

A retina és a vizuális kéreg közötti inger-indukált csatoltság változása az inger paramétereinek függvényében

Készítette:

Todorov Mihail

OTDK dolgozat

Témavezető:

Dr. Juhász Gábor



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Biológiai Intézet
Proteomikai Csoport

Budapest, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
1. ÖSSZEFOGLALÓ	4
2. BEVEZETŐ	4
3. CÉLKITŰZÉSEK	8
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	8
4.1 Kísérleti állatok.....	8
4.2 Műtét.....	9
4.3 Ingerlés és mérés.....	10
4.4 Az oszcillációs potenciálok elkülönítése és vizsgálata.....	11
4.5 Latencia adatok vizsgálata statisztikai módszerrel	12
4.6 Az ERG és a cortex OP-k korrelációjának vizsgálata keresztkorrelációval	12
4.6 Frekvenciaanalízis gyors Fourier-transzformációval.....	14
4.7 Frekvenciaanalízis folytonos wavelet-transzformációval.....	15
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	17
5.1 Az oszcillációs potenciál függése a fényinger-szélességtől	17
5.3 Az oszcillációs potenciál függése a két inger közötti intervallumtól	21
5.4 Az oszcillációs potenciál függése a stimulus frekvenciától.....	23
5.5 Az OP-k változása a stimulus frekvencia függvényében.....	25
6. ÖSSZEFOGLALÓ	26
7. SUMMARY	28
8. IRODALOM	29
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	31
10. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	31

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

EEG	– elektroenkefalogram
EMG	– elektromiogram
ERG	– elektroretinogram
FFT	– Fast Fourier transform (gyors Fourier-transzformáció)
fMRI	– functional Magnetic Resonance Imaging, funkcionális MRI
ISI	– interstimulus intervallum
LED	– Light Emitting Diode, fénykibocsátó dióda
OP	– oszcillációs potenciál
SEM	– Standard Error of Mean
SFR	– Single Flash Response (egyedi villogó inger válasz)
SPRD	– Sprague-Dawley
SSR	– Steady State Response (folyamatosan villódzó inger válasz)
STFT	– Short-time Fourier transform (folytonos ablakozott Fourier-transzformáció)
VEP	– vizuális kiváltott válasz

1. ÖSSZEFOGLALÓ

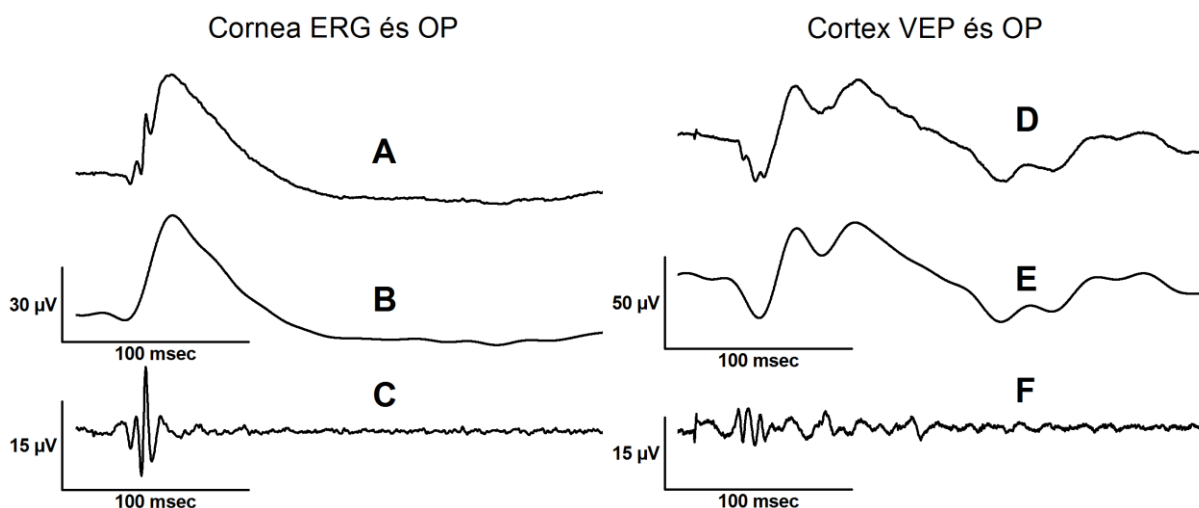
A gamma frekvenciás EEG oszcillációk időzített csatoltságot teremtenek az agykéreg egymástól funkcionálisan elkülönülő területei között. Kísérleteinkben a vizuális rendszer retinális és primer látókérgi - gamma frekvencia tartományba (30 – 70 Hz) eső - oszcillatórikus potenciáljait (OP) vizsgáltuk szabadon mozgó, felnőtt, hím Sprague-Dawley patkányokban. Mértük az OP-k inger-szélesség (0,01 – 1000 msec), az inger-intenzitás (800 – 5000 mcd/mm²), a két inger közötti intervallum (10 – 400 msec) függését, valamint a stimulus frekvencia (0,25 – 25 Hz) hatását a vizuális kéreg válaszaira. Eredményeink szerint a retináról elvezethető és a vizuális kérgen mérhető gamma frekvenciájú oszcillációk biztosítják a két terület csatoltságát. Megállapítottuk, hogy az OP-k tükrözik a kiváltó ingerek paramétereit - a retinális és a kérgi OP-k között állandó latencia figyelhető meg (4 ± 1 msec) - továbbá, hogy egy adott ingerfrekvenciánál a látórendszer átvált egyedi inger módból (single flash response) folyamatos inger módba (steady state response). A csatoltság fogalmát és funkcióját többféle módon képzelik el és modellezik. Adataink szerint valószínű, hogy az OP-k funkciója a retina és a kéreg közötti információ átadás szinkronizálása lehet, hasonlóan a kérgi gamma aktivitáshoz.

2. BEVEZETŐ

Az idegrendszer működése során folyamatosan detektálja a külvilág ingereit. Hatalmas információ áramlik a központi idegrendszerbe, amelynek feldolgozása után az agy szabályozza a szervezet működését. A folyamatos, szenzoros visszacsatolás révén, amit a magatartási vagy mozgási reakcióink váltanak ki érzékszerveinken, szervezetünk egyre jobb és jobb adaptív válaszokat ad a minket körülvevő világra. Minden bemeneti minta és minden kimeneti minta között van egy aktuális összefüggés, amit az agyunkban eltárolt emléknymok figyelembevételével az agy maga hoz létre. Egy ilyen holisztikus agyműködési modellben könnyen belátható, hogy az egyes agyterületek közötti funkcionális összekapcsolódások szövevénye hozza létre azokat az ideiglenes kapcsolatokat, melyeknek leképezése csak az utóbbi évtizedben lett lehetséges, a gyors fMRI technológia fejlődésének következményeként. Ma már képileg is ábrázolható, hogy az egyes agyterületek egy adott agyi funkció kapcsán összekapcsolódnak és ezek a csatolt neuronhálózatok hozzák létre a kimeneteken a speciális motoros mintát. Az összecsatolódásnak különböző agyi aktivációs mintázatok felelnek meg,

amelyek kivétel nélkül igénylik a magasfokú szinkronitást és a szinkronban működő agyterületek gyors változásait. Az idegrendszer makrostruktúráinak összehangolását egy sajátos, nagyon érzékeny elektromos jel indexálja: a gamma oszcilláció. A gamma oszcillációkat összefüggésbe hozták a percepcióval, a tanulással és a kognitív folyamatokkal. A gamma oszcillációk jelentősen változnak a pszichiátriai betegségekben, de függenek az éberségi szinttől is (Sannita, Bandini és mtsai., 2001). Minden olyan betegségben vagy fiziológiai szituációban, ahol az információ feldolgozás sérül vagy változik, elektrofiziológiai és képalkotó eljárásokkal legtöbbször kimutatható a gamma oszcillációk változása (Sumiyoshi, Suzuki és mtsai., 2012). A gamma frekvencián működő agyterületek közötti csatoltságot a két helyen mért gamma aktivitás fázis és frekvencia viszonyai mutatják. A csatoltság erősségét a hullámok amplitúdója és korrelációjuk erőssége jelenti. Ezeket a fogalmakat és a gamma csatoltság mechanizmusait széles körben vizsgálták a központi idegrendszerben és ma már elfogadott, hogy a kérgi és a mély agyterületek közti 40 Hz-es illetve ennél magasabb frekvenciájú gamma csatolás kell az agy tudatos és magas szintű működéséhez (Joliot, Ribary és mtsai., 1994, Lachaux, Rodriguez és mtsai., 1999, Siegel és Konig, 2003, Herrmann, Munk és mtsai., 2004, Ross, Herdman és mtsai., 2005,). Számos adat igazolta a vizuális rendszerben, hogy a tudatos percepció, az alakfelismerés és más bonyolultabb vizuális folyamatok is kapcsolatba hozhatók a vizuális kérgi gamma tevékenységgel (Tallon-Baudry, Bertrand és mtsai., 1996, Prechtl, Cohen és mtsai., 1997, Cardin, Palmer és mtsai., 2005). A retina valójában a központi idegrendszer részének tekinthető, amely az egyedfejlődés során különült el és távolodott el a központi idegrendszertől, rétegezett felépítése, principális sejtjei és ingerfeldolgozó funkciója minden más érzékszervnél hasonlatosabbá teszi az agyhoz. Régóta ismert, hogy a vizuális rendszerben, a retinában és a látókéregben egyaránt mérhetők a gamma tartományban lévő oszcillációk (1. ábra), melyeket külön-külön sokan tanulmányoztak ugyan, de összefüggésbe senki nem hozta a retina és a kéreg közti csatolással. Azt is tudjuk, hogy a vizuális percepció jelentős mértékben a retinális képi előfeldolgozástól függ. A kép egyes információi időben eltolva továbbítódnak a kéreg felé (Galambos, Szabo-Salfay és mtsai., 2001), a retina a képi információt elemeire bontja és az egyes információ blokkokat időbeli információ-szekvenciák formájában közvetíti az agy felé. Ez a feldolgozási mechanizmus magas fokú időbeli összehangolást kíván meg a retinális és a kérgi neuronhálózatok között.

Bizonyíték erre, hogy ha a saccadikus szemmozgások által előidézett retinális változásokat kiküszöböljük, a képet fixáljuk a retinán, a képfeldolgozás másodpercek alatt megszűnik („stabilised image”, Dodge, 1900). Tehát a kép retinán történő gyors változása által okozott jelek a kéreg és a retina közti információ átadáshoz feltétlen szükségesek (Robinson és Wurtz, 1976; Beeler, 1967).



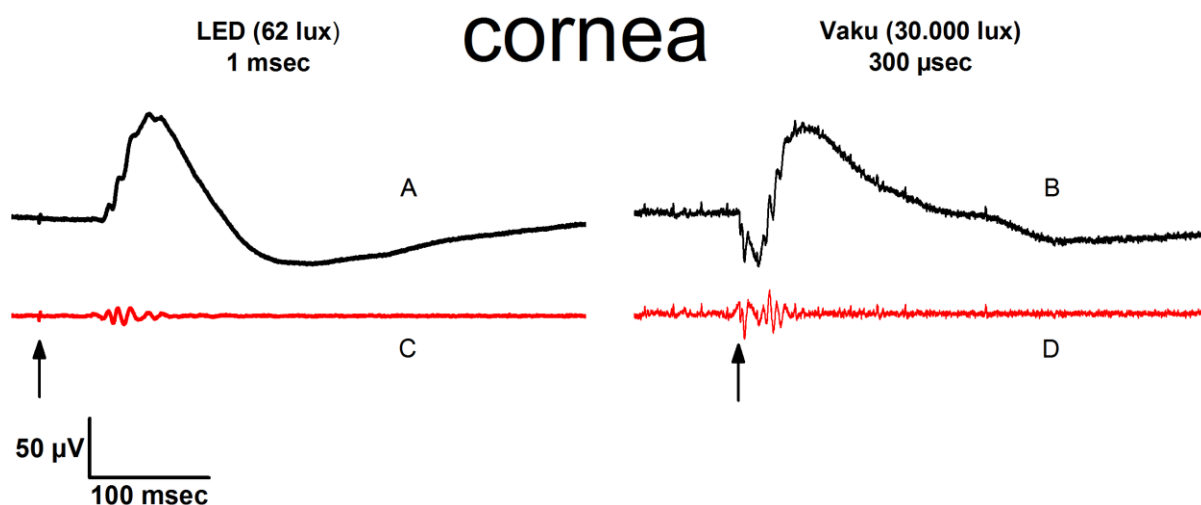
1. ábra: **A:** szemfelszínről elvezetett ERG 0,3 Hz – 10 kHz szűréssel, **B:** ERG 0,3 – 40 Hz szűréssel, **C:** szemfelszínről elvezetett ERG 40 Hz – 10 kHz szűréssel csak az OP látszik, **D:** ipszilaterális primer látókéregből elvezetett VEP 0,3 Hz – 10 kHz szűréssel, **E:** VEP 0,3 – 40 Hz szűréssel, **F:** szemfelszínről elvezetett ERG 40 Hz – 10 kHz szűréssel csak az OP látszik

Laboratóriumunkban sok évvel ezelőtt kidolgoztak egy olyan vizuális elektrofiziológiai preparátumot, mely lehetővé teszi szabadon mozgó patkányokon a retina és a cortex fényingerre történő elektromos válaszainak mérését. Ez volt az első, és máig is az egyetlen olyan preparátum, amelyből altatás nélkül szinkron elvezethető a retinogram és a vizuális kérgi válasz, villanó fényingerre. Ez azért fontos, mert a gamma oszcillációk éber állapotban mérhetők, így kérdésfelvetésünk, miszerint a két struktúra között létezik-e a gamma csatolás, csak szabadon mozgó állatokon vizsgálható. A preparátumot a Novartis és Biogen Idec gyógyszercégek is használják, mert stabil mérést tesz lehetővé és könnyen szabványosítható. Laboratóriumunk korábbi méréseinek során figyelték meg, hogy a szabadon mozgó állatokban mért válaszokból kiszűrhető gamma oszcillációk, az ún. oszcillatórikus potenciálok (OP-k), nagyon hasonlóan, kicsi, de stabil latencia-különbséggel jelennek meg az elektroretinogramon (ERG) és a cortex vizuális kiváltott válasz (VEP) felvételein, mint a kérgi területek csatoltságában széles körben vizsgált gamma oszcillációk. Azonban a két jel korrelációját, mint a gamma oszcillációk csatoló funkciója esetében szokás, nem vizsgálták.

Felmerült tehát a kérdés, hogy az OP-k lehetnek-e a retina és a cortex aktivitását szinkronba hozó, csatoló jelek? A csatolást létrehozó oszcillációktól a következőket várjuk el:

1. A két struktúrában hasonló frekvenciájú két jel legyen.
2. A két struktúra csatoló jelei között erős legyen a korreláció.
3. A korreláció széles ingerparaméter tartományban legyen független az ingerlési paraméterektől.

Jelen dolgozat célja egy olyan szisztematikus vizsgálat elvégzése szabadon mozgó állatokon, amiben a kérgei és retinális OP-k összehasonlíthatók és az alkalmazott ingerek paramétereitől való függésük maximális precizitással megmérhető. Kérdésünk az volt, hogy milyen mértékben és mely paramétereket tükröznék az OP-k, azaz a vizuális információkat szállítják-e, vagy szinkronizáló kvázi-standard csatoló jelek? A kérdést az a megfigyelés vetette fel, amikor a hatalmas fényintenzitású (30.000 lux) fényképezőgép-vaku villanásra mért OP-k alig voltak nagyobbak az 1 msec hosszú LED villanásra (5000 mcd $\approx$ 62 lux) kapott válaszoknál, miközben 10^3 nagyságrendnyi foton-többlet jutott be a szembe kb. 1/3 idő alatt (vaku: 300 μ sec; LED: 1000 μ sec) (2. ábra).



2. ábra: **A:** ERG 0,3 Hz – 10 kHz LED ingerlés mellett, **B:** ERG 0,3 Hz – 10 kHz vaku ingerléssel, **C:** OP 40 Hz – 10 kHz LED ingerlés mellett, **D:** OP 40 Hz – 10 kHz vaku ingerléssel; **nyíl:** ingerbetörés időpontja

A kérdés megválaszolásának számos elméleti és gyakorlati vonatkozása van, ugyanis, ha a távoli agyterületek közti csatoltságot a gamma oszcillációk biztosítják, és ez a modell igaz a retina-cortex relációra is, akkor van egy nagyon könnyen és hatékonyan használható állatkísérleti modellünk a gamma csatoltság vizsgálatára. Emellett szól az is, hogy a ritmikus

ingerre adott oszcillatórikus válaszok a gammához hasonlóan változnak a vizuális rendszerben (Burns, Xing és mtsai., 2011; Martinovic és Busch, 2011). Másfelől az idegrendszeri betegségek, metabolikus zavarok és neurodegenerációk tünetei között gyakran vannak látászavarok. A retina és a cortex OP-k összehasonlító elemzése egy jó, nem invazív diagnosztikai módszerré is fejleszthető lenne, ha sikerülne egyértelműen igazolni az OP-k és a kórfolyamatok kapcsolatát. A dolgozatban bemutatásra kerülő kísérleti anyag egy készülő, nemzetközi publikáció jelentős része.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatom célja az, hogy adatokkal támasszam alá, hogy a retina és a primer vizuális cortex oszcillációs potenciálok lehetnek-e a két terület szinkronizációját, azaz csatoltságát, létrehozó jelek, mint a központi agyi struktúrákban a gamma oszcillációk, vagy csupán a képi információ továbbítását végzik.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

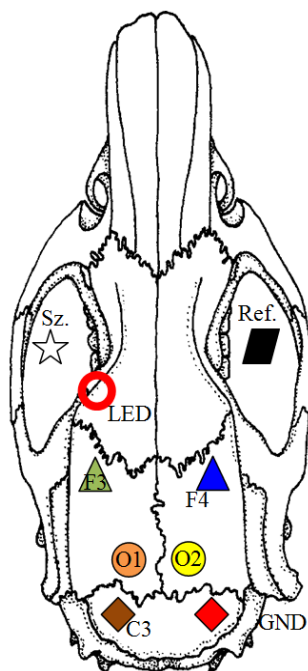
4.1 Kísérleti állatok

A kísérleteket négy hónapnál idősebb 270–450 g Sprague-Dawley (SPRD) patkányokon végeztem, melyeket standard körülmények között tartottunk 12 órás fény-sötét ciklusban (világos: reggel 6h és délután 18h között).

Az Európai Községek 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 jártunk el kísérleteink során, és mindent elkövettünk az állatok szenvedésének és számának csökkentése érdekében.

4.2 Műtét

Az állatok altatását a műtétek alatt inhalációs narkózisban, izoflurán (0,8–1,2 %; Forane, Abbott, India) illetve ketamin (0,8 mg / 100 g testtömeg; Calypsol, Richter Gedeon NyRt., Magyarország) és xilazin (0,3 mg / 100 g testtömeg; Primazin, Alfasan International BV, Hollandia) szerekkel végeztem. Minden állat a 3. ábra szerint lett beépítve.



3. ábra: A patkány beépítési sémája retinogram és primer látókérgi vizuális kiváltott válasz felvételéhez. Az egyes területeket a humán nemzetközi 10-20-as EEG elvezetési pontok jelölési rövidítéseivel neveztem el, kivéve a szem (Sz.) és a referencia elektródokat (Ref). Az F3 és F4 frontális lebeny kérgi elektródja; O1 és O2 az occipitalis lebeny elektródjai; GND a kisagyi földelő elektród; C3 a tartalék földelő pont. A LED dióda a választ kiváltó fényingert szolgáltatta.

A LED dióda 5 mm átmérőjű, piros színű, magas fénykibocsátású (5000 mcd/mm²) volt. A fényforrásokat retrobulbárisan helyeztem el, így a retinát elérő fény mennyisége nem változott az állat szemhéjának helyzetével és a fej pozíciójával. A piros LED alkalmazását indokolta, hogy a piros fény hullámhosszát nyeli el a legkevésbé az élő szövet (Szabo-Salfay, Palhalmi és mtsai., 2001). A Sz.-elektród a több eres, vékony, teflon szigetelésű szövetbarát rozsdamentes huzal (Medwire, SST7) seprőszerűen kihajtott vége volt az állat szemének felszínére helyezve. A Ref.-elektród az előző szemelektród referencia pontjaként szolgáló kb. 25 mm² területű szövetbarát sebkapocsból kialakított lemez volt, ami az utólagos szigetelés miatt, csak az állat bőréhez ért hozzá, így biztosította a lehető legtisztább elektroretinogram (ERG) felvételét és egyidejűleg minimalizálta a nem kívánt izommozgások által keltett elektromiogram (EMG) és az elektród esetleges elcsúszása miatt keletkező műtermékeket. Az F3 és F4 elektródokat a koponya koszorúvarrataitól caudalis irányban 1 mm illetve a saggitalis varrat és a temporalis csont között fél távolságban, szimmetrikusan rögzítettem az agyfelszínhez a koponyacsonton keresztül. Az O1 és O2 elektródokat a lambda varrattól és a saggitalis varrattól 1-1 mm távolságban, szimmetrikusan rögzítettem szintén az agyfelszínre. A GND jelzésű elektród az EEG műszer földelő pontját csatlakoztatta az állathoz.

A C3 elektród biztonsági tartalékul szolgált, amennyiben a GND pont megsérült volna az állat szabad mozgása miatt. Az F3, F4, O3, O4, C3 és GND elektródok rozsdálló acélsavarokból (NONOX 1,6 mm, Menet-Trend Kft., Magyarország) készültek. A csavarokat és az elvezetéseket dentacrylát fogászati cementtel (Pattern Resin LS, GC America Inc., U.S.A.) rögzítettem, ezzel úgynevezett koronát létrehozva, a korona tetején egy dupla tűkesoros csatlakozót helyeztem el, amibe az egyes elektródok elvezetéseit forrasztottam. A korona több hétig stabilan az állat koponyáján maradt és nem irritálta a környező szöveteket. Minden műtét után az állatok 48–72 órát pihentek a 12 órás fény-sötét ciklusú teremben.

4.3 Ingerlés és mérés

Az ingerléshez programozható BioStim univerzális stimulátor rendszert (SUPERTECH Kft., Magyarország) használtam konstans áramerősségű LED meghajtóval. A méréseket standard humán EEG felvételére alkalmas Grass B8 (Grass Technologies, U.S.A.) és Nichon Cohden Neurofax16 (Nichon Cohden, Japán) erősítőkkel mértem. Az adatok digitalizálását, online számítógéphez kötött CED 1401 analóg-digitális adatgyűjtővel (Cambridge Electronic Design, Nagy Britannia) végeztem. Az ERG és EEG görbéket 0,3 Hz – 10 kHz-es tartományban erősítettem (5000x) és 5 kHz-es mintavételezés mellett vettem fel. Két EEG csatornát vettem fel: 1. csatorna az Sz.-Ref. elektródokról mért elektroretinogram; 2. csatorna az F3-O1 közötti kiváltott vizuális válasz (ipszilateralis kéreg). A mérés eredményeit Signal 4 (Cambridge Electronic Design, Nagy Britannia) programmal mentettem el. Az állatok a kísérlet alatt teljesen elsötétített Faraday-ketrecben voltak, szabadon mozoghattak. A jobb eredmények érdekében az állatokat 30 percre sötétben hagytam közvetlenül a mérések előtt, hogy adaptálódjanak környezetükhöz.

A fényinger-szélesség függés vizsgálatánál a fényinger hossza 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 msec volt. Egy inger után 1 sec hosszan történt az ERG és EEG felvétel majd 5 sec elteltével újra egy inger következett. Az így keletkezett felvételekből 300 darabot átlagoltam.

Az inger-intenzitás függés vizsgálatánál a fényerősség szabályozottan 800; 1600; 2500; 3300; 4100; 5000 mcd/mm² értékeket vehetett fel. Egy inger után 1 sec hosszan történt az ERG és EEG felvétel majd 5 sec várakozás elteltével újra egy inger következett. A kiértékelést 300 felvétel átlagából készítettem. Ezeket a paramétereket gondosan kimérték már korábbi kísérleteinkben a laboratóriumunkban, nem okoz jelentős változást a válaszok paramétereiben a relatíve rövid interstimulus intervallum (ISI).

Extra erős ingerként egy fényképezőgép vakuval (30.000 Lux, Panasonic, Matsushita Electric Industrial Co., Osaka, Japán) is stimuláltam, melyre az állatok megrezzenési reakciót mutattak eleinte, de néhány inger után megszokták. Megjegyezném, hogy ilyen ingerből csak nagyon kevés adható, mert a retinát maradandóan károsíthatja.

A két inger közötti intervallum függés vizsgálatához 10; 60; 90; 200; 300; 400 msec-ként kapott egy-egy ingert az állat. Egy sorozat után 1 sec hosszan történt az ERG és EEG felvétel majd 5 sec elteltével újra egy sorozat következett. Az így keletkezett felvételekből 300 darabot átlagoltam.

A stimulus frekvencia hatását 0,25; 3; 9; 11; 25 Hz-es fényinger sorozatokban tanulmányoztam. A 0,25 Hz-es sorozatot folyamatosan, míg a többi sorozatot 3 sec hosszan alkalmaztam, majd 30 sec szünet következett a fényadaptáció hatásainak kiküszöbölése érdekében. Az így keletkezett felvételekből 300 darabot átlagolva, minden első másodpercet külön (sötét adaptált válasz) illetve a második és harmadik másodpercet együtt (fényadaptált válasz) értékeltem ki.

4.4 Az oszcillációs potenciálok elkülönítése és vizsgálata

A felvételeket Origin 8.6 SR2 szoftverrel (OriginLab Co., Northampton, MA, U.S.A.) utólagosan szűrtem meg 40 Hz-es felül áteresztő FFT szűrővel, hogy az ERG illetve EEG görbékből csak az OP-k maradjanak. Az FFT szűrő meredeksége 0,01 Hz és 2dB pontja 40 Hz-nél volt. A szűrő fázistolás korrigált volt és nem gerjedt a jelablak széleinél. Az így szűrt OP-k teljesen pontosan fedésbe hozhatók a nyers adatokban látható OP-kal.

Az OP-kben a retina és a primer vizuális látókéreg közti latencia eltolódást, valamint a jelek változásait az inger paraméterek függvényében két-két egymástól független módon vizsgáltam meg. Mindegyik módszernek más-más erősségei és hiányosságai vannak, így a négy vizsgálati eredmény kölcsönösen megerősíti egymást.

A latenciaidő változásának követésére az OP-k első komponenseinek csúcslatenciáját mértem az ingerbetöréshez (tüske-szerű artefaktum első felszálló éle) képest és statisztikailag elemeztem illetve keresztkorrelációs analízist végeztem. Ez az analízis a fáziseltolás mértékével jellemzi a két jel közötti időzítés különbségeket. A csúcslatencia mérés statisztikai elemzése pontos közelítést ad, de sokszor nehéz konzekvensen alkalmazni, mert az oszcillációk első komponensei az ingerparaméterek függvényében eltűnhetnek vagy újak jelennek meg, ezért a gyenge ingerek esetében pontatlan eredményhez juthatunk. A keresztkorrelációs eljárás pontosabban képezi le a szem és a cortex OP-k időbeli viszonyait,

beleértve a változó és/vagy kései komponenseket is. Gyenge pontja, hogy kevésbé pontos, ami az összevetendő jelek komplexitásából adódik.

A frekvencia analízishez a klasszikus FFT alapú korrelációs függvény analízist illetve az ún. wavelet módszereket alkalmaztam. A Fourier-transzformáció alapú frekvenciánkénti teljesítmény eloszlás pontosan meg tudja mutatni a vizsgált jelet alkotó hullámok domináns frekvenciáit és normalizálva azt is, hogy mekkora részben alkotják a vizsgált jelet, de definíció szerint a transzformáció valós és irracionális tartományait $-\infty$ -tól $+\infty$ -ig összegzi, ezért a hullám időbeli változását nem tükrözi. Továbbá előfordulhat, hogy azonos frekvenciánkénti teljesítmény spektrumot kapunk akkor is, amikor a vizsgált biológiai mechanizmusok erősen különböznek és a nyers adatokban ezt jól lehet látni. A wavelet transzformáció erőssége, hogy a vizsgált jelben lévő hullámok teljesítményét az idő függvényében frekvenciasávonként elkülönítve jeleníti meg illetve intenzitásukat színekkel jelöli, de a wavelet definíciójából adódóan és a Heisenberg-féle bizonytalansági elv miatt nem lehetséges pontos frekvencia értékeket az egyes hullámokhoz rendelni, ehelyett frekvencia sávokat használunk.

4.5 Latencia adatok vizsgálata statisztikai módszerrel

A leszűrt felvételekből ingerparaméter-csoportonként első illetve, ahol lehetett a második, OP komponens csúcslatenciáit mértem, ami az ingerbetöréstől az OP első hullámának maximumáig eltelt idő. Öt állat egyedi értékeit közös statisztikai értékelésnek vettem alá egy utas ANOVA teszttel, egységesen 95 %-os konfidenciaszinten ($p=0,05$). Az így kapott átlagos latenciaváltozás értékét (Mean) és standard hibáját (Standard Error of Mean) ábrázoltam.

4.6 Az ERG és a cortex OP-k korrelációjának vizsgálata keresztkorrelációval

A fényinger-szélesség, -intenzitás és -frekvencia kísérletek adatait keresztkorrelációs vizsgálatnak vettem alá, ami két bemenő diszkrét jel közötti hasonlóságot mutat meg egy képzetes koordináta rendszerben, a korrelogramban. A függőleges tengely, az adatok normalizálása után, egy dimenzió nélküli szám a korrelációs koefficiens, -1 és +1 között. Értéke a két jel egymáshoz hasonlítását, a két adatsor közötti kapcsolat szorosságát mutatja. A módszer három esetet tud elkülöníteni: pozitív korreláció esetén az első görbe pontos késéssel követi (mindig azonos irányban és mértékben) a második görbe változásait.

Negatív korrelációkor a két görbe ellentétesen változik (az első jel maximumainál a másodiknak minimuma van és fordítva), míg semleges korrelációkor a két jel egymástól függetlenül viselkedik. Konvenció szerint +1 és +0,8 valamint -0,8 és -1 közötti érték esetén erős korreláció van, azaz az EEG görbe szorosan követi az ERG görbe elmozdulását. Közepes korreláció +0,7 és +0,5 valamint -0,5 és -0,8 között van. Nem tekintjük bizonyosan korrelálónak a két jelet, ha a hasonlósági mutató +0,4 és -0,4 közötti.

A jelekben lévő periodicitás kimutatására is használható a korreláció analízis, ha az adatsort önmagával korreláljuk és így a jelben lévő periodikusan ismétlődő komponenseket emeljük ki pozitív csúcsokként, ez az auto-korreláció. Ha két jel közötti összefüggést szeretnénk vizsgálni, akkor két különböző adatsort hasonlítunk össze, ez a keresztkorreláció. Mindkét esetben a korrelogramokat úgy számoljuk, hogy az egyik adatsort a másikhoz képest egy kis „t” idővel eltoljuk és a két adatsort összeadjuk, majd 2xt, 3xtnxt eltolást alkalmazunk és az adatokat minden eltolás értéknél összeadjuk. Ez a számítás az alábbi matematikai művelet jó és gyors számítástechnikai közelítését adja:

$$y(m) = \sum_{n=0}^{M-1} f(n) g(n - m)$$

1. egyenlet: a keresztkorreláció egyenlete, ahol $f(n)$ és $g(n)$ a két egyenlően hosszú bemenő jel, M pedig a korrelációs koefficiens

Könnyen belátható, hogy ha a két görbében vannak periodicitások illetve azonos hullámok, akkor ezeket adott eltolás esetén periodikusan fedésbe tudjuk hozni és így ott egy maximumot vagy minimumot kapunk a sorozatos összeadás eredményeként. Az autokorrelogram definíciószerűen szimmetrikus, a keresztkorrelogram aszimmetrikus. A vízszintes tengely az idő, amin a fáziskésés mértéke vagy a periódusidő olvasható le. A függőleges tengely pedig azt mutatja meg, hogy a két görbét egymáshoz eltolva, mikor van maximális és mikor van minimális egybeesés és annak mekkora a relatív értéke a sztochasztikus jelszinthez képest. Megjegyzem, hogy ez az algoritmus csak végtelen számú eltolás esetén ad helyes értéket. Mivel ezt nem tehetjük meg egy véges adatsoron, az ideális esettől való eltérést egy ablakfüggvénnyel vesszük figyelembe, az esetemben a Hamming függvényt használtam, ami a rövid adatsorok esetére ideális. Az ablakfüggvény kiválasztása akkor jó, ha a vizsgált frekvenciatartományban sztochasztikusan generált komplex spektrumú jel egy vízszintes korrelogramot ad és nem háztető alakút.

A korrelációnak három esete lehetséges. Pozitív korreláció esetén a görbe első maximumának, míg negatív korreláció esetén a görbe első minimumának x koordinátája adja

meg az időbeni fáziseltolást. Amennyiben több maximum is van és ezek nem egymásnak egészszámú többszöröseinél vannak (felharmonikusok), akkor lehetséges több komponens eltérő eltolódását is kimutatni. A fázis tengely nulla pontjában a késleltetés nulla; ha pozitív irányban van az első szélsőérték, akkor az első görbe késik a másodikhoz képest, míg ha negatív x-értéknél van, akkor az első görbét követi a második. Utóbbiból látszik, hogy fontos mindig konzekvensen megválasztani az első és második görbét, hogy egymással összevethető eredményt kapjunk. Ezért a jelanalízis során, mindig az első jelnek az ERG OP-t vettem, a második pedig a VEP OP görbéje volt. Minden esetben az ingerbetörést kihagytam és az OP után az OP-t megelőző szakasznak megfelelő hosszúságú utószakaszt vizsgáltam, ezzel eliminálva az ingerbetörés illetve egyéb, nem OP jellegű jelek okozta műtermékeket illetve biztosítottam, hogy a vizsgált jelablak hossza ne változzon az egyes mérések értékelése között. Ez utóbbi az ablakfüggvény szempontjából fontos. A fázistolások és az algoritmusok helyes működését generátorral előállított jelek segítségével előzetesen ellenőriztem. Erre azért volt szükség, mert a programozók által készített számítástechnikai megoldások csak bizonyos korlátok között korrektek gyakran, mint adott minimális jelablak vagy mintavételi frekvencia, stb.

4.6 Frekvenciaanalízis gyors Fourier-transzformációval

A Fourier-transzformáció alapelve, hogy minden hullámot le lehet írni két, vagy több bizonyosan ismert trigonometrikus függvény összegezésével. A trigonometrikus függvények valós (reális) és képzetes (imaginárius) részét két külön függvényben tudjuk ábrázolni. Ezek összege ad egy ismert frekvenciájú függvényt, amit hozzáadunk a vizsgált görbéhez. Ha az eljárást széles hullámfrekvencia tartományban elvégezzük, a kapott eredmény minden pontja egy adott frekvencián mérhető teljesítménnyel arányos. A matematikai megoldást az alábbi egyenlet írja le:

$$F_n = \sum_{i=0}^{N-1} x_i e^{-\frac{2\pi j}{N} ni}$$

2. egyenlet: a diszkrét gyors Fourier-transzformáció egyenlete (DFT), ahol x_i az N sorozata, F_n pedig a Fourier-sor

Az azonos hullámhosszú és fázisú hullámok felerősítik egymás amplitúdóját (konstruktív erősítés), így ha nagy összeget kapunk, akkor a vizsgált görbében jelen van az ismert hullámmal azonos frekvenciájú hullám.

Ha nulla az összege, akkor nincs jelen az adott hullám, vagy ritka esetben kioltásos interferencia miatt hiányzik. Ha a kapott Fourier sorba fejtés egyenletet frekvencia szerint integráljuk, a teljesítmény sűrűségi spektrumot kapjuk. Ez egy jelteljesítmény arányos görbe, ami megadja, hogy milyen frekvencián mekkora az adott jelkomponens teljesítménye, azaz mennyisége. A Fourier spektrumból tehát pontos képet kapunk a jelünket felépítő frekvencia komponensekről és azok arányáról a vizsgált görbében, megkapjuk, a domináns frekvenciákat - ha van ilyen - és azok arányát.

A gyors Fourier-transzformáció, amely digitálisan gyorsabban kivitelezhető algoritmussal közelíti meg a matematikai megoldást, ehhez képest csak bizonyos pontokon vizsgálja a bemenő diszkrét jelet. Ehhez két feltétel szükséges, az egyik a konstans mintavételezési frekvencia (két mintavétel közötti konstans időintervallum) és a legalább kétszer nagyobb mintavételezési frekvencia, mint a jelben meglévő legmagasabb frekvencia. A gyors számítógépes adatrögzítésnek köszönhetően ezek a feltételek ma már teljesíthetők minden biológiai jelre. A kapott eredmény hullám alatti terület (teljesítmény) - frekvencia összefüggés.

4.7 Frekvenciaanalízis folytonos wavelet-transzformációval

A wavelet analízis az STFT, és ezzel együtt az FFT, azon hiányosságait hivatott kiküszöbölni, hogy ha a jel időben variáns, akkor nem látjuk a jelek változásának dinamizmusát a többi analízisben. Az elmélet azon alapul, hogy egy, a hozzávetőlegesen keresett hullámhoz hasonlító, de ismert paraméterű „teszt-hullámot” állítunk elő, majd ablakonként (a jel egy ismert ideig tartó, rövid szakasza) eltolva (τ) összeadjuk a vizsgálandó adatunkkal (innen a wavelet elnevezés). Az ablak hossza és pozíciója adja meg az integrál alsó és felső határát. Egyezés esetén az integrál értéke nagy lesz, tehát a vizsgált görbe tartalmazza az adott frekvenciájú hullámot. A mesterségesen konstruált illesztett hullámot ezután egy meghatározott mértékben széthúzzuk (az időskála mentén) és újra végig vizsgáljuk az ismeretlen görbét. Az eredeti vizsgált hullámot „mother wavelet”-nek nevezik, a széthúzottak pedig a „children wavelet”-ek. A „mother wavelet”-eket felhasználási igényeknek megfelelően lehet kifejleszteni. Én a biológiában szélesen elfogadott Morlet wavelet-et alkalmaztam, ami tranziensen nő majd egy maximumot követve csökken. Ez azért célszerű, mert a biológiai jelek gyakran, ahogy az OP-k is, tranziensen jelennek meg. Azonban a wavelet analízis nem szinuszos harmonikusokra bontó spektrális analízis, így a spektrogram skáláihoz nem lehet pontos frekvenciát rendelni.

A folytonos wavelet transzformáció definíció szerint:

$$C_{a,b} = \int_{\mathbb{R}} x(t) \frac{1}{\sqrt{a}} \psi^* \left(\frac{t-b}{a} \right) dt$$

3. egyenlet: a folytonos wavelet transzformáció egyenlete (CWT), ahol $x(t)$ a bemenő jel, ψ^* a választott wavelet függvény, $C_{a,b}$ pedig az $x(t)$ CWT koefficiense a skálán és b pontban

A Morlet wavelet matematikailag a következő:

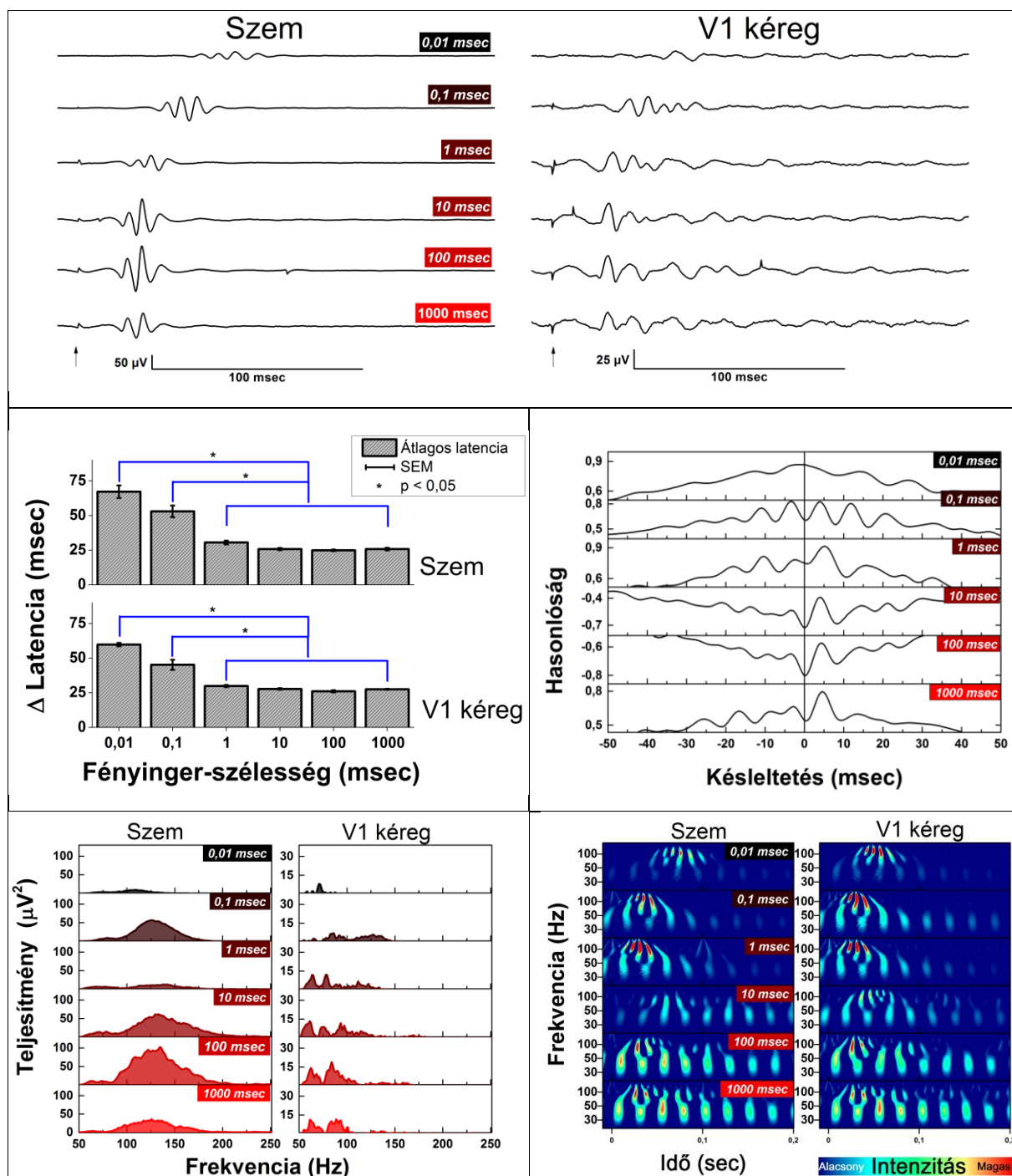
$$\psi(x) = \pi^{-1/4} \cos(kx) e^{-x^2/2}$$

4. egyenlet: a Morlet wavelet egyenlete, ahol k a Morlet hullámok száma

A Morlet wavelet azonban jól definiált és szélesen alkalmazott, így jó közelítéssel meg lehet határozni a vizsgált jel hullámait, és pszeudofrekvenciákat lehet hozzájuk rendelni. Az eredményt körültekintően kell értelmezni, mert a wavelet analízis esetében az időbeni felbontás és a skálák között negatív összefüggés van. Egy térképhez hasonlóan, minél jobban ráközelítünk, annál jobban látszik a frekvenciánkénti felbontás, de az időbeni felbontás romlik, míg ha kinagyítunk, több részletet látunk az időben, de kevesebbet a spektrális eloszlásból. A kapott eredmény a hullám amplitúdójának összefüggése a frekvenciával és az idővel. Az eredményt eltorzíthatja az alacsony skálák szélein megjelenő és a növekvő skálákon egyre nagyobb méretű, kónusz alakú erősen pozitív műtermék, amit az adatsor elején és végén kívül eső fiktív adatok extrapolációja ad, az ún. „cone of influence”. Az ilyen kónusz alatt vagy abba belelógó adatokat nem szabad figyelembe venni a kiértékeléskor.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 Az oszcillációs potenciál függése a fényinger-szélességtől



5. ábra: fent OP-k 40 Hz és 10 kHz közötti tartományban, stabil latencia az ingerbetörés és az OP-k között a nyilak az ingerlést jelzik;

középen latencia analízis: **balra** $n=5$ állatban a csúcslatencia változásának átlaga és standard hibája, **jobbra** a szem és a V1 kéreg közötti fáziskésés, erős korreláció az OP-k között az összes megvilágítás esetében;

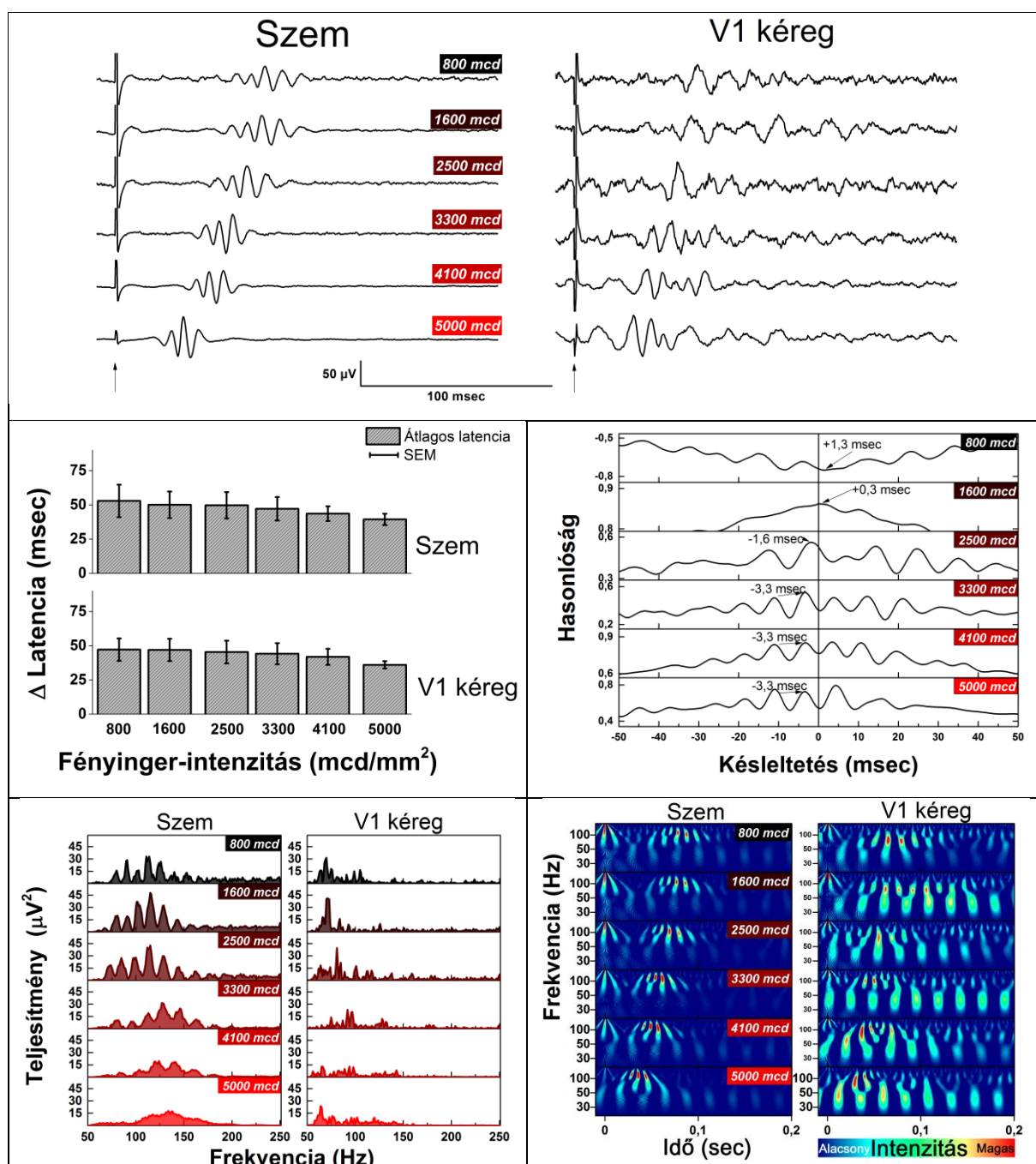
alul a frekvencia analízis területenként: **balra** a normalizált FFT teljesítmény variábilis, **jobbra** a Morlet wavelet időben mutatja a magas gamma tartományú OP-k alakulását, és erősödő 40Hz körüli aktivitás látszik

A nyers, szűrt felvételeken, a fázisanalízis, és némileg a wavelet is, egyértelműen mutatja, hogy a megvilágítás hosszának növekedésével csökkent az ingerbetöréstől az OP-k megjelenéséig eltelt időtartam mind az ERG, mind a VEP esetében. Öt állatban a 0,1–1000 msec ingerhosszúságú esetekben a retinális és vizuális kérgi OP-k átlagos latencia változásai stabilak, nem különböznek egymástól. Csak a csillaggal jelölt 0,01 msec-os ingerlésnél volt szignifikánsan eltérő, de mint a nyers adatokból is látszik, alig értékelhető ezen a fényességi szinten a VEP OP. A keresztkorreláció globális csúcsok pozitív x irányú eltolódása alátámasztja, hogy először a retina OP-k jelennek meg, s csak ezt követi a VEP OP-k megjelenése, valamint megmutatja, hogy az összes esetben erős korreláció van a két OP között. A keresztkorrelációs adatok már a 0,01 msec fényinger-szélesség esetén is egyértelműen bizonyítják az OP-k szoros hasonlóságát, annak ellenére, hogy az a nyers adatokból nem vehető ki tisztán. A 0,1–1 msec illetve az 1000 msec-os megvilágítás esetében szoros pozitív korreláció van, míg a 10 és 100 msec-os ingereknél szoros negatív korreláció látszik.

A frekvenciaanalízis normalizált FFT teljesítménye a szemben gamma tartományú OP aktivitást mutat, nem lineárisan változó teljesítménnyel. A cortexben ez a gamma oszcilláció jelentősen eltolódik az „alacsony gamma” frekvencia irányába, szintén variábilis és alacsony teljesítmény mellett. A Morlet wavelet itt jól mutatja az eredetileg megfigyelhető kb. 120 Hz-es OP-k megmaradását, csupán a hullámok összteljesítményének közel 1/3-ra csökkenése adja az FFT-nél tapasztalt különbséget.

A fentieket tekintve összegezhető, hogy a szem és a primer vizuális látókéreg oszcillációs potenciáljai eleget tesznek a szinkronitást szolgáló jelek három követelményének, mert frekvenciájuk azonos a két területen, a két oszcilláció erősen korrelál egymással, valamint a hullámok teljesítményei függetlenek a fényinger paramétereitől. Gyakorlatilag 1 msec-os vagy afeletti fényingerléskor a retina és a VEP OP-k késleltetése állandó.

5.2 Az oszcillációs potenciál függése az inger-intenzitástól



6. ábra: fent OP-k az ERG és EEG 40 Hz és 10 kHz közötti detektálási tartományában, stabil latencia az inger-betörés és az OP-k között a nyilak az ingerlést jelzik;
 középen latencia analízis: **balra** n=5 állatban a retina válasz és a primer vizuális cortex válasz latenciák különbségének átlaga és standard hibája csökken a beeső fotonok mennyiségének növekedésével, **jobbra** a szem és a V1 kéreg OP-jai között erős korreláció, a szem OP-jai 3,3 msec-el megelőzik a V1 kérgi OP-kat;
 alul: a frekvencia analízis területenként: **balra** az egyes állatok retina és primer vizuális cortex OP-k normalizált FFT teljesítményei 70-120 Hz között mutatnak maximumot, de nem párhuzamosak a fényinger intenzitásával, **jobbra** a Morlet wavelet időben mutatja a magas gamma tartományú OP-k alakulását a növekvő fény függvényében

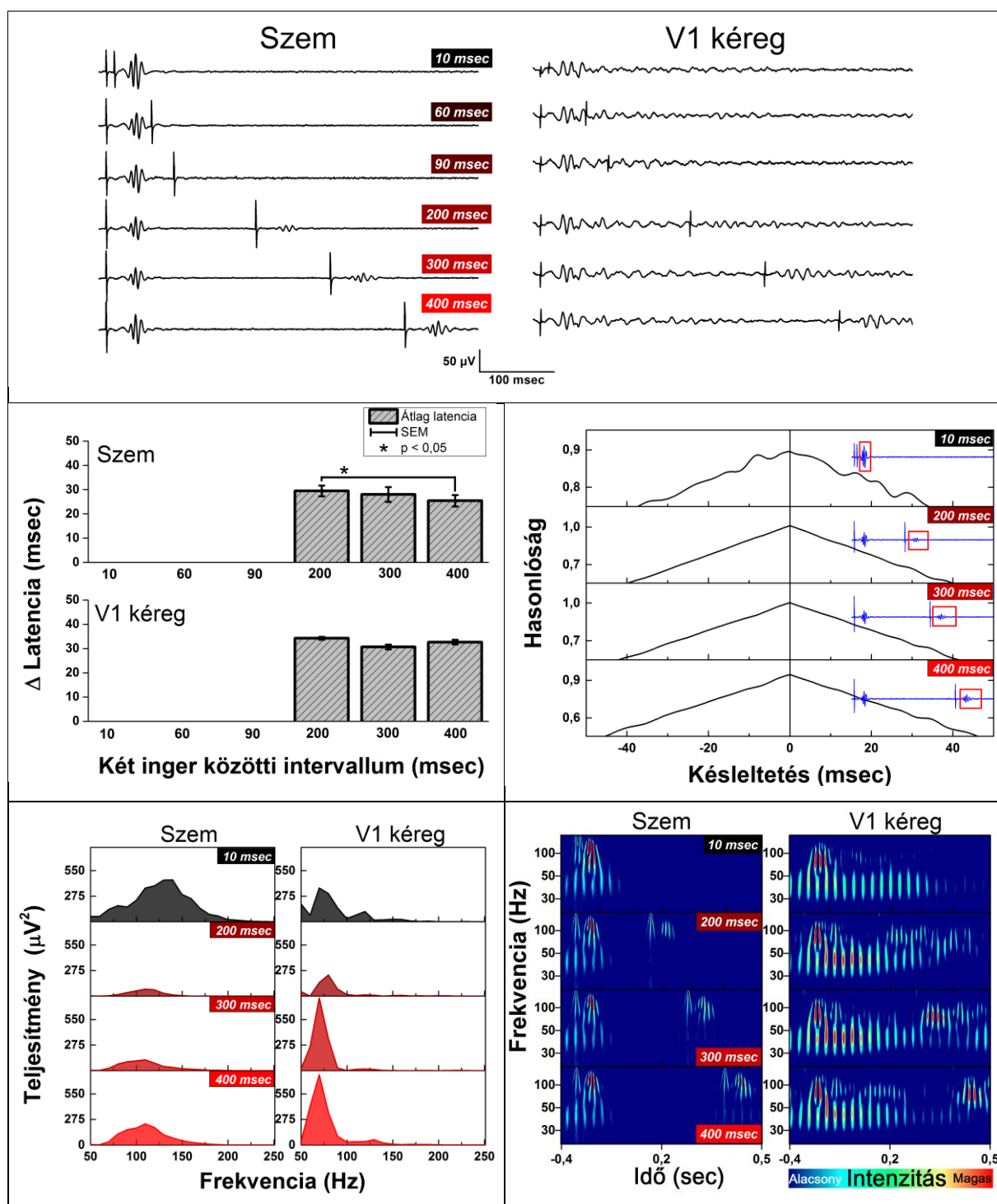
Az ERG és EEG felvételeken jól kivehető, hogy a fényinger-intenzitás növekedésével csökkent az ingerbetöréstől az OP-k megjelenéséig eltelt időtartam, változó amplitúdó mellett.

Az OP-k stabilitását a fényinger intenzitásának variálása nem befolyásolja, mivel a csúcsi átlagos latencia-változások öt állatban nem mutattak szignifikáns eltérést, 95 %-os konfidencia szinten. A keresztkorreláció is erős hasonlóságot mutat a két OP között. A korrelogram a 3300, 4100 és 5000 mcd/mm² esetében különösen stabil fázisviszonyokat jelez. Az alacsonyabb fényesség - 800 és 1600 mcd/mm² - esetében tapasztalt bizonytalan késleltetési viszonyok, a nyers adatokon is látható OP-k hullámainak és komponenseinek számának változásával magyarázhatók, a sötét fényviszonyok miatt.

A frekvenciaanalízis a retinális OP-k normalizált FFT teljesítményei szabálytalanul változnak, míg az egyes frekvenciák spektruma a rövidebb hullámok irányába tolódik el a fényintenzitás növekedésével. A corticalis OP-k teljesítményei és spektruma is szabálytalanul változnak, de arányaiban ugyanolyanok maradnak. A Morlet wavelet spektrogramjában is felfedezhető a kb. 120 Hz-es OP-k „közeledése” az ingerbetöréshez a fényintenzitás növekedésével.

A kísérletben kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy a fényinger-intenzitásának változtatása is alátámasztja a szem és a primer vizuális kéreg kb. 120 Hz-es gamma oszcillációk szinkronizáló szerepét, mert eleget tesznek a három szükséges feltételnek, miszerint frekvenciájuk a vizsgált területeken azonos, egymáshoz viszonyított késleltetése stabil illetve független a közölt inger paramétereitől. Például a mért tartományban az FFT teljesítmény alapján nem lehet egyértelműen megbecsülni visszafelé a fényinger intenzitását. A két korrelációs vizsgálat, valamint a két spektrál analízis eredményei összhangban vannak egymással.

5.3 Az oszcillációs potenciál függése a két inger közötti intervallumtól



7. ábra: **fent** OP-k 40 Hz és 10 kHz közötti tartományban, csak ISI = 200–400 msec esetén látszik OP, a második OP-k között stabil latencia és növekvő amplitúdó;
középen latencia analízis: **balra** a retinalis OP-k átlag latencia-változásai 10–90 msec-ig nem mérhetőek, ISI = 200 és 400 msec esetén szignifikáns átlagos latencia-csökkenés (csillaggal jelölt), a cortexben nincs ilyen változás; **jobbra** a szem és a V1 kéreg piros négyzettel jelölt, második OP-jai között erős korreláció és teljesen azonos fázisban vannak;
alul: a frekvencia analízis területenként: **balra**: a normalizált FFT teljesítménye ISI = 200–400 msec tekintetében növekvő 50–100 Hz-es aktivitás, **jobbra** a Morlet wavelet magas gamma tartományú OP-kat mutat a felvételeken intenzitásnövekedés mellett

Az ERG és EEG felvételeken megfigyelhető az első OP-k pontos megjelenése az ingerbetöréseket követve. Látható, hogy az első OP-k amplitúdója nem függ az interstimulus intervallumtól, ugyanakkor a második OP-k amplitúdója összefüggést mutat az ISI nagyságával, megnövelt ISI nagyobb amplitúdót eredményez.

A retinában és a cortexben a második OP-k a 10–90 msec ISI esetén nem jelennek meg, csak a 200 msec és afeletti ISI esetében válnak mérhetővé. Az ISI variálására a retinális OP-k átlag latencia-változásai 200 és 400 msec között viszonylag stabilak maradnak, egyedül a 200 msec-os ingerlésnél mutatkozik szignifikáns csökkenés 95 %-os konfidencia szinten (a 7. ábrán csillaggal jelzett), de ezt valószínűleg a nehezen elkülöníthető OP eredményezi. A cortex OP-k esetében is statikusnak mondható a kb. 30 msec-es késleltetés. Itt is megfigyelhető a csúcsi átlagos latenciaváltozások mértékének erős hasonlósága a szemben és a V1 kéregben.

Az interstimulus intervallum variálásakor a 10–400 msec-os tartományban az ERG és EEG görbéken látható első oszcillációs potenciálok nem értékelték, mert azok megfelelnek a korábban leírt 5.2-es fejezetben a legerősebb, 1 msec-os, 5000 mcd/mm²-es fényességű ingernek. Ez látszik mindkét terület átlagos latenciaváltozásának értékeiben is, ami kb. 30 msec.

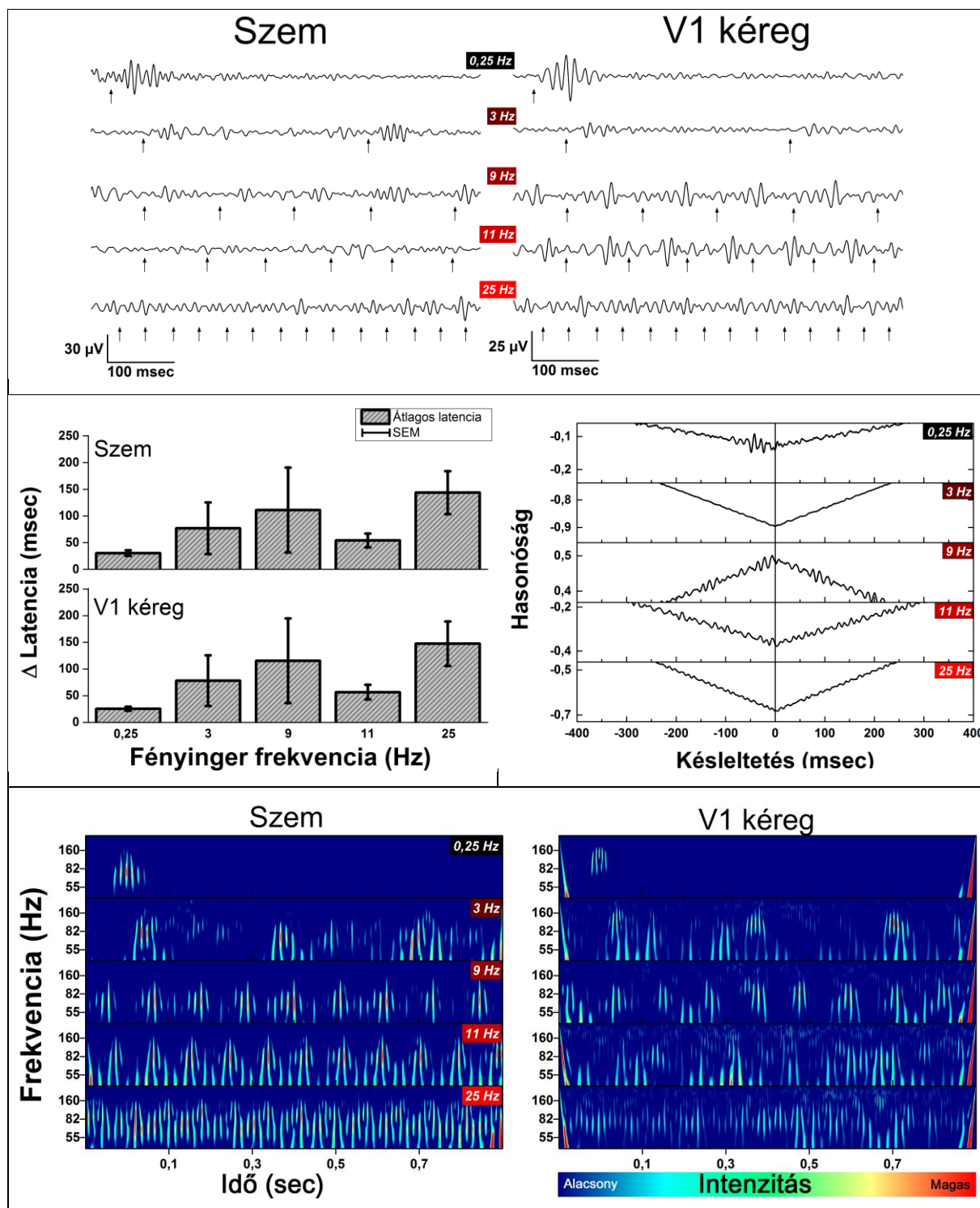
A keresztkorrelációs vizsgálatot is a 200 és 400 msec közötti illetve, összehasonlítás képpen, 10 msec-os ingerlésnél végeztem, amiből egyértelműen látható, hogy a fázisviszonyok az összes kísérlet közül a legstabilabbak maradtak két egymás utáni inger esetében.

A normalizált FFT teljesítmény spektrogramon látható a gamma aktivitás növekedése a 10 msec-os ingerléskor regisztrálthoz képest. Ez a cortexben még kifejezettebb, ahol az 50 – 100 Hz közötti gamma aktivitás meghaladja a 10 msec-osét.

A wavelet analízis alátámasztja, hogy a második OP-k csak az első oszcillációtól meghatározott intervallumot követően (min. 200 msec) alakulnak ki, valamint, hogy amplitúdójuk is velük együtt növekszik.

Az oszcillációs potenciálok interstimulus intervallumtól való függésének vizsgálata fényt derít arra, hogy egymást követő ingerlés során legalább 200 msec-nak kell eltelnie, hogy második OP-kat lehessen detektálni. Ekkor azonban az új ingerre létrejövő OP-k fázisai rendkívül pontosak, ami bizonyíthatja szinkronizáló szerepét.

5.4 Az oszcillációs potenciál függése a stimulus frekvenciától



8. ábra: **fent** OP-k 40 Hz és 10 kHz közötti tartományban, a nyilak az ingerlést jelzik;
középen latencia analízis: **balra** $n=7$ állatban a retina válasz és a primer vizuális cortex válasz latenciák különbségének átlaga és standard hibája növekszik az ingerfrekvencia növekedésével; **jobbra** a szem és a V1 kéreg közötti fáziskésés, erős korreláció az OP-k között az összes villogási gyakoriság esetében;
alul a frekvencia analízis területenként: a Morlet wavelet időben mutatja a magas gamma tartományú OP-k alakulását, és erősödő 40Hz körüli aktivitás látszik

Az ERG és EEG felvételein szembevetendő, hogy a 0,25 Hz-es ingerlésre adott kiváltott válasz jóval nagyobb a magasabb ingerlési frekvenciáknál tapasztaltaknál. Ennek oka, hogy az állat két inger között 4 sec-ig sötétben volt. Nagyobb ingerlési frekvenciát alkalmazva az OP-k amplitúdója kisebb.

FFT spektrális analízist nem tudtam végezni, mert olyan nagy különbségek voltak a spektrogramon, ami nem tette lehetővé a kiértékelést.

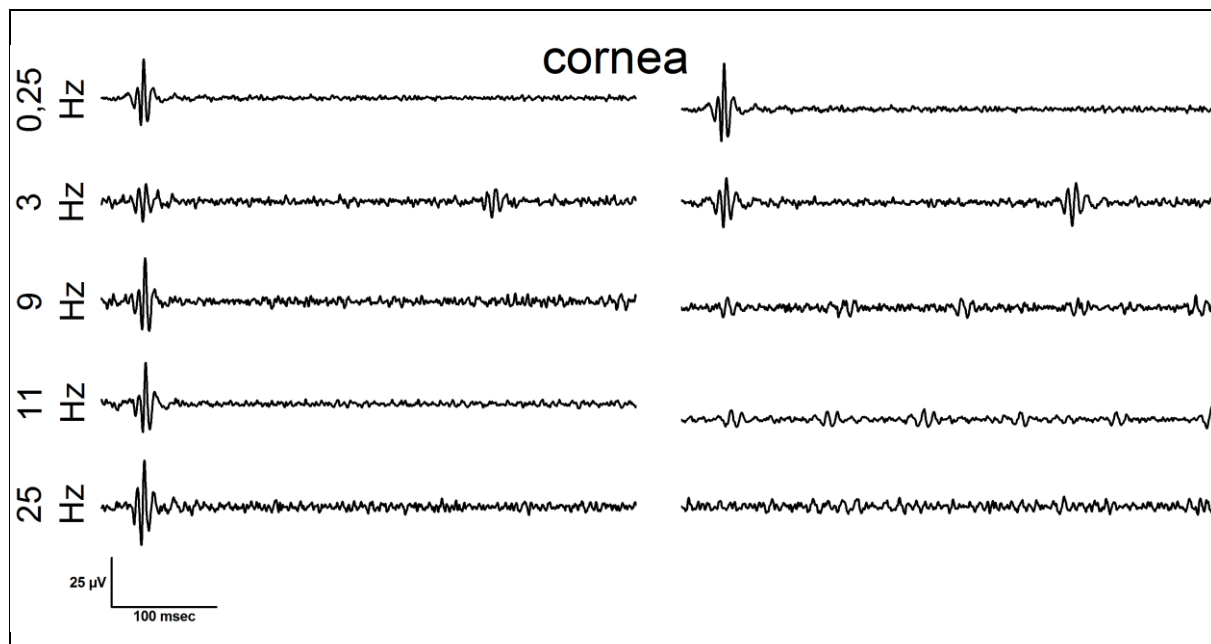
A cornea és a cortex OP-k csúcsi átlagos latencia-változásának elemzésekor két fontos következtetést vonhatunk le. Elsőként látszik, hogy az OP-k átlagos latenciája nagymértékben változik, főleg a standard hibája növekszik növekvő ingerlési frekvenciákon. Továbbá megfigyelhető, hogy a legnagyobb szórás 9 Hz-es ingerlés esetén van, míg 0,25 Hz és 25 Hz környékén csökken. Továbbá szembevetendő az is, hogy a magasabb ingerlési frekvenciáknál a két inger közötti intervallum rövidebb, mint az 5.3-as kísérletben leírt minimális 200 msec, mégis megfigyelhetők további OP-k.

A keresztkorrelációs vizsgálat a 3-25 Hz-es ingerlési sorozatoknál szoros korrelációt mutat a szem és a V1 kéreg OP-jai között. A 0,25 Hz-es adatban látható fáziskülönbség valószínűleg abból adódik, hogy az ERG és a VEP OP-jai eltérő számú komponenset tartalmaznak.

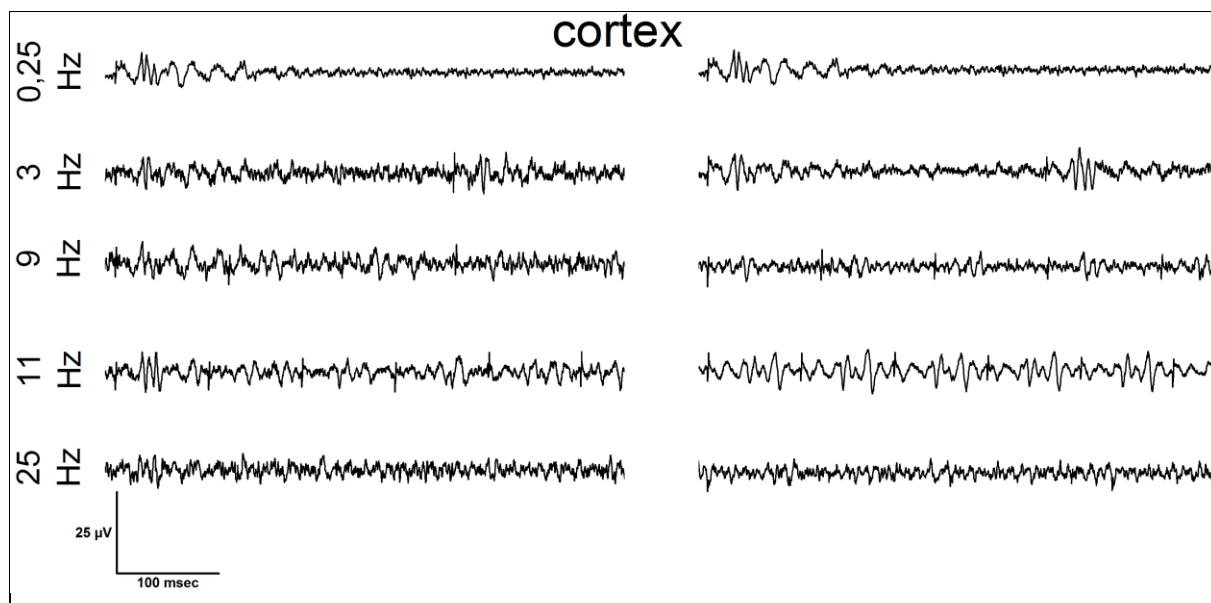
A wavelet transzformáció alátámasztja az ERG és VEP felvételeken látottakat, miszerint folyamatos ingerlésre konzekvensen jelennek meg további OP-k és ezek gamma tartományú oszcillációk.

Fentiek alapján látszik, hogy a folyamatos ingersorozatokkal kiváltott, gamma tartományú oszcillációs potenciálok megfelelnek a célkitűzésekben támasztott három feltételnek, mert a szemben és a V1 kéregben frekvenciájuk azonos, latenciájuk magas fokú korrelációt mutat, és ez megmarad az ingerlési paraméter variálásakor is, tehát az OP-k függetlenek a stimulus frekvenciájától

5.5 Az OP-k változása a stimulus frekvencia függvényében



9. ábra: bal oldal: OP-k a szem első ingerléskori ERG elvezetésén, a sötétadaptált válaszok számottevően hosszabbak és amplitúdójuk nagyobb a további fényadaptált OP-khoz képest; jobb oldal: fényadaptált OP-k



10. ábra: OP-k a cortex VEP sötétadaptált válaszból szűrve, közel azonosak a fényadaptált válasz OP-jaival; jobb oldal: fényadaptált OP-k

A 9. ábrán látható a sötétadaptált állat ERG és EEG tipikus felvétele, míg a 10. ábrán ugyanannak az állatnak a fényadaptált felvételeit mutatom be. Fontos megjegyezni, hogy a magasabb frekvenciákon az OP-k folyamatosak, ami lehetővé teszi a vizuális percepcióhoz szükséges folytonos csatlotságot, hasonlóan a saccadicus szemmozgásokhoz. Ez feltételezi,

hogy ilyenkor a vizuális rendszer valamilyen módváltás következtében érzékelni tudja a 200 msec-os ISI-nál sokkal gyorsabban érkező ingereket.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a retinális és a kérgi OP-k nagyon stabil latenciával jelennek meg a fényinger után, ezzel szemben nem tükrözik az ingerek paramétereit. A hullámok morfológiája és amplitúdója is meglehetősen azonos marad. Egyedül az inger szélessége változtatja meg az OP latenciát, de az is csak a 0,01 és 0,1 msec időtartam eseteiben volt szignifikáns. A retinális és a kérgi OP-k ilyen latencia stabilitása kimeríti az időzítő, szinkronizáló vagy más szóval „csatoló” jel legfontosabb kritériumát, hogy pontos időzítéssel működjön minden inger esetén és széles ingertartományban azonos legyen. A célkitűzésben megfogalmazott kérdésre, hogy az OP-k lehetnek-e a retina és a kéreg közötti időzítő szignálok, mint a kérgen a gamma oszcillációk, nagy valószínűséggel igenlően kell válaszolni a mért adatok alapján. Mivel az OP hullámok amplitúdó teljesítményei nem követik lineárisan a fényinger paramétereit, így nem valószínű, hogy képi információt továbbítanak a cortexhez, hanem alátámasztják az eredeti feltevést, hogy időzítő (az információfeldolgozás elejét jelző), szinkronizáló (a két területen szinkron sejtakisüléseket indukáló) jelek. Egy hibajelenség azonban fellép az OP-k ingerfüggő változásainak mérésekor, mert alacsony ingerintenzitásoknál a biológiai rendszerek kisebb pontosságából adódóan, az egyedi OP-k időbeli ingadozásai (jitter) jelentősen megnőhetnek, ami befolyásolhatja az átlagolt eredményt, hiszen az átlagolás nagyon érzékeny a jelek azonosságára.

A villanó fényingerekre adott kérgi válaszok oszcillatórikus komponenseinek esetében igazolták, hogy a vizuális kéreg sejtjei jelentős számban szinkron sülnek ki a hullámok csúcsainak közelében (Rajkai, Lakatos és mtsai., 2008). A retinális OP-ról ilyen adatok nincsenek, mert az izolált emlős retina preparátumok nem, vagy igen rosszul mutatnak OP-kat. Korábban laboratóriumunk több cikket jelentetett meg arról, hogy a villanó fényinger hatására létrejövő retinális és kortikális válaszok között is mérhető nervus opticus válasz, a chiasma opticum szintén mutat OP-kat (Galambos, Szabo-Salfay és mtsai., 2000). Az OP-k tehát tipikusan a vizuális pályán terjedő hullámok, melyek a gamma frekvenciasávban vannak, jogos tehát a feltételezés, hogy a retina és a kéreg közti szinkronitás megteremtése lehet a szerepük. Korábbi munkánkban leírtuk, hogy a retinogram egy olyan információ csomagot takar, amiben időbeli bontásban a villanó fény több paramétere egymás után jut el a kéregbe elő-feldolgozott formában (Galambos, Juhász és mtsai., 2005). Valószínű, hogy az

OP-k a képi információ csomag kezdetét illetve a feldolgozáshoz szükséges időzítést hordozzák, amennyiben a retina-cortex kapcsolat hasonlít az agyon belüli gamma oszcilláción alapuló csatlakozáshoz (Ribary, 2005; Galambos, Juhász és mtsai., 2005; Galambos, 2007).

A normál látás szükséges feltétele, hogy a kép a retinán 3,4 Hz frekvenciával elmozduljon legalább 0.5° fokkal, mert különben a „stabilized image” jelenség miatt a retinális információk feldolgozása megszűnik, és a látótér elsötétedik (Dodge, 1900). Állókép esetében az elmozdulásokat a saccadikus mikromozgások biztosítják. A gyors mozgás, a fény felvillanással azonosan, szükségszerűen szinkronizáló jeleket kell, hogy generáljon a kéregben. Ezt a jelenséget a kéregben igazolták már (Martinez-Conde, Macknik és mtsai., 2000). A kéregben bizonyítottan vannak olyan sejtek, melyek a szemmozgásokhoz időzítve tüzelnek. Kísérleti adataink szerint ez az időzítő jel nagyon stabil latenciával generálódik a retinában és terjed tovább a vizuális kéregre. Azonban, ha a felvillanások számát növeljük, akkor elérhető a retina és a kéreg funkcionális mód váltása. Az egyes felvillanások helyett egyre kevésbé villódzó, vagy teljesen folyamatos fényt érzékelünk a frekvenciától függően. Méréseink szerint valahol a 11-15 Hz tájékán van a váltás a villanó inger módból (single flash response) a villódzó inger módba (steady state response). Ilyenkor is jól tudtuk mérni egy folyamatos OP aktivitást, ami bizonyítja, hogy a villanássorozatokban is van egy szinkronizáló jel a retina és a kéreg között. Feltételezzük tehát, hogy magasabb ingerfrekvenciák esetén is szükséges az OP, mint csatoló jel.

Összefoglalva megállapítható, hogy a retinális és vizuális OP-k nagyon stabil jelek. Az inger paramétereitől nem, vagy alig függő latenciájuk alapján joggal feltételezhető, hogy az OP-k a gamma oszcillációknak megfelelő retina-cortex csatoló jelek, melyek a két struktúra összehangolt működését biztosítják. Eredményeink biztatóak abban a tekintetben is, hogy az OP-k diagnosztikai felhasználása lehetségessé váljon a közeli jövőben a vizuális percepció változásának objektív mérésére.

7. SUMMARY

Gamma frequency EEG oscillations make time-locked binding between functionally separate brain regions. In our experiments we studied the gamma range (30 – 70 Hz) oscillatory potentials (OP) in freely moving, adult Sprague-Dawley rats. We measured the OP's dependency of stimulus duration (0,01 – 1000 msec), stimulus intensity (800 – 5000 mcd/mm²), interstimulus intervallum (10 – 400 msec) and stimulus frequency (0,25 – 25 Hz) in the visual system. Our results show that OP activity in the retina and the visual cortex serves as coupling between the two regions. We showed that OP's reflect changes of the stimuli - a constant latency is present between the OPs in the retina and in the cortex (4 ± 1 msec) – and that at distinct stimulus frequency the retina changes from single flash mode into steady state mode. There are several theories of definitions and functions of coupling. Our results suggest that the OP's function is synchronizing the information exchange between the retina and the cortex, similarly to the cortical gamma activity.

8. IRODALOM

- Beeler, G. W., Jr. (1967). "Visual threshold changes resulting from spontaneous saccadic eye movements." Vision Res 7(9): 769-775.
- Burns, S. P., D. Xing, 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.
- Cardin, J. A., L. A. Palmer, et al. (2005). "Stimulus-dependent gamma (30-50 Hz) oscillations in simple and complex fast rhythmic bursting cells in primary visual cortex." J Neurosci 25(22): 5339-5350.
- Dodge, R. (1900). "Visual perception during eye movement." Psychological Review 7: 454-465.
- Galambos, R. (2007). "Reflections on the conceptual origins of neuron--glia interactions." Neuron Glia Biol 3(2): 89-91.
- Galambos, R., G. Juhász, et al. (2005). "The human Retinal Functional Unit." Int J Psychophysiol 57(3): 187-194.
- Galambos, R., O. Szabo-Salfay, et al. (2000). "Temporal distribution of the ganglion cell volleys in the normal rat optic nerve." Proc Natl Acad Sci U S A 97(24): 13454-13459.
- Galambos, R., O. Szabó-Salfay, et al. (2001). "Sleep modifies retinal ganglion cell responses in the normal rat." Proc Natl Acad Sci U S A 98(4): 2083-2088.
- Herrmann, C. S., M. H. Munk, et al. (2004). "Cognitive functions of gamma-band activity: memory match and utilization." Trends Cogn Sci 8(8): 347-355.
- Joliot, M., U. Ribary, et al. (1994). "Human oscillatory brain activity near 40 Hz coexists with cognitive temporal binding." Proc Natl Acad Sci U S A 91(24): 11748-11751.
- Lachaux, J. P., E. Rodriguez, et al. (1999). "Measuring phase synchrony in brain signals." Hum Brain Mapp 8(4): 194-208.

- Martinez-Conde, S., S. L. Macknik, et al. (2000). "Microsaccadic eye movements and firing of single cells in the striate cortex of macaque monkeys." Nat Neurosci **3**(3): 251-258.
- Martinovic, J. and N. A. Busch (2011). "High frequency oscillations as a correlate of visual perception." Int J Psychophysiol **79**(1): 32-38.
- Prechtl, J. C., L. B. Cohen, et al. (1997). "Visual stimuli induce waves of electrical activity in turtle cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7621-7626.
- Rajkai, C., P. Lakatos, et al. (2008). "Transient cortical excitation at the onset of visual fixation." Cereb Cortex **18**(1): 200-209.
- Ribary, U. (2005). "Dynamics of thalamo-cortical network oscillations and human perception." Prog Brain Res **150**: 127-142.
- Robinson, D. L. and R. H. Wurtz (1976). "Use of an extraretinal signal by monkey superior colliculus neurons to distinguish real from self-induced stimulus movement." J Neurophysiol **39**(4): 852-870.
- Ross, B., A. T. Herdman, et al. (2005). "Stimulus induced desynchronization of human auditory 40-Hz steady-state responses." J Neurophysiol **94**(6): 4082-4093.
- Sannita, W. G., 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.
- Siegel, M. and P. Konig (2003). "A functional gamma-band defined by stimulus-dependent synchronization in area 18 of awake behaving cats." J Neurosci **23**(10): 4251-4260.
- Sumiyoshi, A., H. Suzuki, et al. (2012). "Coupling between gamma oscillation and fMRI signal in the rat somatosensory cortex: its dependence on systemic physiological parameters." Neuroimage **60**(1): 738-746.
- Szabo-Salfay, O., J. Palhalmi, et al. (2001). "The electroretinogram and visual evoked potential of freely moving rats." Brain Res Bull **56**(1): 7-14.
- Tallon-Baudry, C., O. Bertrand, et al. (1996). "Stimulus specificity of phase-locked and non-phase-locked 40 Hz visual responses in human." J Neurosci **16**(13): 4240-4249.

9. 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 dolgozatomat szakmai szempontból lektorálta.

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

10. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

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.

1. A laboratóriumunk által kidolgozott műtési séma szerint a kísérleti állatokat magam operáltam.
2. A szem (ERG) és a primer vizuális kéreg kiváltott válaszaiban (VEP) lévő oszcillációs potenciálok latencia-változásainak illetve amplitúdó teljesítményeinek függését mértem a fényinger-paraméterek tükrében.
3. A fényinger-szélesség, -intenzitás, továbbá a két inger közötti intervallum és a stimulus frekvencia változásaira mért válaszokat magam rögzítettem.
4. A válaszok statisztikai kiértékelését Origin programmal végeztem, és arra jutottam, hogy az OP-k a retina és a cortex közötti szinkronizációt biztosítják, mert stabilan megmaradnak az ingerlésre, de annak paramétereit nem tükrözik, így nem valószínű, hogy a képi továbbítást végeznék.