

DIPLOMAMUNKA

A kolinerg és a dopaminerg rendszer asszociatív tanulásban betöltött szerepének egyidejű vizsgálatára alkalmas eljárás kidolgozása

Király Bálint

Témavezető:

Dr. Hangya Balázs

tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Tanszéki konzulens:

Dr. Légrády Dávid

egyetemi docens

BME Nukleáris Technikai Intézet

Nukleáris Technika Tanszék

BME

2018



Diplomamunka feladat a Fizikus mesterképzési szak hallgatói számára

A hallgató neve: <i>Király Balint</i>	specializációja: <i>Orvosi fizika</i>
A záróvizsgát szervező tanszék neve: NTI	

A témavezető neve: Dr. Hangya Balázs - munkahelye: MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet - beosztása: Csoportvezető - email címe: hangya.balazs@koki.mta.hu	A konzulens neve: Légrády Dávid - tanszéke: NTI - beosztása: egy. docens - email címe: legrady@reak.bme.hu
---	---

A kidolgozandó feladat címe: A kolinerg és a dopaminerg rendszer asszociatív tanulásban betöltött szerepének egyidejű vizsgálatára alkalmas eljárás kidolgozása
A téma rövid leírása, a megoldandó legfontosabb feladatok felsorolása: A neuromodulátorok – mint az acetil-kolin vagy a dopamin – olyan vegyületek, melyek segítségével egy neuron szabályozni tudja más neuroncsoportok viselkedését, így gyorsan tud hatni a neurális adatfeldolgozásra. Ezáltal a neuromodulátor-rendszereknek központi szerepük van az egészséges kognitív funkciókban. A kolinerg vagy dopaminerg neuronok működési rendellenességei állnak olyan degeneratív idegrendszeri betegségek mögött, mint például az Alzheimer-kór vagy a Parkinson-kór, így azok egészséges viselkedésének pontosabb megértése jelentős lépést jelenthet az ilyen betegségek kezelése felé. A különböző neuromodulátor-rendszerek részben átfedő kognitív folyamatokat kódolnak, gyakran nagyon hasonló módon, ezért működésük és tanulásban betöltött szerepük nehezen vizsgálható és csak részben ismert. Ezek pontos megértéséhez kiemelt jelentőségű, hogy az egyes rendszerek egyedi neuronjait azonos kísérleti körülmények között és azonos időben tudjuk vizsgálni, hiszen így információt nyerhetünk azok együttes viselkedéséről az akciós potenciálokra jellemző időfelbontás mellett. A hallgató feladata egy olyan kísérleti eszköz és eljárás megtervezése illetve megvalósítása, amely alkalmas arra, hogy optogenetikailag azonosított kolinerg és dopaminerg sejtek viselkedését tudja vizsgálni extracelluláris elvezetés segítségével egérmodellekben, operáns tanulási feladat teljesítése közben, a fenti kritériumoknak megfelelően. A vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen az elektródok nagyon pontos beültetése a kísérleti állat agyába. Ennek ellenőrzésére a hallgató feladatához tartozik a beültetett elektródok in vivo lokalizációját célzó protokoll kidolgozása CT és MRI képalkotás segítségével. A feladat folytatása a kidolgozott eljárás alkalmazása a két rendszer tanulásban betöltött szerepének egyidejű vizsgálatára és a mért adatok elemzése.
A záróvizsga kijelölt tételei, (csak Alkalmazott Fizika BSc esetén):

Dátum: <i>2017.09.18.</i>

Hallgató aláírása: <i>Király Balint</i>	Témavezető vagy tanszéki konzulens aláírása: <i>Légrády Dávid</i>	A témakiírását jóváhagyom (tanszékvezető aláírása):
--	--	---



Önállósági nyilatkozat

Alulírott Király Bálint a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem fizikus MSc szakos hallgatója kijelentem, hogy ezt a diplomamunkát meg nem engedett segédeszközök nélkül, önállóan, témavezetőm irányításával készítettem, és csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, melyet szó szerint, vagy azonos értelemben, de átfogalmazva más forrásból vettem, a forrás megadásával jelöltem.

Budapest, 2018. június 8.

Király Bálint

Kivonat

Az optogenetika és az extracelluláris elvezetés együttes alkalmazásával *in vivo* körülmények között vizsgálhatjuk kísérleti állatok optogenetikailag azonosított neurokémiai populációhoz tartozó idegsejtjeinek tanulásban betöltött szerepét. Általános célunk annak vizsgálata, hogy a kéreg alatti agyterületek különböző neuromodulátor-rendszerei hogyan vesznek részt az egészséges kognitív funkciók kialakításában, kiemelt figyelmet szentelve a kolinerg és dopaminerg neuronok vizsgálatára, amelyek működési rendellenességei állhatnak olyan degeneratív idegrendszeri betegségek kialakulása mögött, mint az Alzheimer-kór vagy a Parkinson-kór. A különböző neuromodulátor-rendszerek részben átfedő kognitív folyamatokat kódolnak, gyakran nagyon hasonló módon, ezért működésük és tanulásban betöltött szerepük nehezen vizsgálható és csak részben ismert. Ezek pontos megértéséhez kiemelt jelentőségű, hogy az egyes rendszerek egyedi neuronjait azonos kísérleti körülmények között és azonos időben tudjuk vizsgálni, hiszen így információt nyerhetünk azok együttes viselkedéséről.

Diplomamunkám keretében kidolgoztam egy kísérleti eljárást, amely alkalmas a kérdéses sejtek elektrofiziológiai vizsgálatára egérmockokban a fenti kritériumoknak megfelelően. Ez magába foglalta a kísérleti környezet és a tanulási paradigma megtervezését, megvalósítását és tesztelését, a két rendszer egyidejű elektrofiziológiai vizsgálatát és optogenetikai gerjesztését lehetővé tevő mikroelektródák megtervezését és megépítését, valamint a viselkedési események, illetve elektrofiziológiai adatok rögzítését és szinkronizált elemzését végző programok megírását.

A vizsgálatok kritikus pontja az elektródák pontos implantálása, ezért az eljárás egészül egy pre-klinikai képalkotó módszereken (CT, MRI) alapuló elektródlokalizációs-protokollal, amely – a korábban elérhető módszerekkel szemben – *in vivo* körülmények közt teremti meg az elektródlokalizáció lehetőségét, közvetlenül a beültetés után, ezáltal drasztikusan javíthatja a területen folyó kutatások határfokát, mivel hibás beültetés esetén lehetőséget biztosít annak korrigálására, vagy a feleslegessé váló – és akár hónapokig is tartó – kísérletek elhagyására.

Az eljárás tesztelése során igazoltuk, hogy a kísérleti állatok könnyedén képesek voltak megtanulni az auditoros operáns tanulási feladat alapját, majd az automatikusan bevezetésre kerülő különböző nehézségű új feladatokat. A tesztelés során optogenetikailag azonosítottunk egy dopaminerg sejtet, amelynek így vizsgálni tudtuk a tanulási feladat egyes részelemeire adott válaszát. Az *in vivo* elektródlokalizációs protokoll pontosságát hisztológiai eredményekkel összehasonlítva verifikáltuk.

Abstract

Optogenetics combined with extracellular recording enables us to investigate the role of certain neurochemically defined neuron populations in learning. Our overarching goal is to investigate how the different neuromodulatory systems of the subcortical areas take part in the formation of healthy cognitive functions, focusing particularly on cholinergic and dopaminergic neurons, malfunctions of which are responsible for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. Different neuromodulatory systems participate in overlapping cognitive processes and often represent similar behaviourally relevant variables, hence their unique roles in cognitive functions such as learning, memory, and attention are not well characterized. To address this, it is crucial to study them under the same experimental conditions. Moreover, to reveal potential redundancies in neuromodulatory codes, it is necessary to investigate these systems simultaneously.

In my thesis, I designed an experimental procedure which is suitable for electrophysiological recordings in mice to study the firing activity of neuromodulatory cells under the above conditions. This included the designing and testing of the experimental environment, the learning paradigm, and the microelectrode drives suitable for dual electrophysiological recording and optogenetical tagging as well as writing programs for recording and analysing the electrophysiological data synchronized with behavioral events.

To study optogenetically identified cholinergic and dopaminergic neurons, it is essential to precisely target the nuclei housing these cell types. Therefore the procedure is supplemented by an electrode localizing protocol using pre-clinical imaging methods (CT, MRI), which – unlike the methods available today (i.e. *post hoc* histological localization) – make it possible to determine the exact position of the electrodes *in vivo*, shortly after surgery. Should the implanted electrodes prove to have missed the target location, it would allow corrections or facilitate early termination, thus saving valuable experiment time that could extend to months for each implanted animal.

During the testing process, we proved that experimental animals were able to easily learn the basics of the auditory operant learning task, and they were able to learn automatically introduced new sounds of different difficulty levels afterwards. During testing, a dopaminergic cell was optogenetically identified, which allowed us to examine its responses to the different parts of the learning process. The accuracy of the *in vivo* localization method was verified by comparison with histological analysis.

Tartalomjegyzék

Feladatkiírás	iii
Önállósági nyilatkozat	v
Kivonat	vii
Tartalomjegyzék	ix
1. Motiváció	1
2. Alkalmazott módszerek	5
2.1. In vivo elektrofiziológia	7
2.1.1. Technikai háttér	7
2.1.2. Akciós potenciálok klaszteranalízise	7
2.2. Komputertomográfia	11
2.2.1. Technikai háttér	11
2.2.2. A röntgensugárzás fizikai alapjai	11
2.2.3. Tomográfiás képalkotás	12
2.3. Mágnesesrezonancia-képalkotás	13
2.3.1. Technikai háttér	14
2.3.2. A magmágneses rezonancia fizikai alapjai	14
2.3.3. Képalkotás gradienstér alkalmazásával	18
2.4. Agyi atlaszok	20
2.5. Képfeldolgozás	21
2.6. Hisztológia	22
3. A kidolgozott neurofiziológiai vizsgálati eljárás	23
3.1. A mérési eljárás	24
3.1.1. A kísérleti berendezés	24
3.1.2. Tanulási feladat	26
3.1.3. Mikroelektród-készítés és beültetés	30
3.2. Eredmények	32
3.2.1. Viselkedési eredmények	33
3.2.2. Elektrofiziológiai eredmények	36

4. A kidolgozott in vivo lokalizációs protokoll	39
4.1. Mérési protokoll	40
4.1.1. CT-beállítások	40
4.1.2. MRI-beállítások	42
4.1.3. Anesztézia	43
4.1.4. A mérés menete	44
4.2. Lokalizációs protokoll	45
4.2.1. Képfeldolgozási protokoll	45
4.2.2. Koordinátarendszer-illesztési protokoll	51
4.3. Eredmények	53
4.3.1. Esettanulmányok	55
5. Összefoglalás és további tervek	59
Irodalomjegyzék	61

1. fejezet

Motiváció

Az idegtudomány az idegrendszer működésével és rendellenességeivel foglalkozó tudományterület. Célja az idegsejtek működésének, funkciójának és kommunikációjának vizsgálata, valamint annak megértése, hogy az egyes elemek milyen mechanizmusok mentén építik fel a természet egyik legkomplexebb rendszerét. Az elmúlt tíz évben az optogenetika alkalmazása forradalmi változásokat hozott a területen. A módszer kiemelt jelentőségét alátámasztja, hogy 2010-ben a Nature Methods folyóirat az év tudományos módszerének választotta [1].

A technika alapját olyan speciális fényérzékeny fehérjék (pl.: *channelrhodopsin*, *halorhodopsin*, *archaerhodopsin*) adják, amelyek az emberi retinában is megtalálható rodopszinokkal szemben, nagyon rövid – a gyors idegsejtek kommunikációjára is jellemző – időkarakterisztika mellett funkcionálnak. Ezek az ioncsatornák megtalálhatóak különféle mikroorganizmusok membránjában, ahol a fototaxis (fény által kiváltott mozgás) szabályozásában vesznek részt. Genetikai módszerekkel megoldható, hogy ezeknek a mikroorganizmusoknak a génállományából kinyerjük azt a kódrészletet, amely a fényérzékeny ioncsatornákat kódolja, és speciális vírusok, illetve sejttípus-specifikus promóter¹ alkalmazásával lehetőség van arra is, hogy ezt a kódrészletet célzottan – genetikailag definiált típusú – élő sejtek génállományába juttassuk, amelyek így fehérjeszintézisük során kifejezik ezt a gént és saját membránjukon reprodukálják a fényérzékeny ioncsatornákat. Ezzel a módszerrel fény segítségével stimulálhatóvá tehetünk idegsejteket is, ugyanis az idegi

¹Új gén kezdetét jelző DNS-szakasz

ingerületátvitel alapját éppen a különböző ioncsatornák megfelelően szinkronizált kinyílása és bezáródása valósítja meg, amit a preszinaptikus neuron axonjából felszabaduló ingerületátvivő vegyületeknek (neurotranszmitterek) a posztzinaptikus sejt neurotranszmitter-érzékeny receptoraihoz történő kötődése vált ki. Így a fényérzékeny neuronok esetében fényt vezetve a sejthez (az agy esetében ez jellemzően szálóptikával lehetséges) az ingerület mesterséges módon is kiváltható.

Az optogenetika neurobiológiai célokra történő alkalmazása tehát megteremti annak lehetőségét, hogy mesterségesen aktiváljunk genetikailag definiált idegsejteket, illetve – az extracelluláris elvezetési technikákkal kiegészülve – azonosíthatjuk is őket, hiszen egyedül a fényérzékeny ioncsatornákkal rendelkező sejtek válaszolnak a fényimpulzusokra. Ez azt is jelenti, hogy *in vivo* körülmények között – sőt akár speciálisan megtervezett tanulási vagy viselkedési szituációkban – vizsgálhatjuk kísérleti állatok optogenetikailag azonosított idegsejtjeinek természetes viselkedését.

Hallgatóként a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetnek Rendszer-Neurobiológia Kutatócsoportjában kapcsolódtam be az idegtudományi kutatások világába. A kutatócsoport célja kognitív funkciók ideglettani alapjainak pontos megértése az egészséges, illetve sérült agyban. Érdeklődésünk középpontjában a kéregalatti agyterületek néhány kiemelt jelentőségű idegsejt típusának, a neuromodulátor-rendszereknek a vizsgálata áll. A neuromodulátorok – mint az acetil-kolin vagy a dopamin – olyan vegyületek, melyek segítségével egy neuron szabályozni tudja más neuroncsoportok viselkedését, így gyorsan tud hatni a neurális adatfeldolgozásra. Ezáltal a neuromodulátor-rendszereknek központi szerepük van az egészséges kognitív funkciókban. A különböző neuromodulátor-rendszerek részben átfedő kognitív folyamatokat kódolnak, gyakran nagyon hasonló módon, ezért működésük és tanulásban betöltött szerepük nehezen vizsgálható és csak részben ismert. Ezek pontos megértéséhez kiemelt jelentőségű, hogy az egyes rendszerek egyedi neuronjait azonos kísérleti körülmények között és azonos időben tudjuk vizsgálni, hiszen így információt nyerhetünk azok együttes viselkedéséről az akciós potenciálokra jellemző időfelbontás mellett.

Feltételezhetően a kolinerg és dopaminerg neuronok működési rendellenességei

állnak olyan degeneratív idegrendszeri betegségek mögött, mint az Alzheimer-kór vagy a Parkinson-kór, így egészséges viselkedésük pontosabb megértése jelentős lépést jelenthet a hasonló betegségek kezelése felé. A kutatócsoport munkájába bekapcsolódva célozom egy olyan eljárás kidolgozását, amely optogenetikai és elektrofiziológiai módszerek segítségével alkalmas a kolinerg és dopaminerg rendszer asszociatív tanulásban betöltött szerepének vizsgálatára. Diplomamunkám célja egy olyan kísérleti eszköz és eljárás kidolgozása valamint tesztelése volt, amely alkalmas a két rendszer szimultán vizsgálatára kísérleti állatokban, auditoros operáns tanulási feladat teljesítése közben.

A két rendszer sikeres vizsgálatához nem csak a kérdéses neurokémiai populáció optogenetikai azonosítására van szükségünk, nélkülözhetetlen az elektród rendkívül precíz beültetése is. A sejtek aktivitását ugyanis azokból az agyi magokból kell elvezetnünk, amelyet vizsgálni akarunk és ahol a vizsgálni kívánt sejttípus nagy számban előfordul. Ezek jellemzően kis méretű, az agyszövet mélyében elhelyezkedő struktúrák, ezért az elektródok nagy pontosságú implantálására van szükségünk, ami komoly technikai kihívást jelentő feladat és régóta csak részben megoldott problémának minősül az ezzel foglalkozó kutatócsoportok számára. (Egy kisméretű mélyagyi mag eltalálására irányuló beültetés még egy sokéves tapasztalattal rendelkező kutató számára is nagyon gyakran sikertelenül zárul.) A beültetés sikerességének ellenőrzése jelenleg hisztológiai (szövetteni) metszetek alapján lehetséges, amely *post-mortem* módszer, vagyis csak az állat halála után kapunk képet az elektródok egzakt pozíciójáról, és gyakran nem egyértelmű nyomok alapján tudunk csak következtetéseket levonni.

Az anatómiai precizitás nagyfokú igénye (amelynek nehézsége két agyterület egyidejű vizsgálatakor még problematikusabb) miatt a célozom kiegészül egy olyan elektródlokalizációs eljárás megvalósításával, amely a jelenleg elérhető módszerekkel szemben *in vivo* körülmények közt teremti meg az elektródok pozíciójának nagy pontosságú lokalizálásának biztonságos módját kísérleti egerekben, ezáltal jelentős anyagi és időbeli megtakarítás lehetőségét biztosítva a területen dolgozó kutatócsoportok számára, hiszen az eredmények alapján lehetőség nyílik a sikeres beültetés gyors verifikációjára, hibás beültetés esetén pedig korrekcióra, vagy a beültetést

követő hosszas, hónapokig tartó – így feleslegessé vált – mérések elhagyására.

A következő fejezetekben bemutatom a felhasznált módszerek fizikai és technikai hátterét (2. fejezet), ismertetem a megvalósított vizsgálati eszköz és eljárás (3. fejezet), illetve a kidolgozott elektródlokalisációs protokoll (4. fejezet) pontos paramétereit és a tesztelés eredményét, végül összefoglalom az elért eredményeket és felvázolom a tervezett folytatás lehetséges irányait (5. fejezet). A téma jellege alapos vizuális illusztrációt követel meg, gyakran olyan ábrákkal, amelyeknek kis részletei is fontosak, ezért a dolgozat ábrái online nagyobb felbontásban is elérhetőek: <https://goo.gl/uQcNK8>.

2. fejezet

Alkalmazott módszerek

Az idegtudományi kutatásokban használatos elektrofiziológiai módszerek célja idegsejtek elektromos aktivitásának vizsgálata. Non-invazivitása miatt (bár egyes esetekben invazív elektródákat is használnak) humán vizsgálatokban nagyon elterjedt módszer az elektroencefalográfia (EEG), amely nagy számú idegsejt szinkronizált, összegzett aktivitásának vizsgálatára alkalmas, ezáltal a módszer térbeli felbontása gyenge.

A kísérleti állatok vizsgálatakor jellemző extracelluláris elvezetés célja egyedi neuronok viselkedésének, illetve az idegszövet egy kis térfogatában elhelyezkedő neuronok együttes aktivitásának vizsgálata mikroelektródák segítségével. *In vivo* körülmények közt végzett extracelluláris elvezetés segítségével az idegrendszer legkisebb funkcionális egységének szintjén vizsgálhatjuk a különböző viselkedési eseményekre adott reakciókat.

Szintén megkerülhetetlen eszközei nemcsak a klinikumnak, de a kisállatokon végzett preklinikai gyógyszerkísérleteknek és az élettani kutatásoknak is az *in vivo* és non-invazív képalkotó eljárások. A képalkotó eljárások alapját mindig valamilyen morfológiai vagy funkcionális információval kapcsolatban lévő fizikai paraméter térképének elkészítése adja. Az elektródlokalizáció szempontjából lényeges megoldások az anatómiai információkat szolgáltató morfológiai módszerek.

A legelterjedtebb ilyen módszer a komputertomográfia (CT – az angol *computed tomography* rövidítése), amely tágabb értelemben minden olyan megoldást jelöl, ahol számos irányból elkészített vetületi képek alapján, inverz Radon-transzformáció [2] segítségével készítünk tomográfias, vagyis a vizsgált tárgy virtuális szeleteinek sorozatából összeálló háromdimenziós képet. Az orvosi gyakorlatban – annak kiemelt jelentősége miatt – a CT rövidítés alatt a hagyományos planáris (síkra vetített, szummációs) röntgenképalkotás tomográfias módszerrel továbbgondolt változatát értjük. CT-képalkotás segítségével tehát elkészíthetjük egy élőlény röntgenfotonyengítési tulajdonságának háromdimenziós térképét, amely pontos anatómiai információkat szolgáltat annak belső szerkezetéről, kiváló felbontás és a csontok szép kirajzolódása mellett, ugyanakkor a különböző légyszöveti részek közt jelentős kontrasztot nem biztosítva.

Egy másik fontos eljárás a mágnesesrezonancia-képalkotás (MRI – az angol *magnetic resonance imaging* rövidítése), amely – mióta Paul Christian Lauterbur 1973-ban először alkalmazta a magmágneses rezonancia jelenségét képalkotásra [3] – korunk egyik alapvető diagnosztikai eljárásává és az orvosi képalkotó eszközök legdinamikusabban fejlődő területévé vált. A módszer legnagyobb előnye a legtöbb képalkotó modalitással szemben (CT, SPECT, PET), hogy nem használ ionizáló sugárzást, így mind a páciens, mind a vizsgálatot végző személy szervezetére nézve összehasonlíthatatlanul kisebb megterhelést jelent. A diagnosztika oldaláról nézve az MRI igen jó felbontást, kiemelkedően jó légyszöveti kontrasztot és választható irányú szeletek vizsgálatának lehetőségét biztosítja. Többféle mérési lehetőség áll rendelkezésre, így különféle vizsgálati módszerekkel és beállításokkal különböző kontrasztok érhetőek el, és nemcsak anatómiai, de funkcionális információ is nyerhető (pl. fMRI, MRI-angiográfia, diffúziós MRI).

A következőkben összefoglalom a kidolgozott neurofiziológiai vizsgálati eljárásban idegsejtek aktivitásának vizsgálatára használt elvezetési technika és az elektrodlokalisációs protokollban alkalmazott két képalkotó módszer biofizikai és technikai hátterét, kitérek a lokalisációs módszer verifikálására használt mikroszkópos hisztológiai felvételek típusaira, illetve az orvosi képalkotásban és az ideglettani kutatásokban agyi területek azonosítására használható anatómiai atlaszokra.

2.1. In vivo elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai egysejt elvezetés célja egy tüzelő neuron jól elkülöníthető akciós potenciáljának felvétele egy mikroelektroda segítségével, mérve az elektróda környezetének potenciálkülönbségét egy távoli referenciához képest. A módszer biofizikai alapját a sejten végighaladó akciós potenciál által kiváltott (és a akciós potenciál továbbterjedését megvalósító) töltésáramlás adja az axonmembránon keresztül (Na^+ - és K^+ -kapuzott ioncsatornák).

2.1.1. Technikai háttér

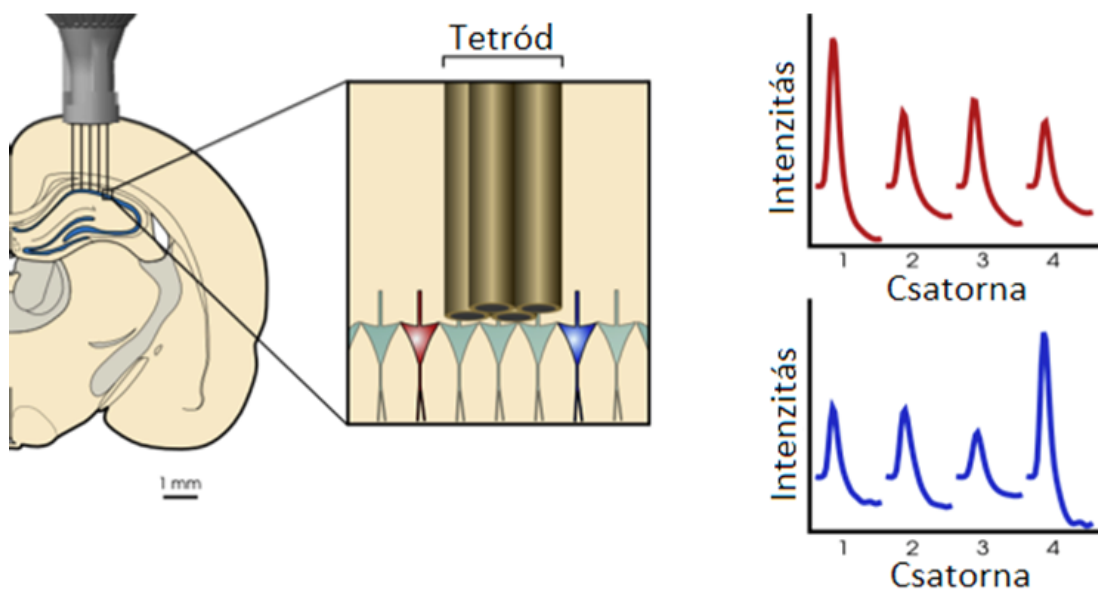
A töltésáramlás által létrehozott feszültségváltozás mikroelektrodák segítségével időben vizsgálható, kétféle mérési megoldás lehetőségét biztosítva. A membrán átszúrásával a sejt belső terében (intracelluláris elvezetés) közvetlenül mérhetjük a membránpotenciált, míg neuron közelébe helyezett elektródok segítségével (extracelluláris elvezetés) a környező neuronoktól származó összegzett töltésáramlásból származó potenciálon (local field potential) túl, a jel felerősítésével és sávszűréssel mérni tudjuk az elektródhoz nagyon közel eső neuronok akciós potenciáljait (spike) is .

Az előbbi eljárás hátránya, hogy elsősorban nagyobb méretű sejtek esetén és csak nagyon precíz bevezetés esetén kivitelezhető, illetve a sejtmembrán károsodásával jár, ezáltal nem lehet hosszabb ideig vizsgálni egy sejtet. Emiatt az egyedi idegsejtek aktivitásának mérése in vivo kísérletek esetében jellemzően extracelluláris elvezetéssel történik.

2.1.2. Akciós potenciálok klaszteranalízise

Extracellulárisan elhelyezett kisméretű elektródák segítségével a szűrt jelből egy küszöb bevezetésével akciós potenciálokat különíthetünk el, amelyek egyedi neuronokhoz rendelhetőek a jelalakjuk hasonlósága alapján (spike sorting¹). A csoportosítás minősége drasztikusan javulhat [4], ha több elektród szálát egymáshoz annyira közel helyezünk el, hogy az egyes neuronok jele több csatornán is

¹Akcióspotenciál-csoportosítás, elvi alapját az adja, hogy az egyes neuronok jó közelítéssel mindig ugyanazt a rájuk jellemző egyedi akciós potenciál alakot tüzelik



2.1. ÁBRA. A tetród szerkezetének és működésének sematikus ábrája [5]

megjelenhet, ugyanakkor a geometriai elrendezésnek megfelelően a jel amplitúdója változó. Egy ilyen megoldás az általunk is alkalmazott tetród, amely négy vékony, összetekert nikrómdrótból áll (2.1. ábra).

Az egyes tetródokon detektált – küszöböt meghaladó amplitúdójú – jelalakok a környező neuronok akciós potenciáljainak és különböző zajoknak a keverékei. Az akciós potenciálok csoportosíthatóak az így kapott elemek bizonyos kvantifikálható tulajdonságait kiszámítva, az ezek által kifeszített térben végzett klaszteranalízis segítségével, (szemi-)automatikus eljárásokkal vagy manuálisan, a nagy dimenziós tér síkvetületei alapján. A kidolgozott eljárásban az MClust[6] szoftvert használtuk manuális klaszterezés végrehajtásához.

Az általunk használt jelalakokat jellemző tulajdonságok a jelamplitúdó és a mintavételezett pontok (w_i) normált négyzetösszegeként definiált energia (E) voltak:

$$E = \frac{\sum_{i=1}^n w_i^2}{n} \quad (2.1)$$

Az analízis eredményeként kapott klaszterek valódi sejtek akciós potenciáljának való megfelelését számos kvalitatív és kvantitatív minőségi jellemző alapján értékeltük (2.2. ábra). Előbbiek közé tartoztak a jelalak megfelelése a biológiailag reális akcióspotenciál-alakoknak (ezáltal kiszűrhetőek különböző visszatérő elektronikus zajok), a klaszter egyes akciós potenciáljai közt eltelt idő (két akciós potenciál közt biofizikai okokból minimum 1 ms-nak el kell telnie – ha egy sejtől származnak).

Kvantitatív minőségi jellemzőként a [7] cikkben bevezetett két mennyiséget vettük figyelembe a klaszter szeparáltságának statisztikai vizsgálatára. Ezek definiálásához be kell vezetünk az i -edik elem Mahalanobis-távolságát[8] a C klaszter centrumától:

$$D_{i,C}^2 = (x_i - \mu_C)^T \Theta_C^{-1} (x_i - \mu_C) \quad (2.2)$$

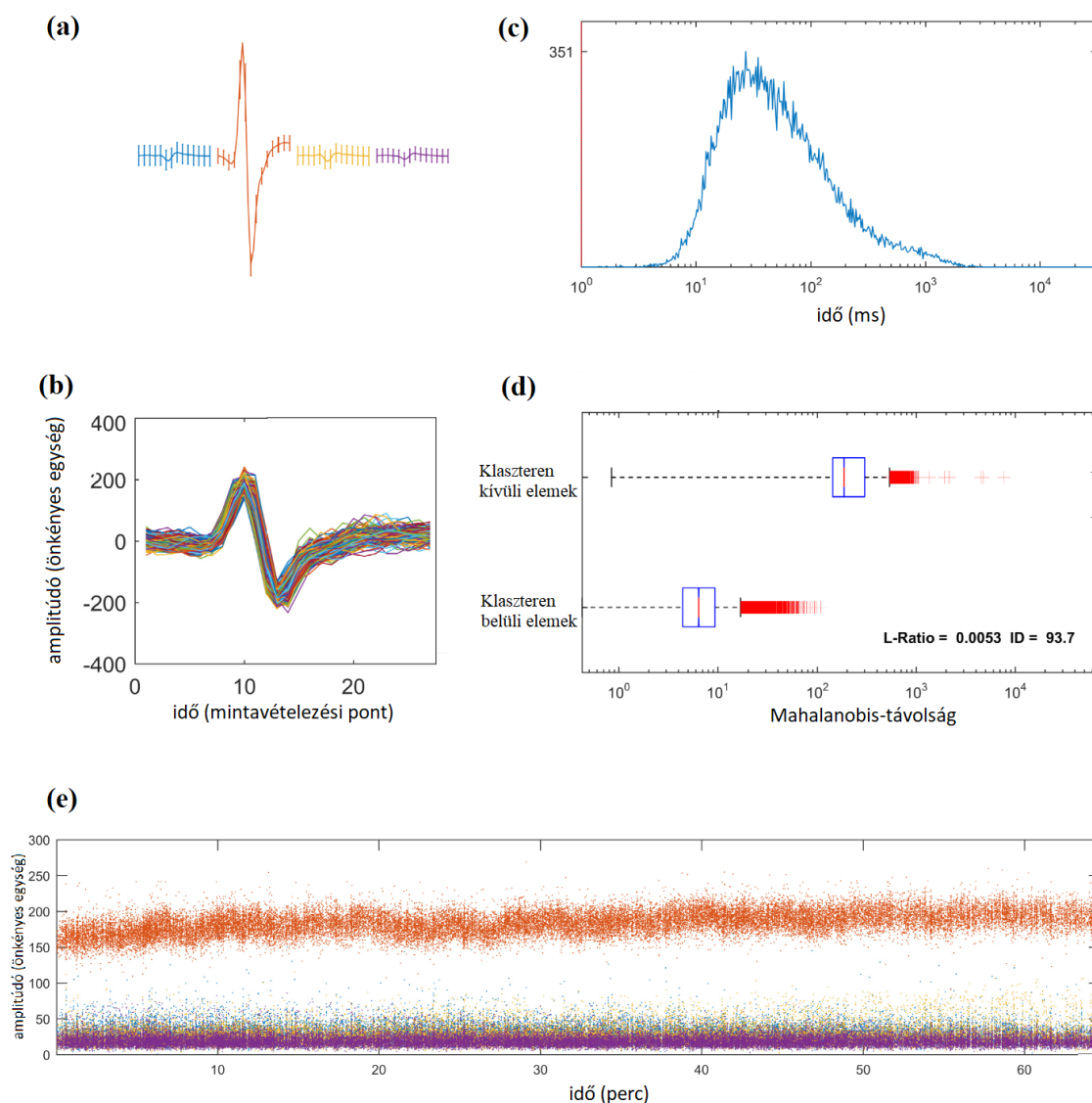
ahol x_i a i -edik elem klaszteranalízishez figyelembe vett tulajdonságainak vektora, μ_C ezek átlaga a C klaszter elemeire, Θ_C a C klaszter elemeinek kovarianciamátrixa.

A kvantitatív minőségjellemzők bevezetéséhez feltételezzük, hogy az elemek tulajdonságainak eloszlása a klaszterben normális eloszlást követ. Ekkor a D^2 értékek eloszlásától azt várhatjuk, hogy a χ^2 eloszlást kövessék a klaszterezéshez használt tér d dimenziójának megfelelő szabadsági fokkal (esetünkben ez nyolc, mivel két tulajdonságot vizsgáltunk tetródonként négy csatornára).

Az első minőségi jellemző ezekkel a feltevésekkel a következő módon vezethető be:

$$L_{\text{ratio}} = \frac{1}{n_C} \sum_{i \notin C} 1 - E_{\chi_d^2}(D_{i,C}^2) \quad (2.3)$$

ahol E a d -dimenziós χ^2 eloszlás eloszlásfüggvénye, n_C a klaszterhez tartozó elemek száma. A bevezetett L_{ratio} minél kisebb értéke azt mutatja, hogy a klaszter jól szeparált a klaszteren kívül eső elemektől. Ellenkező esetben valószínűsíthető, hogy a klaszter olyan elemeket is tartalmaz, amelyeknek azon kívül kellene lennie, illetve kimaradtak belőle a klaszterhez tartozó elemek (a klaszter centrumához közel eső, klaszteren kívül lévő elemek nagymértékben járulnak hozzá az L_{ratio} értékéhez, a



2.2. ÁBRA. Az akciós potenciálok klaszteranalízisekor figyelembe vett minőségi paraméterek. (a) Átlagos jelalak a négy csatornán (b) Összes jelalak a legnagyobb aktivitású csatornán (c) Az egyes akciós potenciálok közt eltelt idő hisztogramja (d) Mahalanobis-távolságok eloszlása a klaszteren belüli és kívüli elemekre, L_{ratio} , ID szám (e) Az összes akciós potenciál mért amplitúdója az idő függvényében

távoli elemek kismértékben).

A második minőségi jellemző az izolációs távolság (ID), amely definíció szerint egy n_C elemű klaszter esetén a klaszteren kívüli D^2 értelemben n_C -edik legközelebbi elem D^2 értéke. Ezáltal az izolációs távolság azt jellemzi, hogy milyen távol vannak a klaszter elmei a többi elemtől D^2 értelemben.

2.2. Komputertomográfia

Az in vivo lokalizációs protokoll legfontosabb elemének a CT-képképzés tekinthető. Mivel a fém elektród röntgenfotonelnyelési képessége az élő szervezetben megtalálható anyagok ilyen tulajdonságának sokszorososa, helye jól azonosítható a felvételeken, és a szintén szépen kirajzolódó koponya alapján – bizonyos mértékig – tájékozódásra is van lehetőségünk. A fémeknek ez a tulajdonsága egyben problémát is jelent, ugyanis az elektródhoz egyéb fémalkatrészek is tartoznak (vezetékek, elektronika), amelyek kimagasló elnyelési képességüknek köszönhetően fémműtermékeket okoznak, így ronthatják a kép minőségét, ugyanakkor az állat fejének megfelelő pozicionálása mellett ez a lokalizációt lényegileg nem zavarja.

2.2.1. Technikai háttér

Egy CT-készülék legfontosabb elemei a *röntgenső*, a *detektorpanel*, amely ólom kollimátorrendszerből², szcintillációs kristályból³ és látható fényt érzékelő detektorból áll, valamint a forrásnak és a detektornak a vizsgált objektum körüli szinkronizált forgatását megvalósító motor (*gantry*). A protokoll kidolgozása során rendelkezésünkre álló eszköz egy NanoXTM-CT volt, amely 9 μm -es legjobb felbontásával olyan nagy precizitást igénylő problémák vizsgálatára is alkalmas, mint az elektródok lokalizációja.

2.2.2. A röntgensugárzás fizikai alapjai

A Wilhelm Conrad Röntgen által 1895-ben felfedezett röntgensugárzás [9] alatt olyan elektromágneses sugárzást értünk, melynek hullámhossza 0,01 és 10 nm közé esik és elektronok emittálták. Szintén Röntgen volt az első, aki felismerte, hogy felfedezése alkalmas lehet élő szervezetek belső struktúrájának megismerésére részeinek eltérő elnyelési tulajdonságai alapján. Röntgensugárzás és anyag kölcsönhatásában három folyamat játszik szerepet: a fotoeffektus (a foton energiájának teljes elnyelődése) [10], a rugalmatlan Compton-szórás (az energia egy

²Ez biztosítja képképzéshez szükséges leképezést azáltal, hogy a detektor egy pontjába csak bizonyos szögterületből érkező fotonok.

³Ionizáló sugárzás hatására annak energiájával arányos intenzitású látható fényvillanásokat produkáló anyag.

része átadódik az anyag töltéshordozóinak, és a foton terjedési iránya megváltozik) [11] és a rugalmas szórás (a foton energiája nem, csak terjedési iránya változik). Ezen folyamatok összessége adja a vizsgált anyagra jellemző $\mu(\mathbf{r})$ lineáris gyengítési együtthatót, amely a Lambert–Beer-törvénynek [12] megfelelően jellemzi a sugárzás intenzitásának (I) gyengülését valamilyen terjedési irány (L egyenes) mentén:

$$I(L) = I_0 \cdot e^{-\int_L \mu(\mathbf{r}) d\mathbf{r}} \quad (2.4)$$

A gyengítés nélküli nyaláb intenzitása (I_0) könnyen megmérhető, így különböző irányokban vizsgálva a transzmittált nyaláb intenzitását (I) következtethetünk a gyengítési együtthatóra.

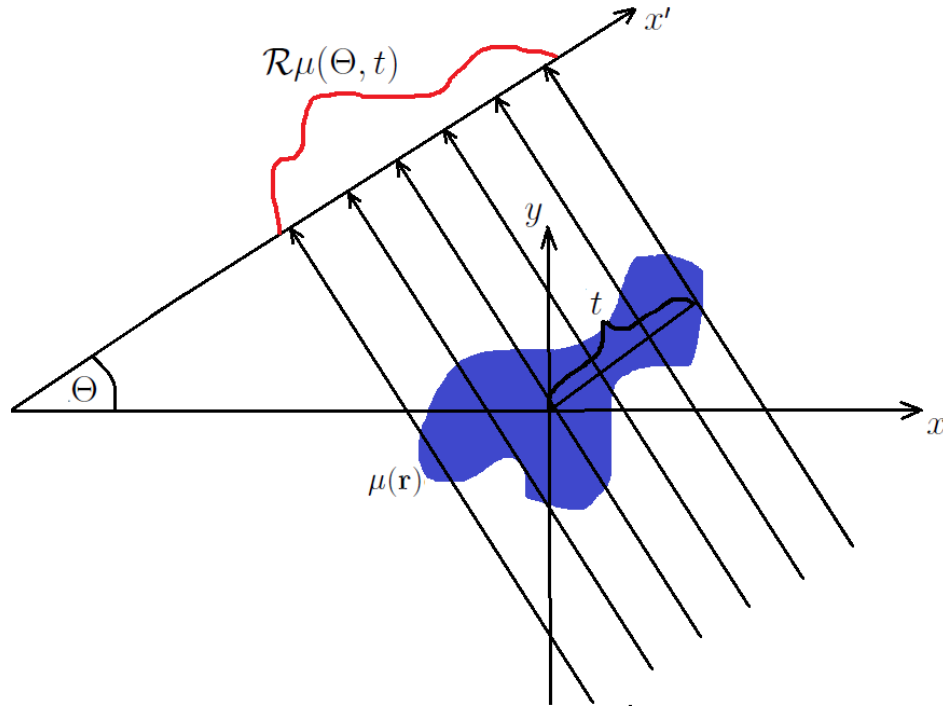
$$\int_L \mu(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = -\ln \frac{I}{I_0} \quad (2.5)$$

2.2.3. Tomográfiás képalkotás

A CT-vizsgálat célja a gyengítési együttható különböző egyenesek mentén vett integrált értékeiből visszaállítani annak (kétdimenziós metszetekből felépülő) háromdimenziós eloszlását. Ha a (2.5) vonalintegrált egy sík minden L egyenesére elvégezzük (az egyeneseket $t \in [-\infty, \infty]$ origótól vett távolsággal és az egyenes normálisának x -tengellyel bezárt $\Theta \in [0, \pi]$ szögével paraméterezzük, a 2.3. ábrának megfelelően), a CT-képalkotás matematikai alapját adó Radon-transzformálthoz jutunk, melyet először Johann Radon írt fel 1917-ben [2]:

$$\mathcal{R}\mu(\Theta, t) = \int_L \mu(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.6)$$

CT-mérés során tehát az adatgyűjtési szakaszban a gyengítési együttható vonalintegráljait vesszük fel, minél sűrűbben mintavételezett L egyenesek mentén, – ezzel megkapjuk a gyengítési együttható Radon-transzformáltját – majd a rekonstrukciós szakaszban a gyengítési együttható térképének visszaállítására vonatkozó inverz probléma megoldása a feladatunk, amely analitikus és iteratív módszerekkel is lehetséges. A probléma leggyakrabban alkalmazott analitikus megoldása a Fourier-inverziós szűrt visszavetítési formula [13, 14]:



2.3. ÁBRA. Radon-transzformáció

$$\mu(x, y) = \frac{1}{2\pi} \int_0^\pi \mathcal{F}_{\nu, t}^{-1}(|\nu| \mathcal{F}_{t, \nu}(\mathcal{R}\mu(t, \Theta))) d\Theta \quad (2.7)$$

ahol a polárkoordinátákkal paraméterezett frekvenciatér radiális koordinátájának (ν) abszolút értékével való szorzás egy Fourier-térben végzett felül áteresztő szűrésnek felel meg.

2.3. Mágnesesrezonancia-képzés

Kiváló lágyszöveti kontrasztjának köszönhetően a kidolgozott in vivo lokalizációs protokollban a mágnesesrezonancia-képzés biztosítja számunkra az agy körvonaláról és egyes belső struktúrákról (agykamrák) szerzett anatómiai információinkat, amelyek alapján a későbbiekben az agyi atlaszt illeszthetjük. A módszer nagy hátránya, ami a klinikumban is állandó figyelmet igényel, hogy fémeszközök nem kerülhetnek az óriási mágneses térbe. Ennek következményeként MRI-képzésre a protokollban csak a műtét elvégzése előtt van lehetőségünk.

2.3.1. Technikai háttér

Egy MRI-berendezés legalapvetőbb eleme a nagyon erős (általában 1–7 T) és minél homogénebb mágneses tér. Ennek előállítására *szupravezető tekerccsel* vagy *állandó mágnessel* történik, melyben a megfelelő hűtés mellett fennálló zérus ellenállás következtében a tekercsbe vezetett (akár nagyon nagy) áram a tápegység kiiktatása után is csillapodás nélkül fennmarad. A jelképzés és jeldetektálás eszköze a mágnesen belül elhelyezett rádiófrekvenciás adó- és vevőantennaként szolgáló *RF tekercs*, míg a képalkotás feltételét a három egymásra merőlegesen elhelyezett *gradienstekercsel* megfelelő algoritmus szerint inhomogénné tett mágneses tér biztosítja. A nagy mágneses tér és a külső rádiófrekvenciás zajok miatt az eszköz nélkülözhetetlen része az *árnyékolás* is. A protokoll kidolgozása során alkalmazott eszköz egy állandó mágnesű 1 T-s nanoScan[®] PET-MRI-készülék volt, melynek legjobb felbontása 100 μm .

2.3.2. A magmágneses rezonancia fizikai alapjai

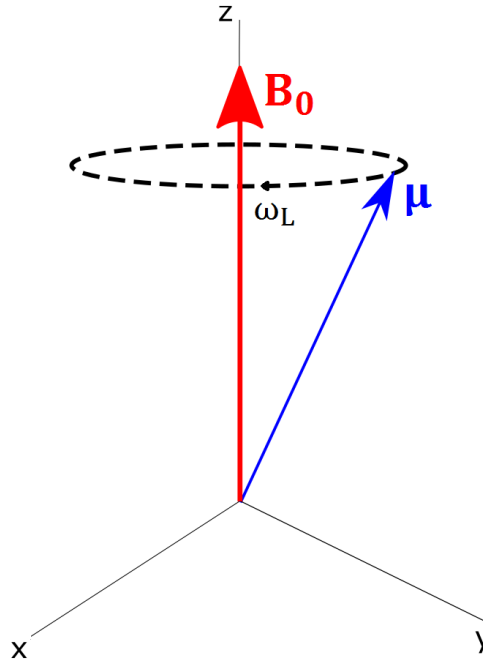
Az 1930-as években Isidor Isaac Rabi kísérletei [15, 16] ahhoz a megállapításhoz vezettek, hogy az elektronhoz hasonlóan az atommagot felépítő nukleonok (a proton és a neutron) is feles spinű fermionok. A spin (\mathbf{S}) és a hozzá tartozó mágneses momentum ($\boldsymbol{\mu}$) közti kapcsolatot az egyes részecskékre jellemző giromágneses faktor (γ) adja meg:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{S} \quad (2.8)$$

Rabi csoportjának munkája vezetett az MRI fizikai alapját adó magmágneses rezonancia jelenségének 1938-as felfedezéséhez is [17]. Nem nulla eredő mágneses momentumú atommagot z irányú külső mágneses térbe (\mathbf{B}_0) helyezve a tér és a momentum kölcsönhatnak egymással. Ekkor a kölcsönhatás klasszikus leírása és a forgatónyomaték (\mathbf{N}) definíciója alapján a következő összefüggések írhatóak fel:

$$\mathbf{N} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0 \quad (2.9)$$

$$\mathbf{N} = \frac{d\mathbf{S}}{dt} \quad (2.10)$$



2.4. ÁBRA. Larmor-precesszió

Felhasználva a (2.8) összefüggést az alábbi mozgásegyenlethez juthatunk:

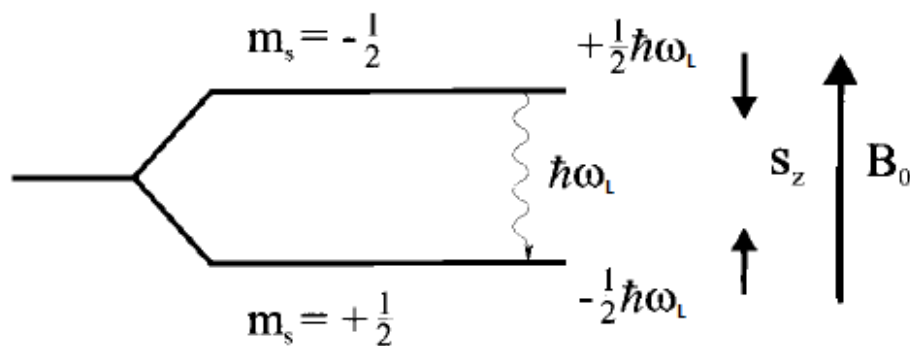
$$\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \gamma \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0 \quad (2.11)$$

Ez az egyenlet a mágneses momentumra vonatkozóan egy \mathbf{B}_0 körüli precessziót ír le (2.4. ábra), melynek szögsebességét Larmor-frekvenciának nevezzük:

$$\boldsymbol{\omega}_L = -\gamma \mathbf{B}_0 \quad (2.12)$$

Ugyanakkor vegyük figyelembe, hogy a mágneses momentum kvantált. Vizsgáljuk meg a spin helyzeti energiáját a \mathbf{B}_0 indukciójú térben. Ekkor a Hamiltonoperátor a következő alakban írható fel, felhasználva a impulzusmomentum z -komponensének $S_z = \hbar m_s$ kvantáltságát (\hbar a Planck-állandó 2π -ed része, m_s a mag spinkvantumszáma) és a (2.8) egyenletet:

$$H = -\boldsymbol{\mu} \mathbf{B}_0 = -\hbar \gamma m_s B_0 \quad (2.13)$$



2.5. ÁBRA. Zeeman-effektus feles spin (pl. hidrogénmag) esetén

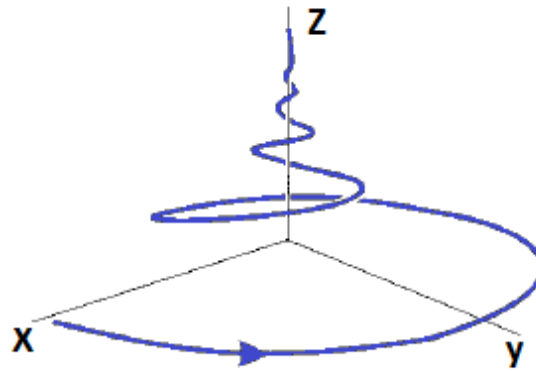
Ezt a jelenséget – vagyis, hogy külső mágneses térben az energianívók felhasadnak – Zeeman-effektusnak nevezzük (2.5. ábra). A (2.12) összefüggés és a spinkvantumszám tulajdonságai alapján a két szomszédos nívó közti energiakülönbség:

$$\Delta E = \hbar\omega_L \quad (2.14)$$

Tehát a Larmor-frekvencia által meghatározott ΔE energiájú fotonnal gerjesztve a rendszert abszorpció (és indukált emisszió) következhet be, a rendszer rezonanciában gerjeszthető. A (2.12) összefüggés alapján láthatjuk, hogy adott térerősség mellett a Larmor-frekvencia az egyes atommagokra jellemző érték. Élőlényekben gyakorisága miatt az MRI-képzéskor szempontjából kiemelt jelentősége van a hidrogénmagnak (emberekben 62% [18]), ezért a következőkben erre koncentrálnunk. 1 T indukciójú tér esetén a hidrogénmagra (tehát egy protonra) vonatkozóan $\nu_L = \frac{\omega_L}{2\pi} = 42,58$ MHz [19], vagyis ezeknek a magoknak a gerjesztése rádiófrekvenciás (RF) elektromágneses impulzussal lehetséges.

A (2.13) egyenlet alapján láthatjuk, hogy az energetikailag legkedvezőbb esetben a mágneses momentumok párhuzamosak a külső térrel⁴. Az egyes momentumok összegeként felépülő mágneszettségvektor gerjesztő impulzus hatására tetszőleges szögben elforgatható eredeti, longitudinális (külső mágneses térrel párhuzamos) állapotából, melyet ennek az állapotnak a visszaépülése követ (2.6. ábra),

⁴A Boltzman-féle rendeződési elv [20] alapján a mágneses térben párhuzamosan beálló spinek száma (szobahőmérsékleten) csak kismértékben nagyobb az ellentétes irányban beállókénál. A mágneszettség mégis mérhető nagyságú, mivel a vizsgált minták nagyon nagy számú atomot tartalmaznak.



2.6. ÁBRA. 90°-osan gerjesztett mágneszettség relaxációja

miközben a gerjesztett állapot többletenergija a rács közeli atomjaival termikus kölcsönhatásban leadásra kerül (spin-rács relaxáció). A visszaépülés gyorsasága két, térerősségtől, hőmérséklettől és a szövet anyagától és szerkezetétől függő relaxációs idővel jellemezhető. T_1 jellemzi a longitudinális mágneszettségkomponens visszaépülését, míg T_2 a longitudinálisra merőleges irányú, transzverzális mágneszettségkomponens eltűnését. Utóbbi értékére T_1 felső korlátot ad, de az ún. spin-spin relaxáció miatt lehet kisebb is nála ($T_1 \geq T_2$). Ennek oka, hogy a precesszió frekvenciája a lokális tér nagyságától függ, amely a külső tér és a környező spinek keltette tér szuperpozíciója. Így a lokális tér inhomogenitása miatt a kezdetben azonos fázisból induló, de kismértékben eltérő frekvencián precesszáló momentumok koherenciája elvész, és – bár az egyes momentumok transzverzális komponense továbbra is változatlan – a makroszkopikus mágneszettség komponense lecsökken. A gyakorlatban a külső tér sem teljesen homogén, amely szintén koherenciavesztést okoz.

MRI-képképzés során a protonszűrűségeken kívül, ezeknek a relaxációs időknél a térképét tudjuk elkészíteni. A beállítások függvénye, hogy a kapott képet az anyag melyik tulajdonsága határozza meg (például T_2 -súlyozott beállítás esetén a T_2 relaxációs idő).

A jeldetektálás fizikai alapját a III. Maxwell-törvény (Faraday-féle indukciós törvény) adja:

$$\oint_{\partial S} \mathbf{E} \, d\mathbf{l} = - \frac{d}{dt} \iint_S \mathbf{B} \, d\mathbf{S} \quad (2.15)$$

Tehát időben változó mágneses tér egy ∂S zárt hurokban a bezárt S felületre vett fluxusának változási sebességével arányos feszültséget kelt. A relaxáló mágnesezettség vizsgálata így a mintát körülvevő tekercsben keltett feszültség mérésével lehetséges.

Levezethető [21], hogy az ideális esetben detektálható $S(t)$ jelre (mely a transzverzális mágnesezettség időderiváltjából származik), a következő összefüggés érvényes:

$$S(t) \sim \frac{dM_{\text{transzverzális}}}{dt} \sim \int e^{-\frac{t}{T_2(\mathbf{r})}} \rho(\mathbf{r}) e^{i\phi(\mathbf{r},t)} d^3\mathbf{r} \quad (2.16)$$

ahol $\phi(\mathbf{r}, t)$ a precessió fázisa az \mathbf{r} helyen a t időpillanatban, $\rho(\mathbf{r})$ az ún. effektív spinsűrűség, amely arányos az egységnyi térfogatban található spinek számával, de számos más tényezőnek is függvénye (eszköz paraméterei, a gerjesztés utáni kezdeti mágnesezettség, Larmor-frekvencia). Ez azonban önmagában még semmilyen képet nem ad a spinsűrűség vagy a relaxációs idők térbeli viszonyairól.

2.3.3. Képkotás gradienstér alkalmazásával

A képkotás megvalósításához vezető ötlet Paul Christian Lauterbur nevéhez fűződik (1973) [3]. Az alkalmazott ötlet lényege, hogy a gerjesztés után, az eredetileg – ideális esetben – homogén, z irányú mágneses tér nagyságát egy irány mentén lineárisan helyfüggővé tesszük a gradienstekercsek által keltett z irányú \mathbf{G} gradienstér segítségével, ezzel helyfüggővé téve a Larmor-frekvenciát is:

$$\mathbf{B}(\mathbf{r}, t) = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ B_0 + \mathbf{G}(t)\mathbf{r} \end{pmatrix} \quad (2.17)$$

$$\mathbf{G}(t) = \nabla B_z(\mathbf{r}, t) \quad (2.18)$$

$$\omega_L(\mathbf{r}, t) = \omega_{L,0} + \Delta\omega_L(\mathbf{r}, t) \quad (2.19)$$

ahol az $\omega_{L,0} = \gamma B_0$ összefüggéssel analóg módon $\Delta\omega_L(\mathbf{r}, t) = \gamma \mathbf{G}(t)\mathbf{r}$.

A (2.16) összefüggés alapján ismerjük a precessió fázisának jelentőségét a mérhető jelben. A bevezetett \mathbf{G} gradienssel a $\phi(\mathbf{r}, t)$ fázis a következő alakban írható fel:

$$\phi(\mathbf{r}, t) = - \int_0^t \Delta\omega_L(\mathbf{r}, t') dt' = -\gamma\mathbf{r} \int_0^t \mathbf{G}(t') dt' \quad (2.20)$$

Észrevehetjük, hogy nagyon előnyös a t időről áttérnünk az alábbi \mathbf{k} változóra, amely a gradienst is tartalmazza és a fázis egy egyszerű alakban kifejezhető vele:

$$\mathbf{k} = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t \mathbf{G}(t') dt' \quad (2.21)$$

$$\phi(\mathbf{r}, t) = -2\pi\mathbf{k}\mathbf{r} \quad (2.22)$$

A bevezetett \mathbf{k} térben vizsgálódva azt látjuk, hogy ha a relaxáció hatásától eltekintünk, a (2.16) jel az effektív spinsűrűség Fourier-transzformáltja, \mathbf{k} pedig a térfrekvencia.

$$S(\mathbf{k}) = \int \rho(\mathbf{r}) e^{-i2\pi\mathbf{k}\mathbf{r}} d^3\mathbf{r} = \mathcal{F}[\rho(\mathbf{r})] \quad (2.23)$$

Ez az eredmény kiemelt jelentőségű, hiszen azt jelenti, hogy a jelet a \mathbf{k} térben megfelelő sűrűséggel vizsgálva és a jel inverz Fourier-transzformáltját véve az effektív spinsűrűség térbeli eloszlása visszaállítható:

$$\mathcal{F}^{-1}[S(\mathbf{k})] = \rho(\mathbf{r}) \quad (2.24)$$

A (2.16) összefüggés alapján látható, hogy egy egyszerű gerjesztés után mérhető jel az effektív spinsűrűsége túl a T_2 relaxációs időnek is függvénye, illetve az effektív spinsűrűsége keresztül arányos a kezdeti mágneszettség nagyságával. Egy MRI-vizsgálat jellemzően gerjesztések sorozatából áll, ezért az első gerjesztés kivételével az újra gerjeszthető longitudinális tag mindig a T_1 relaxációs időtől függő érték. Így a kapott képen a különböző szövetek közti kontrasztot a spinsűrűsége túl a szövetre jellemző T_1 és T_2 relaxációs idők, és az alkalmazott mérési szekvencia paraméterei (pl. repetíciós idő, echoidó) határozzák meg.

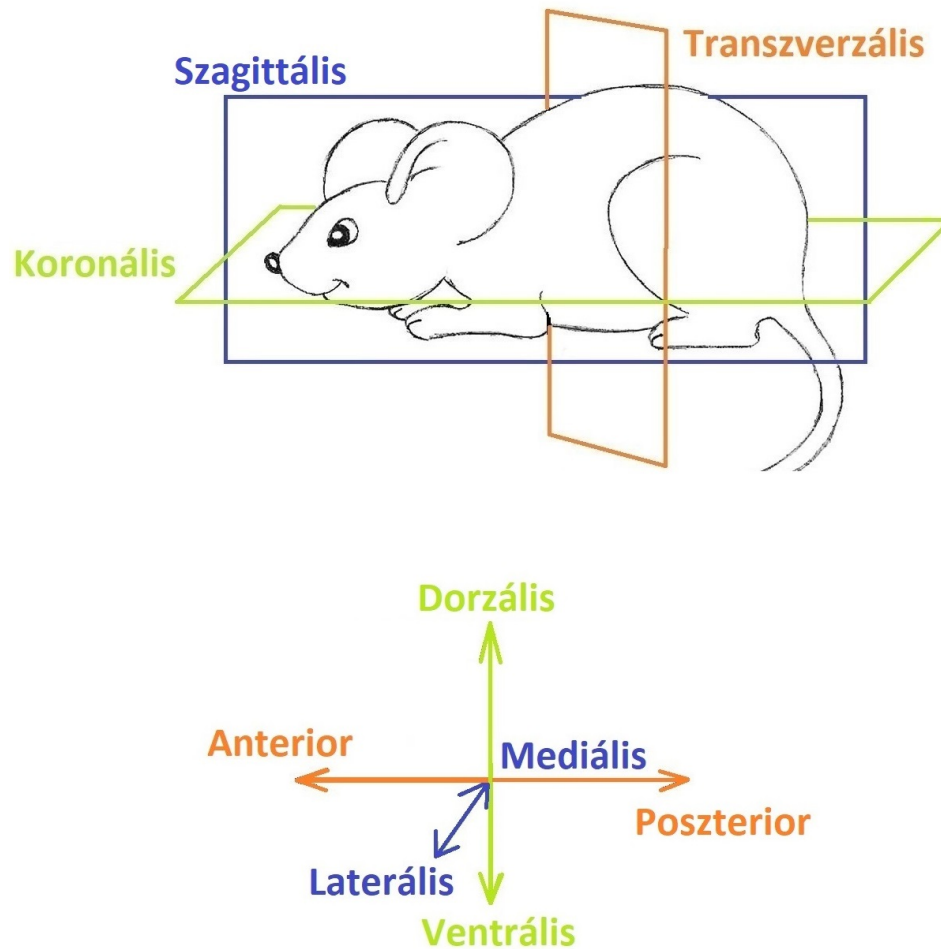
2.4. Agyi atlaszok

Az agyi atlaszok egyszerű megközelítésben egyfajta térképek, amelyek segítséget nyújtanak agyi képalkotó eljárások eredményein való háromdimenziós tájékozódásban. Felépítésüket tekintve különböző anatómiai síkok mentén vett (jellemzően a 2.7 ábrán látható szagittális, koronális és transzverzális) metszetekből állnak, amelyek az egészséges agy minden releváns struktúráját jelölik, és egy-egy számot rendelnek hozzájuk. Így az atlaszok speciális koordináta-rendszerek, amelyekben az egyes pontok értékei a térbeli pozíciónak megfelelő struktúra kódját jelölik. Ezáltal a neuroanatómiai ismereteink egy kompakt, jól kezelhető formában tárolhatóak, amely a koordináta-rendszer pontos illesztése és a méretek megfelelő transzformációja mellett lehetőséget ad agyterületek pontos és verifikált beazonosítására és különböző egyedekről készített felvételek összehasonlítására.

A klinikai és preklinikai kutatások fejlődésével együtt, az elmúlt évtizedben a kifejlett humán agy atlaszain túl megjelentek fejlődő kori, és más fajok (elsősorban egerek és patkányok) agyával foglalkozó atlaszok is.

A protokollban felhasznált atlasz, egy 2012-ben *In Vivo Mouse Brain Atlas* néven publikált atlaszgyűjtemény [22], amely öt egér T_2 -súlyozott MRI-felvételei alapján készült, melyeken manuálisan azonosították (majd többszörös független ellenőrzésnek vetették alá) az egyes agyterületeket, így az anatómiai információ a CT és MRI felvételekkel könnyen koregisztrálható (illeszthető), és szabadon hozzáférhető [23] formában érhető el, az atlasz alapját adó MRI-felvételekkel együtt.

A háromdimenziós atlasz készítésekor az azonosítás alapja Paxinos és Franklin általános sztenderdként elfogadott hisztológiai atlasza volt [24], amelyet a műtétek tervezésénél, a lokalizáció kvantitatívva tételekor és a hisztológiai lokalizációkor mi is használtunk. Az atlasz origója a *bregma* (a koponyaboltoztat legmagasabb pontja, a koszorúvarrat és a szagittális varrat találkozásánál lokalizálható), az egyes struktúrák ehhez viszonyított koordinátáknak felelnek meg, amelyek 0,12 mm-enként vett transzverzális és szagittális metszeteken adottak.



2.7. ÁBRA. Anatómiai síkok és irányok

2.5. Képfeldolgozás

Az in vivo képek utólagos feldolgozás a VivoQuantTM pre-klinikai képfeldolgozó program segítségével történt, amely alkalmas az orvosi képalkotó eljárásoknál alkalmazott DICOM formátum kezelésére. A következő fejezetben bemutatott protokoll kétféle képalkotó modalitással, és egy referencia állat alapján készült atlaszal dolgozik. A képfeldolgozó program alkalmas a különböző modalitásokkal készült képek illetve atlaszok fuzionálására, és a különböző állatokról készült képek különbségei miatt szükséges transzformációk (eltolás, forgatás, tükrözés, nagyítás) elvégzésére is.

2.6. Hisztológia

Az *in vivo* kísérleteket követően az egereket ketamin-xylazin oldattal mélyen elaltattuk és az egyes tetródok helyét – a későbbi lokalizálást elősegítendő – elektrolitikus lézióval⁵ megjelöltük. Ezt követően az egereket 4%-os paraformaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk, az agyat eltávolítottuk a koponyából és a paraformaldehid oldatban post-fixáltuk. Az agyról körülbelül 50 μm -es metszete-
ket készítettünk, amelyeket konfokális és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltunk (Nikon Ni-E C2⁺). Minden releváns metszetről négy típusú felvételt készítettünk:

Bright-field A minta alulról kerül megvilágításra, miközben felülről vizsgáljuk.

A kontrasztot a transzmittált fény gyengülése adja a különböző sűrűségű területeken, illetve a metszet kontúrjánál.

Dark-field A minta alulról került megvilágításra a nyaláb közepének kitakarásával majd a kapott gyűrű nyalábjainak fókuszálásával. A cél a mintát felülről vizsgálva a szóródott nyalábok detektálása a közvetlenül transzmittált nyalábok kizárásával.

FITC A minta kék fénnel kerül megvilágításra, amely gerjeszti a műtét során injektált vírus által megfertőzött területet (a vírus egy zöld fluoreszcens proteint is expresszál). A metszeten ez megjelöli a műtétjeink célterületét.

TRITC A tetródokat az implantálást megelőzően egy zöld fénnel gerjeszthető piros fluoreszcens festékkel (DiI) vontuk be, amely a mikroszkópos képeken kirajzolja az elektróda útját.

Az így kapott felvételekre – elsősorban a dark-field és FITC képek alapján – ráillesztettük a hisztológiai atlaszt (kiemelt figyelmet szentelve az elektród és a célterületkörnyéki struktúrák illeszkedésére) – majd főként a bright-field és TRITC képekből kiindulva – rekonstruáltuk a tetród korábbi útját az agyban. Az atlasz alapján az elektród pozícióját agyi területeknek, illetve atlaszbeli koordinátáknak feleltettük meg a kísérlet kiértékeléséhez, valamint az *in vivo* lokalizációval való összehasonlításhoz.

⁵A idegszövet megsebzése az elektródba vezetett áram segítségével annak környezetében.

3. fejezet

A kidolgozott neurofiziológiai vizsgálati eljárás

A kognitív funkciók, mint a tanulás, a memória vagy a figyelem neurális hátterének mélységekbe menő, sejtszintű megértése olyan kísérleti eljárás megvalósítását követeli meg, amelyben a relevánsnak feltételezett neuronpopuláció egyedi neuronjai célzottan vizsgálhatóak az akciós potenciálokra jellemző miliszekundumos időskálán, kísérleti állatokban, *in vivo* körülmények között, jól kontrollált tanulási feladat teljesítése közben. Végső célunk annak megértése, hogy az egyes neuronpopulációk sejtjei a tanulás mely szakaszában és milyen módon vesznek részt. Ehhez olyan feladat megtervezése szükséges, amelyben a tanuláshoz kapcsolódó egyes események (pl. inger, megerősítés) időben jól elkülönülnek, és az idegi aktivitás és a viselkedési események közti korreláció jól vizsgálható.

A különböző neuromodulátor-rendszerek részben átfedő kognitív folyamatokat kódolnak, gyakran nagyon hasonló módon, ezért működésük és tanulásban betöltött szerepük nehezen vizsgálható és csak részben ismert. Még behatóbb képet nyerhetünk a neurális feldolgozás folyamatáról, ha az egyes neuromodulátor-rendszerek neuronjait azonos kísérleti körülmények között és azonos időben tudjuk vizsgálni, hiszen így információt nyerhetünk azok együttes viselkedéséről.

Ebben a dolgozatban célunk egy olyan megoldás megvalósítása volt, amelyben a bazális előagy kolinerg sejtjei és a középagy dopaminerg sejtjeinek együttes viselkedése vizsgálható auditoros asszociatív operáns tanulási feladatban, fej-befogott

körülmények között (utóbbi nagyon előnyös az elektrofiziológiai felvétel minőségének és az állat viselkedésének kontrollálhatósága, illetve detektálhatósága szempontjából). Technikai okokból ezeknél a kísérleteknél 4. fejezetben ismertetett *in vivo* lokalizációs protokollt még nem alkalmaztuk.

A következőkben részletesen bemutatom a fenti elvárásoknak megfelelően kidolgozott tanulási feladatot, a kísérleti összeállítást és az elektrofiziológiai elvezetést megvalósító mikroelektródát, valamint kitérek a tesztelés közben gyűjtött viselkedési és elektrofiziológiai eredményeinkre, illetve azok értelmezésére.

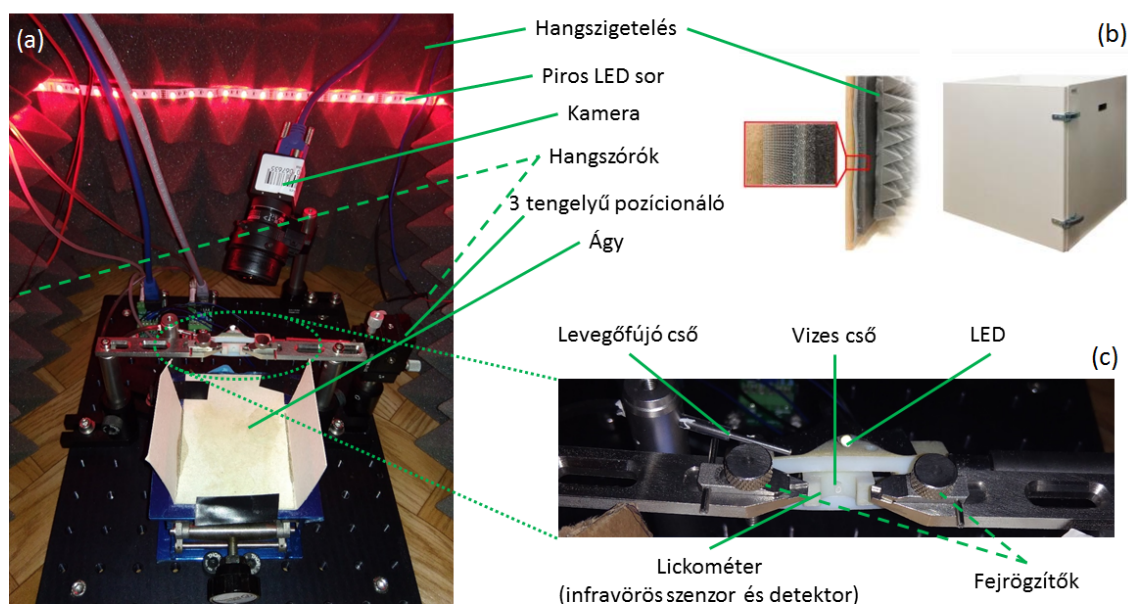
3.1. A mérési eljárás

A kidolgozott eljárás alapja egy hangszigetelt dobozban [25] kialakított mérési elrendezés, amelyben megfelelő elektronikai eszközök és egy MATLAB® környezetben a nyílt forráskódú Bpod [26] programcsomaghoz fejlesztett kód valósítja meg a kísérleti állat viselkedésének detektálását (a korábbiakban megfogalmazott elvárásoknak megfelelően miliszekundumos pontossággal), az ennek megfelelő válaszokat (jutalom, büntetés) és a tanulási feladat dinamikus továbbhaladását. Az elektrofiziológiai elvezetés és az optogenetikai stimuláció egy erre a célra tervezett speciális mikrodrive segítségével történik [27], melynek továbbfejlesztésével lehetőség nyílik két agyterület szimultán vizsgálatára is.

3.1.1. A kísérleti berendezés

Mivel kísérletünkben auditoros ingerekre szeretnénk tanítani a kísérleti állatot, kísérleti berendezésünk (3.1. ábra) alapja egy akusztikus szivacsokkal bélelt közepes sűrűségű farostlemezekből álló hangszigetelt doboz, melynek belseje be van borítva egy rozsdamentes acélból készült sűrű hálóval (Faraday-kalitka¹) az elektrofiziológiai elvezetés zajmentesítésének érdekében. A dobozban kialakított apparátus elemei a megvalósítani kívánt tanulási feladat paramétereinek megfelelően egy fej-befogó berendezés (a elektród beültetésekor rögzítésre kerül egy fémrúd

¹A Faraday-kalitka az elektromágneses tér kiküszöbölésére szolgáló, vezető anyagból készült hálóval körülvett térrész, amelybe a vezető anyag töltéshordozó részecskéinek átrendeződése miatt a külső elektromos erőter nem hatol be.

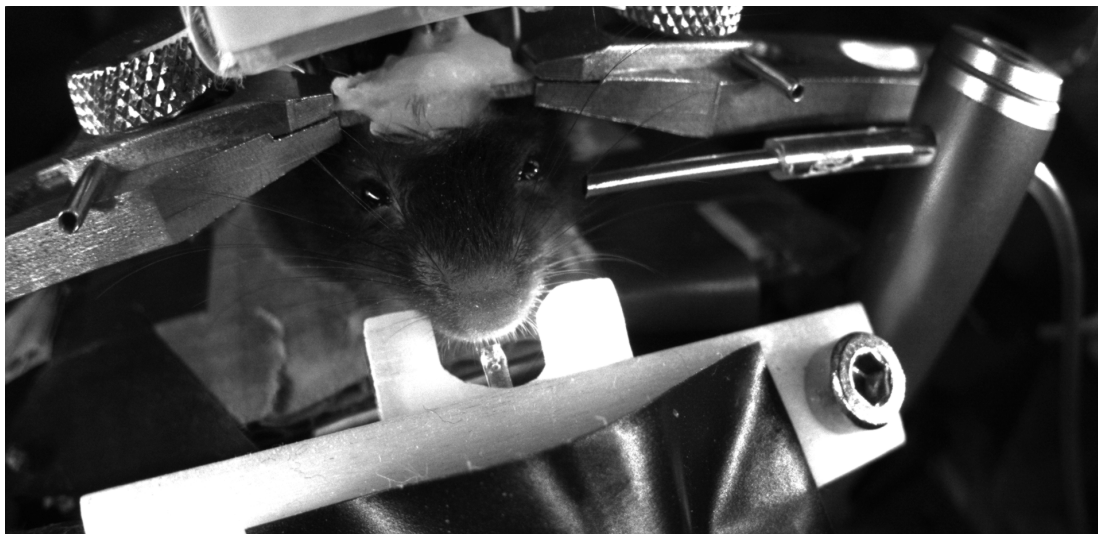


3.1. ÁBRA. A mérési berendezés ábrája. (a) A teljes összeállítást tartalmazó hangszigetelt doboz (b) Az összeállítás állatot körülvevő elemei (c) Az állat fejénél elhelyezkedő elemek

is az állat fején, az eszköz ezt fogja meg két oldalról a 3.2. ábrán látható módon), egy állítható magasságú mérőágy, amelyen az állat a mérés során tartózkodik, egy 3D nyomtatott lickométer (nyelvcsapás mérő) infravörös emitterrel és szenzorral (detektáljuk, ha az állat nyelve megszakítja az infravörös nyalábot), víz-jutalmat továbbító műanyagcső a lickométer közepén, egy sűrített levegőfújást továbbító cső az állat szájához igazítva, valamint két hangszóró a doboz oldalán rögzítve. A berendezés kiegészül továbbá egy kamerával (PointGray), valamint egy, a doboz falához rögzített piros LED-sorral (a piros tartományban nem érzékeny az egerek szeme), amelyek segítségével az állat viselkedése a zárt dobozban is kívülről monitorozható.

Fontos szempont, hogy minden egér feje kismértékben különbözik, valamint az állat fejére rögzített fém sem mindig azonos irányban és pozícióban helyezkedik el. Ezért az állattal interakcióba lépő elemek úgy kerültek kialakításra, hogy azok pozíciója az állat paramétereinek megfelelően állíthatóak legyenek – ennek legfontosabb része, hogy a lickport egy háromtengelyű pozicionáló segítségével pontosan az állat szájához igazítható.

A tanulási feladatban jutalomként alkalmazott vízadag mennyiségét ($3 \mu\text{l}$) a



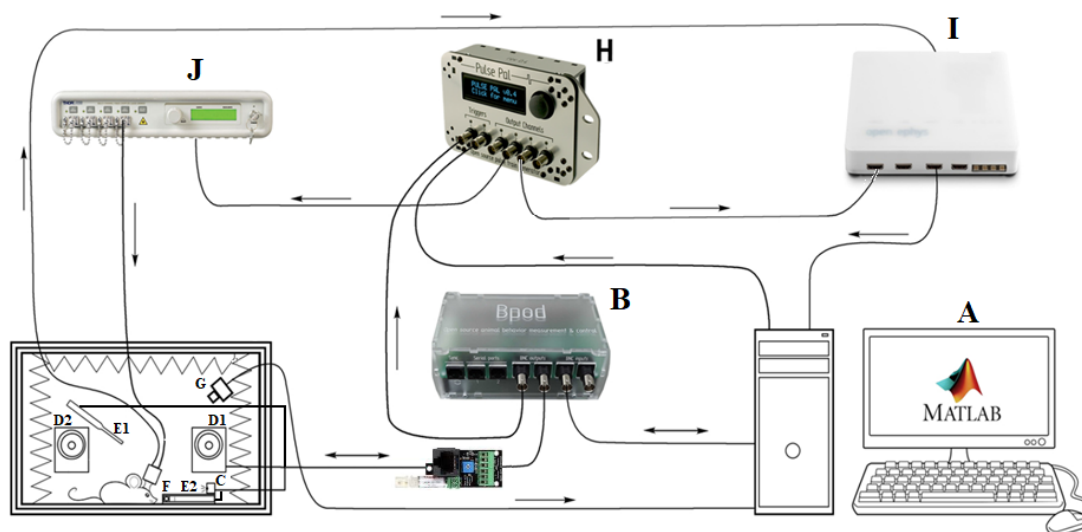
3.2. ÁBRA. A kísérlet pillanatfelvétele

Bpod rendszer beépített kalibrációs rendszerével állítottuk be, az ingerként alkalmazott hangok kalibrációját a [25] cikknek megfelelően végeztük.

A kísérlet különböző eseményeit, illetve az állat reakcióinak detektálását a beprogramozott Bpod [28] eszköz által kontrollált nyomtatott áramkörök valósítják meg, az elektrofiziológiai elvezetést az elektród EIB boardjához (lsd. 3.1.3. fejezet) csatlakoztatott – szűrést, előerősítést és digitális átalakítást is végző – elektronikai modulon (Intan) [29] keresztül az Open Ephys [30] rendszer végzi. A viselkedési és elektrofiziológiai adatsorok utólagos időbeli szinkronizációjához szükséges jelek generálását és az optogenetikai stimulációhoz szükséges lézert a Bpod-on keresztül kiadott utasításoknak megfelelően egy Pulse Pal [31] eszköz irányítja (3.3. ábra).

3.1.2. Tanulási feladat

Célunk egy auditoros asszociatív operáns tanulási feladat kidolgozása volt, amely alkalmas kognitív funkciók idegi hátterének miliszekundumos időfelbontású vizsgálatára egy jól kontrollálható környezetben, ahol a tanulási teszt minden eleme időben jól elkülönül. A feladat lényege egy hangfrekvencia-detekciós paradigma, amelyben két jól elkülönülő frekvenciájú hang (4 és 10 kHz) jutalmat (víz), illetve büntetést (levegőfújás az állat arcára) jelez előre, amely kimenetel abban az esetben élesül, ha az állat a hang megszólalása alatt (0,6 s) belenyúl a lickométerbe.



3.3. ÁBRA. Az elektrofiziológiai elvezetést és a viselkedési feladatot megvalósító összeállítás sematikus ábrája. A MATLAB kód (A) által a Bpod (B) eszközön keresztül vezérelt LED (C), hangszórók (D1, D2), vizes és levegős cső (E1, E2), lickométer (F) és kamera (G) az elektrofiziológiai elvezetéshez és az optogenetikai stimulációhoz kiegészül egy Pulse Pal (H) és egy Open Ephys (I) eszközzel, valamint egy kék lézerrel (I).

A jutalom, illetve a büntetés a választ követően egy normális eloszlású (0,2 s várható értékű, 0,03 s szórású 0,1 és 0,3 s közti) késleltetés után jelent meg, így időben elkülönül az állat hangra adott motoros válasza, és a megerősítés kézbesítése. Minden teszt kezdetét egy fehér LED kialvása jelezte. A teszt abban az esetben indult el, ha előtte az állat 1,5 s-ig nem nyalt bele a lickométerbe. A stimulus megjelenését egy exponenciális eloszlású² (1,3 s várható értékű, 0,3 és 4 s közti időtartam) előszakasz előzte meg, ezáltal (kiegészülve a nagyon szűken választott 0,6 s-os válasz-időablakkal) figyelemigényelővé téve a tesztet. Amennyiben az állat az előszakasz során belenyalt a lickométerbe, a LED újra kigyulladt, és a teszt újraindult. A teszt végeztével a LED újra kigyullad, és ha az állat 1,5 s-ig nem nyal, újabb teszt indul. A végső feladat nehézsége egy harmadik hang megjelenésével változtatható.

²Választásunkat az exponenciális eloszlás örökifjú tulajdonsága indokolja, hiszen ekkor – hasonlóan a radioaktív bomláshoz – az esemény következő pillanatban történő bekövetkeztenek valószínűsége nem függ attól, hogy mennyi idő telt el azt megelőzően.

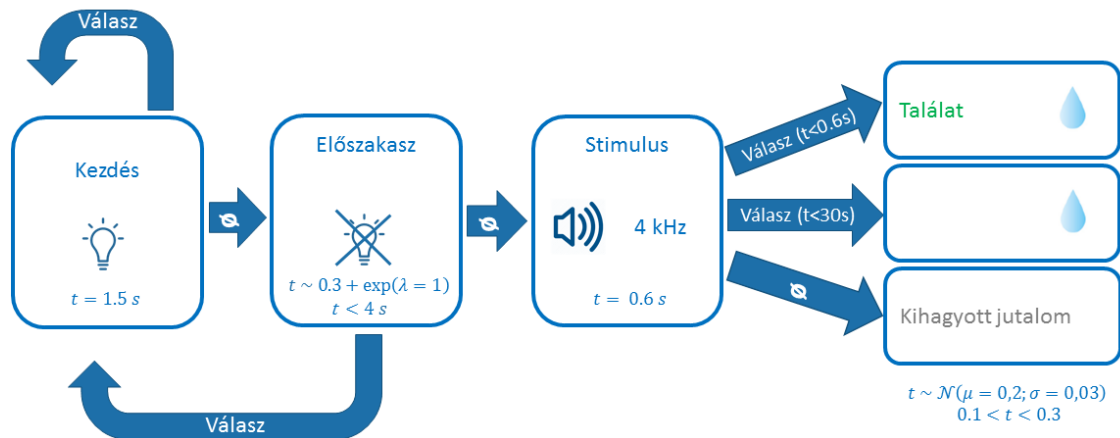
A teljes paradigma megtanulásához fokozatosan vezettük be a feladat egyes elemeit. A tanítás kezdetén az – eleinte kizárólagosan alkalmazott – jutalmat jelző hang (4 kHz) megjelenését követően 30 másodperce van az állatnak reagálni (3.4. ábra). A hang-jutalom asszociáció kialakulása után (50 találat a végső válaszablakon belül) a válaszablak automatikusan lerövidül a végső 0,6 s-os időre. Miután az állat stabilan teljesített (70% fölötti találati arány), bevezetésre kerül a büntetést jelző 10 kHz-es hang, a tesztek 50%-ában (3.5. ábra). Ezekben az esetekben az állatnak meg kell tanulni, hogy a büntetés elkerüléséhez a hang megjelenése alatt nem szabad belenyalni a lickométerbe.

Miután az állat mindkét típusú tesztben jól teljesített (a büntetést jelző hang esetén a tesztek 30%-ánál kevesebb választ tekintettük ennek), bevezettük a jutalmat vagy büntetést előrejelző harmadik hangokat (ezek frekvenciája és előrejelzett kimenetele a bevezetésekor véletlenszerűen kerül kiválasztásra), amelyeket megtanulásuk esetén (70% fölötti helyes viselkedés³ mindhárom hang vonatkozásában) a hang lecserélése követ (5, 6, 7, 8, 9 kHz frekvenciák közül, kizárva egy frekvencia közvetlen ismétlődését, miközben a két eredeti hang változatlan marad és egyszerre mindig három különböző hangok alkalmazunk). Ekkor továbbra is egyaránt a tesztek fele végződhet jutalommal, illetve büntetéssel, de a harmadik hangra jellemző kimenetelnél a tesztek 50-50%-án (tehát az összes teszt 25-25%-án) osztozik az eredeti és az aktuális harmadik hang.

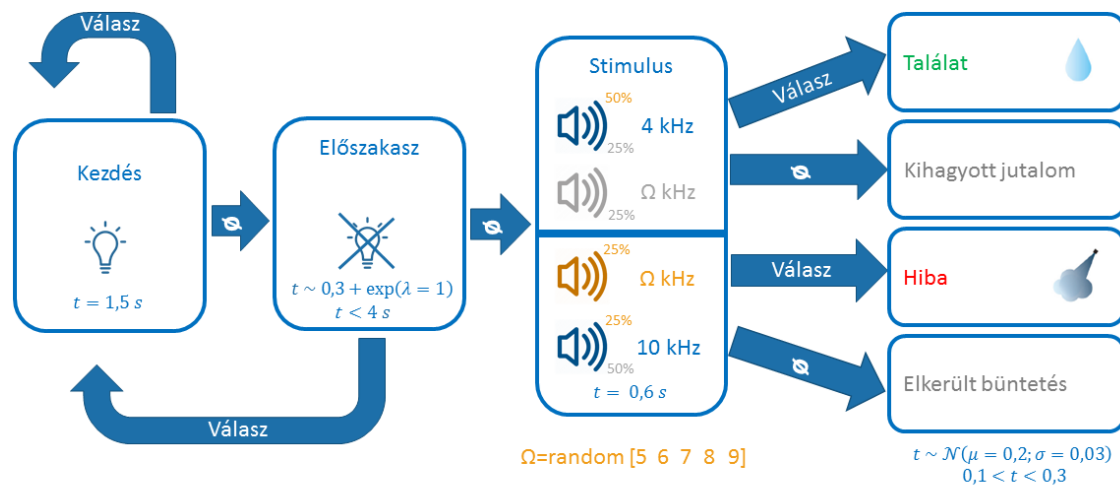
A végső feladat bevezetésének fokozatosságát azzal biztosítottuk, hogy az első három hang esetén nem véletlenszerűen választottunk:

- (i) Az eredeti két hangtól frekvenciában azonos távolságra lévő jutalmat jelző hang
- (ii) Az eredeti jutalmat előrejelző hanghoz közelebbi büntetést jelző hang
- (iii) Az eredeti büntetést előrejelző hanghoz közelebbi jutalmat jelző hang

³Átlagot számolva mindhárom hangra az utolsó 50 teszt teljesítményéből. Minden új hang esetén minimum 33 teszt teljesítése után volt lehetőség a hang teljesítésére, továbbá ha 350 teszt alatt nem sikerült elérni a 70%-os határt, automatikusan új hangot vezettünk be.



3.4. ÁBRA. Viselkedési feladat első és második fázisának sematikus ábrája. A második fázisban a válaszablak a végső 0.6 s-ra rövidül.



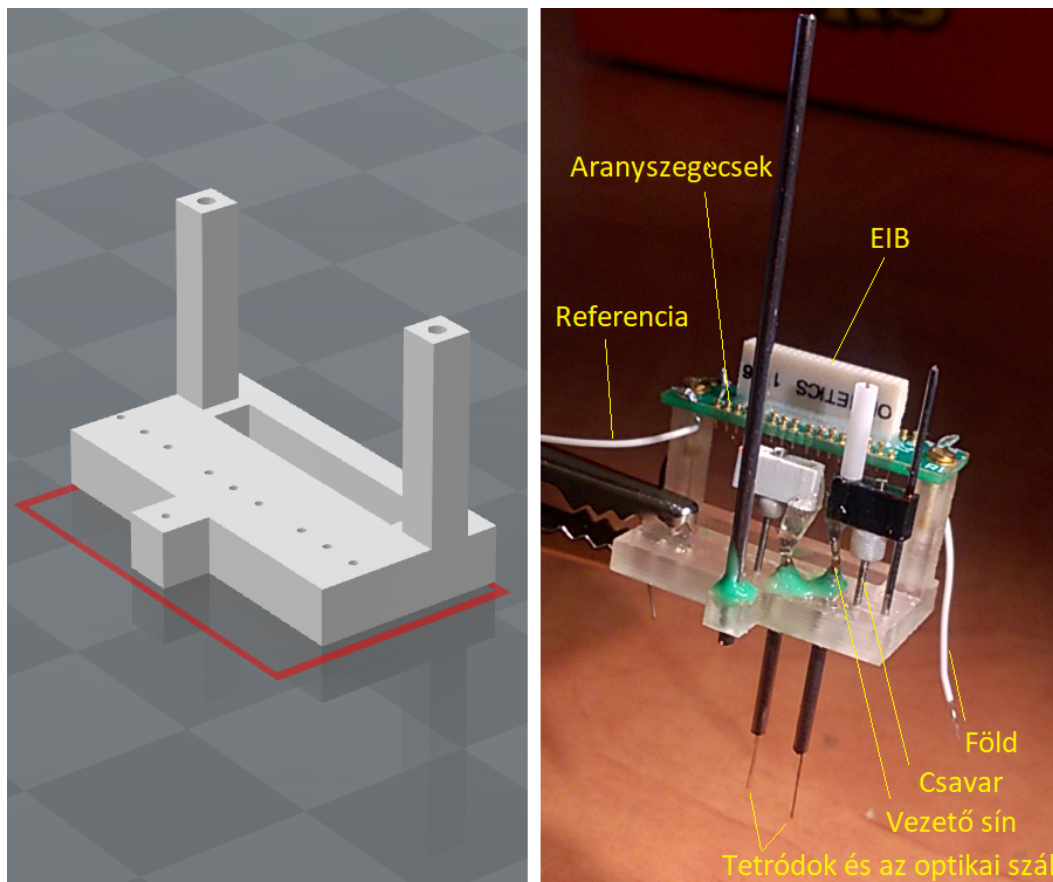
3.5. ÁBRA. Viselkedési feladat harmadik és negyedik fázisának sematikus ábrája. A negyedik fázisban megjelenik a harmadik (Ω) hang, amelynek frekvenciája és kimenetele (jutalom illetve büntetés) a bevezetésekor véletlenszerűen kerül kiválasztásra.

3.1.3. Mikroelektród-készítés és beültetés

A mélyagyi idegi aktivitások monitorozásához és az optogenetikai stimulációhoz speciálisan erre a célra tervezett [27], nyolc tetródból és egy optikai szálból álló ventrális irányban mozgatható mikroelektródot készítettünk. Fontos szempont, hogy az épített elektródnak stabilnak és precízen pozicionálhatónak kell lennie. Az elektród alapja egy 3D nyomtatott műanyag váz. Ebbe egy kilenc poliimid csövet tartalmazó vezetősínt helyeztünk, amelyet egy csavar segítségével tudunk dorzoventrális irányban mozgatni. A kilenc poliimid csőbe kellett nagy precizitással elhelyeznünk a nikrómhuzalból (átmérő: $12,7 \mu\text{m}$) készített nyolc darab tetródot, valamint az optogenetikai stimulációhoz szükséges optikai szálát. Minden tetród egyenként négy szálát egyesével érintkezésbe hoztuk és aranysegecsekkel (Neuralynx) rögzítettük a műanyag vázra erősített elektród interface kártya (EIB-36-Narrow, Neuralynx) megfelelő bemenetein, amelyhez hozzáforrasztottuk a referencia és a föld vezetékeket is. Végül a szálak végeit aranyoldatba (Neuralynx-Gold Plating Solution) helyeztük és galvanizáltuk (ekkor elektromos áram hatására a katódhoz csatlakoztatott elektróda szálaira vékony fémréteg válik ki az aranyoldatból, ezáltal a tetródszálak effektív felülete növekszik és impedanciája csökkenthető).

A későbbi vizsgálatokhoz szükséges duális – két agyterület szimultán vizsgálatát megvalósító – elektród megépítéséhez egy speciális műanyag váz megtervezése volt szükséges (3.6. ábra), amelyben két mozgatható vezetősín helyezhető el a kérdéses agyi struktúráknak megfelelő távolságban. Az általunk vizsgálni kívánt HDB (horizontal limb of the diagonal band of Broca, *bregmához* viszonyítva anterior: 0,75 mm, laterálisan: 0,6 mm) és VTA (ventral tegmental area, *bregmához* viszonyítva posterior: 3,1 mm, laterálisan: 0,6 mm) esetén ez a távolság 3,85 mm (a későbbi anteroposterior irány mentén).

Az implantátum beültetését és a vírus injektálását egy sztereotaxiás váz (Kopf Instruments) segítségével hajtottuk végre. A fejbőr borotválása és megnyitása után láthatóvá vált a koponya felszíne, rajta a koponyavarratokkal (3.7. ábra). Az egér fejét az atlasz [24] sztenderd irányainak megfelelően rögzítettük a sztereotaxiás keretben, vagyis a *bregma* és *lambda* pontok azonos dorzoventrális koordinátákra

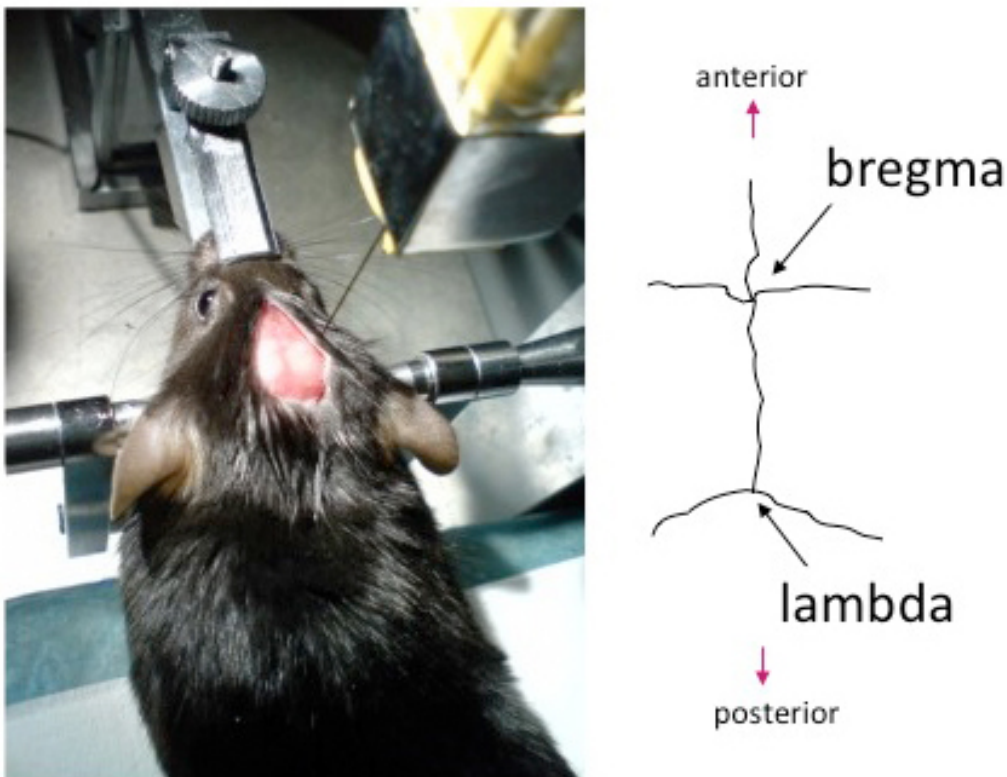


3.6. ÁBRA. Az HDB-ből és a VTA-ból történő duális elvezetéshez tervezett speciális mikroelektróda 3D nyomtatott műanyag váza és az elkészült mikroelektróda

kerültek, így az atlaszhoz illesztett koordináta-rendszerben mozogva célozhattuk meg a kiválasztott agyterületet.

A megfelelő koordinátákon (és további két ponton, a föld és referencia vezeték számára) egy fogászati fúró segítségével megnyitottuk a koponyát, a dura eltávolításával szabaddá tettük az agyfelszínt és egy Cre-rekombináz-függő módon⁴ channelrhodopsint és zöld fluoreszcens proteint expresszáló adeno-asszociált vírus vektort (AAV 2/5. EF1a.Dio.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH) injektáltunk az állat agyába a megfelelő koordinátákon. A későbbi post mortem lokalizációhoz a tetródokat piros fluoreszcens DiI (Invitrogen) festékbe mártottuk és az elektródot beültettük a vírus beadásával azonos pozícióba, majd fogászati cementtel rögzítettük az állat fején. A kísérletek végeztével, az implantáció sikerességét a 2.6.

⁴A vírus által kódolt protein csak a Cre-rekombináz expresszáló neuronokban fejeződik ki. Az általunk használt transzgenikus ChAT-Cre egerek esetében ezek a kolinerg sejtek, a DAT-Cre egereinknél a dopaminerg sejtek.



3.7. ÁBRA. A műtéti összeállítás fotója és a *bregma*, illetve a *lambda* pozíciójának sematikus ábrája a koponyavarratok kereszteződésénél [32].

fejezetben leírtaknak megfelelően készített hisztológiai felvételekkel ellenőriztük.

3.2. Eredmények

Az eljárás kidolgozása során a protokoll részeit összesen hét C57BL/6 egeren teszteltük. A teljes, végleges kísérleti eljárás megfelelését a célkitűzéseknek ebből két egeren vizsgáltuk, egyik esetben csak a viselkedési adatokat gyűjtve, amely a második (DAT-Cre) egér esetében az elektrofiziológiai adatokkal is kiegészült, egy VTA-t célzó implantált elektród segítségével. A következőkben ennek a két egérnek a tanításából és vizsgálatából származó adatokon keresztül mutatom be a protokoll adatfeldolgozási részét és az eljárás alkalmasságát neurokémiai neuronpopulációk egyedeinek optogenetikai azonosítására és viselkedésük elektrofiziológiai vizsgálatára, auditoros asszociatív tanulási feladat teljesítése közben, melyben a kísérleti állatok változó nehézségű jutalmat, illetve büntetést előrejelző hangokat voltak képesek megtanulni.

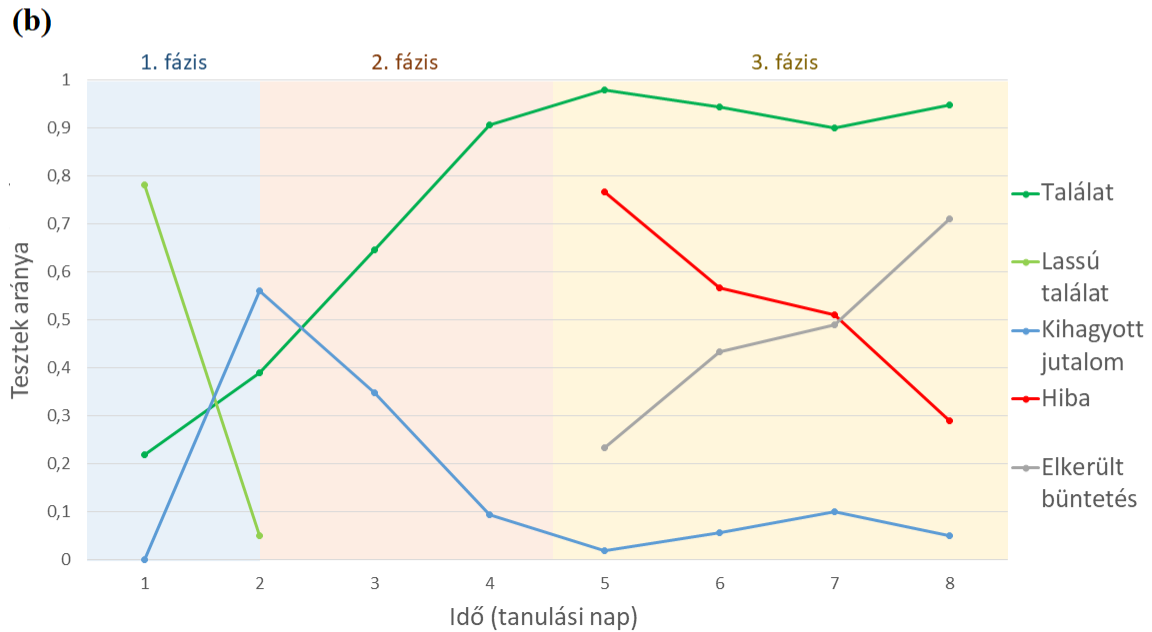
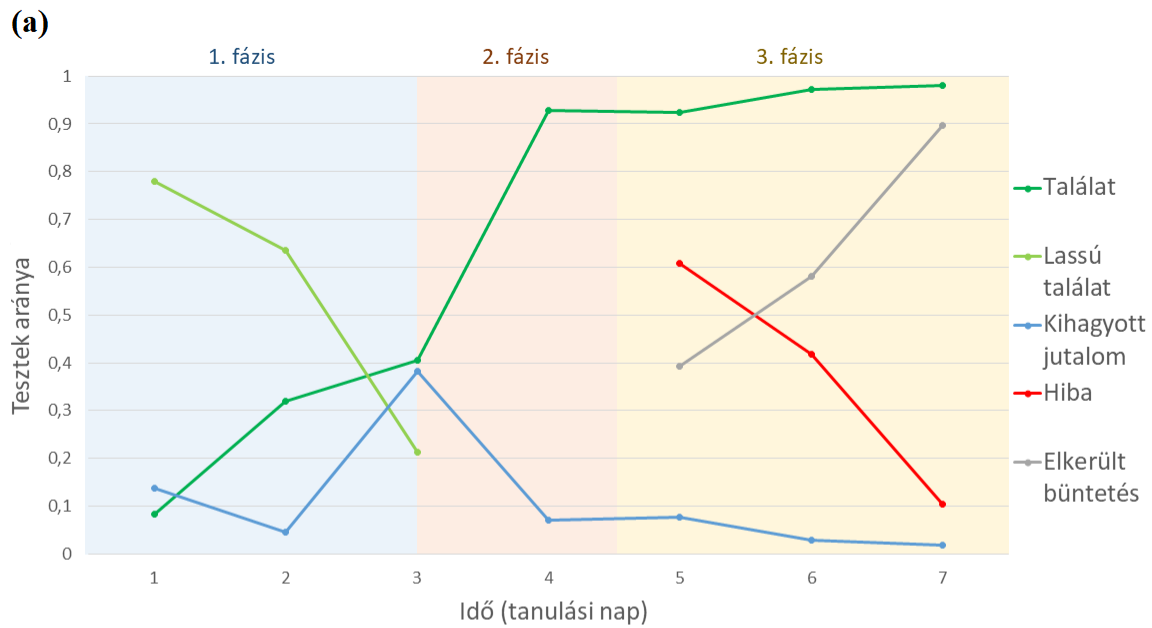
3.2.1. Viselkedési eredmények

Annak érdekében, hogy a jutalomként alkalmazott víz megfelelően motiváló legyen a feladat teljesítéséhez, a műtétből való felépülést követően az állatok napi vízádagját 1 ml-re csökkentettük testtömegük állandó monitorozása mellett, eredeti tömegük 85%-a körül tartva azt. Ezt követően az állatokat napi egy alkalommal tanítottuk, ekkor a feladat során megszerzett vízmennyiséget egészítettük ki 1 ml-re. A teljes tanulási feladat egyes elemeit a 3.1.2. fejezetben leírtaknak megfelelően három előzetes fázison keresztül, fokozatosan vezettük be.

A tanulási feladat első fázisában a hang-válasz⁵-jutalom asszociáció megteremtése volt a célunk. 50 végső válaszablakon belüli helyes reakció után – ezt jellemzően a 2-3 tanulási nap alatt érték el (3.8. ábrák) – automatikusan bevezetésre került a második fázis, amelyben az állatnak meg kellett tanulni gyorsan reagálni a hangjelzésre – ez jellemzően további 2-3 napot vett igénybe. A második fázis végére az állatok megszokták a kezdetben meglehetősen kellemetlen fej-rögzítéses szituációt, és nem mutatták különösebb kényelmetlenség jelét. 70%-os találati arány elérése után bevezetésre került a büntetést előrejelző hang. A büntetések elkerülésének megtanulása általában 3-5 napot vett igénybe.

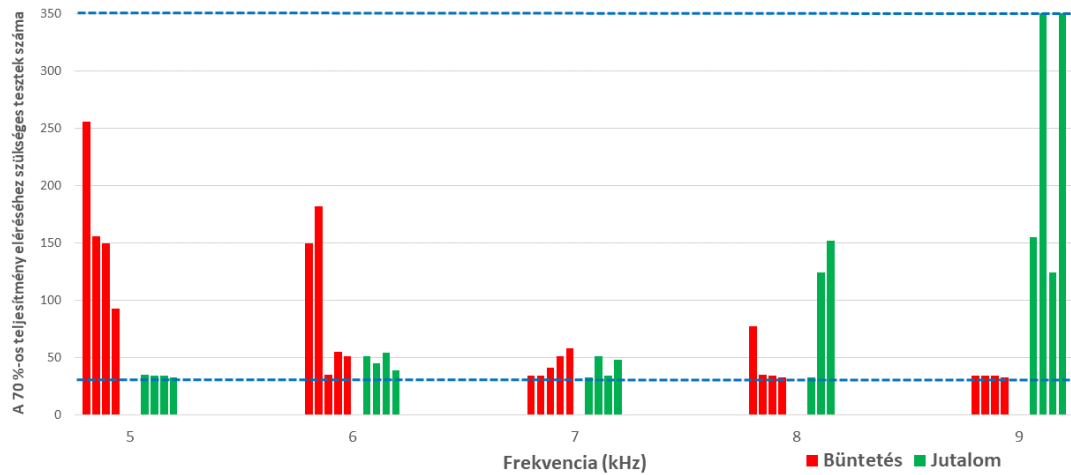
Az előzetes szakaszt követően az állatokat több héten keresztül taníthatjuk a teljes feladatra. Ez lehetőséget ad arra, hogy a megcélzott agyi régió egészét bejárjuk az elektróddal, miközben az állatnak folyamatosan új, gyakran a korábban megtanultakkal ellentétes kimenetelű feladatokat kell megtanulni. A viselkedési eredmények igazolták azt a hipotézisünket, hogy az eredeti – és a teljes kísérlet alatt változatlanul hagyott – két hanghoz közeli azonos kimenetelű új hangok könnyű feladatot jelentettek, míg az ellentétes kimenetelt előrejelző új hangok annál nehezebb feladatot jelentettek, minél közelebb voltak az azonos kimenetelű eredeti hanghoz (3.9. ábra). Az új hangok nehézségét meghatározó további tényezőnek az előző harmadik hang közelsége és előrejelzett kimenetele bizonyult. Ezáltal a protokoll valóban lehetőséget biztosít arra, hogy változó nehézségű feladatok megtanulása közben vizsgálhassuk a sejtek aktivitását.

⁵megnyalni a vizet adagoló csövet

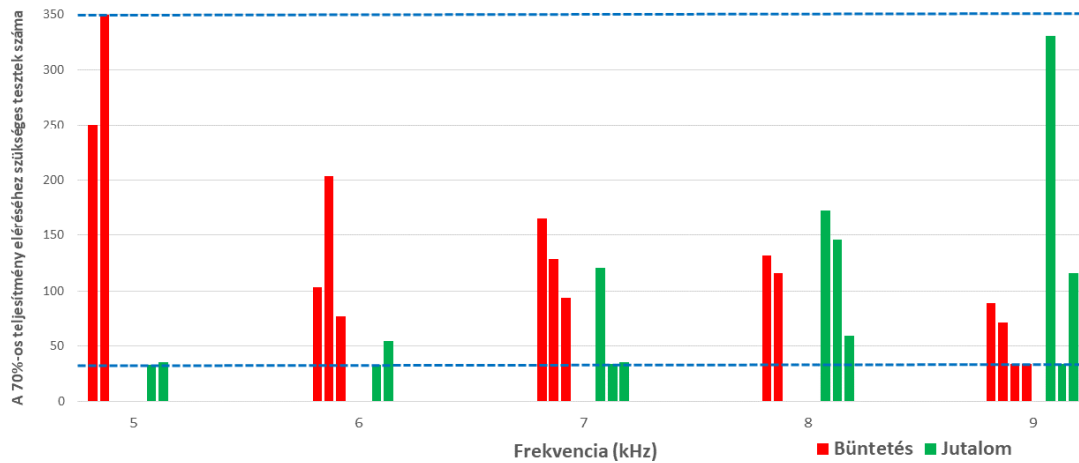


3.8. ÁBRA. Az első (a) és második (b) eger teljesítménye a feladat első három fázisában.

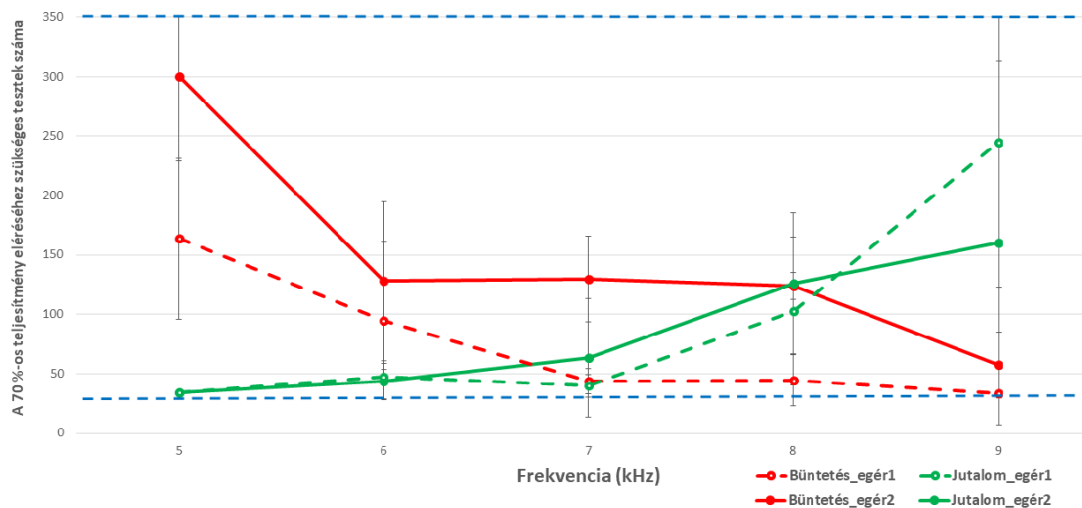
(a)



(b)



(c)



3.9. ÁBRA. A teljes feladat harmadik hangjainak megtanulásához (70% fölötti teljesítmény) szükséges tesztek száma az első (a) és a második (b) egér esetében, illetve a szükséges tesztek átlagos száma és szórása a két egér esetében (c). Új hang bevezetéséhez minimum 33 teszt teljesítése volt szükséges, és maximum 350 próbálkozás állt rendelkezésre (kék szaggatott vonalak).

3.2.2. Elektrofiziológiai eredmények

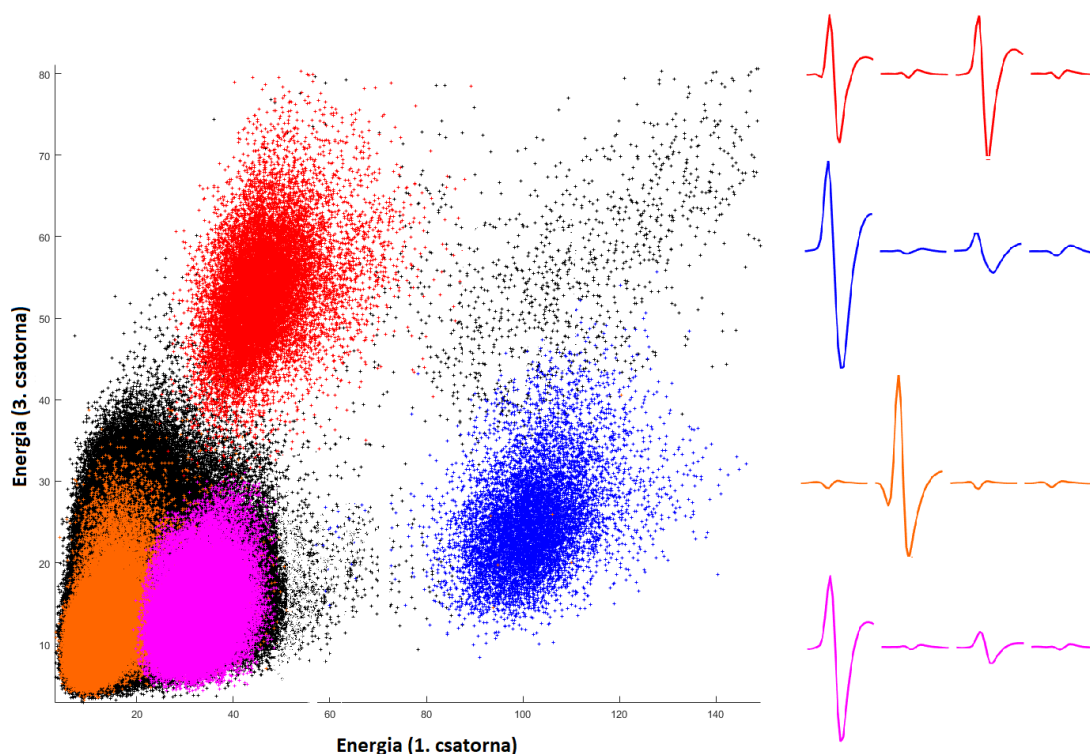
A második egér esetében az implantált elektróda és az optikai szál segítségével teszteltük a módszert egyedi sejtek neurofiziológiai viselkedésének vizsgálatára, különös figyelmet fordítva az azonosítható dopaminerg sejtekre, ezért minden tanítás előtt és után 2-2 percig optogenetikailag stimuláltuk a vizsgált területet. A tanulási feladat teljesítése közben elvezetett elektrofiziológiai adatok utólagos elemzése a nyílt forráskódú MClust [6] akciós potenciálokot klaszterező szoftver, és a szintén nyílt forráskódú Cellbase [33] programcsomaghoz fejlesztett elemzőkód segítségével történt.

Első lépésként az MClust szoftverben a paramétertér több síkvetületét felhasználva manuálisan csoportosítottuk az elvezetett akciós potenciálokot a (3.10. ábra) a 2.1.2. fejezetben részletezett biológiai kritériumokat, a paraméterek időbeli változását (például ha egy sejt a mérés során kismértékben távolodott az tetródtól, az akciós potenciálok amplitúdója csökkent), és a szeparáció minőségére jellemző kvantitatív mérőszámokat figyelembe véve.

Ezt követően a Cellbase programcsomagban implementált kódunk időben szinkronizálta az egyes sejtek akciós potenciáljait az optogenetikai stimuláció és a viselkedési feladat teljesítése során rögzített adatokkal. Végeredményben így lehetőségünk nyílt az egyes sejtek aktivitásának vizsgálatára a tanulás közben teljesített tesztek különböző releváns eseményeinek (pl.: LED kikapcsolása, hang megjelenése, jutalom és büntetés realizálódása), valamint lézimpulzusok időkörnyezetében.

A kísérlet során közel száz jó minőségben ($L_{\text{ratio}} < 0,05$; $ID > 20$) szeparálható neuron aktivitását sikerült elvezetnünk a VTA-környéki területekről. Összességében elmondhatjuk, hogy ezek körülbelül 70%-a reagált a büntetésre, 40%-a a jutalomra és 50%-a a kondicionált hang-stimulusra valamilyen formában (gátlással vagy aktivációval). Az, hogy egyik esemény időkörnyezetében se történjen változás a sejt tüzelési mintázatában mindösszesen az összes sejt 15%-ára volt jellemző.

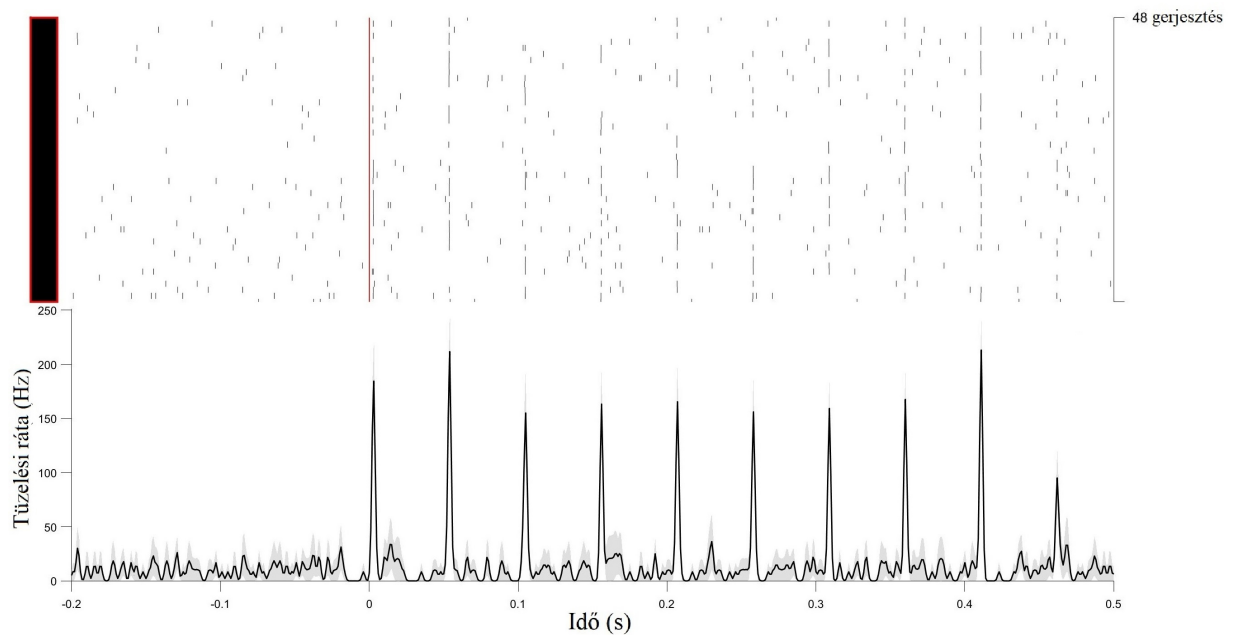
A kísérlet során optogenetikai gerjesztéssel sikeresen azonosítottunk egy dopaminerg sejtet (3.11. ábra), melynek viselkedését ezután a tanulási feladat negyedik fázisában vizsgálhattuk, egy új, jutalmat előrejelző hang (8 kHz) megtanulása közben. A 3.12. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy a dopaminerg sejt tüzeléssel



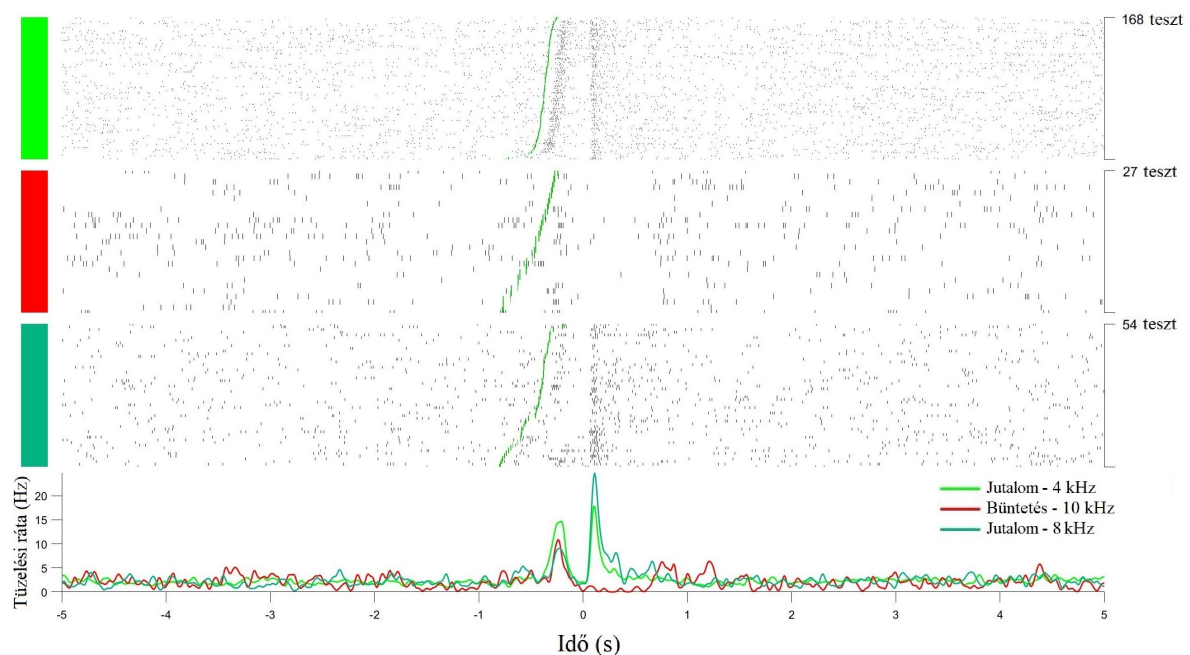
3.10. ÁBRA. Példa a manuális klaszterezésre a paraméter tér egyik síkvetületén és a klaszterekhez tartozó átlagos jelalakok. A kék és piros klaszterek láthatóan jól szeparáltak, a rózsaszín klaszter csak kisebb mértékben különül el a zajtól (fekete), a narancssárga sejt egy másik csatornán volt látható és más vetületeken szeparálható.

reagált a hangok megjelenésére, és a már jól ismert, biztos jutalmat előrejelző 4 kHz-re jobban aktiválódott, mint a másik két esetben. Szintén leolvasható, hogy a jutalom továbbítását nagyon gyorsan egy éles tüzelési, illetve tüzeléssorozat-ra (burst) jellemző aktiváció követte, miközben a büntetésre a tüzelés gátlásával reagált. Az azonosított dopaminerg sejt sem a LED kigyulladására, sem annak kialvására nem reagált.

Fontos jellemzője a dopaminerg sejteknek a két, jutalmat előrejelző hangra adott reakciók viszonylatában látható különbség; a hangokra adott válaszokkal ellentétesen, itt az új hangot követő – váratlanabb – jutalmakra figyelhető meg erősebb hatás. Az ezt leíró komplex viselkedési változó az ún. reward prediction error, amely jellemzi a dopaminerg neuronok várt és ténylegesen realizálódó jutalom közti különbséget kódoló tulajdonságát [34].



3.11. ÁBRA. Az azonosított dopaminerg sejt aktivitása 20 Hz-es optogenetikai stimuláció hatására. Fent: a sejt akciós potenciáljainak rastergrafikonja az idő függvényében, a gerjesztés időkörnyezetében (0 s a gerjesztési sorozat kezdete.). Minden kis fekete vonal a sejt egy-egy akciós potenciáljának felel meg. Lent: a vizsgált sejt tüzelési rátája az idő függvényében. Jól látszik, hogy a sejt ténylegesen tüzeléssel reagál a kék fényre.



3.12. ÁBRA. Az azonosított sejt viselkedése a tanulási feladat tesztjei során. Fent: a vizsgált sejt rastergrafikonjai a két eredeti és az új, jutalmat előrejelző harmadik hangra, a megerősítés (0 másodperc) időkörnyezetében (a rastergrafikonon zölddel jelölve az egyes tesztek esetében a hang bekapcsolásának ideje). Lent: a vizsgált sejt tüzelési rátája az idő függvényében. Világoszöld: 4 kHz – jutalom; piros: 10 kHz – büntetés; sötétzöld: 8 kHz – jutalom

4. fejezet

A kidolgozott *in vivo* lokalizációs protokoll

A 3. fejezetben bemutatott eljárás kritikus pontja az elektród nagyon pontos beültetése. A 2. fejezetben bemutatott képalkotó módszerek együttesen szolgáltatják azokat az információkat, amelyek alapján egy biztonságos, precíz – agyterület pontosságú –, *in vivo* lokalizációs eljárás kidolgozható. Várakozásaink szerint azáltal, hogy az elektródpozíció a műtétet követően közvetlenül, az élő állatban meghatározható, jelentősen javulhat a területen folyó kutatások hatékonysága.

Az elektród beültetése után (*post-operatio*, a továbbiakban *post-op*) készített CT-felvételeken jól látható a fém elektród pozíciója, ugyanakkor lágyszöveti kontraszt nélkül a kérdéses agyterület meghatározásához szükséges atlaszillesztés precíz elvégzése nem lehetséges. Ennek megfelelően az agy strukturális vizsgálatának gyakorlatban elterjedt eszköze a jó lágyszöveti kontrasztot adó MRI-képalkotás. Az erős mágneses tér ugyanakkor nem kompatibilis az elektróddal és a hozzá tartozó fém alkatrészekkel, ezért egyetlen lehetőségünk, hogy az elektród beültetését megelőzően (*pre-operatio*, a továbbiakban *pre-op*) végzünk MRI-méréseket, és ezek alapján próbáljuk meg illeszteni az atlaszt – illetve az MRI-felvételt, ami alapján az atlasz készült. Ha a műtét előtt, azonos elrendezésben CT-felvételt is készítünk, az könnyen fuzionálható az MRI-képpel, így végeredményben egy CT-atlasz fúzióhoz juthatunk, amelyen a *pre-op* CT-t a *post-op* CT-re cserélve az elektródok lokalizációja lehetségessé válik.

A kapott felvételek alapján két megoldást dolgoztunk ki a lokalizáció megvalósítására. Az első módszer eredménye egy háromdimenziós ábra, amelyet a *post-op* CT és az atlasz fuzionálásával kapunk. Az ábráról kvalitatív módon leolvasható, hogy az elektród mely nagyobb agyterületben helyezkedik el, pontosan milyen irányba mozog a háromdimenziós térben, van-e valamilyen sérülése vagy geometriai hibája. A legkisebb agyterületek vizsgálatához és a módszer pontosságának meghatározásához fontos célunk volt egy kvalitatív módszer kidolgozása, amelyet a második módszer a *post-op* CT és a hisztológiai atlasz koordináta-rendszereinek illesztésével valósít meg.

Ebben a fejezetben először bemutatom a mérések elvégzésénél használt megoldásokat és beállításokat, majd a kapott képek utólagos feldolgozásának folyamatát részletezem a két típusú lokalizáció megvalósításához. A fejezet végén bemutatom a módszer tesztelésének eredményét négy állaton, ismertetem a leolvasható tanulságokat, és hisztológiai eredményekkel verifikálom a módszer pontosságát.

4.1. Mérési protokoll

A méréseket két részben, a műtét előtti napokban és a műtét után egy héttel végeztük. A műtét előtti alkalommal egy CT-, illetve egy MRI-mérés, a műtét után egy CT-felvétel elkészítésére került sor.

4.1.1. CT-beállítások

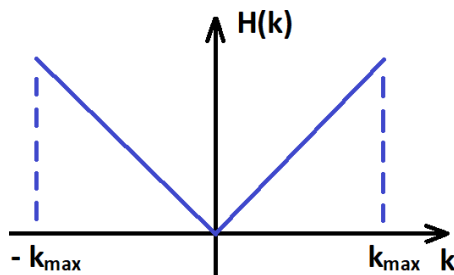
A mérésekhez és a képrekonstrukciókhoz a következő beállításokat találtuk a lokalizáció szempontjából optimálisnak:

- Mérési beállítások
 - Röntgenenergia: 45 kVp (peak kilovoltage) – Meghatározza a röntgen-cső maximális feszültségét, vagyis az elektronok kinetikus energiáján keresztül a sugárzási spektrum csúcsfeszültségét. Az általunk választott érték a lehetséges beállítások közül (45 kVp, 55 kVp, 65 kVp) a legkisebb, ugyanis (ebben az energiatartományban) a kisebb energia

nagyobb csont-lágyszövet, illetve elektród-lágyszövet kontrasztot eredményez¹ (előbbi a képfuzionálás, utóbbi az elektród lokalizálása szempontjából fontos). Az alacsony energián kisebb a fotonok áthaladóképesége, így a kisebb detektálható fotonszám egyben rosszabb jel-zaj arányt is eredményez.

- Expozíciós idő: 1300 ms – Az általunk választott expozíciós idő a legnagyobb választható beállítás (500 ms, 900 ms, 1300 ms), mivel hosszabb expozícióval növelhető a fotonszám, így korrigálható a csőfeszültségválasztás hatása a jel-zaj arányra. A klinikai gyakorlatban az expozíciós időt jellemzően a legkisebb – még elfogadható jel-zaj arányt biztosító – értékre állítják a dózis csökkentésének, illetve mozgási műtermékek kizárásának céljából, de ezek a szempontok az altatott (és rögzített fejű) állat esetében nem meghatározóak.
- Nagyítás: Medium Zoom – A NanoXTM-CT felépítése – a néhány mikrométeres felbontások elérése érdekében – a mozgatható röntgenforrással lehetőséget ad különböző nagyításokat (Maximum FOV, Medium Zoom, Maximum Zoom) megvalósító forrás-tárgy távolságok beállítására. A választott beállításon az egér teljes koponyája kényelmesen belefér a látómezőbe.
- Binning: 1:1 – Pixel-összevonást nem alkalmaztunk, hogy megtartsuk a jó felbontást.
- Szkennelési módszer: Cirkuláris – A detektor és a forrás egy körpályán mozogva járja körbe a mozdulatlan forrást. (További lehetőségek: helikális, szemicirkuláris.)
- Projekciók száma: 360 – A legnagyobb választható projekciósűrűség (180, 240, 360), egy fokos lépésközzel, amely a legjobb jel-zaj arányt biztosítja.

¹Ennek oka, hogy a kisebb energián a kölcsönhatási típusok között a fotoeffektus dominál, amelynek lényegesen erősebb a rendszámfüggése.



4.1. ÁBRA. A Ram–Lak-szűrő áteresztési karakterisztikája

- Rekonstrukciós beállítások
 - Pixelméret: $19 \mu\text{m}$ – A rekonstrukció során elérhető legjobb felbontás a fenti mérési beállítások mellett.
 - Szeletvastagság: $19 \mu\text{m}$ – A rekonstrukció során elérhető legkisebb szeletvastagság a fenti mérési beállítások mellett.
 - Szűrő: Ram–Lak – A szűrt visszavetítés (2.7) egyenletben felírt szűrési tagjaként a Ram–Lak-szűrőt (4.1. ábra) használtuk.

4.1.2. MRI-beállítások

Az MRI-méréseket a következő beállításokkal végeztük:

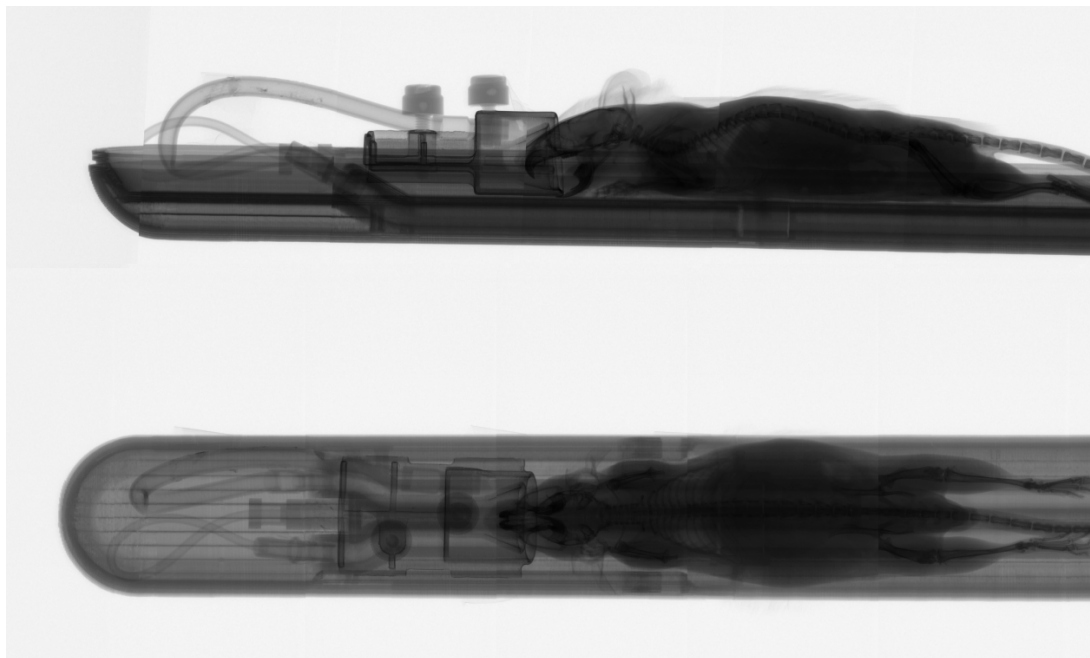
- Szekvencia: T_1 -súlyozott gradiens echo – A \mathbf{k} -tér bejárásához a gerjesztés után alkalmazott gradiens tér, a spin-spin relaxációhoz hasonlóan – mivel egy irány mentén kissé eltérő Larmor-frekvenciákat hoz létre – a spinek precessziójának koherenciavesztését eredményezi, így a mérhető jel nagyon hamar eltűnik. A folyamat visszafordítható úgy, hogy az adatgyűjtés előtt egy ellenkező irányú, ugyanolyan erősségű és hosszúságú gradienst alkalmazunk, hiszen ekkor – ugyanazon mechanizmus szerint, ahogyan a koherenciavesztés kialakult – a spinek újra koherens állapotba kerülnek, így a jel újra megjelenő (a T_2 -relaxáció által megengedett mértékben). Ez a jelenséget nevezzük gradiens echonak, amely egy jó megoldás gyors T_1 -súlyozott képek készítésére, mivel így csökkenthetjük az altatásban töltött időt, miközben pontos anatómiai információt nyerünk az agy kontúrjáról, illetve az agykamrák pozíciójáról. A T_1 -súlyozás minőségét tovább állítja az echoidő (T_E) és a repetíciós idő (T_R) megválasztása.

- T_R : 15 ms – Két gerjesztés közt eltelt idő. Rövid időnek választva T_1 -súlyozott képet kapunk, mert a következő gerjesztés pillanatáig kisebb részben tud végbemenni a T_1 -relaxáció.
- T_E : 2,2 ms – Az echo ideje a gerjesztés pillanatát követően. Az általunk választott érték a beállítható legrövidebb, hogy a T_2 -relaxációból származó jelgyengülés a legkisebb legyen.
- Gerjesztés szöge: 25° – A választott T_R -nek megfelelő optimális választás az erős jelintenzitáshoz.
- Felbontás: $0,4 \times 0,4 \times 0,4$ mm – \mathbf{k} -tér mintavételezési sűrűségével állítható a kapott kép felbontása. Az általunk választott felbontás gyors mérés mellett a későbbi képfúziókhoz megfelelő felbontású képet eredményez.
- Gerjesztések száma a \mathbf{k} -tér egy sorának bejárásakor: 8 – Több gerjesztés eredményét átlagoljuk, így javítható a jel-zaj arány.

4.1.3. Anesztézia

A protokoll kidolgozásakor kiemelt szempont volt, hogy a kísérleti állatra nézve biztonságos eljárást dolgozzunk ki, hiszen a módszerünk által verifikáltan sikeres műtéten átesett állat anyagi értelemben és a befektetett munka szempontjából is jelentős érték. A jó minőségű képek – akárcsak a klinikumban – percekig (vagy akár 10 percekig) tartó mozdulatlan állapotot igényelnek, ami a kísérleti állatok esetében kizárólag altatott állapotban érhető el.

Az általunk alkalmazott anesztéziás módszer az izoflurán inhaláció (belégzés), amelynek előnyei, hogy könnyen kezelhető, alkalmas az altatás megkezdésére és fenntartására is – hiszen a vizsgálat közben is folyamatosan adagolható –, az altatás és az ébredés is gyors, az adagolás megszűnése után hatásai hamar elmúlnak és a mellékhatások is nagyon ritkák. Az izoflurán a klinikai gyakorlatban is az egyik leggyakrabban alkalmazott és legbiztonságosabbnak tartott megoldás az anesztéziás állapot fenntartására.

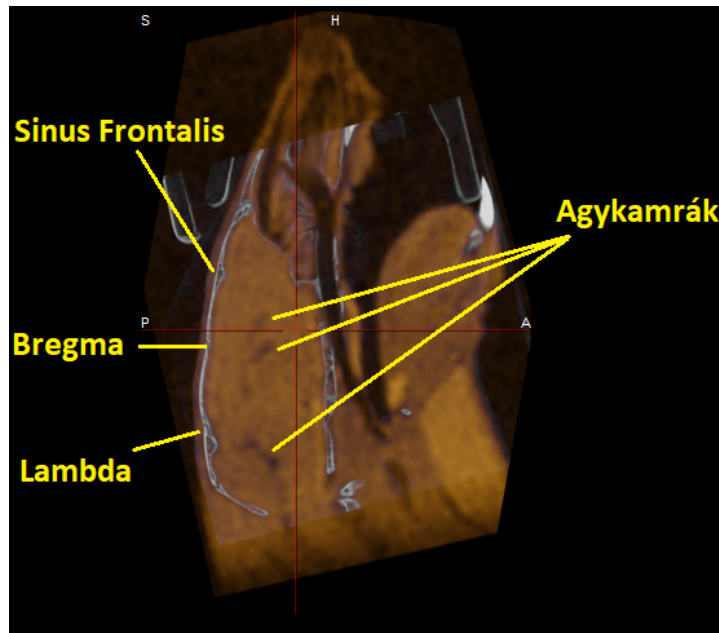


4.2. ÁBRA. Az ágyról és a mérési elrendezésről készített röntgenfelvétel felülnézetből és oldalirányból

4.1.4. A mérés menete

A *pre-op* CT, illetve MRI készítésekor a könnyű fuzionálás érdekében fontos szempont volt, hogy a két mérés közt az állat pozíciója ne változzon. Ezért – az állatok izofluránnal történő altatását követően – a két mérést egy ilyen célokra gyártott, mindkét eszköz rendszerével kompatibilis mérőággal, közvetlenül egymás után végeztük, a mérések között az állatot az ággal együtt áthelyezve a másik készülékbe. Az ág kialakítása (4.2. ábra) azt is lehetővé teszi, hogy az állat feje egy jól rögzített állapotban maradjon (a metszőfogak egy műanyag elembe akaszthatóak, az állat orra pedig egy alagútba kerül), és a mérés során megfelelő koncentrációban izofluránt adagolhassunk neki, ezzel fenntartva a folyamatos – de nem mély – anesztéziás állapotot. A *post-op* CT-felvétel készítésekor az állat fejét célszerű kicsit előredönteni, így a fém alkatrészek nem párhuzamosak a röntgennyalábok útjával, és a műtermékük kevésbé vetül az érdekes területre.

Mindkét modalitás esetében a vizsgálatokat egy tájékozódást segítő méréssel kezdtük – az MRI esetében egy nagyon gyors szekvenciával, a CT esetében egy oldalirányból, illetve felülnézetből készített röntgenképpel – amelyek alapján, már a pontos pozíciók ismeretében tervezhettük meg a végleges mérés beállításait.



4.3. ÁBRA. Anatómiai tájékozódási pontok az első példaállat agyának szagittális CT-MRI metszetén

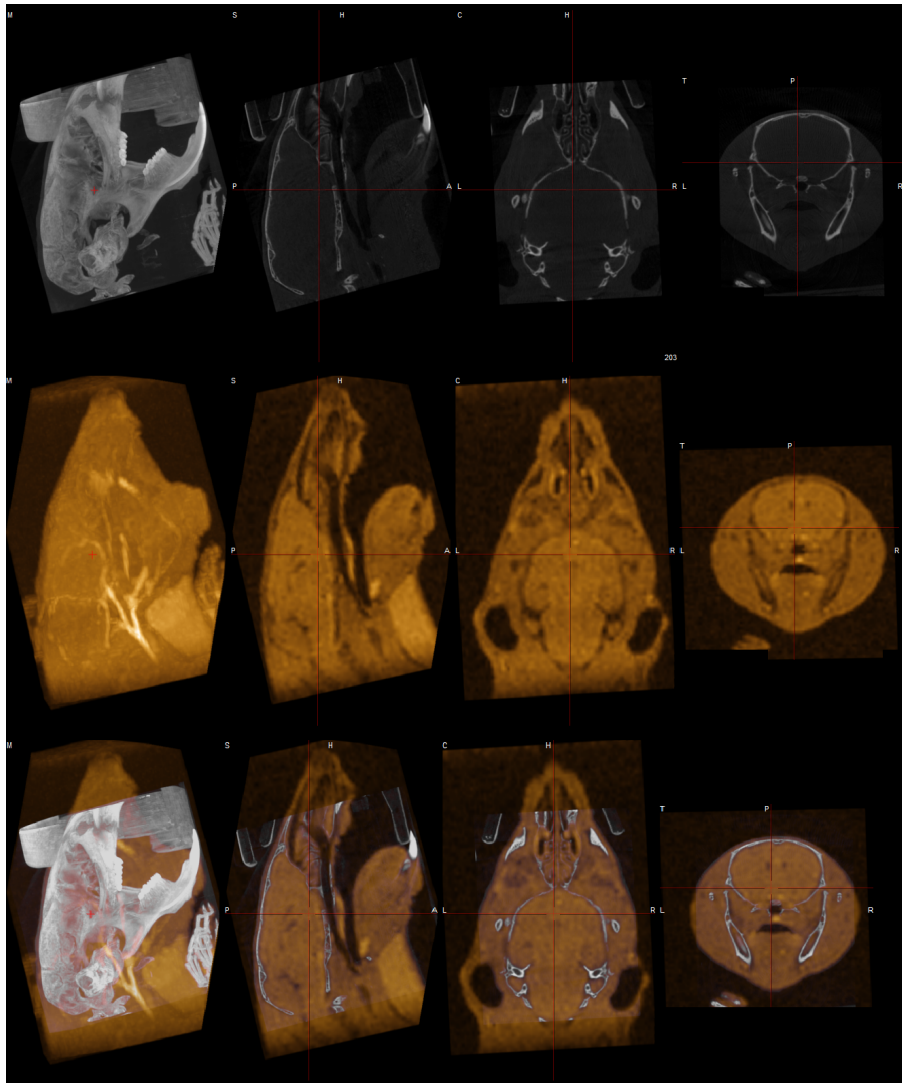
4.2. Lokalizációs protokoll

4.2.1. Képfeldolgozási protokoll

Az eljárás célja egy nagyfokú precizitással elkészített *post-op* CT-atlasz fúzió elkészítése. Mivel a CT-felvételeken csak a koponya pozíciója határozható meg pontosan, ezért a pontos CT-atlasz fúzió több lépésen keresztül érhető el. A protokoll kidolgozásakor azt az elvet követtük, hogy a pontosság érdekében mindig vagy csak ugyanolyan modalitású képeket, vagy különböző modalitású képek esetén csak azonos állatról készült képeket fuzionáltunk közvetlenül. Ez jellemzően a képek transzformációja (eltolás, forgatás, tükrözés, külön állatokról készült felvétel esetén merőleges affinitás) után lehetséges, különböző anatómiai tájékozódási pontok, mint az agy kontúrja, a koponya alakja, a *bregma*, a *sinus frontalis*, illetve a *lambda* és az agykamrák figyelembevételével (4.3. ábra).

Miután az összes felhasznált képről a nem releváns részeket (pl. mérőágy) eltávolítottuk és az optimális vizualizációnak megfelelően ablakoltuk², a végeredmény a következőkben részletezett lépések során készült el. A protokoll lépéseit az első kísérleti állat példáján ábrákkal is szemléltetem.

²A mért intenzitások egy kiválasztott részének szétterítése egy szürke skálán.

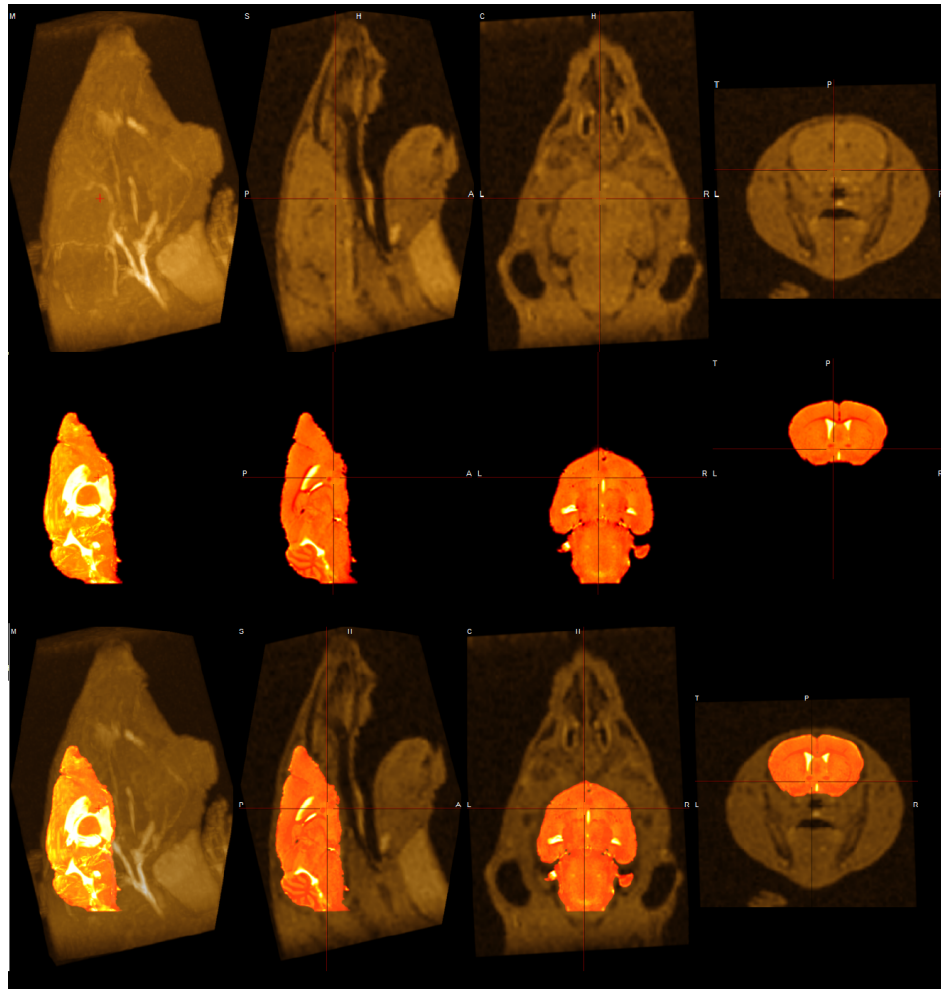


4.4. ÁBRA. A képfeldolgozás első lépése az első egér példáján. Fent: *pre-op* CT, középen: *pre-op* MRI, alul: *pre-op* CT – *pre-op* MRI fúzió. Balról jobbra: MIP³, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet

(i) *pre-op* CT – *pre-op* MRI fúzió

Az első lépés elvégzésekor ugyanannak az állatnak a pár perc különbséggel elkészített felvételeit fuzionáljuk. Mivel a két eszköz közt az állatot a mérőágygal együtt szállítottuk, az állat pozíciója is jó pontossággal megegyezik, így az első lépés rutinfeladatnak tekinthető. A fuzionálás alapját elsősorban az teremti meg, hogy az MRI-képen – a CT-képen jól látszódó – koponya helye jelhiányként jelentkezik, így mindkét képen jól azonosítható, és megfelelő forgatásokkal és eltolásokkal fedésbe hozható (4.4. ábra).

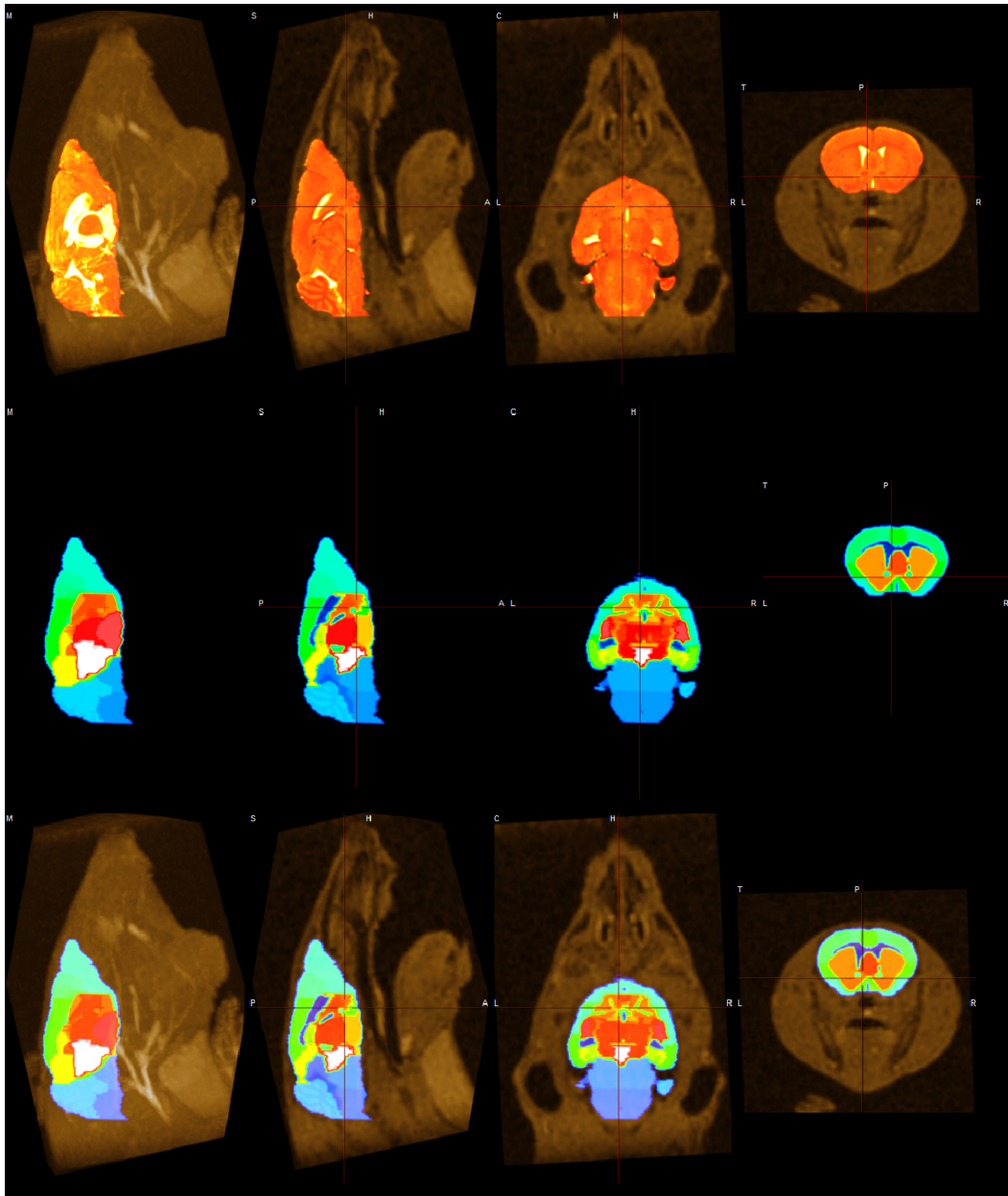
³Maximum intensity projection: háromdimenziós információ ábrázolásának céljából egy irányból minden egyenes mentén a legnagyobb intenzitású pont sík lapra vetítésével kapott kép.



4.5. ÁBRA. A képfeldolgozás második lépése az első egér példáján. Fent: *pre-op* MRI, középen: Atlasz MRI, alul: *pre-op* MRI – atlasz MRI fúzió. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet

(ii) *Pre-op* MRI és atlasz MRI

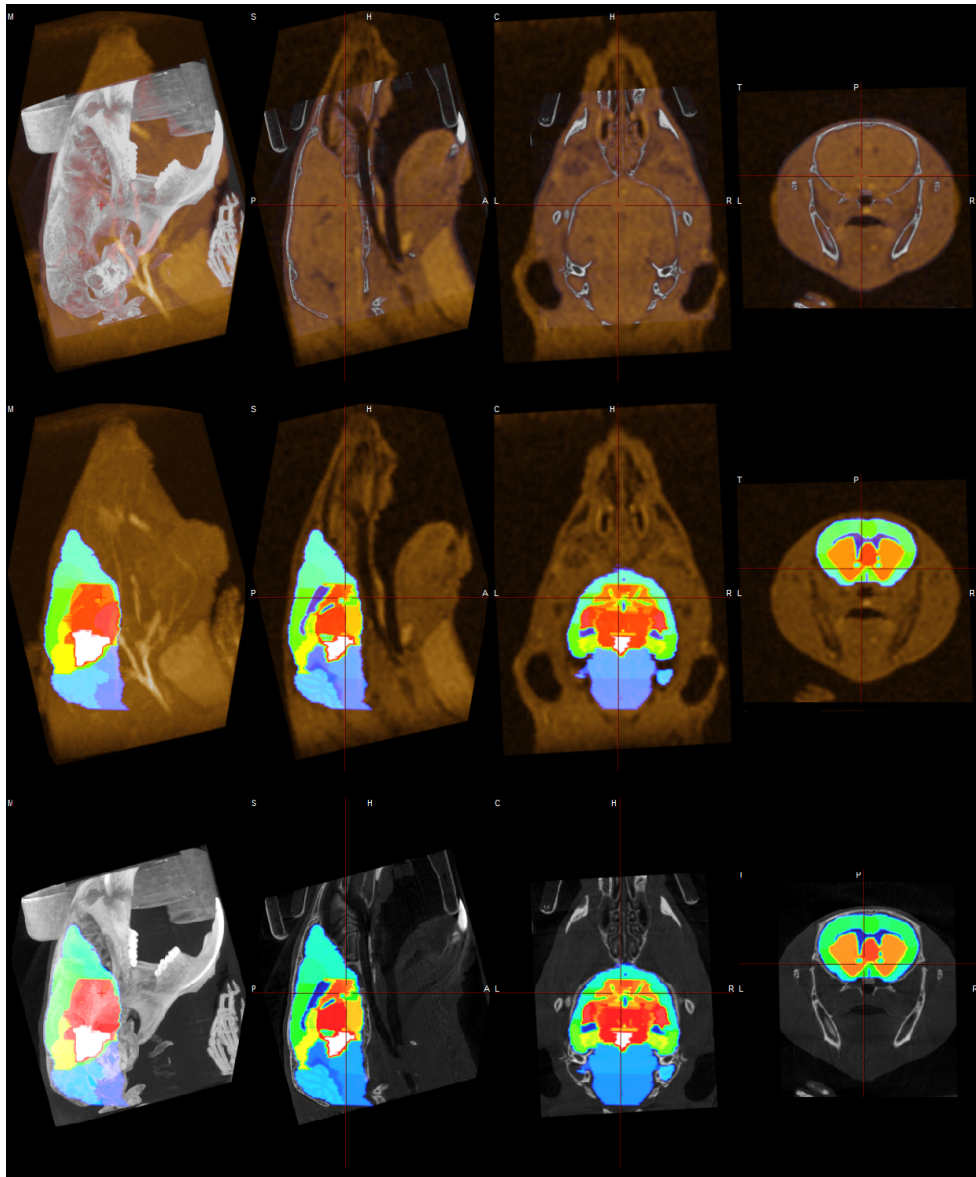
Az egyik kritikus lépés a *pre-op* MRI fuzionálása az atlasz alapját adó MRI felvételekkel (atlasz-MRI). A nehézséget az jelenti, hogy ekkor két külön állat MRI-felvételét kell fuzionálnunk, így – kis, néhány százalékos – hasonlósági transzformációkra is szükség lehet, hiszen minden egér anatómiája kismértékben különböző. Segítséget jelent ugyanakkor, hogy az atlaszgyűjtemény öt egér adatait tartalmazza, így lehetőség van a leginkább hasonló egyedek kiválasztására. A fúzió során a tájékozódás alapja az agy kontúrja, továbbá az MRI felvételeken egyes belső struktúrák (elsősorban az agykamrák) is szépen kivehetőek, melyek alapján a fúzió igen nagy pontossággal elvégezhető, és jól kontrollálhatóak a nagyítási lépések hatásai (4.5. ábra).



4.6. ÁBRA. A képfeldolgozás harmadik lépése az első egér példáján. Fent: *pre-op* MRI, középen: atlasz, alul: *pre-op* MRI – atlasz fúzió. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet

(iii) *Pre-op* MRI – atlasz

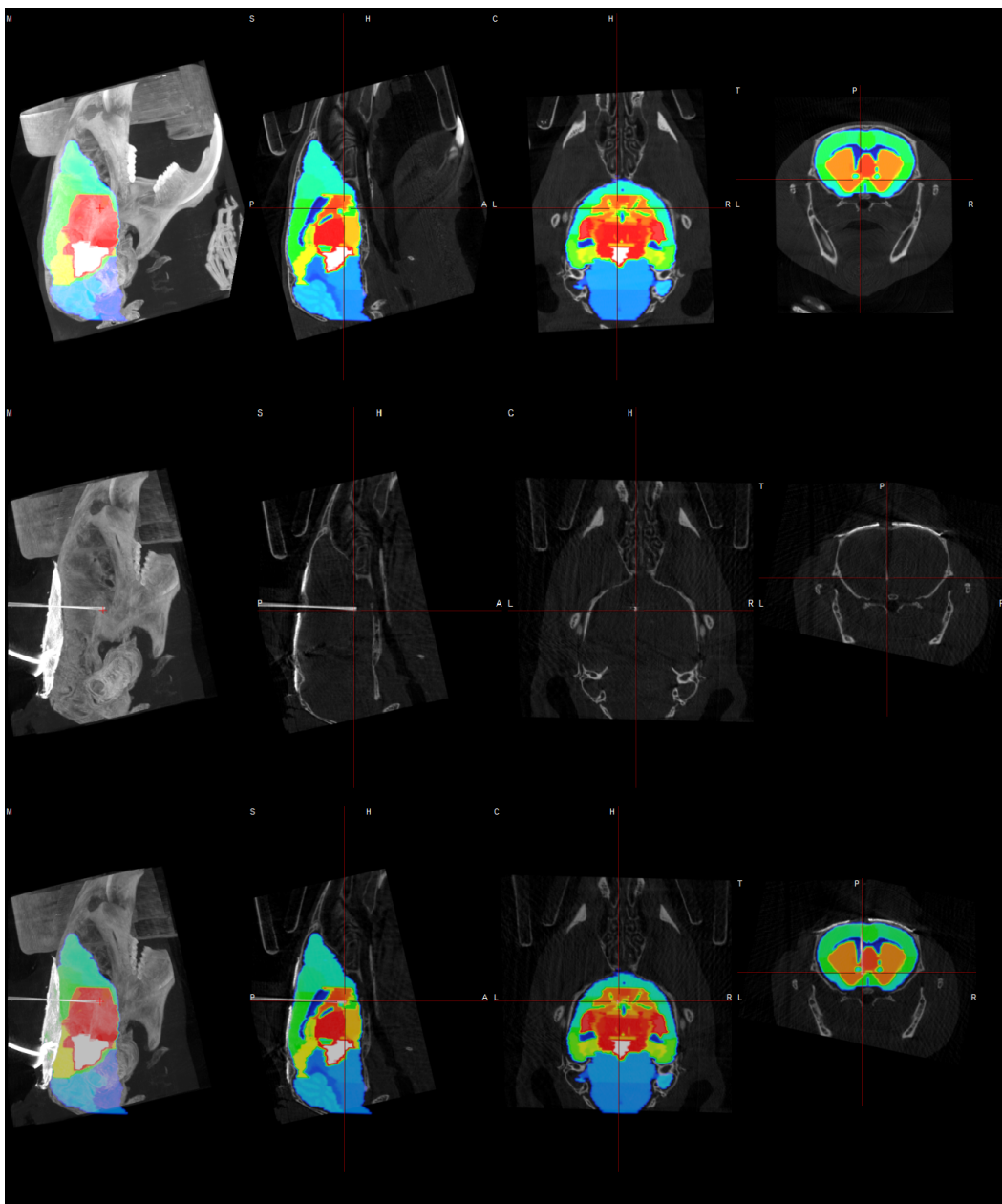
Azokkal a transzformációkkal, amelyekkel az MRI-felvételeket fedésbe tudtuk hozni, fuzionálható a *pre-op* MRI-felvétel az atlaszsal is, hiszen az atlasz a hozzá tartozó MRI-felvételek alapján lett bejelölve (4.6. ábra).



4.7. ÁBRA. A képfeldolgozás negyedik lépése az első egér példáján. Fent: *pre-op* CT – *pre-op* MRI fúzió, középen: *pre-op* MRI – atlasz fúzió, alul: *pre-op* CT – atlasz fúzió. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet

(iv) *Pre-op* CT – atlasz

A fenti lépések eredményeként már könnyen elkészíthető a *pre-op* CT fúziója az atlaszsal, hiszen a *pre-op* MRI felvételeket már mindkettővel fuzionáltuk a korábbiakban. Ebben a lépésben lehetőségünk van ellenőrzésre, illetve kis-mértékű utólagos korrekcióra is, a koponya néhány jól azonosítható pontja (elsősorban a *sinus frontalis* és a *lambda*) alapján, amelyeknek helye az agy körvonalán is leképeződik (4.7. ábra).



4.8. ÁBRA. A képfeldolgozás ötödik lépése az első egér példáján. Fent: *pre-op* CT – atlasz fúzió, középen: *post-op* CT, alul: *post-op* CT – atlasz fúzió. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet

(v) *post-op* CT – atlasz

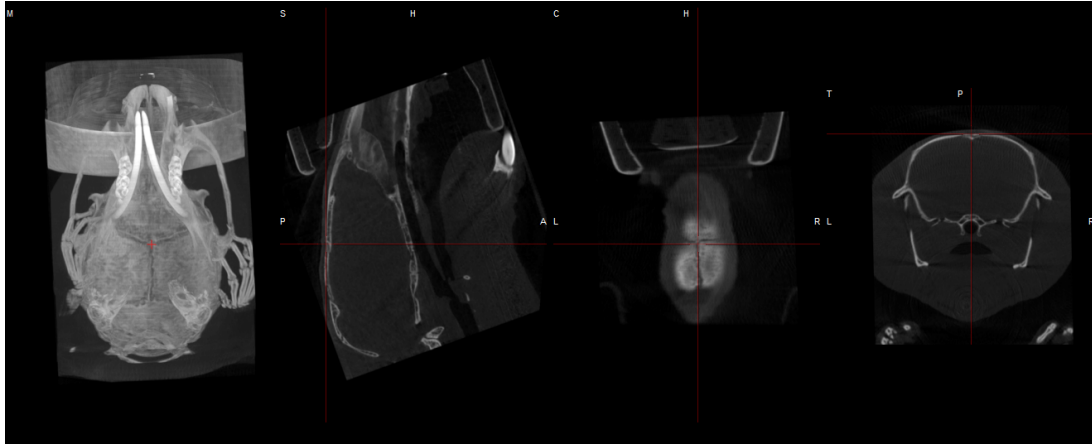
A végeredmény eléréséhez már csak arra van szükségünk, hogy a *pre-op* CT-t a *post-op* CT-re cseréljük, tehát utóbbit ugyanabba a pozícióba kell transzformálnunk, mint amely a *pre-op* esetben volt jellemző (4.8. ábra).

Az így kapott képek alapján már lehetségessé válik az elektródok pontos pozíciójának háromdimenziós vizuális lokalizációja.

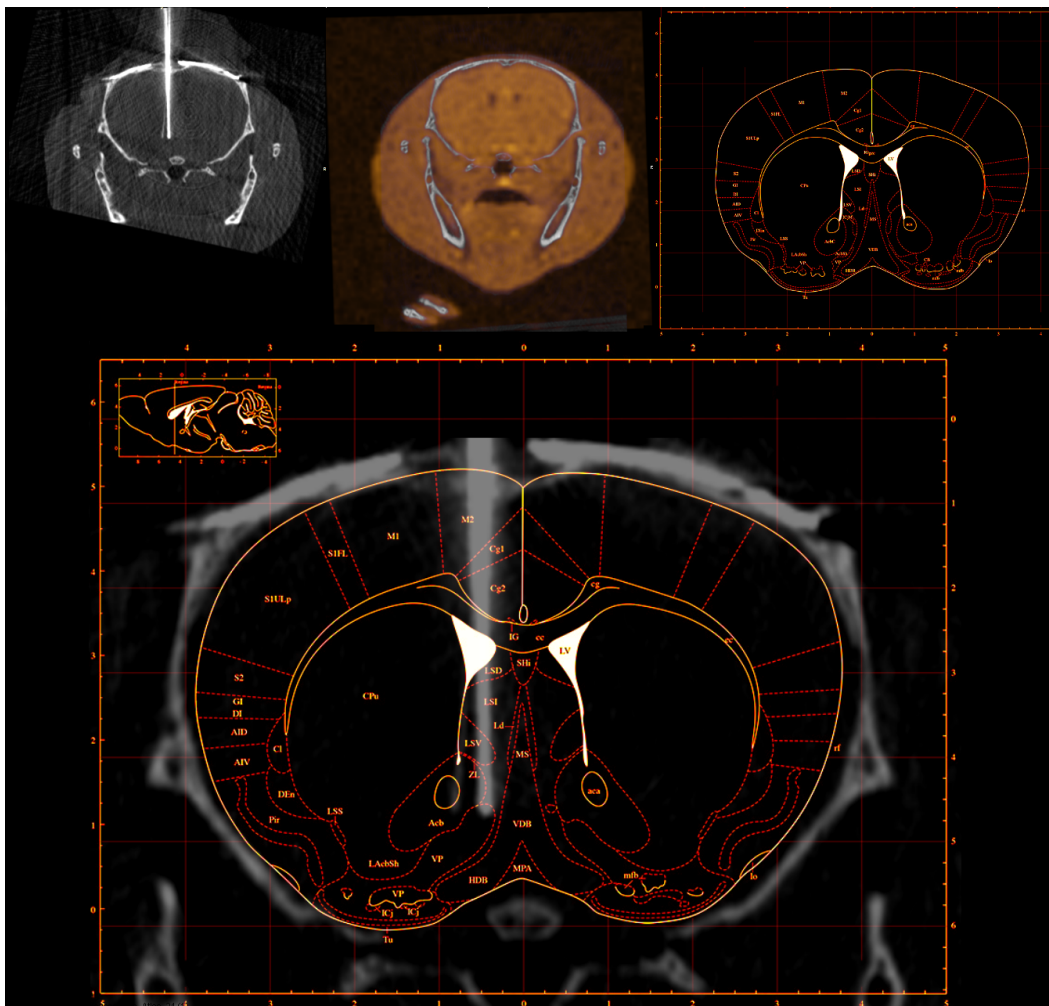
4.2.2. Koordinátarendszer-illesztési protokoll

A lokalizáció másik lehetséges útja a műtét tervezésénél is alkalmazott hisztológiai atlasz [24] koordináta-rendszerének illesztése. A koordináta-rendszer origója a *bregma*, amelynek pozíciója a *pre-op* CT-felvételek alapján is jól lokalizálható (4.9. ábra). Az illesztéshez még az szükséges, hogy a CT-felvétel is a sztereotaxiás fejrögzésnek megfelelő sztenderd irányok mentén legyen pozicionálva. Ez elméletileg megtehető két további, mindkét koordináta-rendszerben ismert pozíciójú, nem egy egyenesre eső pont koordinátáinak egyeztetésével, de a CT-képen nem azonosíthatóak agyi pozíciók, az MRI-képek pedig már elve szubjektív transzformációkkal lettek a CT-felvételekhez illesztve, továbbá az MRI-felvételek alapján sem egyszerű a (0,12 mm szeletvastagsággal dolgozó) atlaszban is egzaktul definiálható pontokat precízen megfeleltetni. Ezért a koordináta-rendszer illesztését a *bregma* koordinátáinak egyeztetésén túl az agykoponyának az atlasz által alkalmazott sztenderd irányokba való forgatásával értük el, ami az atlasz szagittális metszetének megfelelő tájolással és a koronális és transzverzális metszetek szimetriájának beállításával biztosítható. A pontok MRI alapú megfeleltetését így csak ellenőrzésre használtuk.

Az egyeztetett koordináta-rendszerekben az elektród helyét a felbontás ($19\ \mu\text{m}$) ismeretében az elektród hegyét tartalmazó voxel (térbeli pixel) sorszámával leolvashatjuk, hibabecslésre pedig az alapján van lehetőségünk, hogy a leolvasott pont hány voxelyi környezete felelne szintén meg a szubjektív leolvasásunknak – mind a *bregma*, mind az elektród pozíciójának meghatározásakor. (Utóbbit a mediolaterális és a anteroposzterior irányban érdemes egy tartományként megadni, mivel a tetród végén a szálak kismértékben széttartanak, így nagyobb kiterjedésük van.) Ez durva becsléssel – a koordinátarendszer-illesztés pontatlanságát is figyelembe véve – öt voxel, tehát a Gauss-féle hibaterjedéssel számolva 0,15 mm alatti becsült hibával dolgozhatunk (mind a három koordinátában). Anteroposzterior irányban leolvassva a *bregmától* vett távolságot arra is lehetőségünk nyílik, hogy vizualizálás céljából a megfelelő transzverzális metszetet kiválasztva a metszetre illesszük a hisztológiai atlaszt az eddigiekben bemutatott atlaszillesztési protokollhoz hasonlóan (4.10. ábra).



4.9. ÁBRA. *Bregma*-lokalizáció az első egér *pre-op* CT-felvételén. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet



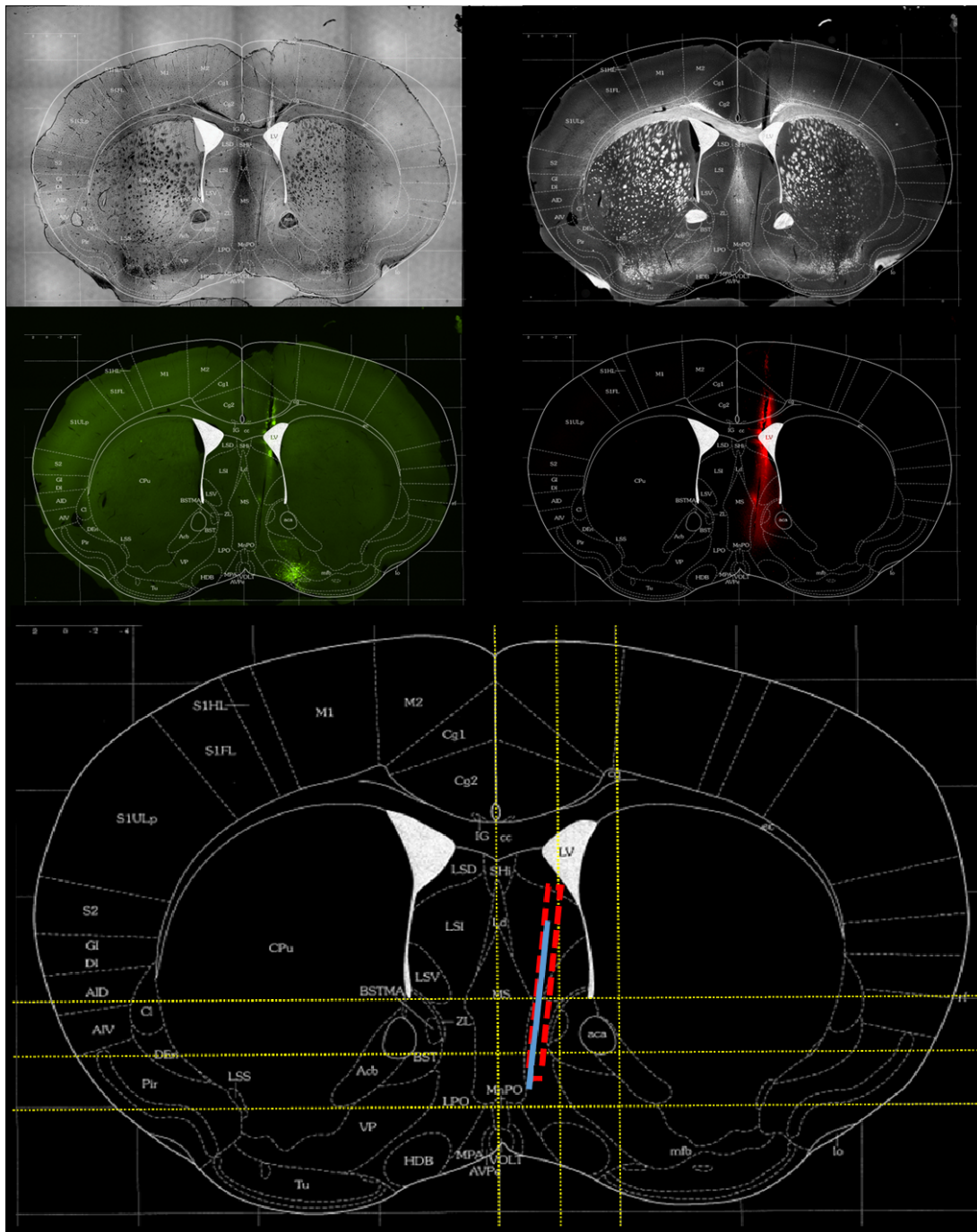
4.10. ÁBRA. A hisztológiai atlasz illesztése az első egér példáján. Az illesztést segítheti az MRI-felvétel által szolgáltatott információ az agykamrák pozíciójáról és az agy kontúrjáról. Fent (balról jobbra): A *post-op* CT-felvétel elektródot tartalmazó metszete, az MRI-felvétel megfelelő metszete, az elektród *bregmától* vett anteroposterior irányú távolságához legközelebbi metszet a hisztológiai atlaszból. Lent: *post-op* CT-felvétel fúziója a hisztológiai atlaszal.

4.3. Eredmények

A lokalizációs protokollt összesen négy – technikai okokból a 3.2. fejezetben tárgyalt állatoktól eltérő – egeren teszteltük, akikből az in vivo képalkotó méréseket követően a 2.6. fejezetben leírtaknak megfelelően hisztológiai felvételeket készítettünk a két módszer összehasonlításához és az in vivo módszer pontosságának verifikálásához (4.11. ábra). A hisztológiai lokalizációnál a bizonytalanság legnagyobb forrása, hogy az atlasz diszkrét, 0,12 mm-enként vett transzverzális metszetekből áll, ami alsó korlátot ad az anteroposterior irányú koordináta-leolvasás pontosságának, és egyben terheli a többi koordináta-leolvasási pontatlanságot is (hiszen az atlasz egy oldala csak egy konkrét anteroposterior koordinátának megfelelő metszetet jellemez pontosan). További hibaforrások a kiválasztott atlaszoldal szubjektív illesztésének pontossága, a metszetek preparálása során elkövetett pontatlanságok (ezek közül kiemelendő a nem tökéletesen az atlasz pozicionálásának megfelelő metszési irányok). Mindezek alapján, az in vivo módszer hibabecslésénél is használt logikát követve, egy 0,2 mm-es becslést tettünk a hisztológiai lokalizáció pontosságára (ez megfelel az anteroposterior irányú diszkretizáció felkerekített másfélszeres értékének).

Az implantációkról összességében elmondható, hogy egy sikeres, egy a terület szélét eltaláló (nem tökéletes, de potenciálisan hasznos eredményhez vezető) és két rontott beültetésünk volt, és a két módszer mind a négy esetben hibahatáron belüli egyezést mutató eredményt hozott (4.1. táblázat) – ez egyben azt is mutatja, hogy a két módszer pontosságára tett becslésünk feltehetőleg helytálló volt. Az elektródkoordináták közvetlenül a műtétet követően ellenőrizhetőek, így a két rontott esetben lehetőség van – az így feleslegessé vált – mérések elhagyására.

Másik fontos várakozásunk a módszerrel kapcsolatban, hogy a in vivo lokalizáció – és a kísérletek határfokának javulásán túl – pontosabb és részletesebb, háromdimenziós információt biztosít az esetlegesen rontott beültetések esetén a hiba forrásáról, ami a hisztológiai lokalizáció esetén csak részlegesen elérhető. A hiba okának pontos megértése nagy segítséget jelenthet a beültetéseket végző kutatónak, aki a következő műtéteket már ezeknek az információknak a figyelembevételével végezheti, és ezzel csökkentheti a szisztematikus hibák hatását.



4.11. ÁBRA. Példa a hisztológiai lokalizációra (a negyedik egér *bregmától* anterior irányban 0,62 mm-re lévő metszete). Fent a bright-field, dark-field, FITC és TRICH felvételek az illesztett atlaszal, alul a tetród fenti felvételek alapján rekonstruált útja (kék) megjelölve az atlaszon, összehasonlítva az *in vivo* lokalizáció eredményével a metszetnek megfelelő síkból (szaggatott piros)

		in vivo		hisztológia	
		koordináta (mm) [$\pm 0,15$]	Találat/ Hiba	koordináta (mm) [$\pm 0,2$]	Találat/ Hiba
1. egér	AP	0,34 - 1,03		0,38 - 0,98	
	ML	0,38 - 0,65	Találat	0,3 - 0,7	Találat
	DV	5,97		–	
2. egér	AP	0,65 - 1,03		0,62 - 0,86	
	ML	0,61 - 0,91	Találat	0,75 - 0,9	Találat
	DV	5,29		5,25	
3. egér	AP	0,67 - 1,1		0,5 - 0,86	
	ML	0,02 - 0,29	Hiba	0,05 - 0,25	Hiba
	DV	5,51		5,55	
4. egér	AP	0,21 - 0,72		0,26 - 0,62	
	ML	0,26 - 0,67	Hiba	0,25 - 0,5	Hiba
	DV	4,72		4,9	

4.1. TÁBLÁZAT. Az in vivo és a hisztológiai lokalizáció eredményei a négy állat esetében. Az anteroposterior (AP) és mediolaterális (ML) irányok mentén azt a tartományt olvastuk le, amelyet a tetród széttartó szálai lefednek, a dorzoventrális (DV) irányban az elektróda legventrálisabb pontját kerestük meg. Utóbbi az első egér esetében a hisztológia lokalizációnál hiányzik, mivel az elektród túlmént a metszet szélén.

4.3.1. Esettanulmányok

A következőkben négy példaállaton keresztül mutatom be a lokalizáció eredményét, a hibaforrásokat és a tanulságokat. A műtét célja mind a négy esetben az HDB terület eltalálása volt, bregmától számítva anterior irányban 0,75 mm; laterálisan 0,6 mm; ventrálisan 4,5 - 5,7 mm-es célkoordinátákkal (a műtét során az HDB-től dorzálisan ültetünk be, és a neurofiziológiai kísérlet során járjuk végig a területet az elektróddal).

(i) Első esettanulmány

Az első állat esetében a 4.12. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy mind mediolaterális, mind az anteroposterior iránnyal közel tökéletesen párhuzamos az elektród útja, ennek megfelelően az elektród eltalálta a célterületet. A

4.10. (beültetés után közvetlenül) és a 4.14. (kísérlet közben és végén) ábrákat vizsgálva megállapíthatjuk, hogy az elektród a terveknek megfelelően a célterülettől dorzálisan került beültetésre, és a kísérlet során ventrálisan bejárta a teljes célterületet, és végül az agy legalján is túlment (a dorzoventrális koordináták kismértékben eltértek a tervezettől).

(ii) Második esettanulmány

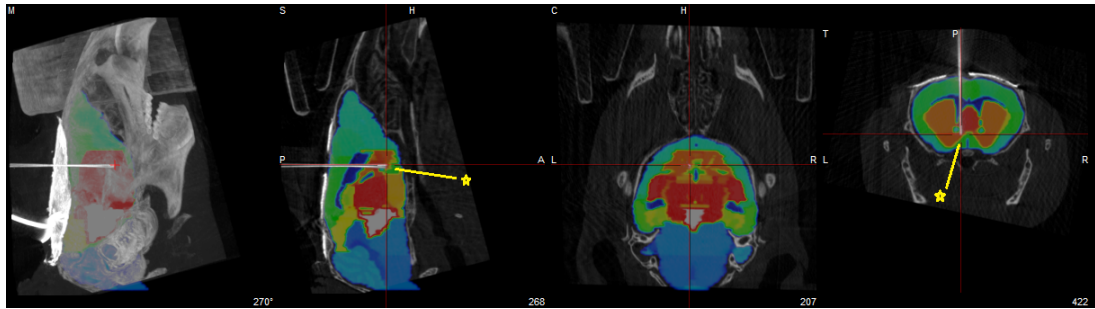
A második állat esetében a 4.13. ábrát vizsgálva észrevehetjük, hogy az elektród az anterior és laterális irányban is kismértékben (2° és 5° fok eltéréssel) ferde. Ez azt eredményezi, hogy az elektród végpontja anterior helyezkedik a tervhez képest, ahol a célterület mediálisan elhelyezkedő része található. Mivel az elektród laterálisan ferde, végeredményben az elektród egy része találja csak el a célterület szélső tartományát (4.15. ábra).

(iii) Harmadik esettanulmány

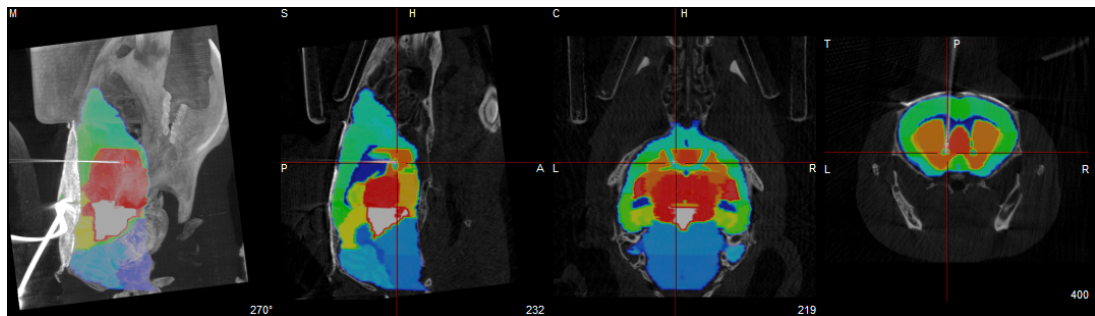
A harmadik példán (4.16. ábra) egy szerencsétlen eseményt láthatunk; a tetród szálak egy ponton megtörnek, és ezt követően várttól egészen eltérő irányban (60° anterior irányban) mozognak tovább, így az elektród nem találja el a célterületet. További hiba, hogy bár az elektród iránya közel párhuzamos a mediolaterális iránnyal, a beültetési pont túlságosan mediálisan helyezkedik el.

(iv) Negyedik esettanulmány

A negyedik példa az előző esethez hasonló eredményt hozott. A 4.17. ábrát vizsgálva észrevehetjük, hogy a tetródon az ábrán jelölt pontban egy hurok alakult ki, emiatt a tervezettől teljesen eltérő dorzoventrális koordinátára került beültetésre, továbbá a posterior és mediális irányban is jelentős mértékben ferde (50° és 60° fok), így hibás eredményhez jutottunk.



4.12. ÁBRA. *Post-op* CT – atlasz fúzió az első egér esetében. A piros kereszttek az elektród végének helyét, a sárga csillag a célterület jelöli. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet



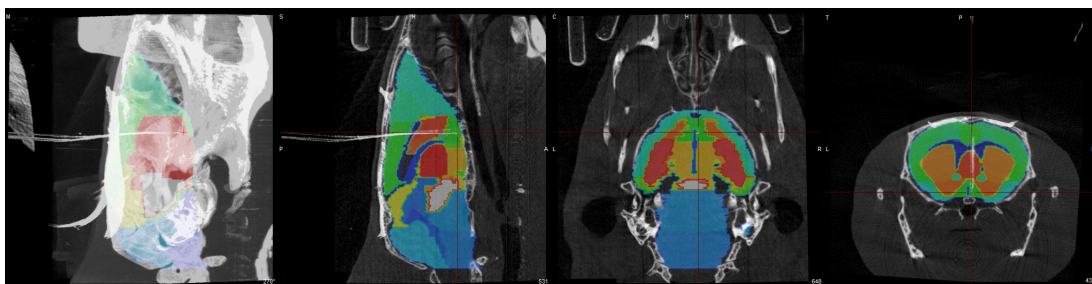
4.13. ÁBRA. *Post-op* CT – atlasz fúzió a második egér esetében. A piros kereszttek az elektród végének helyét jelölik. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet



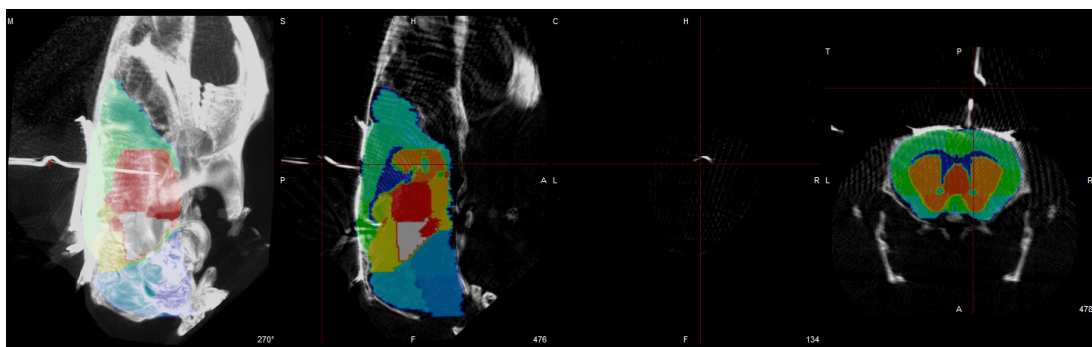
4.14. ÁBRA. Az első egér CT mérésének fúziója a hisztológiai atlasz megfelelően kiválasztott metszetével (*bregmától* anterior irányban 0,74 mm-re).



4.15. ÁBRA. A második egér CT mérésének fúziója a hisztológiai atlasz megfelelően kiválasztott metszetével (*bregmától* anterior irányban 0,74 mm-re).



4.16. ÁBRA. *Post-op* CT – atlasz fúzió a harmadik egér esetében. A piros keresztetek az elektród végének helyét jelölik. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet.



4.17. ÁBRA. *Post-op* CT – atlasz fúzió a negyedik egér esetében. A piros keresztetek a tetródokon kialakult hurok helyét jelölik. Balról jobbra: MIP, szagittális metszet, koronális metszet, transzverzális metszet.

5. fejezet

Összefoglalás és további tervek

Diplomamunkám keretében a 2. fejezetben bemutatott módszerek felhasználásával kidolgoztam és teszteltem egy teljeskörű kísérleti eljárás alapjait, amely alkalmas arra, hogy optogenetikailag azonosított kolinerg és dopaminerg neuronok viselkedését tudja vizsgálni extracelluláris elvezetés segítségével egérmodellekben, auditoros operáns tanulási feladat teljesítése közben, a témakiírásban megfogalmazott kritériumoknak megfelelően.

A munka kiterjedt a kísérleti környezet, a tanulási paradigma és a két rendszer egyidejű elektrofiziológiai vizsgálatát és az optogenetikai azonosítást megvalósító mikroelektróda megtervezésére és megvalósítására, valamint a tanulási feladat vezérlését és a viselkedési, illetve elektrofiziológiai eredményeket elemző kód implementálására több nyílt forráskódú szoftver felhasználásával (3.1. alfejezet).

A 3.2. alfejezetben ismertettem a kísérleti eljárás tesztelésének eredményét, amely megmutatta, hogy a feladat első fázisait az állatok ténylegesen képesek voltak gyorsan megtanulni, majd a teljes feladat bevezetésével új, (várakozásainknak megfelelően) változó nehézségű hangokat megtanulni. A kísérletek során sikerült optogenetikailag azonosítani egy dopaminerg sejtet, amelynek viselkedését egy új, jutalmat jelző hang bevezetése közben vizsgáltuk.

A sikeres elvezetés kritikus pontja, hogy a mikroelektródát pontosan a megfelelő agyi magba implantáljuk, amely komoly kihívást jelentő feladat. Emiatt egy külön fejezetet (4. fejezet) szenteltünk egy új elektródlokalizációs protokoll kidolgozásának pre-klinikai képalkotó eszközök (CT, MRI) használatával, amely a

korábban elérhető módszerekkel szemben *in vivo* körülmények között, közvetlenül a beültetést követően teremti meg az elektródpozíció meghatározásának lehetőségét, ezáltal drasztikusan javíthatja a területen folyó kutatások hatásfokát. A protokoll részét képezi egy kvalitatív módszer, amely egy háromdimenziós atlasz és a CT-felvételek fúziójával információt biztosít számunkra az elektród hozzávetőleges pozíciójáról, haladási irányáról, illetve az esetleges problémákról. A protokoll másik felét egy kvantitatív eljárás adja, amely a hisztológiai atlasz és a CT koordináta-rendszerének megfeleltetésével lehetőséget biztosít az elektróda pozíciójának leolvasására atlasz-koordinátaként, 0,15 mm-es pontossággal. A módszer pontosságát hisztológián alapuló lokalizációval összehasonlítva verifikáltuk.

A továbbiakban szeretnénk a kidolgozott eljárások alkalmazásával a kolinerg és a dopaminerg neuronok asszociatív tanulás egyes részelemeire adott választát vizsgálni statisztikailag elemezhető mennyiségű neuron felvételével. Célunk annak megértése, hogy a két rendszer hogyan kódol a feladatban olyan komplex viselkedési változókat, mint például az elvárt és a ténylegesen realizálódó jutalom különbsége vagy a megerősítés váratlansága, és feltárni, hogy a két rendszer milyen módokon és milyen mértékben reprezentál redundáns, korrelált és független információt a tanulás során. Ehhez statisztikai viselkedési és biofizikai neuronhálózati modelleket, továbbá hagyományos lineáris és nem lineáris információelméleti alapú korrelációs mértékeket fogunk használni.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Hangya Balázsnak a problémafelvetésért, értékes tanácsaiért és témám vezetéséért és Dr. Szigeti Krisztiánnak az *in vivo* lokalizáció kérdéseiben megosztott szakmai véleményéért, valamint hogy rendelkezésünkre bocsátotta a mérésekhez használt képalkotó eszközöket. Köszönet illeti továbbá Sviatkó Katalint, aki megtanította a kísérleti állatokkal végzett munka és az elektródimplantációs műtétek alapjait, Balázsfi Diánát, aki lokalizációs protokoll teszteléséhez az elektródok építését és implantálását végezte, valamint Dr. Nicola Solarit a kísérleti berendezés hibáinak kijavításában, Bús Flórát a tanulási feladat tervezésében, illetve tesztelésében és Horváth Ildikót az *in vivo* képalkotó mérések elvégzésében nyújtott segítségért.

Irodalomjegyzék

- [1] „Method of the year 2010,” *Nature Methods* **8** (2011).
- [2] J. Radon, „Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten,” *Berichte Sächsische Acad. Wissenschaft. Math. Phys., Klass* **69**, 262 (1917).
- [3] P. C. Lauterbur, „Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance,” *Nature* **242**, 190 (1973).
- [4] K. D. Harris, D. A. Henze, J. Csicsvári, H. Hirase, and G. Buzsáki, „Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements,” *Journal of Neurophysiology* **84**, 401 (2000).
- [5] „Hippocampal tetrode example,” (2018. május 25-ei állapot), URL <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/9/97/HippocampalTetrodeExample.png>.
- [6] A. Redish and N. Schmitzer-Torbert, „MClust spike sorting toolbox,” (2002).
- [7] N. Schmitzer-Torbert, J. Jackson, D. Henze, K. Harris, and A. Redish, „Quantitative measures of cluster quality for use in extracellular recordings,” *Neuroscience* **131**, 1 (2005).
- [8] P. C. Mahalanobis, *On the generalized distance in statistics* (National Institute of Science of India, 1936).
- [9] W. Röntgen, „Über eine neue Art von Strahlen: vorläufige Mitteilung,” *Sitzungsber. Phys. Med. Gesell.* (1895).

- [10] A. Einstein, „Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt,” *Annalen der Physik* **322**, 132 (1905).
- [11] A. H. Compton, „A quantum theory of the scattering of X-rays by light elements,” *Physical Review* **21**, 483 (1923).
- [12] J. D. Ingle Jr. and S. R. Crouch, *Spectrochemical analysis* (Old Tappan, NJ (US); Prentice Hall College Book Division, 1988).
- [13] R. A. Brooks and G. Di Chiro, „Principles of computer assisted tomography (cat) in radiographic and radioisotopic imaging,” *Physics in Medicine & Biology* **21**, 689 (1976).
- [14] D. Légrády, *Introduction to the mathematics of medical imaging* (Széchenyi Terv, 2012).
- [15] G. Breit and I. Rabi, „Measurement of nuclear spin,” *Physical Review* **38**, 2082 (1931).
- [16] M. Fox and I. I. Rabi, „On the nuclear moments of lithium, potassium, and sodium,” *Physical Review* **48**, 746 (1935).
- [17] I. Rabi, S. Millman, P. Kusch, and J. Zacharias, „The magnetic moments of Li_3^6 , Li_3^7 and F_9^{19} ,” *Physical Review* **53**, 495 (1938).
- [18] H. S. Stoker, *General, Organic, and Biological Chemistry, 7th Edition* (Cengage Learning, Boston, 2016).
- [19] M. A. Bernstein, K. F. King, and X. J. Zhou, *Handbook of MRI Pulse Sequences* (Elsevier Academic Press, San Diego, 2004).
- [20] J. Kertész, G. Zaránd, and A. Deák, *Statisztikus fizika* (BME - TÁMOP, 2013).
- [21] E. M. Haacke, R. W. Brown, M. R. Thompson, and R. Venkatesan, *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design* (Wiley-Blackwell, 1999).

- [22] J. Bai, T. L. H. Trinh, K.-H. Chuang, and A. Qiu, „Atlas-based automatic mouse brain image segmentation revisited: model complexity vs. image registration,” *Magnetic resonance imaging* **30**, 789 (2012).
- [23] J. Bai, T. L. H. Trinh K. Chuang and A. Qiu, „In vivo mouse brain atlas,” (2018. május 25-ei állapot), URL http://www.bioeng.nus.edu.sg/cfa/mouse_atlas.html.
- [24] G. Paxinos et al., *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, 2013).
- [25] N. Solari, K. Sviatkó, T. Laszlovszky, P. Hegedűs, and B. Hangya, „Open source toolkit for temporally controlled rodent behavior suitable for electrophysiology and optogenetic manipulations,” *bioRxiv* p. 243469 (2018).
- [26] J. Sanders, „Bpod – Open source rodent behavior measurement and control,” (2018. május 25-ei állapot), URL <https://github.com/sanworks/Bpod>.
- [27] B. Hangya, S. P. Ranade, M. Lorenc, and A. Kepecs, „Central cholinergic neurons are rapidly recruited by reinforcement feedback,” *Cell* **162**, 1155 (2015).
- [28] J. Sanders, „Bpod State Machine – Open platform for precision animal behavior measurement,” (2018. május 25-ei állapot), URL <https://sanworks.io/shop/viewproduct?productID=1027>.
- [29] Intan, „RHD2132 /RHD2216 amplifier / accelerometer boards,” (2018. május 23-ai állapot), URL http://www.intantech.com/RHD2132_RHD2216_amp_accel_board.html.
- [30] J. H. Siegle, A. C. López, Y. A. Patel, K. Abramov, S. Ohayon, and J. Vogt, „Open Ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology,” *Journal of Neural Engineering* **14**, 045003 (2017).
- [31] J. I. Sanders and A. Kepecs, „A low-cost programmable pulse generator for physiology and behavior,” *Frontiers in Neuroengineering* **7**, 43 (2014).
- [32] K. Shimizu and Y. Fukada, „Stereotaxic surgery for suprachiasmatic nucleus lesions in mice,” *Bio-protocol* **7**, 12 (2017).

-
- [33] A. Kepecs, Z. F. Mainen, S. P. Ranade and B. Hangya, „Cellbase – MATLAB-based data base and analysis functions for neural recordings.” (2018. május 25-ei állapot), URL <https://github.com/hangyabalazs/CellBase>.
- [34] W. Schultz, „Dopamine reward prediction error coding,” *Dialogues in Clinical Neuroscience* **18**, 23 (2016).