

# Elméleti módszerek idegsejtek neurofiziológiai viselkedésének vizsgálatára kísérleti adatok alapján

Doktori tézisek

**Cserpán Dorottya Rita**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Somogyvári Zoltán, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Fiáth Richárd, Ph.D., tudományos munkatárs  
Dr. Kozák Lajos, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Dr. Alpár Alán, MTA doktora, egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Dobolyi Árpád, MTA doktora, tudományos tanácsadó

Dr. Madarász Emília, MTA doktora, professor emerita

Budapest  
2018

# 1. Bevezetés

Napjainkra lehetségessé vált az egyes idegsejtek aktivitásának és viselkedésben betöltött szerepének mélyreható tanulmányozása, megértése. Továbbá az idegsejtek fizikai modellezése is fejlett, azonban ez nem jelenti, hogy teljesen értjük a neuronokra érkező bemenetek hatását és szerepét.

A multielektroda-rendszerek gyors fejlődése lehetővé teszi, hogy az idegsejtek elektrofiziológiai viselkedéséről minél több részletet rögzítsünk. A modern kísérleti módszerekkel párhuzamosan új elméleti módszerekre is szükség van, amelyek az adatok feldolgozását és a minél több információ kinyerését lehetővé teszik.

Ezen módszerek, mint bármely más, a valóság modelljén alapuló módszer, nem tökéletesek és sok esetben az ebből fakadó hibákat nem ismerjük vagy nem vesszük figyelembe. Például, jelenleg is folyik a mért, illetve számolt egy idegsejthez kötődő monopól aktivitásról kialakult diskurzus, hiszen ez sérti a kvázisztatikus feltételezést, mely fontos feltételezés sok módszerben. Ezen a jelenség azonban a mérési-, számolási módszerek limitációjával is magyarázható, mint azt a disszertációban megmutatjuk. Mindezek ellenére ezen módszerek új és elengedhetetlen információt nyújtanak a kutatás során.

A disszertáció első részében az egyes idegsejtek áramforrás-sűrűség rekonstruálásához használt módszerekhez kötődő eredményeinket mutatjuk be, ezután pedig az skCSD [1] módszert, mely képes az egyes idegsejtek morfológiáján rekonstruálni az áramforrásokat.

## 2. Célkitűzés

### **1. A kísérleti módszerek limitációjának vizsgálata a monopól áramforrás megjelenését illetően**

Célunk a kísérletekben mért és azóta is vitatott monopól áramforrások megfigyeléséhez vezető okok megértése, megmagyarázása. Megvizsgáljuk az extracelluláris tér véges mintavételezésének szerepét a monopól momentum megjelenésében.

### **2. Az sCSD módszer érzékenységének vizsgálata a kísérleti elrendezés tökéletlenségét illetően**

Az sCSD módszer [2] egyik fő feltételezése, hogy az idegsejt fő tengelye párhuzamos a lineáris elektródával. Ez kísérletileg nagyjából megvalósítható, például az agy felszínére merőlegesen beszúrt lineáris elektróda a piramisjelekkel párhuzamos. Megvizsgáljuk, hogy mekkora torzítást jelent a rekonstrukcióban ezen feltevés sérülése.

### **3. Az skCSD módszer bevezetése és validálása**

Az skCSD módszer célja az idegsejtek elektrofiziológiai viselkedésének finom részleteinek felderítése a membrán-áramforrassűrűség-eloszlások becslésével. A multielektroda-rendszerek magas tér- és időbeli felbontásának köszönhetően az skCSD módszer ms alatti és pár 10  $\mu\text{m}$  körüli térbeli felbontással bír. Továbbá az új módszer bevezetésének fontos része a változatos eseteken való validálás. Ez kihívást jelent kísérletesen

és szimulációs eseteken is, rendelkezésre álló eszközeink miatt mi főleg ez utóbbival foglalkozunk.

A disszertációban először az skCSD eljárás elméleti levezetését mutatjuk be, azaz az extracelluláris potenciálok és membránáramforrások közötti kapcsolat leírását. Ezután a módszer validálása következik szimulált adatokon. Ez többféle szempontból is előnyös: lehetővé teszi az “igazi” áramforrassűrűség-eloszlás ismeretét és az azzal való összehasonlítást. A sokféle, tetszőlegesen megválasztott, elrendezésen lehet tesztelni kezdve az egyszerűbb esetektől a komplexekig. Végül a módszert kísérleti adaton is alkalmazzuk.

### 3. Módszerek

A célkitűzésben megfogalmazott pontok vizsgálatához főként az idegsejtek elektrofiziológiai viselkedéséhez kapcsolódó szimulált, alkalmanként pedig kísérleti adatokat használtunk. R és Python nyelvekben írt szkriptek futtatásával a Neuron és LFPy szoftvercsomagok segítségével egyszerű és biológiailag releváns szimulált adatokat generáltunk. A virtuális elrendezéseket úgy választottuk meg, hogy a generált adat változatos legyen és az adott szempontból fontos tulajdonságokat tartalmazza. Az skCSD módszer validálásához használt kísérleti adat pedig olyan extracelluláris potenciálokat tartalmazott, melyek 14 csatornás, hippocampális szeletből történő elvezetéssel kerültek rögzítésre. Ezen kívül egy közeli idegsejten patch-clampes technikával intracelluláris mérés is történt, illetve az idegsejt morfológiája is rekonstruálásra került. Ezek alapján az adatok előfeldolgozása után tüske-triggerelt átlagot számoltunk.

Az áramforrassűrűség-eloszlások számolására a tCSD, sCSD és vCSD módszereket használtuk. Amíg a tCSD a legrégebbi, legegyszerűbb és legelterjedtebb módszer, addig a másik két idegsejtek populációinak áramforrassűrűség-eloszlásainak becslésére használt módszer fejlettebb matematika eszköztár segítségével, több paraméter használatával ugyan, de pontosabb eredményt nyújtanak. Az skCSD módszer kifejlesztésénél pedig építettünk a kCSD eljárásban alkalmazott matematikai formalizmusokra, azaz a kernel-trükkre. Az skCSD módszer az sCSD módszer fő céljában képez előrelépést, azaz az egyes idegsejtek áramforrás- sűrűség-eloszlásainak pontosabb becslésében.

## 4. Eredmények

Az eredményeket három fő téma köré csoportosítva a következő tézispontokban fogalmaztuk meg:

### **1. Az extracelluláris potenciálok véges térbeli mintavételezése az idegsejtek nem nulla monopól áramforrás értékének méréséhez vezet**

Szimulációkon keresztül megvizsgáltuk az idegsejtek látszólagos monopól áramforrásának kiméréséhez használt kísérleti és matematikai eszközök limitációit. Két különböző morfológiájú idegsejt elektrofiziológiai viselkedését szimuláltuk és az ehhez kapcsolódó extracelluláris potenciálokat a tér különböző pontjain rögzítettük. Ezeket a pontokat úgy választottuk meg, hogy egy rácsot alkossanak, a különböző esetekben különböző rács-állandóval. A tCSD és vCSD módszereket használuk az áramforrassűrűség-eloszlások becslésére. Ezután kiszámoltuk a monopól, dipól és kvadrupól momentumokat. Ahogy vártuk, minél nagyobb a rácsállandó, annál rosszabb a felbontás minősége és annál nagyobb a megjelenő monopól értéke.

### **2. Az sCSD módszer rekonstrukciója stabil még a jelentős mértékű az elrendezésre vonatkozó feltétel sérülése esetén is**

A lineáris sejt modell pozícióját az elrendezésben 2 szög és a sejt-elektroda távolság ( $d$ ) segítségével írtuk le.  $\alpha$  az elektródával való párhuzamossághoz képesti dőlési szöget jelenti,  $\beta$  pedig az elfordulást. A nem ideális elrendezésből adódó torzulás megállapítására ismert áramforrassűrűség-eloszlást generáltunk a sejten, az  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $d$  változóknak adott értéket választottunk, ám a

rekonstrukciót úgy végeztük el, mintha az sCSD módszer feltételei teljesülnének. Azt találtuk, hogy az sCSD módszer jobban teljesít mint a tCSD, amennyiben a dőlési szög nem túl nagy, azaz még kísérletesen is könnyen megvalósítható. Továbbá tapasztalataink szerint a távolságbecslést a reális dőlési szögek kevésbé befolyásolják.

### **3.1 A bevezetett skCSD módszer célja az egyes idegsejtek áramforrássűrűség-eloszlásának rekonstrukciója a sejt morfológiáján**

A áramforrássűrűség-eloszlás és a mért extracelluláris potenciálok közötti kapcsolat leírásához kernel függvényeket használtunk. Ezeket bázisfüggvényekből építettük fel, melyek a potenciálok és az áramforrássűrűség-eloszlások terén vannak értelmezve. A sejt morfológiáját egy hurokra képeztük le, amelyet lefedtünk az áramforrássűrűséghez kapcsolódó bázisfüggvényekkel.

A módszernek 3 paramétere van: a gaussos bázisfüggvények száma és szélessége, valamint a regularizációs paraméter. A paraméterek ideális értékét kereszt-validációs hibával vagy szimulált adatokon való hangolással kapjuk meg.

### **3.2. Az skCSD módszer képes egyszerű és komplex áramforrássűrűség-eloszlások rekonstrukciójára szimulált adatokon**

A labda-rúd idegsejtmodell és lineáris próba elrendezés esetén a módszer alapvető tulajdonságait néztük. Megmutattuk, hogy több elektróda alkalmazása esetén jobb térbeli felbontás érhető el, a mért potenciálokat előállító magasabb CSD Fourier-módusok vagy részletesebb szinaptikus bemeneti mintázatok rekonstruálhatók.

Az Y-alakú idegsejt modellen megmutattuk, hogy a módszer képes a különböző ágakra érkező bemeneteket megkülönböztetni, továbbá vizsgáltuk a zaj hatását különböző számú elektródák esetén.

A ganglionsejt modellje volt a legkomplexebb és egyúttal biológiailag releváns modellünk, a becsült áramforrások sűrűség-eloszlásokon terjedési mintázatokat figyeltünk meg. Továbbá a rekonstrukció tesztelésén kívül az ideális kísérleti elrendezésre vontunk le következtetéseket a különféle elektróda kiosztások segítségével.

### **3.3. Az skCSD módszer releváns rekonstrukciót nyújt kísérleti adaton alkalmazva is**

Végül a módszert egy kísérleti adaton teszteltük, mely során párhuzamos intra- és extracelluláris mérés készült egy hippocampális szelet sejtjéről patch-clamp és egy 14 csatornás elektróda használatával. Mivel ebben az esetben nem állt rendelkezésre a valós áramforrások sűrűség-eloszlás, a módszer optimális paramétereit szimulációk segítségével állapítottuk meg. A módszert a kísérleti adatból kapott tüske-triggerelt átlagon alkalmaztuk, így a rekonstrukció az akciós potenciál képződését mutatja.



## 5. Következtetések

Feltételeztük, hogy az extracelluláris tér diszkrét tér- és időbeli mintavételezése valamint az alkalmazott módszerek közelítéseinek hatása hozzájárul a monopól áramforrások megfigyeléséhez. A feltevéseink alátámasztására szimulációt használtunk, mely során egy tüzelő idegsejthez kötődő extracelluláris potenciálokat egy 3 dimenziós elektródaráccsal rögzítettük. Mivel a véges mintavételezés vizsgálódásaink alapján hozzájárul a monopól áramforrások “megjelenéséhez”, a kvázisztatikus közelítés, mely rengeteg módszer alapját képezi, érvényessége nem elvetendő.

Az sCSD módszer célja az egyes idegsejtek áramforrassűrűség-eloszlásainak becslése egy egyenes szakaszból álló sejtmodellen. Ez a módszer rendhagyó feltételezésekkel él a kísérleti elrendezést és a sejt-elektróda távolság becslését illetően. Annak érdekében, hogy megértsük a módszer limitációit illetve az eredmények hitelességét, a disszertációban olyan szimulált eseteket tanulmányoztunk, melyekben az sCSD eljárás fő feltevése sérül. Az sCSD módszer jól teljesített,  $\alpha = 20^\circ$  dőlési szög esetén is elfogadható hibát adott. Ez már egy olyan érték, mely alatti pontosság egy kísérletben elérhető.

A kifejlesztett skCSD módszer célja ugyancsak az egyes idegsejtek áramforrassűrűség-eloszlásainak becslése extracelluláris potenciálokból, de az idegsejt morfológiáján. Az eljárást számos szimulált illetve egy kísérleti adaton validáltuk.

A rekonstrukció és az ismert áramforrassűrűség-eloszlás összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a gyengétől a hitelesig

változik a minőség mikor az elektródák száma elegendően nagy a finom részletek rögzítéséhez.

Az Y-alakú sejt esetén megmutattuk, hogy a különböző ágaira érkező bemenetek megkülönböztethetőek. Az skCSD módszer értelmes információt nyújt a membrán áramforrássűrűség-eloszlásairól azon esetekben, mikor az interpolált potenciál és egyéb CSD módszerek nem informatívak. Továbbá a rekonstrukció nem érzékeny az elektródák elrendezésére és adott méretű zaj esetén is stabil a rekonstrukció.

A ganglionsejt morfológiát és kereskedelmi forgalomban kapható multielektroárcsot használó szimuláción megmutattuk, hogy biológiailag releváns, zajos esetben is alkalmazható a módszer.

Tehát az skCSD módszer megfelelően teljesített a kísérleti adat esetén is, még ha az csak a sejt tüzelésre átlagolt tér-időbeli áramforrássűrűség-eloszlás mintázatok becslését jelentette is.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### **Disszertációhoz kapcsolódó publikációk**

[1] Cserpán D., Meszéna D, Wittner L, Tóth K, Ulbert I, Somogyvári Z, Wójcik D: Revealing the Distribution of Transmembrane Currents along the Dendritic Tree of a Neuron with Known Morphology from Extracellular Recordings eLife 2017;6:e29384 DOI: 10.7554/eLife.29384

[2] Somogyvári Z, Cserpán D., Ulbert I, Érdi P: Localization of single cell current sources based on extracellular potentials patterns: the spike CSD method, European Journal of Neuroscience 36, Issue 1, November 2012.

### **Egyéb publikációk**

[3] Kántor O, Cserpán D., Völgyi B, Lukáts A, Somogyvári Z: The Retinal TNAP. In: Fonta C., Négyessy L. (eds) Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP). Subcellular Biochemistry, vol 76. Springer, Dordrecht. 2015

[4] Zátonyi A, Borhegyi Z, Srivastava M, Cserpán D., Somogyvári Z, Kisvárday Z, Fekete Z: Functional brain mapping using optical imaging of intrinsic signals and simultaneous high-resolution cortical electrophysiology with a flexible, transparent microelectrode array, Sensors and actuators B-chemical 27: pp. 519-526. (2018)

[5] Zátonyi A, Borhegyi Z, Cserpán D., Somogyvári Z, Srivastava M, Kisvárday Z, Fekete Z: Optical Imaging of Intrinsic Neural Signals and Simultaneous MicroECoG Recording Using Polyimide Implants. Proceedings 1: Paper 610. 4 p. (2017)