közbeni időszakról. A műtéti stressz, fájdalom, kellemetlen érzések és emlékek nem csak a műtét alatt, hanem a poszt-operatív fázisban is igen károsak lehetnek. Olyan hosszú távú hatásaik fordulhatnak elő, mint a szorongás, pánikbetegség, vegetatív zavarok, vagy a későbbi beavatkozásoktól való félelem. Nagy szükség

van tehát olyan objektív mérésre, amivel a vizuális rendszer narkózis alatti szétcsatlóságát indikálni lehet.

A vizuális rendszerben is keletkeznek gamma frekvenciasávnak megfelelő, oszcillatorikus potenciálok. Ezeket már nagyon régen leírták a retinában és újabban a kéregben is (*Sannita és mtsai., 1995; Szabó-Salfay és mtsai., 2001*), azonban máig nem vizsgálták szinkronban a retinális és a kérgi oszcillációkat, többek között különböző technikai okok miatt. Laboratóriumunkban sikerült először egy nagyon stabil és reprodukálható preparátumot kidolgozni szabadon mozgó patkányokban, amivel megbízhatóan és az állat magatartásától függetlenül lehet mérni a retinogramokat (ERG) és a kérgi kiváltott potenciálokat (VEP) egyaránt (*Szabó-Salfay és mtsai., 2001*). A dolgozatban ezt a vizuális fiziológiai preparátumot használtam fel annak vizsgálatára, hogy ha az állat szabadon mozgó, éber állapotból narkózisba megy át, hogyan változnak meg a különböző, gamma tartománybeli oszcillációk, és követi-e a változás a narkotikum dózisát, valamint a percepció elvesztését.

1.1 Az agykéreg gamma oszcillatorikus aktivitása

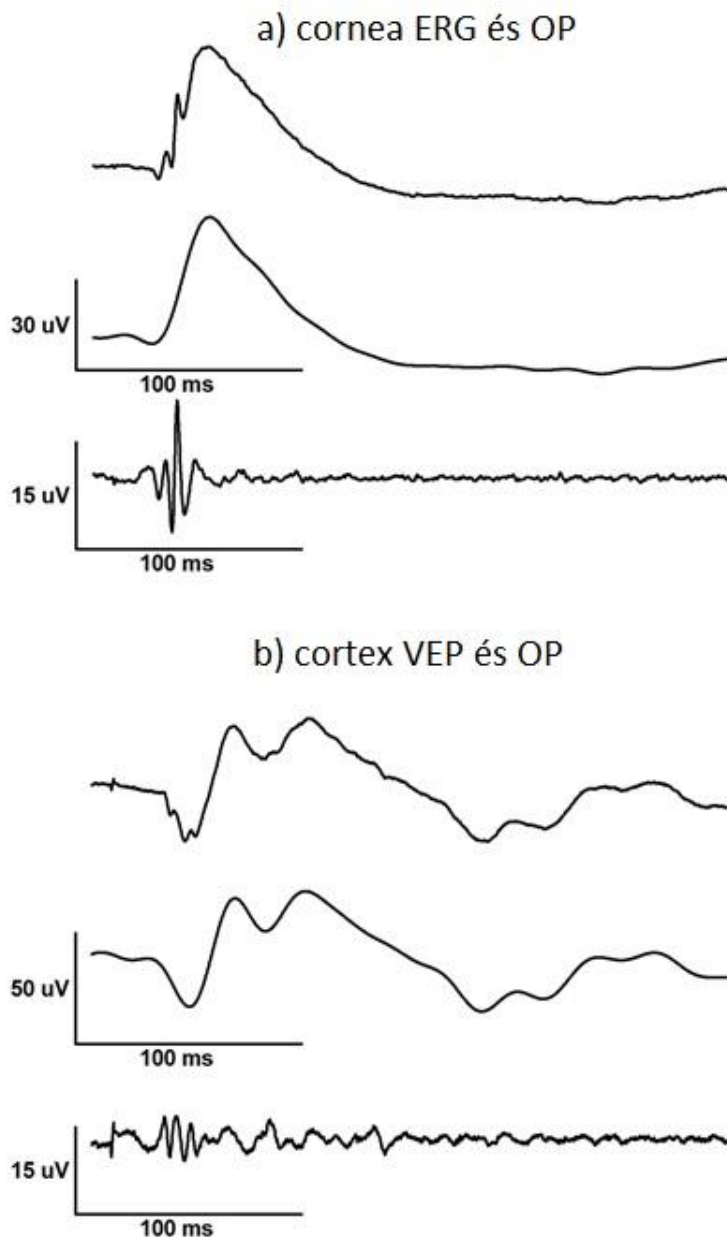
A gamma oszcillációk az agyi elektromos mezőpotenciálok-, illetve az EEG periodikus változásai a 30-70 Hz-es tartományban. Először az 1930-as évek elején – nem sokkal az elektroencefalográfia (EEG) felfedezését követően – írták le őket. Kezdetben ezeket a magas frekvenciájú oszcillációkat zajnak tartották, főleg az EEG-felvételen megjelenő nagyobb periódusidejű, lassabb hullámokhoz viszonyítva. Napjainkban azonban már ismert tény, hogy az agykéreg gamma tartománybeli szinkronizált oszcillatorikus aktivitása az idegi működés alapvető mechanizmusa, melynek intenzitása a kognitív és percepciós folyamatok során – mind embereknél, mind állatok esetében – megnövekszik (*Martinovic és Busch, 2011*). Mióta először leírták a primer látókéreg (V1) neuronjai közötti nagy frekvenciájú oszcillációs szinkronitást, alapos kutatásokat végeztek ezeknek az oszcillációknak a látásban betöltött szerepére vonatkozólag.

Az egyik elképzelés szerint a gamma oszcillációk szinkronba kerülése egy szabályos időközönkénti referenciaszignált jelent az agy számára; ezt az elgondolást nevezték el a gamma aktivitás „clock” elméletének (*Burns és mtsai., 2011*). Burns és munkatársai vizsgálataik során azonban arra az eredményre jutottak, hogy a vizuális kéregben nincsen nyilvánvaló jelenléte a gamma „clock”- szignálnak, illetve statisztikailag nincs nagyobb autokoherencia az oszcillációk

között, mint ahogyan az spontán is előfordulhatna. A rövid, nagy amplitúdójú, gamma-tartományban mozgó burst-ök viszont egy átmeneti szinkronizáló jelként működhetnek a különböző agyterületek neuronhálózatai között, vagyis ideiglenes csatlotságot hozhatnak létre a funkcionálisan elkülönülő gamma aktivitású területek között, hogy azok neuronjai egyidejűleg tüzeljenek (Ribary, 2005; Burns és mtsai., 2011). Tehát az oszcillációk szerepe ez esetben csak az iniciáció, a szinkronizáció kiváltása.

1.2 Oszcillációs potenciálok (OP) a retinán

Az agykéreg mellett a vizuális rendszer más elemei is képesek különböző oszcillációkat generálni (Wachtmeister, 1998). Fényinger hatására a retinogram (ERG) b-hullámának felszálló ágán megfigyelhető, 1-5 kis hullámként megjelenő oszcillációkat nevezzük oszcillatórikus potenciáloknak (OP), melyek a 40-90 Hz-es frekvenciatartományban mozognak.



1. ábra: A retinán (a) és a cortexen (b) megfigyelhető oszcillációs potenciálok 0,25 Hz-es fényinger hatására a „nyers” adatsoron, majd 40 Hz-es alul- ill. felüláteresztő szűrőt használva.

A gyakorlatlan szemnek ezek gyakran nem, vagy nehezen észrevehetőek az ERG felvételen, mert a b-hullám felszálló ágán ülnek rajta, ezért különböző szűrési technikák alkalmazása szükséges, hogy az ERG többi komponense mellett az OP-k is jól láthatóvá és azonosíthatóvá váljanak (1. ábra). Az oszcilláció ezen típusát nevezzük „single flash”, azaz egyedi inger által kiváltott oszcillációs potenciálnak.

A retinán megfigyelhető egy másik típusú oszcilláció is, mely akkor alakul ki, amikor nagyfrekvenciájú inger éri azt. Egy bizonyos ingerfrekvencia fölött a látórendszer single flash módból átvált „steady state response” (SSR), vagyis folyamatos ingerléssel kiváltott válasz módba, melyet 20 Hz, vagy annál nagyobb frekvenciájú villogó fényingerrel lehet kiváltani (Martinovic és Busch, 2011). Az SSR szintén alátámasztja az elméletet, miszerint az egyes távoli agyterületek között összekapcsoltság jöhet létre a gamma oszcillációk által, ugyanis csökkent mértékét figyelték meg olyan pszichiátriai betegeknél (pl. autisták esetén), ahol az egyes kortikális régiók közötti csatlakozás mértéke is lecsökkent (Burns és mtsai., 2011).

Bár az OP-k kialakulása sejtszinten még nem teljesen leírt, valószínűsíthető, hogy ezek a retina ganglionsejtjeinek axonjai által generált akciós potenciálokkal vannak összefüggésben; a retinogram nagyon korai komponensei, melyek a látóidegen keresztül hagyják el a szemet (Galambos és mtsai., 2001). A b-hullám létrejötte után 3 ms-mal a chiasmában regisztrálták a retinán kívüli első OP-t, majd 10 ms-mal később a látókéregben. A cortexen a fénystimulust követően kb. 30 ms-mal, az első leszálló ágon jelennek meg az OP-k (1. ábra). Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a retina oszcillációs potenciáljai is gamma frekvenciás hullámok, melyek szinkronban vannak a cortex oszcillációival. Itt azonban felmerül a kérdés, hogy hasonló funkciót lát-e el ez a típusú gamma oszcilláció, mint amit az agykéreg esetében is megfigyeltek; vagyis hogy funkcionálisan összekapcsolja-e a látórendszer különböző területeit, szinkronizálva a retina és az agykéreg közötti információátadást.

A retina tulajdonképpen az agy egy kis részének tekinthető, mely az ontogenezis során eltávolodott a központi idegrendszertől. Így tehát azt feltételezhetjük, hogy ha két egymástól elkülönülő, távoli agyterület gamma oszcillációk általi összecsatolása általános érvényű az idegrendszerre nézve, akkor a retina és a látókéreg gamma frekvenciás oszcillációs potenciálokon keresztüli összecsatoltsága is lehetséges. Ha ez igaz, akkor a retinális és kérgi OP-k amplitúdója és hullámalakja a csatlakozás mértékét tükrözi, hasonlóan az agyi gamma aktivitáshoz. Tehát ha a

vizuális rendszer elemeit szétkapcsoljuk, és megszűnik a látási percepció, akkor változások állnak be az oszcillációs potenciálokban is.

1.3 Az anesztézia hatása az agy működésére

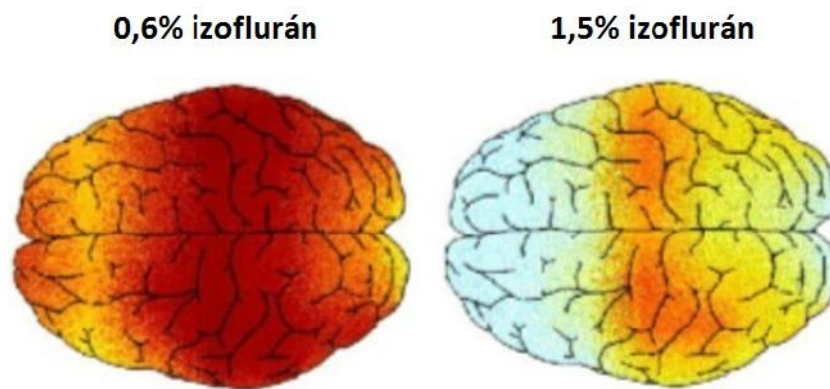
Az egyes agyterületek közötti összecsatloltság, a konnektóm megváltozása a mai napig az aneszteziológia egyik fontos kulcskérdése. Bár nap mint nap emberek százait műtik általános anesztézia befolyása alatt, az egyes altatószerek hatásáról még mindig igen keveset tudunk, működésükről nincsen pontos, egyértelmű képünk.

A múltban az anesztézia agyi aktivitásra gyakorolt hatásának mérését kizárólag viselkedési mintázatok megfigyelésére vagy EEG felvételekre alapozták. Az elmúlt évtizedekben azonban az új neurobiológiai módszerek fejlődése lehetővé tette a mérési lehetőségek kiterjesztését többek között olyan eljárásokra, mint a pozitron emissziós tomográfia (PET) és a funkcionális mágneses rezonancia (fMRI) (Heinke és Schwarzbauer, 2002). Ezeknek a képalkotó eljárásoknak a segítségével képesek vagyunk követni az agy hemodinamikai és metabolikus aktivitásváltozásait a narkózis során, míg az elektrofiziológiai technikák az agykéreg elektromos aktivitását tükrözik nagy időbeli, de kis térbeli felbontással. A klinikai gyakorlatban jelenleg is alkalmazott módszerek (mint pl. a BIS – bispectral index sensor) lehetővé teszik a neurális aktivitás általános követését a műtét során (Johansen és Sebel, 2000), azonban nem teszik lehetővé például annak a megbecslését, hogy az egyes betegek pontosan mikor fogják visszanyerni az eszméletüket az anesztéziát követően.

Sokáig azt feltételezték, hogy a narkotikumok hatására az agy minden régiójában egységesen lecsökken a metabolizmus és a vérátáramlás. Azonban alacsonyabb dózisok alkalmazása mellett ez nem tekinthető általánosan igaznak: fMRI vizsgálatokkal igazolták, hogy némely agyterületek vérátáramlása lecsökken, míg másoké megnő, vagyis alacsonyabb dózisban alkalmazva az egyes narkotikumokat, azok a központi idegrendszer bizonyos területeire aktiváló, míg másokra szupresszálo hatással bírnak (Ramani, 2005; Becker és mtsai., 2012).

Vizsgálataim elvégzéséhez azért választottam az izofluránt, mint inhalációs anesztetikumot, mert eltérő koncentrációk mellett különbözőképpen befolyásolja az agy működését (2. ábra). Szubanesztetikus dózisban alkalmazva egyes régiók ingerlékenységét megnöveli; még csak fájdalomcsillapító hatása van, eszméletvesztést nem okoz, és a vizuális percepció is megmarad. Magasabb koncentrációérték mellett azonban lecsökkenti az agyi

aktivitást, a vizuális percepció megszűnik és a fájdalomcsillapítás mellett az eszméletvesztés is bekövetkezik. Alacsony koncentrációban alkalmazva (0,1 mM) ilyen, a fentiekben már említett kettős hatásról számoltak be: egyidejűleg képes a hippocampusz CA1 régiójában megnövelni az idegrendszeri hálózatok ingerlékenységét, míg a neocortexben lecsökkenti a neurális aktivitást (Becker és mtsai., 2012).



2. ábra: Különböző koncentrációjú izoflurán hatása az agyi elektromos aktivitásra. Az ábrán a melegebb színek az intenzívebb EEG aktivitást jelölik (Kochs és Schneider, 2001 nyomán).

Az izoflurán vizuális percepcióra gyakorolt hatását vizsgálta macskákon Villeneuve és Casanova. Azt tapasztalták, hogy magas, 1,64%-os izoflurán-koncentrációnál olyan burst-szuppresszáló EEG mintázatok jelentek meg, melyek alapján az agy látszólag válaszképtelennek tűnt. Azonban különböző nemspecifikus ingerekkel (tapsolás, érintés vagy vizuális stimuláció) képesek voltak EEG burst-ök kiváltására, ami azt sugallja, hogy amikor az EEG felvételek alapján az állat igen mély narkózis állapotában van, az agy működése akkor sem teljesen gátolt, vagy válaszképtelen, hanem az alapvető ingerekre való reagáló-képessége még ekkor is megmarad (Villeneuve és Casanova, 2003).

Bár sok kutatás célpontjául szolgál, az izoflurán pontos hatásmechanizmusa – sok más narkotikumhoz hasonlóan – még mindig nem ismert teljes mértékben. Valószínűsíthető, hogy GABA, glutamát és glicinreceptorokhoz kötődik, ám az egyes receptorokon különböző hatással bír (Herring és mtsai., 2009). A glicin receptor aktivitásának csökkentésével a motoros funkciókat gátolja (izomrelaxáció), míg az NMDA glutamát receptor altípus aktivitását növeli

(Ries és Puil, 1999). A klinikumban alkalmazott koncentrációk mellett az izoflurán a nocicepciót egyidejűleg három különböző mechanizmus útján is befolyásolja: (1) α_1 -adrenoceptor-mediált leszálló pronociceptív mechanizmus útján, (2) α_2 -adrenoceptor-mediált leszálló antinociceptív mechanizmus útján és (3) az analgészia intrinsic noradrenerg mechanizmusa útján (Kingery, 2002).

Mindezek mellett az is bizonyítottnak tekinthető, hogy az izoflurán anesztézia során átrendeződnek az egyes agyterületek közti funkcionális kapcsolatok (Heinke és Koelsch, 2005), vagyis az agyi tudatos funkciók azért alakulnak át vagy függesztődnek fel, mert az adott működésben résztvevő területek közötti funkcionális kapcsolat megszűnik, és más módon csatlakozik össze.

A kísérletek során a patkányokat egy felületes (0,6%) és egy mélyebb (1,5%) narkózis állapotában is vizsgáltam pont ezen okból kifolyólag, hogy az izofluránnak ez a kettős hatása megfigyelhető és igazolható legyen.

2. Célkitűzések

Kísérletem célja az izoflurán anesztézia során létrejövő felszínes- (0,6%) és mély narkózis (1,5%) retinális és kérgi oszcillációkra gyakorolt hatásának vizsgálata volt, ezáltal igazolva, hogy a gamma frekvenciás OP-k hozzák létre a retina és az agykéreg közötti információáramlás szinkronizáltságát. A mérések célja egyrészt a gamma csatolás igazolása volt a retina - cortex relációban, másrészt annak kiderítése, hogy használhatóak-e az oszcillatórikus potenciálok által indikált csatoltsági mértékek a narkózis követésére.

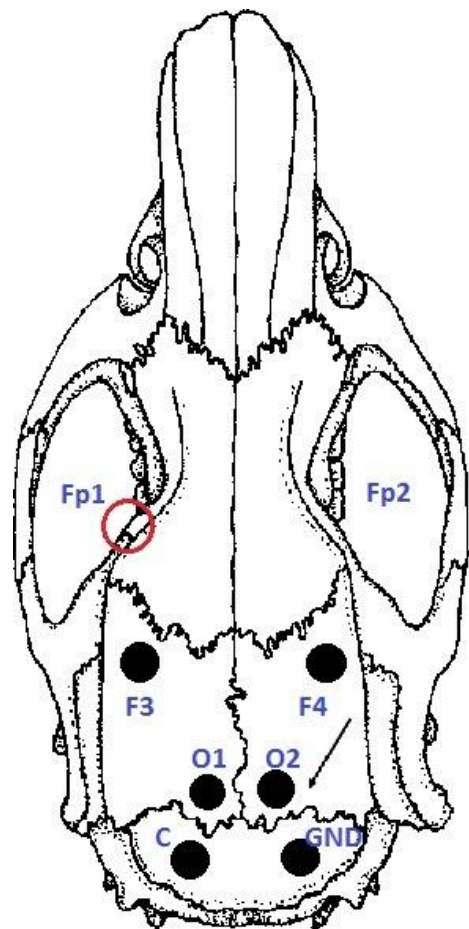
3. Anyagok és módszerek

3.1 A kísérleti állatok beműtése

Méréseimet 4 hónapnál idősebb, 350-450 g, hím Sprague-Dawley patkányokon (n=5) végeztem, melyeket 3-4 fős csoportokban, standard körülmények között tartottunk 12 órás fény-sötét ciklusban (világos: reggel 6h és délután 18h között).

Az állatok műtétje izoflurán (Forane, Abbott, India) anesztézia alatt történt (1,2 - 0,6%-os koncentrációértékek között), melynek során az állat koponyájába hat rozsdamentes acélból készült csavarelektrodot (NONOX 1,6 mm, Menet-Trend Kft., Magyarország) építettem be bilaterálisan a primer látókéreg (O1, O2), a parietális kéreg (F3, F4), illetve a kisagy fölé (C, GND; a 3. ábra szerint). A GND-vel jelzett elektód szolgált az EEG műszer földelő pontjaként, a C pedig tartalék földelő pontként arra az esetre, ha a másik valamilyen oknál fogva – az állat szabad mozgása következtében – megsérülne. A csavarelektrodok rögzítését követően a bal szem fölé polimerizáción alapuló fogászati cementtel (Pattern Resin LS, GC America Inc., USA) 5 mm átmérőjű, vörös fényű, magas fénykibocsátású (5000 mcd/mm^2), csatlakozó aljzattal ellátott LED diódát erősítettem a koponya felszínéhez (3. ábra, piros jelzés), mely a választ kiváltó fényingert szolgáltatva a kísérlet során. A retrobulbáris elhelyezést, illetve a LED színét az indokolja, hogy így a retinát érő fény mennyisége nem változik az állat pislogásával, a vörös színt pedig kevésbé nyeli el az élő szövet (Szabó-Salfay és mtsai., 2001).

Egy több-eres, teflon szigetelésű, szövetbarát rozsdamentes acélhuzalt használtam szemelektrodként, melyet a bal szem fölé, a szemgolyó és a felső szemhéj találkozásához helyeztem el. A vezeték szemgolyó felőli végéről eltávolítottam a szigetelést és „esernyőszerűen” széthajtottam a hét szálát, hogy annak a corneával érintkező felülete minél nagyobb lehessen (néhány mm^2) és a szemgolyó felszínére mintegy ráboruljon. A műtétet követően az állatok nem mutatták jelét annak, hogy az elektrod bármilyen módon is irritálná az operált szemet.



3. ábra: A kísérleti állat műteti sémája retinogram és primer látókérgi vizuális kiváltott válasz felvételéhez. Az egyes pontokat a humán nemzetközi 10-20-as EEG elvezetési pontok rövidítéseivel neveztem el. A C tartalék földelő pontot jelöl.

Plate elektródként egy kb. 4x8 mm-es rozsdamentes acéllapot használtam, melyet sebkapocsból készítettem el és a bőr alá, a jobb oldali rágóizom fölé helyeztem el. Szigetelésként az izommal kontaktusba lépő felszínét vastagon beborítottam fogászati cementtel. A plate elektród szerepe, hogy a szemelektród referenciapontjaként egy nagy, elektromosan csaknem szigetelt referenciát biztosítson a fejen, így téve lehetővé a lehető legtisztább – EMG műtermékektől mentes – elektroretinogram (ERG) felvételét.

A 3. ábrán nyíllal jelzett ponton került beépítésre az állat koponyájába a kb. 0,5-0,7 mm átmérőjű és 1-1,5 cm hosszúságú, rozsdamentes acélból készült kanül, melyen keresztül képes voltam a későbbi vizsgálatok során tetrodotoxint (TTX) juttatni a primer látókéreg felszínére. A kanült szintén fogászati cement segítségével rögzítettem a megfelelő helyzetben, és az eltömődés, beszennyeződés elkerülése érdekében egy pontosan illeszkedő, rozsdamentes acéltömítéssel láttam el.

Végül az összes elektród (csavar-, szem- és plate elektródok) végét külön-külön egy dupla tűskesoros, tűzlábú csatlakozóhoz forrasztottam, s fogászati cementtel borítottam be, kialakítva így az ún. „koronát” az állat fején, ami hetekig stabilan a koponyához rögzítve maradt anélkül, hogy a környező szövetet, vagy magát a patkányt irritálná. A teljes műtét elvégzéséhez szükséges idő minden esetben kb. egy óra volt. Az állatoknak egy hetes felépülési időt biztosítottam a mérések megkezdése előtt, 12 órás fény-sötét ciklusú szobában.

Kísérleteim során az Európai Közösségek Tanácsa 86/609/EEC direktívában, illetve az 1998. évi XXVIII törvényben (az állatok védelméről és kíméletéről), a 243/1998 kormányrendeletben (az állatkísérletek végzéséről) és az egyetemi állatvédelmi előírásokban foglaltak szerint jártam el, és mindent elkövettem az állatok szenvedésének és számának csökkentése érdekében.

3.2 Az EEG és ERG elvezetése és regisztrálása

Az agyfelszínről elvezetett EEG és a corneáról mért ERG jel elvezetése egy tízeres szalagkábelrel történt; az ingerléshez programozható BioStim univerzális stimulátor rendszert (SUPERTECH Kft., Magyarország) használtam, konstans áramerősségű LED meghajtóval. Az erősítéshez Grass EEG-t (Grass Technologies, USA; erősítés: 7 μ V/mm a cortexen, 5 μ V/mm a retinán; szűrők: 0,3 Hz low, 10 kHz high, mintavételezés: 5 kHz); a jel átalakításához CED 1401

AD konvertert (Cambridge Electronic Devices, Cambridge, UK), az EEG és ERG regisztrálásához pedig Signal 4.06 (Cambridge Electronic Design Ltd.) software-t használtam.

Két EEG csatorna került regisztrálásra, az egyik az F4 – O2 jelű elektródok közötti ellenoldali (contralateralis), a másik az F3 – O1 elektródok közötti azonos oldali (ipsilateralis) kiváltott vizuális válasz; illetve harmadik csatornaként a szemelektrod és a plate (Fp1 – Fp2) közötti ERG.

A méréseket a patkányokon külön-külön, egyesével végeztem el. A kísérlet kezdetekor egy teljesen elsötétített Faraday-kalitka belsejében elhelyezett 25x25x40 cm-es üvegterráriumba tettem be az állatokat, ahol szabadon mozoghattak. Kb. 15 perces sötétadaptációt és az új környezet megszokását követően a kísérleti állat koronájába épített LED segítségével 4 másodpercenkénti (0,25 Hz) fényfelvillanásokkal ingereltem a retinát, a kiváltott jelet pedig a Signal program segítségével regisztráltam. A 0,25 Hz-es ingerlés egy – korábbi méréseink során megállapított – optimális frekvencia, ugyanis emellett az egyes oszcillációk még jól elkülöníthetőek egymástól a felvételen, könnyen kiértékelhetőek, viszont a mérés sem tart túlságosan hosszú ideig. Minden állat esetén kb. 300 frame-et, azaz 1 másodperc hosszúságú egyedi választ vettem fel.

A kontrollmérést követően a patkányokat műanyag altatódobozba tettem és először 0,6%-os, majd 1,5%-os izoflurán-koncentráció mellett is a fentiekhez hasonlóan mértem az elvezethető EEG-t és ERG-t. Az anesztézia egyik esetben sem tartott fél óránál tovább, nehogy a kísérleti állat véletlenül túlaludjon és elpusztuljon a mérés befejezése előtt. Az altatást követően az állatokat az altatódobozból kivéve visszahelyeztem az üvegterráriumba és megvártam, amíg felébrednek.

Az altatásban elvégzett mérést követően 2-3 nappal a koronába épített kanülön keresztül Hamilton-fecskendő segítségével 1 µl 1 µM-os nátriumcsatorna-blokkoló tetrodotoxint (TTX) juttattam a patkányok primer látókérgének felszínére, és a fentiekben leírtak szerint, 0,25 Hz-es ingerlés mellett mértem az elvezethető EEG és ERG-jeleket.

3.3 Az adatok kiértékelése

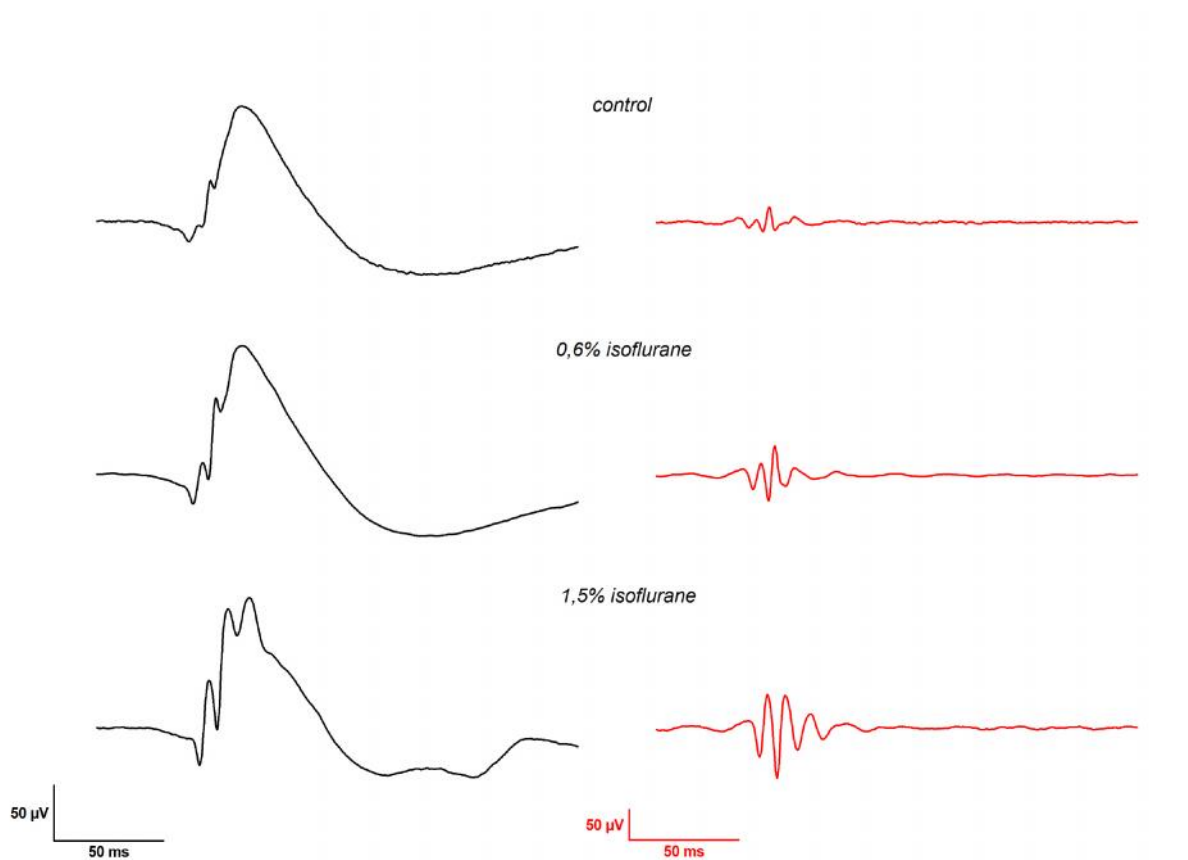
A mérések során kapott adatok statisztikai kiértékeléséhez és az eredmények grafikai ábrázolásához az OriginPro 8.6 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) software-t vettem igénybe. A jobb kiértékelhetőség érdekében utólagosan a program 40 Hz-es felüláteresztő

szűrőjét használtam, hogy az egyes görbéken ülő OP-k jobban láthatóvá váljanak. A statisztika készítéséhez a retináról és a cortexről elvezetett OP-k közti latenciát, illetve az egyes OP-k csúcstól-csúcsig mért amplitúdó értékét használtam fel; emellett az OP-k jelenlétét FFT amplitúdó-teljesítmény analízis (power spectrum) segítségével is bizonyítottam. Az ábrázoláshoz az egyes adatsorok összesített átlagát (mean), illetve standard szórásértékét (SE of mean) alkalmaztam. A szignifikancia-szintet Student-féle kétmintás t-próba segítségével állapítottam meg, melynek során az egyes kontroll értékekhez külön-külön viszonyítottam a 0,6% illetve az 1,5%-os izofluránban mért értékeket. Mindezek mellett a retináról és a kéregből elvezetett oszcillációkat keresztkorreláltattam egymással annak megállapítása érdekében, hogy az egyes oszcillációk mennyire vannak fázisban egymáshoz képest.

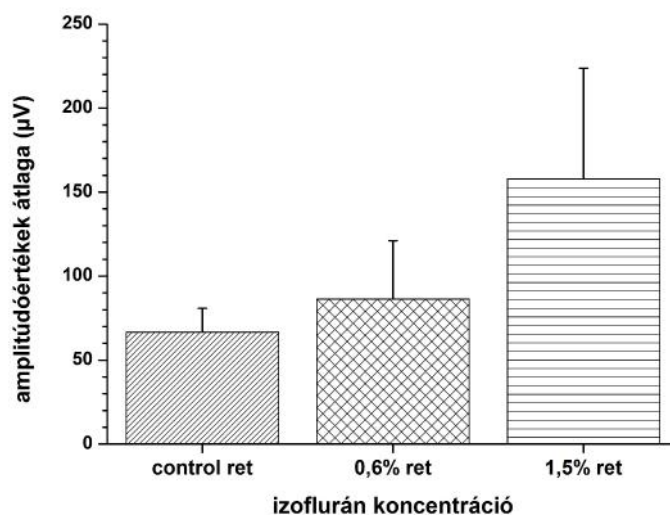
4. Eredmények

Az eltérő izoflurán-koncentrációk mellett végzett felszínes-, illetve mély narkózis különböző módon befolyásolta mind az ERG és a VEP görbék lefutását, mind a retinális és kérgi oszcillációs potenciálok tulajdonságait.

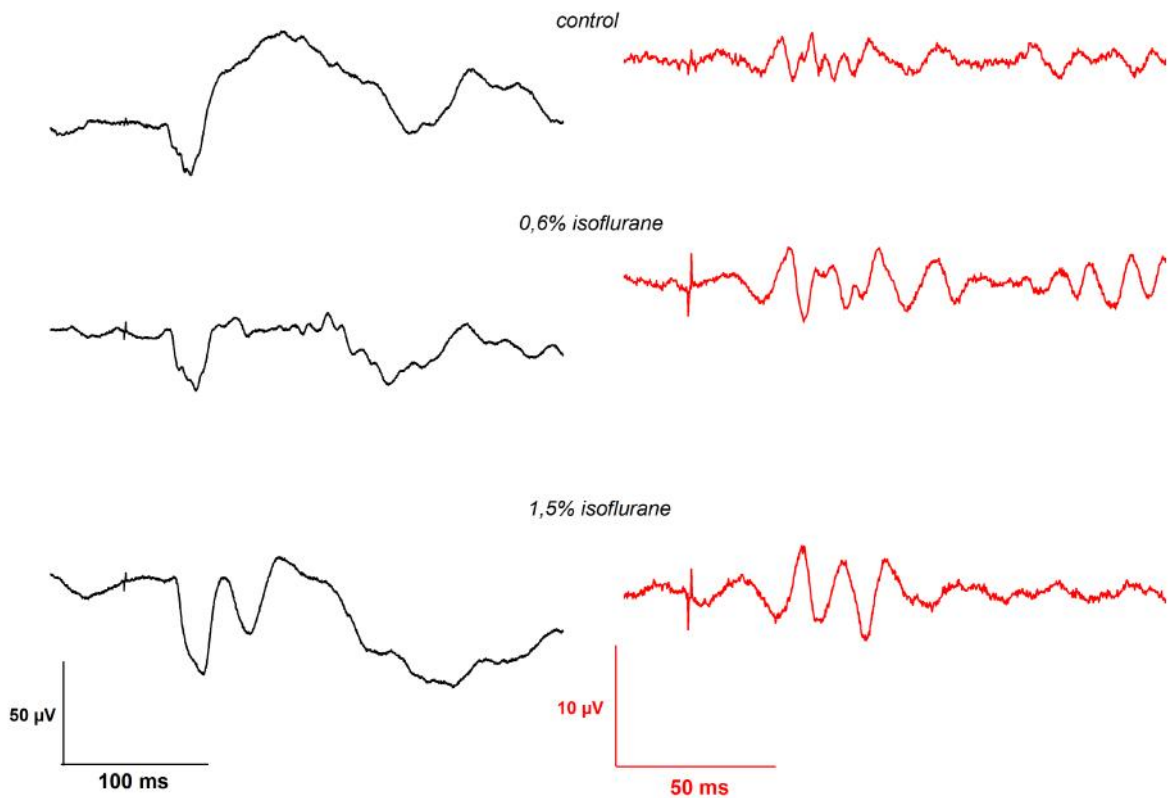
Általánosságban igaz, hogy izoflurán anesztézia hatására 0,25 Hz-es ingerlés mellett a retinogram b-hullámának és a VEP hullámainak lefutása megváltozott. A retinális OP-k csúcstól-csúcsig mért amplitúdója az izoflurán koncentrációjának növelésével arányosan megnövekedett. Emellett a VEP OP-inak amplitúdóértékei is megnövekedtek a növekvő izofluránkoncentráció függvényében, bár kevésbé szembetűnő módon, mint a retinális oszcillációk esetén (4. és 6. ábrák). Az oszcillációk csúcstól-csúcsig mért amplitúdóértékeire Student-féle kétmintás t-próbát végeztem, az egyes izofluránkoncentrációkat (0,6% és 1,5%) külön-külön hasonlítva a kontrollértékekhez. A retinális oszcillatorikus potenciálok amplitúdóértékei – bár jól láthatóan megnövekedtek – 95%-os konfidenciaszinten nem mutattak szignifikáns változást a kontrollhoz képest (5. ábra). Ez valószínűleg a kis állatszám miatt adódó magas szórásértékeknek tudható be, mely a jövőben a kísérlet folytatásával, így az n-szám növelésével korrigálható lesz. A kérgi oszcillációk amplitúdóértékei 0,6%-os izofluránkoncentráció alkalmazása mellett szignifikáns különbséget ($p=0,03662$) mutattak a kontrollértékekhez viszonyítva, míg 1,5%-os koncentrációnál nem volt szignifikáns a különbség a nagyobb szórásértékek miatt (7. ábra).



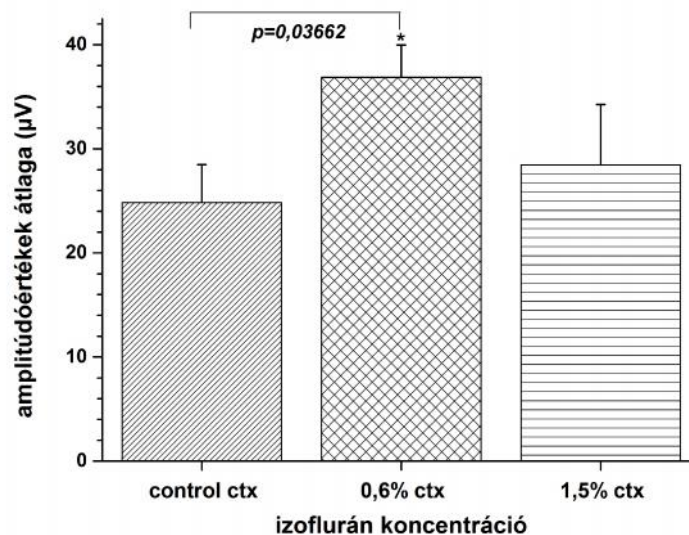
4. ábra: Az elektroretinogram (ERG) lefutása 0,25 Hz frekvenciájú vizuális ingerlés mellett a kontrollmérés közben, illetve a görbe lefutásának megváltozása 0,6%-os és 1,5%-os koncentrációjú izoflurán hatására. Az ábrán feketével a 0,3 Hz – 10 kHz tartományban szűrt, pirossal pedig a 40 Hz feletti tartományban szűrt ERG-t jelöltem.



5. ábra: A retinális oszcillációs potenciálok amplitúdóváltozásai éber, valamint különböző koncentrációjú (0,6% és 1,5%) izofluránnal anesztetizált állatokban (ret = retina).

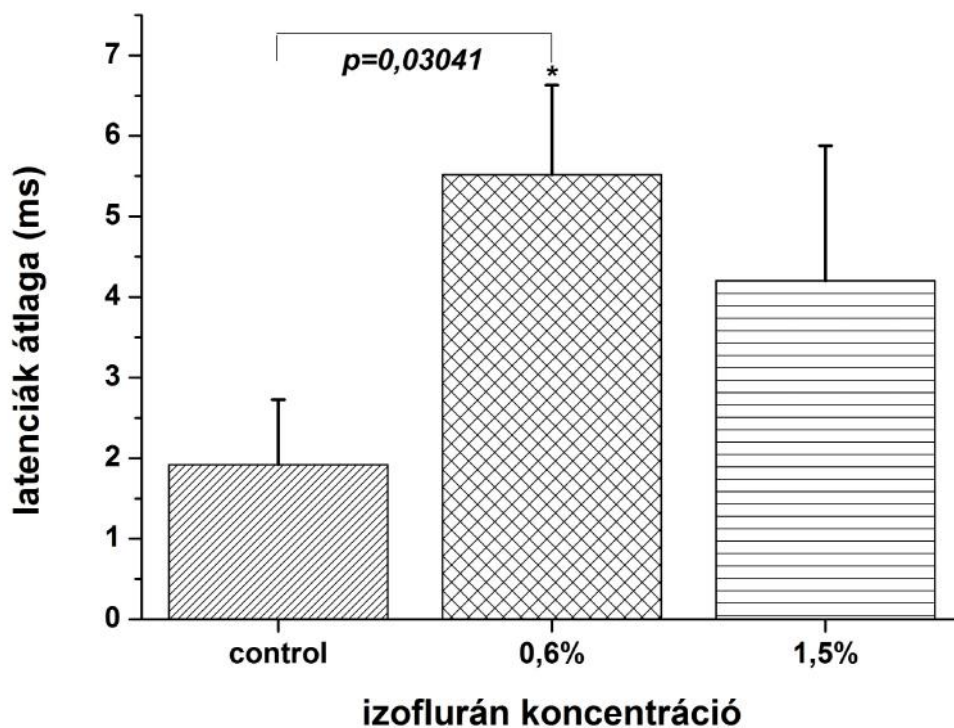


6. ábra: A vizuális kiváltott válasz (VEP) lefutása 0,25 Hz frekvenciájú vizuális ingerlés mellett a kontrollmérés közben, illetve a görbe lefutásának megváltozása 0,6%-os és 1,5%-os koncentrációjú izoflurán hatására. Az ábrán feketével a 0,3 Hz – 10 kHz tartományban szűrt, pirossal pedig a 40 Hz feletti tartományban szűrt VEP-et jelöltem.



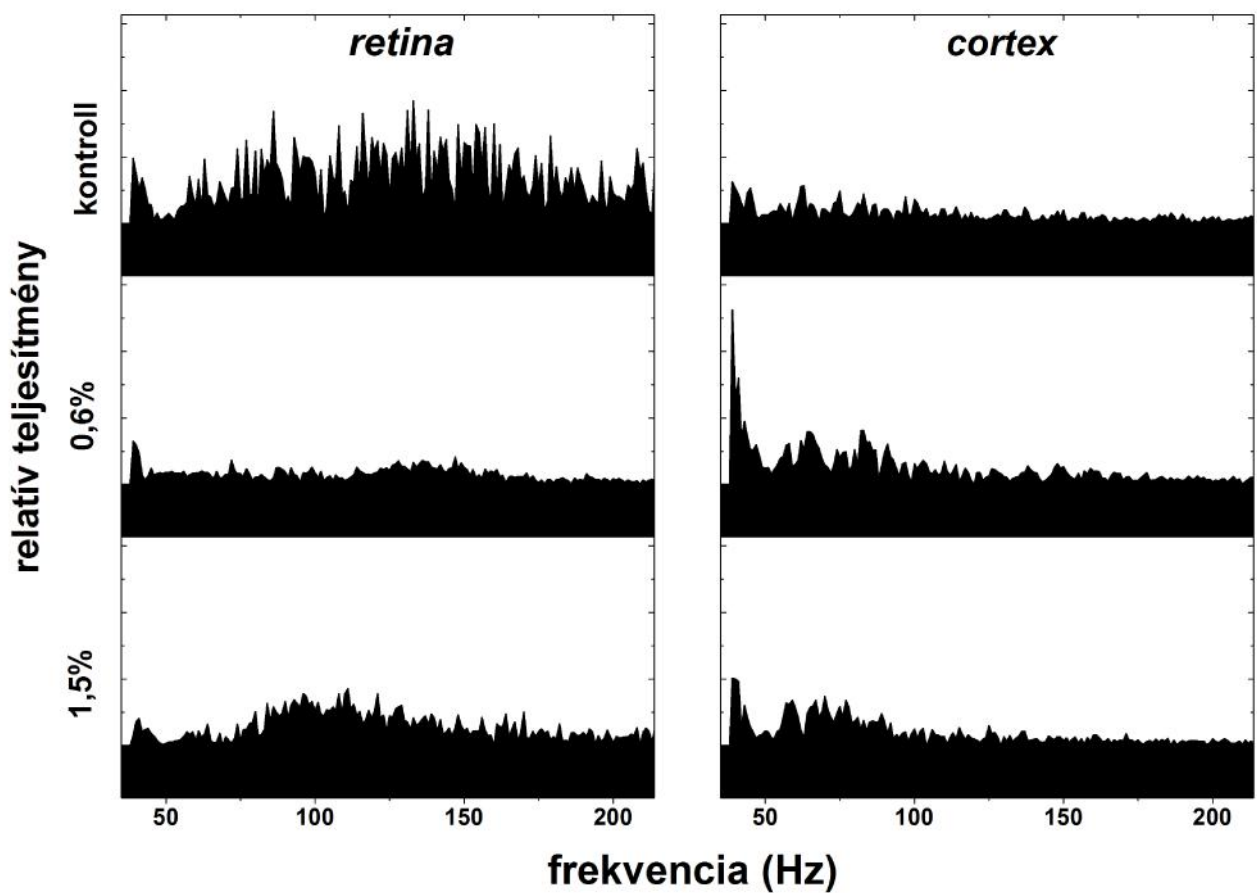
7. ábra: A kortikális oszcillációs potenciálok amplitúdóváltozásai éber, valamint különböző koncentrációjú (0,6% és 1,5%) izofluránnal anesztetizált állatokban (ctx = cortex).

Az amplitúdóértékek változása mellett a 0,25 Hz-es ingerlés hatására az ERG-n és VEP-en is megjelenő, egymásnak megfeleltethető oszcillációs potenciálok közti latenciák értékét is lemértem. A kapott adatokon Student-féle kétmintás t-próbát végeztem, külön-külön a kontrollértékhez viszonyítva a 0,6%-os koncentrációnál, majd az 1,5%-os izoflurán koncentráció esetében lement latenciaértékeket. A kapott eredmény szerint a két különböző izoflurán-koncentrációt a kontrollértékhez viszonyítva, 95%-os konfidenciaszinten szignifikáns változás mutatható ki a latenciákban ($p=0,03041$; 8. ábra). Az 1,5%-on mért adatokat a kontrollhoz viszonyítva viszont nem kaptam szignifikáns különbséget, vélhetőleg ez esetben is a nagyobb szórásérték miatt.



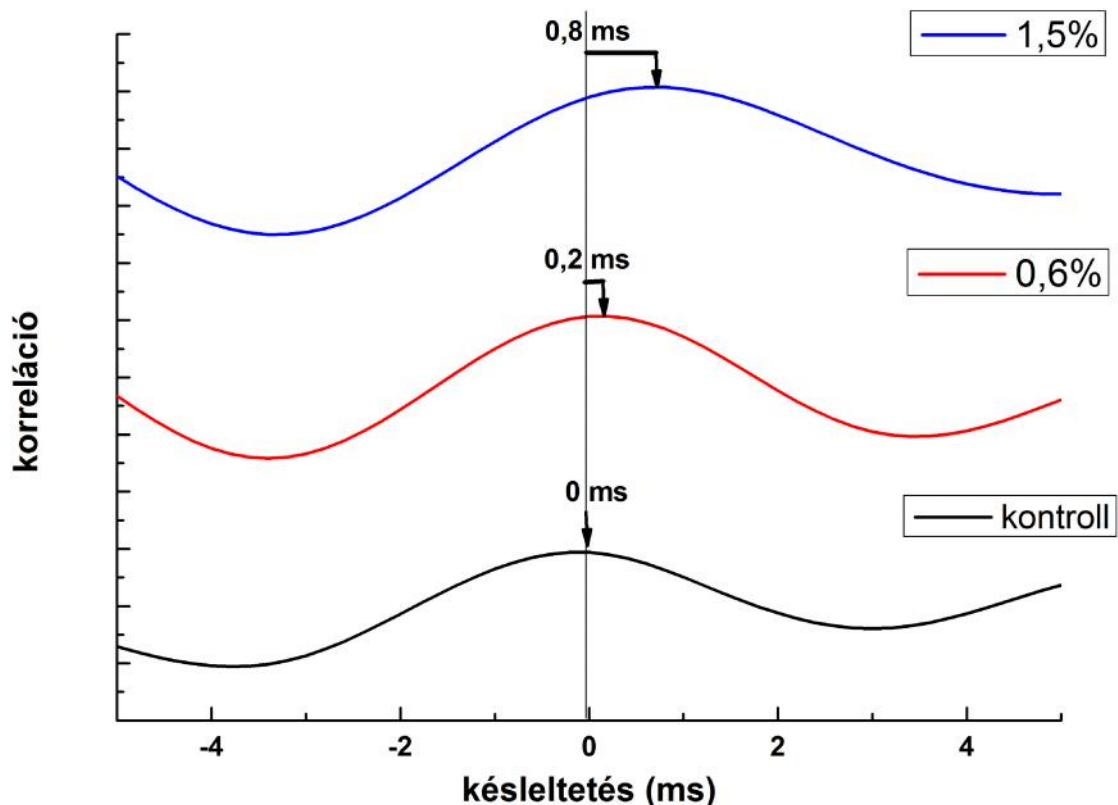
8. ábra: Az ERG-n és a VEP-en megjelenő oszcillációs potenciálok közti latenciák változásai különböző koncentrációjú izoflurán (0,6% és 1,5%) hatására.

Az egyes oszcillációk amplitúdóinak és a köztük észlelhető latenciáknak a lemérése mellett FFT amplitúdó-teljesítmény analízist is végeztem, amely a felvett adatsorokban előforduló frekvenciák relatív, egymáshoz viszonyított teljesítményét mutatja meg. Jól látható, hogy az izoflurán koncentrációjának növelésével az oszcillációs potenciálok frekvenciájának megfelelő 40-90 Hz-es tartományban megnőtt a teljesítmény a kortikális oszcillációs potenciálok esetében (9. ábra). A lenti ábrán a frekvenciatengely 40 Hz-es értéktől indul, ugyanis az adatsorok utólagos, szoftveres felüláteresztő szűrése miatt a 40 Hz alatti frekvenciák elvesztek.



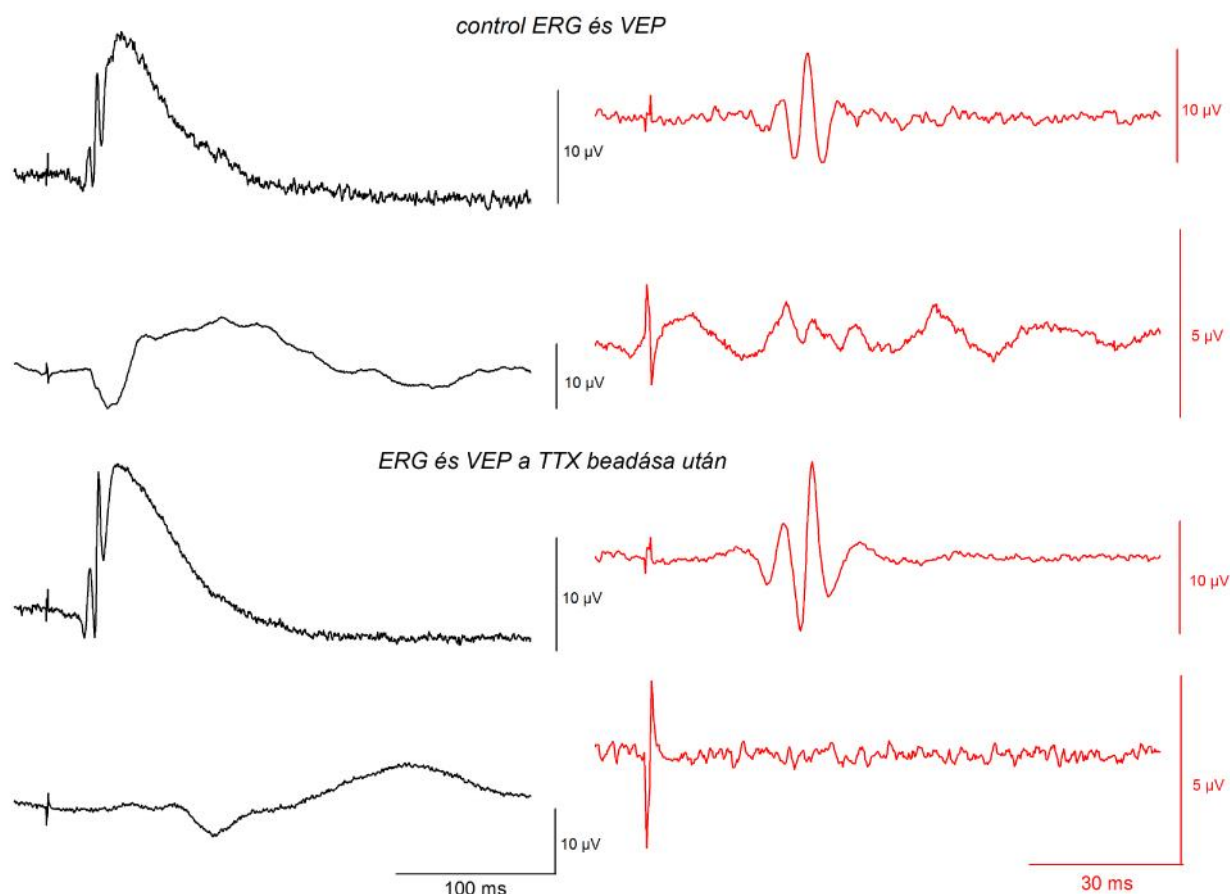
9. ábra: A retinális és kortikális oszcillációs potenciálok jelének teljesítményváltozásai az egyes izoflurán-koncentrációk függvényében, FFT amplitúdó-teljesítmény analízist használva.

A jelfeldolgozásban, különösen idősorok elemzésénél az adatsorok összehasonlítására gyakran alkalmaznak korrelációs függvényeket. A keresztkorreláció segít két adatsor közötti összefüggés megtalálásában. Ha az egyik adatsort eltoljuk, akkor késleltetett hatások is felfedezhetőek. Ezért a retina és a primer vizuális kéreg (V1) között fennálló funkcionális szinkronitás bizonyításaként a retináról és a cortexről elvezetett oszcillációk között keresztkorrelációt végeztem, ami azt mutatja meg, hogy a retinális és kortikális oszcillációk mennyire vannak fázisban egymáshoz képest. Jól látható, hogy a kontroll esetében az oszcillációk pontosan fázisban vannak, ugyanis a görbének a 0 pontban van a maximuma. Az izoflurán koncentráció növelésével arányosan az oszcillációk közötti késleltetés egyre nagyobb lesz (0,2 ms, ill. 0,8 ms) és pozitív irányba tolódik el, ami azt jelenti, hogy a 2. görbe követi az elsőt, esetünkben a kortikális oszcilláció a retinálisat (10. ábra).



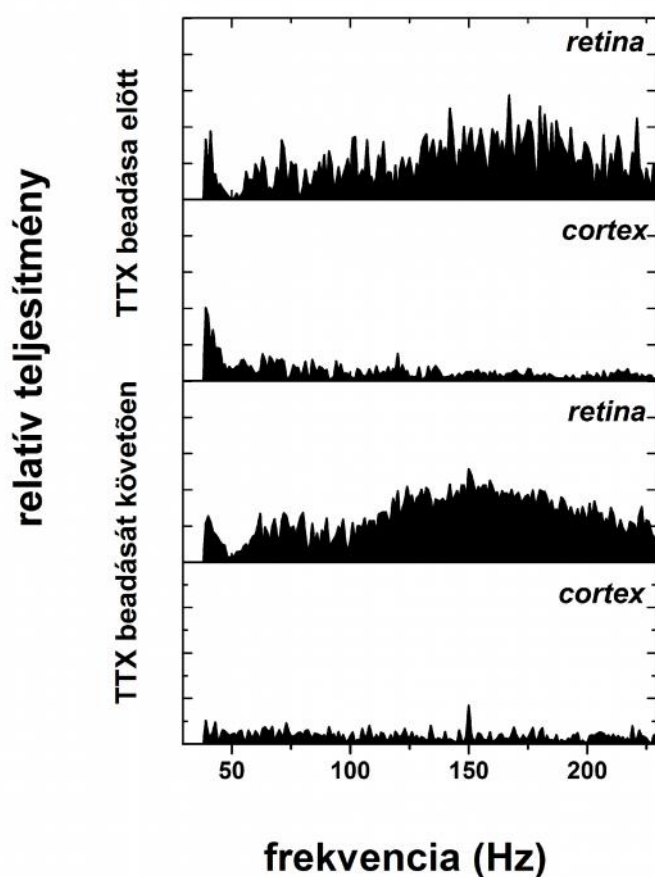
10. ábra: A retinális és kortikális oszcillációk közötti korreláció éber (fekete), valamint különböző koncentrációjú (0,6% - piros és 1,5% - kék) izofluránnal anesztetizált állatokban.

Annak igazolására, hogy a mérések során nem a retinális oszcillációk terjedtek át passzívan a cortexre, a nátriumcsatornákat blokkoló tetrodotoxint (TTX) juttattam Hamilton-fecskendővel a koronába épített kanülön keresztül a primer látókéreg felszínére. Az 1 μ l 1 μ M koncentrációjú TTX megszüntette a kérgi sejtek aktivitását, így az általuk generált oszcillációs potenciálokat is, a retina változatlan oszcillatórikus aktivitása mellett (11. ábra), amit az FFT amplitúdó-teljesítmény analízis elvégzése is alátámasztott (12. ábra). Az ábrán jól látható, hogy a TTX beadását követően a kortikális OP-k jelének teljesítménye lecsökkent a kontrollhoz viszonyítva, míg a retinális oszcillációs potenciálok jelének teljesítménye változatlan maradt a tetrodotoxin beadását követően is.



11. ábra: 1 μ l 1 μ M koncentrációjú TTX hatása az ERG és VEP görbéken megjelenő oszcillációs potenciálokra 0,25 Hz-es ingerlési frekvencia mellett. Az ábrán feketével a 0,3 Hz – 10 kHz tartományban szűrt, pirossal pedig a 40 Hz feletti tartományban szűrt ERG-t és VEP-et jelöltem.

Azért, hogy kizárjam annak a lehetőségét, hogy az észlelt változást az 1 μ l TTX beadása miatt létrejött térfogatnövekedés okozta, a mérést megelőző napon kontrollként a TTX-szel azonos mennyiségű ACSF-et (artificial cerebrospinal fluid) juttattam a kanülön keresztül a primer látókéreg felszínére. Az így mért retinális és kortikális oszcillációs potenciálok nem mutattak változást az ACSF beadása előtt regisztrált oszcillációs potenciálokhoz képest, vagyis a térfogatnövekedés nem okozott változást a VEP görbék lefutásában, sem a kortikális oszcillációk tulajdonságaiban. Tehát a TTX beadását követően megfigyelhető változás (a kortikális oszcillációk eltűnése) valóban a TTX fiziológiai hatása miatt következett be, nem pedig a térfogatnövekedés miatt.



12. ábra: A retinális és kortikális OP-k jelének teljesítményváltozásai a nátriumcsatorna-blokkoló tetrodotoxin beadása előtt, és azt követően.

5. Diszkusszió

A kapott adataink azt mutatják, hogy az izoflurán mind alacsony (0,6%-os), mind magas (1,5%-os) koncentrációban módosította a retinális és a kérgi OP-ket is. Az oszcillációs potenciálok latenciaideje a retina és a kéreg között szignifikánsan módosult, igazolva, hogy a narkózis alapvetően megváltoztatja az agyi területek konnektivitási mintázatait (*Heinke és Koelsch, 2005*). Emellett az OP-k amplitúdója is – mint azt az FFT analízis is mutatja – megváltozott az anesztézia alatt: a narkotikum koncentrációértékének növekedésével arányosan növekedett az amplitúdó. Mint ismert, az alacsony dózisokban az izoflurán excitatórikus hatású, ennek megfelelően a 0,6%-os koncentrációnál mért válaszok erőteljes növekedését látjuk. A retinális és a kérgi oszcillációs potenciálok – adataink szerint – dóziszfüggő változásokat mutatnak izoflurán anesztéziában a narkózis mélysége szerint. A klinikai gyakorlat számára tehát felmerül annak a lehetősége, hogy a retinográfiás mérések felhasználhatóak a narkózis mélységének indikálására.

Az agykérgi elvezető elektródok közvetlen közelébe, a primer látókéreg felszínére beadott 1 μ M-os, 1 μ l dózisú TTX – ami a sejtek akciós potenciál genezisének hatékony gátlószere –, erősen lecsökkentette a kérgi oszcillációs potenciálok amplitúdóját, bár teljesen nem szüntette meg azokat. Joggal feltételezhetjük tehát, hogy a kérgi OP-k az elektród közelében elhelyezkedő sejtek akciós potenciáljaival korrelációban lévő jelenségek. Mindezek mellett megjegyzem, hogy egyes állatokban még 1,5 %-os izoflurán-koncentráció esetén is megfigyelhető maradt egy vagy több kérgi OP-komponens. Ez a „maradék” OP vagy passzívan terjedt át más agyterületekről, vagy előfordulhat, hogy vannak izoflurán-rezisztens oszcillációs potenciálok is – az adataim alapján ez világosan nem eldönthető. Az azonban egyértelműen igazolható, hogy amikor a kérgi oszcillációk amplitúdóját csökkentettem TTX-szel, akkor a retinális válasz nem változott meg. Ezek alapján elmondható, hogy nincsen visszafelé terjedő, kéregből a retinába befutó időzítő szerepük az OP-knak.

A méréseim során kapott adatok alátámasztják azt az elképzelést, hogy a non-invazív technológiával szerzett retinális és kortikális oszcillációs potenciálok összevetése alkalmas lehet az anesztézia mélységének objektív mérésére a klinikumban.

6. Összefoglalás

A retina és az agykéreg között az oszcillációs potenciálok (OP) funkcionális csatoltságot hoznak létre, hasonlóan a kérgi gamma oszcillációs csatoltsághoz. A narkózis egyik lényeges jellemzője a vizuális információfeldolgozás elemeinek szétcsatolása, ami a percepció megszűnéséhez vezet.

Krónikus kísérleteinket felnőtt Sprague-Dawley patkányokon végeztük. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy 0,25 Hz-es vizuális ingert alkalmazva, az izoflurán hatására létrejött felszínes- (0,6%) és mély narkózis (1,5%) milyen hatással van a retinális és a kérgi OP-k alakulására. Arra az eredményre jutottunk, hogy a narkózis mélysége nem csak befolyásolja az oszcillációs potenciálok egyes tulajdonságait (amplitúdó, latencia, korreláció), hanem azok pontosan követik a narkózis mélységét, tehát az összecsatoltság „mértékének” tekinthetők. Annak igazolására, hogy nem a retinális OP-k terjedtek át passzívan a cortexre, nátriumcsatorna-blokkoló tetrodotoxint (TTX) adtunk a primer látókéreg felszínére. A TTX megszüntette a kérgi oszcillációs potenciálokat a retina változatlan oszcillációs aktivitása mellett.

Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy az oszcillációs potenciálok mérése felhasználható lesz a narkózis ellenőrzésére a humán klinikumban is.

7. Summary

Coupling of distant brain areas in the CNS can be performed by time-locking gamma oscillations. In the visual system such kind of timing has been found between the retina and the primary visual cortex (V1). There are already two separately investigated oscillatory responses to flash in the visual system: the retinal oscillatory potentials (OPs) and the visual evoked potential OPs. During anaesthesia this coupling between the retina and the cortex changes leading to the loss of perception.

The aim of the present study is to collect convincing data about how the low- (0.6%) and high-dose (1.5%) isoflurane anaesthesia modifies the retinal and cortical oscillatory potentials. We recorded the OPs from two structures of the visual system, the retina and the V1 of freely moving and anaesthetized SPRD rats. Using 0.6% and 1.5% isoflurane, OPs (amplitude, latency, correlation) changed dose dependently. Introducing tetrodotoxin (TTX) on V1 surface demonstrated that retinal OPs do not passively spread to the cortex.

Our results suggest that OPs follow the depth of the narcosis indicating changes in the level of coupling. Thus measuring oscillatory potentials could provide an effective method for monitoring narcosis progress in clinical practice by tracking changes in visual data processing.

Irodalomjegyzék

Becker K, Eder M, Ranft A, von Meyer L, Zieglgänsberger W, Kochs E, Dodt HU. 2012. Low dose isoflurane exerts opposing effects on neuronal network excitability in neocortex and hippocampus. PLoS One. 7(6):e39346.

Burns SP, Xing D, et al. 2011. Is gamma-band activity in the local field potential of V1 cortex a "clock" or filtered noise? J Neurosci. 31(26): 9658-9664.

Buzsáki G, Wang XJ. 2012. Mechanisms of Gamma Oscillations. Annual Review of Neuroscience Vol. 35: 203-225.

Galambos R, Szabó-Salfay O, Szatmári E, Szilágyi N, Juhász G. 2001. Sleep modifies retinal ganglion cell responses in the normal rat. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(4):2083-8.

Galambos, R., G. Juhász, et al. 2005. The human Retinal Functional Unit. Int J Psychophysiol. 57(3): 187-194.

Heinke W, Schwarzbauer C. 2002. In vivo imaging of anesthetic action in humans: approaches with positron emission tomography (PET) and functional magnetic resonance imaging (fMRI). Br J Anaesth. 89:112–122.

Heinke W, Koelsch S. 2005. The effects of anesthetics on brain activity and cognitive function. Curr Opin Anaesthesiol. 18(6):625-31.

Herring BE, Xie Z, Marks J, Fox AP. 2009. Isoflurane inhibits the neurotransmitter release machinery. J Neurophysiol. 102(2):1265-73.

- Jehle T, Ehlken D, Wingert K, Feuerstein TJ, Bach M, Lagrèze WA.** 2009. Influence of narcotics on luminance and frequency modulated visual evoked potentials in rats. *Doc Ophthalmol.* 118(3):217-24.
- Johansen JW, Sebel PS.** 2000. Development and clinical application of electroencephalographic bispectrum monitoring. *Anesthesiology.* 93:1336–1344.
- Kingery WS, Agashe GS, Guo TZ, Sawamura S, Davies MF, Clark JD, Kobilka BK, Maze M.** 2002. Isoflurane and nociception: spinal alpha2A adrenoceptors mediate antinociception while supraspinal alpha1 adrenoceptors mediate pronociception. *Anesthesiology.* 96(2):367-74.
- Kochs E, Schneider G.** 2001. Algesimetry: Concepts For Intelligent Anesthesia Monitors. *The Internet Journal of Neuromonitoring.* Volume 2 Number 2. DOI: 10.5580/5a.
- Martinovic J, Busch NA.** 2011. High frequency oscillations as a correlate of visual perception. *Int J Psychophysiol.* 79(1):32-8.
- Myles PS, Leslie K, McNeil J, et al.** 2004. Bispectral index monitoring to prevent awareness during anaesthesia: the B-Aware randomised controlled trial. *Lancet.* 363:1757–1763.
- Paik SB, Kumar T, Glaser DA.** 2009. Spontaneous local gamma oscillation selectively enhances neural network responsiveness. *PLoS Comput Biol.* 5(3):e1000342.
- Qiu M, Ramani R, Swetye M, Rajeevan N, Constable RT.** 2008. Anesthetic effects on regional CBF and BOLD and the coupling between task induced changes in CBF and BOLD – fMRI study in normal human subjects. *Magn Reson Med.* 60: 987-996.
- Ramani R.** 2005. Effects of sub-anaesthetic and anaesthetic doses of Sevoflurane on regional cerebral blood flow in healthy volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand.* 49; 1223-1224.

Ribary U. 2005. Dynamics of thalamo-cortical network oscillations and human perception. *Prog Brain Res.* 150:127-42.

Ries CR, Puil E. 1999. Ionic mechanism of isoflurane's actions on thalamocortical neurons. *J Neurophysiol.* 81(4):1802-9.

Sannita WG, Lopez L, Piras C, Di Bon G. 1995. Scalp-recorded oscillatory potentials evoked by transient pattern-reversal visual stimulation in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 96(3):206-18.

Sannita, WG, F Bandini, et al. 2001. Time dynamics of stimulus- and event-related gamma band activity: contrast-VEPs and the visual P300 in man. *Clin Neurophysiol.* 112(12): 2241-2249.

Sumiyoshi A, Suzuki H, Ogawa T, Riera JJ, Shimokawa H, Kawashima R. 2012. Coupling between gamma oscillation and fMRI signal in the rat somatosensory cortex: its dependence on systemic physiological parameters. *Neuroimage.* 60:738-46.

Szabó-Salfay O, Pálhalmi J, Szatmári E, Barabás P, Szilágyi N, Juhász G. 2001. The electroretinogram and visual evoked potential of freely moving rats. *Brain Res Bull.* 56(1):7-14.

Villeneuve MY, Casanova C. 2003. On the use of isoflurane versus halothane in the study of visual response properties of single cells in the primary visual cortex. *J Neurosci Methods.* 129(1):19-31.

Wachtmeister L. 1998. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res.* 17(4):485-521.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Juhász Gábornak, aki tanácsaival, tanításaival és kritikáival mindig segítségemre volt a munkám során és a dolgozat megírásában. Emellett köszönet illeti Dr. Kékesi Adrienna Katalint, aki a dolgozatot többször átolvasta és nyelvhelyességileg leellenőrizte.

Különösen hálás vagyok munkatársamnak, Todorov Mihailnak, aki mindig segítséget nyújtott, ha a mérésekkel, illetve a kiértékeléssel kapcsolatos kérdéseimmel hozzá fordultam.

Nem utolsó sorban köszönet illeti a Proteomikai Csoport doktorandusz hallgatóit és szakdolgozóit, akikhez bármikor bátran fordulhattam segítségért.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

A TDK dolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, a mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

Szerzői hozzájárulás:

- 1) A laboratóriumunk által már korábban kidolgozott műtéti séma szerint a kísérleti állatok operációját magam végeztem el.
- 2) 0,25 Hz-es frekvenciájú fényinger hatására lemértem a retináról elvezethető ERG és a kortikális EEG jeleket, valamint az azokon ülő oszcillációs potenciálokat mind éber állapotban, mind anesztézia során 0,6 és 1,5%-os izoflurán-koncentráció mellett. A különböző mélységű narkózis hatására az OP-k amplitúdója megváltozott, míg a latenciaértékek nem mutattak szignifikáns különbséget.
- 3) A primer látókéregre 1 μ l 1 μ M-os TTX-et juttattam, ezáltal igazolva, hogy az OP-knak nincsen visszafelé terjedő, kéregből a retinába befutó időzítő szerepük.
- 4) A lemért adatok kiértékelését, az eredmények ábrázolását és a statisztikai vizsgálatokat OriginPro software-rel magam végeztem el.