

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki

**Bartosz Jura**

Nr albumu: 307409

**Analiza połączeń funkcjonalnych  
kora-hipokamp w trakcie hipokampalnych  
oscylacji lokalnego potencjału polowego typu  
ripples.**

Praca magisterska

na kierunku Zastosowania fizyki w biologii i medycynie

specjalność Neuroinformatyka

Praca wykonana pod kierunkiem

**dr hab. Tiazy Bem**

Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej

im. Macieja Nałęcza PAN

oraz

**dr hab. Macieja Kamińskiego**

Uniwersytet Warszawski

Warszawa, lipiec 2015

*Oświadczenie kierującego pracą*

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data

Podpis kierującego pracą

*Oświadczenie autora pracy*

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

## Streszczenie

Celem pracy było zbadanie oddziaływań pomiędzy korą a hipokampem w trakcie konsolidacji pamięci, zwłaszcza podczas występujących wtedy epizodów oscylacji LFP typu *ripple*. Dokonano przeglądu literatury pod kątem tematu oddziaływań angażujących korę i hipokamp, z naciskiem właśnie na fazę konsolidacji pamięci. Przeprowadzono analizę występowania i właściwości epizodów *ripple* w rejestracjach LFP u sześciu zwierząt doświadczalnych. Zbadano zmienność stanów fizjologicznych u poszczególnych zwierząt, szukano przede wszystkim odcinków snu wolnofalowego, sprawdzono jak długo trwał i jaka była jego relacja z epizodami *ripple*. Wykonano analizę oddziaływań pomiędzy korą a hipokampem przy użyciu metody DTF na odcinkach w trakcie *ripple*, a także tuż przed i tuż po zakończeniu tych epizodów. Porównano wyniki u zwierząt w grupie kontrolnej i w grupie testowej z podanym środkiem amyloid beta, realizującej model choroby Alzheimera. Niektóre rezultaty uzyskane za pomocą metody DTF wzbudziły pewne wątpliwości co do swojej wiarygodności. Postarano się wyjaśnić przyczyny takiego stanu rzeczy, a mogły one leżeć w samym charakterze analizowanych danych.

## Słowa kluczowe

konsolidacja pamięci, hipokamp, pacjent H. M., LFP, ripple, SWS, analiza parametryczna, DTF

## Dziedzina pracy (kody wg programu Socrates-Erasmus)

13.2 - Fizyka

## Tytuł pracy w języku angielskim

Analysis of the functional connections between cortex and hippocampus during hippocampal LFP oscillations called ripples.

# Spis treści

1	Wprowadzenie.	6
2	Pamięć krótkotrwała.	9
3	Pamięć długotrwała.	10
4	Pamięć deklaratywna.	12
5	Środkowy płat skroniowy.	13
6	Hipokamp.	13
7	Sen wolnofalowy.	15
8	Kompleks ostra fala - <i>ripple</i> .	16
9	Odtwarzanie.	19
10	Aktywność całego mózgu w trakcie <i>ripple</i> .	20
11	Zaburzenia w formowaniu pamięci.	22
12	Oddziaływanie kora - hipokamp.	23
12.1	Fale teta. . . . .	26
12.2	Szybka i wolna gamma. . . . .	30
12.3	Fale z zakresu <i>ripple</i> . . . . .	31
12.4	Fale delta. . . . .	31
12.5	Poziom pojedynczych komórek. . . . .	32
12.6	Kierunek oddziaływań. . . . .	32
13	Cele badania.	33
14	Analiza parametryczna.	35

<b>15</b>	<b>Wielozmienny model autoregresyjny.</b>	<b>36</b>
<b>16</b>	<b>Metoda DTF.</b>	<b>37</b>
<b>17</b>	<b>Przebieg eksperymentów na zwierzętach.</b>	<b>40</b>
<b>18</b>	<b>Model choroby Alzheimera u zwierząt.</b>	<b>41</b>
<b>19</b>	<b>Analiza danych.</b>	<b>42</b>
19.1	Wstępne przetwarzanie sygnałów. . . . .	42
19.2	Szukanie snu wolnofalowego. . . . .	43
19.3	Analiza epizodów <i>ripple</i> . . . . .	54
19.4	Występowanie <i>ripple</i> w różnych stanach fizjologicznych. . . . .	60
19.5	Wybór kanałów do analizy. . . . .	60
19.6	Decymacja i jej związek z DTF. . . . .	61
19.7	Stabilność modelu w metodzie DTF. . . . .	62
19.8	Analiza DTF. . . . .	63
<b>20</b>	<b>Dyskusja.</b>	<b>75</b>
<b>21</b>	<b>Dlaczego DTF nie chciał działać.</b>	<b>77</b>
<b>22</b>	<b>Symulacje.</b>	<b>79</b>
<b>23</b>	<b>Podsumowanie.</b>	<b>82</b>

# 1 Wprowadzenie.

Jeszcze na początku drugiej połowy XX wieku ludzie mieli bardzo mgliste pojęcie, żeby nie użyć dosadniejszego określenia i nie powiedzieć, że nie wiedzieli praktycznie nic, o fizjologicznych podstawach pamięci. Przypuszczano, że funkcje odpowiedzialne zarówno za formowanie pamięci jak i gromadzenie i przetwarzanie wspomnień rozproszone są po różnych obszarach mózgu, głównie w szeroko ujętej korze mózgowej, a zaangażowane w cały proces obwody komórkowe są wspólne i uczestniczą również w ogólnej aktywności intelektualnej i percepcyjnej. Nie podejrzewano, żeby tworzenie nowych wspomnień, zachodzące przecież u człowieka bezustannie, w tak różnych okolicznościach, miało się odbywać w jakiejś jednej, sprecyzowanej lokalizacji. Nie wiedzano o żadnej konkretnej strukturze, której można by przypisać podobną funkcję i na której mógłby spoczywać główny ciężar w procesach związanych z pamięcią. O jakikolwiek postęp w tej dziedzinie badań czy zdobycie bardziej szczegółowych informacji było wtedy niezmiernie ciężko, i nie trudno się temu dziwić, na przeszkodzie stał bowiem brak niezbędnych technik doświadczalnych, brakowało sprzętu i wystarczająco zaawansowanej metodologii badań, pozwalających na uzyskanie miarodajnych wyników, bez nadmiernego uszczerbku na zdrowiu osoby poddanej badaniu. Stojąc w obliczu tak niedostatecznych środków, trudno jest zgłębić lub choćby w niewielkim stopniu naruszyć tak złożony problem, jakim z całą pewnością jest ludzka pamięć. Ażeby bowiem starać się poznać namacalne, komórkowe mechanizmy kryjące się za zjawiskiem takim jak pamięć, należy od ogólnej obserwacji zachowania pacjenta, dość niezobowiązującej i opartej na podstawach psychologicznych, przejść do badania i klasyfikacji konkretnych struktur mózgowych i starać się powiązać ich działanie z całościowym funkcjonowaniem jednostki. Do tego zadania potrzebny jest sposób na precyzyjny pomiar aktywności poszczególnych obszarów mózgu, umożliwiający dotarcie i wydzielenie objawów czynności danej struktury z całego, otaczającego ją gęstoczu zwojów mózgowych. Jeśli dana struktura jest rozmiarów niewielkich i znajduje się w głębi, przykryta wierzchnią warstwą kory mózgowej, zwykły zapis czynności elektrycznej

mózgu EEG, rejestrowany z powierzchni głowy, będzie zwykle niewystarczający. Pierwsze, pionierskie badania wykorzystujące wewnątrzczaszkowy zapis czynności elektrycznej (Elektrokortikogram, ECoG), przeprowadzono natomiast dopiero w latach pięćdziesiątych XX wieku, na pacjentach dotkniętych epilepsją. Stawiano wtedy dopiero pierwsze kroki, a jakość i wobec tego przydatność uzyskiwanych zapisów, dla celów innych niż lokalizacja silnych wyładowań padaczkowych, nie była duża. W momencie więc, gdy nic nie wskazywało na to, żeby przynajmniej w najbliższej przyszłości miał się dokonać jakikolwiek przełom w kwestii badań nad pamięcią, wtedy dość nieoczekiwanie, w sposób całkowicie przypadkowy, z pomocą przyszedł badaczom pacjent znany w literaturze pod inicjałami H. M. [1] [2].

Pacjent H. M. po wypadku rowerowym jakiemu uległ w młodości cierpiał na dotkliwe, nasilające się napady padaczkowe. Stopień intensywności choroby doszedł z czasem do tego poziomu, że zaczął uniemożliwiać pacjentowi kontynuowanie pracy zawodowej i normalne funkcjonowanie w ogólności. Zwykle leki nie pomagały, zdecydowano się wobec tego na zabieg chirurgiczny i wycięcie kawałka mózgu, zawierającego domniemane źródło, z którego ataki padaczkowe rozprzestrzeniały się na całą jego resztę. Obszarem zakwalifikowanym do wycięcia i ostatecznie usuniętym, była większa część środkowego płata skroniowego, w obu półkulach. Główną strukturą, która znalazła się w usuniętym fragmencie, a która wzbudziła potem najżywsze zainteresowanie, był hipokamp.

W miarę rozwoju technik pomiarowych, późniejsze, dokładniejsze badania przy użyciu skanera MRI, a także, już po śmierci pacjenta M. H., trójwymiarowe modele struktury jego mózgu, który został pobrany, pocięty na plastry i odpowiednio spreparowany, ujawniły dokładniejszy obraz uszkodzeń spowodowanych przez interwencję chirurgiczną [3]. Cięcia były w istocie nieco mniej rozległe niż wówczas sądzono, na swoim miejscu pozostał drobny zewnętrzny fragment zakrętu kory przyhipokampalnej, poza samym hipokampem wycięto jednak także jądro migdałowe i większą część zakrętu kory przyhipokampalnej. Stwierdzono też ślady cięć w innych miejscach, dochodzące do kory, nie jest jednak pewne czy podobne uszkodzenia zostały spowodowane wprost ingerencją chirurgiczną, czy może pojawiły się z innych przyczyn w późniejszym okresie życia pacjenta. Niezależnie

jednak od obecnych, bardziej aktualnych ustaleń, to co stało się z pacjentem tuż po operacji przykuło największą uwagę do samego hipokampu, jako struktury w owym czasie najlepiej znanej. Cały ów obszar, który został usunięty, określano wtedy bowiem jeszcze jako „rejon” czy „sferę” hipokampu i nie znano szczegółowego, funkcjonalnego podziału na mniejsze podstruktury wchodzące w skład i okolice środkowego płata skroniowego.

Wkrótce po operacji stwierdzono, że zabieg przyniósł spodziewany efekt, a ataki epileptyczne ustały, jednocześnie odkryto jednak także, że pacjent nie jest w stanie zapamiętywać nowych, spotykających go zdarzeń, a nabyte informacje zaraz ulatują mu z pamięci. Poza tym wszelkie inne funkcje intelektualne wydawały się nietknięte, pozostawione przez operację w stanie, w jakim były dotychczas. Co więcej, pacjent w stopniu normalnym, nie gorzej od przeciętnej wśród zwykłych ludzi, zachował wspomnienia z odległej nawet przeszłości, takie, które posiadał jeszcze przed operacją. Okazało się, że usunięcie hipokampa wywołało u pacjenta H. M. amnezję. Amnezję szczególnego typu bo przejawiającą się jedynie w niezdolności do nabywania nowych wspomnień, a nie wywierającą destrukcyjnego wpływu na wspomnienia już posiadane. Od tego czasu poddano pacjenta niezliczonym testom i badaniom, a jego przypadek stał się impulsem do wzmożonych, zakrojonych na szeroką skalę badań nad hipokampem i jego związkiem z pamięcią. Poprzez systematyczną obserwację pacjenta stwierdzono między innymi, że czas, w którym, tuż po nabyciu, potrafi daną informację utrzymać w pamięci nie jest stały i ściśle określony, a raczej zależy od różnych czynników. Natężenie uwagi miało przy tym swój znaczny udział, dzięki skupieniu bowiem, pacjent był w stanie pamiętać nowy fakt bądź wydarzenie aż do 15 minut, mógł swobodnie prowadzić konwersację lub odliczać wstecz. Przy jej braku natomiast lub gdy w grę wchodziły bodźce niewerbalne, jak obrazki bądź twarze ludzkie, zapomnienie przychodziło zwykle już po minucie. Obserwacje powyższe wraz ze wspomnieniami pacjenta z czasu przed operacją, zachowanymi w stopniu najwyraźniej nienaruszonym, potraktowane zostały jako niezmiernie wyrazisty dowód na poparcie tezy o istnieniu dwóch rodzajów pamięci, pamięci krótkotrwałej i pamięci długoterminowej



## 2 Pamięć krótkotrwała.

Otoczenie zewnętrzne i wszystkie jego składniki, obiekty, dźwięki i wydarzenia, wśród których znajduje się człowiek w czasie teraźniejszym i które postrzega w sposób świadomy, trafiają do systemu pamięci krótkotrwałej. Podobnie dzieje się w przypadku zdarzeń umysłowych, najświeższych myśli i rozważań, które pozostają przez moment do dyspozycji właściciela, a jeśli nie poświęci się im dalszej uwagi, po pewnej chwili ulegają zapomnieniu. Pojemność pamięci tymczasowej odpowiadająca ilości różnych informacji jakie mogą jednocześnie znajdować się w jej zasobach, jest ograniczona. Uważa się, że istnieje dosyć niewielka liczba dostępnych tak zwanych „gniazd”, przy czym każde z nich pomieścić może nie więcej niż jeden odrębny element. Objętość pojedynczego elementu nie jest jednak ściśle ustalona, a w zależności od tego jak wiele informacji uda się skondensować w jedną, w miarę integralną całość, faktyczna pojemność pamięci może podlegać wahaniom. W zadaniu polegającym na zapamiętywaniu ciągu cyfr, przeciętny człowiek jest w stanie dojść do około siedmiu i wg klasycznych prac, na tym przykładzie liczbę owych elementów szacuje się właśnie na tyle, z dokładnością do dwóch [4] [5].

Ślady pamięciowe mogą brać swe pochodzenie z różnych modalności zmysłowych i każdy z nich może posiadać swoje własne specyficzne cechy, bodźce wzrokowe mogą zachowywać się inaczej niż te pochodzenia werbalnego.

Podobna zdolność do utrzymania nowych bodźców w pamięci przez pewien krótki czas, niezbędna jest aby człowiek mógł funkcjonować w sposób poprawny. Pozbawiony jej, nie byłby w stanie poradzić sobie z sytuacją w środowisku zewnętrznym jaka go spotyka, z utrzymaniem relacji społecznych, nie potrafiłby reagować odpowiednio na nieustannie zmieniające się warunki zewnętrzne. Co więcej, określona pojemność pamięci tymczasowej potrzebna jest aby przyswajać nowe informacje i tym samym zdobywać wiedzę i uczyć się.

Obiekty złożone w tymczasowych obwodach pamięciowych, przez czas swojego trwania dostępne są na potrzeby bieżących procesów myślowych, umysł może je przywoływać,

przetwarzać, korzystać z nich według aktualnych potrzeb. System, w ramach którego się to odbywa, klasyfikuje się jako jeszcze inny rodzaj pamięci, określany jako pamięć robocza [7].

Przedział czasowy, w którym pojedyncza informacja może utrzymać się w pamięci podręcznej, bez aktywnego podtrzymywania, określa się na mniej więcej od 15 do 30 sekund. Dokładna wartość w każdym przypadku może wahać się w zależności od różnych czynników, jak stopień zakłóceń wywoływanych przez natłok innych bodźców i myśli, które dążą by zająć miejsce dotychczasowych śladów pamięciowych. Gdy odpowiedni czas mija, a uwaga człowieka nie jest poświęcona danemu przedmiotowi ale skupiona gdzie indziej, przychodzi zapomnienie. Kwestią o największym znaczeniu jest właśnie uwaga, świadome skupienie na konkretnym przedmiocie, które może znacząco wydłużyć czas jego przebywania w pamięci tymczasowej. Jeśli wykorzystywanie danej informacji trwa wystarczająco długo, jeśli powtarza się i wraca do niej, jej ślad może przybrać formę mniej podatną na interferencje, a ostatecznie trafić do pamięci długotrwałej [6].

Specyficzna lokalizacja, w której miałyby mieścić się tymczasowe ślady pamięciowe nie jest dokładnie znana. Możliwe, że odpowiedzialność za ich przechowywanie rozproszona jest na różne struktury, próbuje się ich szukać w hipokampie, korze okołowąchowej, a także na obszarze płata ciemieniowego, szczególnie w zakręcie nadbrzeżnym [7].

### 3 Pamięć długotrwała.

Po utrwaleniu się na skutek intensywnego powtarzania, towarzyszących jej silnych emocji, bądź za przyczyną któregoś z innych, niepoznanych dobrze mechanizmów, dana informacja może przenieść się do pamięci długotrwałej. Pojemność tej pamięci jest potencjalnie nieograniczona, pomieścić może dowolną ilość danych, a złożone tam wspomnienia przetrwać mogą nawet całe życie. Niepodatne są przy tym na jakiegokolwiek bieżące interferencje, nie wymagają także aktywnego odświeżania poprzez jakąkolwiek świadomą nimi manipulację. Takie głęboko pogrzebane wspomnienie ujawnić się może, bądź to przez

świadomy akt przywoływania danego wspomnienia lub też mimowolnie, za sprawą okoliczności, choć dokładne, rządzące tymi mechanizmami prawa nie są jasne.

Za sprawą pacjenta H. M. poczyniono także po raz pierwszy obserwacje sugerujące, że pamięć nie jest tworem zupełnie jednolitym, jednym mechanizmem spełniającym różne, podporządkowane sobie funkcje. Podstawą takiej konstatacji były rezultaty doświadczeń, przeprowadzanych na pacjencie, sprawdzających jego zdolność do przyswojenia sobie pewnych nowych, prostych umiejętności wzrokowo – ruchowych. Poddany został między innymi próbie, w której musiał nauczyć się wodzić długopisem po nakreślonym kształcie geometrycznym, patrząc się przy tym wyłącznie w odbicie swojej ręki w lustrze. Po kilku dniach treningu, a następnie po krótkiej przerwie, potrafił bez większych trudności odtworzyć czynność, której się nauczył, chociaż jednocześnie nie był w stanie w żaden sposób przypomnieć sobie samego faktu nauki. Wyglądało więc na to, że utrata hipokampu nie miała ujemnego wpływu na typ pamięci, nazwany pamięcią proceduralną, to jest dotyczącą umiejętności, w głównej mierze motorycznych, nabywanych przez człowieka stopniowo i bez pełnej świadomości istoty takiej wiedzy. Zniszczona została natomiast zdolność przyswajania pamięci typu epizodycznego. Trudno byłoby wobec tak jawnego świadectwa utrzymać dalej w mocy pogląd o całościowym, globalnym charakterze pamięci, wykorzystującej te same obwody i szlaki komórkowe do zarządzania śladami pamięciowymi różnego typu. Najwyraźniej pewna specyficzna, konkretna rola musiała być powierzona fragmentowi mózgu, jaki został wycięty, zupełnie odrębna i niezależna od funkcji, które nie uległy zanikowi za przyczyną operacji.

Z czasem ludzie doszli do przekonania, że rozróżnienie pamięci nie kończy się na tych dwóch klasach, a może ulegać dalszym podziałom na mniejsze, jeszcze bardziej specyficzne obszary. Przyjęło się wobec tego stosować ukute w tym celu terminy pamięci deklaratywnej, to jest takiej jaką utracił pacjent H. M i pamięci niedeklaratywnej, pod którą kryje się liczna grupa innych podtypów. Dosyć rozgałęziona dziś klasyfikacja wzięła jednak swój początek właśnie od charakterystyki stanu pacjenta H. M.

## 4 Pamięć deklaratywna.

Potocznie, w życiu codziennym, mówiąc o pamięci zazwyczaj rozumie się przez to pojęcie odmianę pamięci typu deklaratywnego. Ten dość pojemny termin, odnosi się do całej gamy śladów pamięciowych, których wspólnym mianownikiem jest sposób w jaki powstają, natychmiastowy, tuż po doświadczeniu bodźca i fakt, że człowiek jest świadomy ich kształtu i pochodzenia i zna dokładnie treść jaką niosą. Funkcjonuje dalszy podział, na pamięć semantyczną, służącą gromadzeniu szeroko pojętych umiejętności opartych na wiedzy i epizodyczną, odpowiedzialną za reprezentowanie wydarzeń, których człowiek był kiedyś świadkiem bądź miejsc, w których przebywał, jak i towarzyszącego im kontekstu.

Do niezwykłego zainteresowania przypadkiem pacjenta H. M. przyczyniła się z pewnością siła jego amnezji, za sprawą której zapominanie przychodziło w sposób tak nagły i nieodwołalny, a kontrast między śladami wydarzeń sprzed i po operacji, w umyśle pacjenta był tak dobitny. W obliczu faktów, należało uznać, że natura faktycznie tak zorganizowała zarządzanie procesami pamięciowymi, że przetwarzanie pamięci różnego rodzaju zachodzi w obwodach komórkowych względem siebie, do pewnego stopnia, rozłącznych. Od podobnej konstatacji prowadzi natomiast prosta droga do pytania, w jaki sposób pamięć, która pojawia się najpierw, krótkotrwała i ulotna, zamieniana jest następnie w pamięć innego typu, mogącą trwać nawet przez całe życie. Ażeby wyjaśnić to zjawisko, wysunięto przypuszczenie, iż istnieje pewna faza pośrednia, podczas której zachodzi proces przekształcania śladów pamięciowych do postaci mniej podatnej na interferencje. Zbiorczej, nie znanej w szczegółach, grupie mechanizmów prowadzących do powyższego skutku, nadano nazwę konsolidacji pamięci. Za konkretną natomiast, dobrze sprecyzowaną w przestrzeni lokalizację odpowiedzialnych obwodów neuronalnych, uznano hipokamp, bowiem to właśnie pozbawienie pacjenta H. M. tej struktury, doprowadziło do dramatycznego upośledzenia konsolidacji pamięci.

Sprawa pacjenta H. M. pozwoliła dosyć precyzyjnie określić struktury w mózgu, których sprawne działanie niezbędne jest aby mogło nastąpić utrwalenie nabytych wcześniej

wspomnień. Zdefiniowano znajdujący się w środkowym płacie skroniowym specyficzny system pamięci, obejmujący niemal cały zakręt hipokampu, w skład którego wchodzi hipokamp właściwy i różne odcinki kory hipokampu – węchowa (łac. enthorinal), przyhipokampowa (ang. parahipocampal) i przyległa okołowęchowa.

## 5 Środkowy płat skroniowy.

Środkowy płat skroniowy jest centralną częścią płata skroniowego kory mózgowej kresomózgowia. W jego skład, poza hipokampem, wchodzi okolice okołowęchowe, kora przyhipokampowa i, znajdująca się pomiędzy hipokampem, a korą nową, kora węchowa.

## 6 Hipokamp.

Hipokamp jest strukturą niewielkich rozmiarów, znajdującą się w środkowym płacie skroniowym, kształtem przypominającą konika morskiego, któremu zawdzięcza swoją pochodzącą z Greki nazwę. Stanowi przedłużenie skraju kory mózgowej, zawinięte do wewnątrz. Składa się ze stopy, koryta i strzępka. W ścianę dolnego rogu komory bocznej wpukła się zakręt hipokampa, a utworzona w ten sposób wyniosłość stanowi właśnie hipokamp właściwy. Początkowy szeroki odcinek zwany jest stopą. Powierzchnia zakrętu zwrócona w stronę komory pokryta jest blaszką istoty białej, która tworzy koryto. Z koryta odchodzą natomiast włókna nerwowe zwane strzępką hipokampa, dające początek sklepieniu. Funkcjonuje podział na część brzuszną (ang. ventral) i grzbietową (ang. dorsal), a choć podobnej budowy, to każda stanowi fragment innego obwodu neuronalnego. Z punktu widzenia histologicznego dzieli się natomiast na cztery pola: CA1, CA2, CA3 i CA4, z czego dla pamięci istotne są zwłaszcza CA1 i CA3.

Hipokamp wraz z okolicami uznaje się za ważny element układu limbicznego, leżący w dośrodkowej, wewnętrznej części płata limbicznego. W ujęciu dziś już do pewnego stop-

nia historycznym, rola jaką pełni system limbiczny w przetwarzaniu informacji nerwowej, opiera się na zarządzaniu emocjami, produkcji, przetwarzaniu i kontrolowaniu zachowań emocjonalnych, nadzorowaniu zachowań napędzanych popędem, a także udziale w organizacji pamięci długotrwałej. Zarówno co do dokładnego składu płata limbicznego i należących do niego obiektów, jak i do ogólnej zasadności określania zbioru różnych struktur, o całym wachlarzu funkcji, mianem wspólnego systemu, istnieją poważne wątpliwości. Mimo wszystko, wciąż określa się w ten sposób obszar na styku obu półkul, zawierający w sobie po fragmencie każdego z płatów oprócz skroniowego, otaczający wzgórze.

Udało się więc, z dużą dozą pewności, określić konkretną strukturę niezbędną dla poprawnej konsolidacji pamięci. Posiadając już w miarę rzetelną wiedzę na temat miejsca, następnym krokiem było ustalenie czasu i okoliczności, w których owa konsolidacja zachodzi.

Za przyczyną pacjenta H. M prace nad poznaniem szczegółowych mechanizmów znacznie przyspieszyły, nabierając niespotykanego dotąd tempa. Od tego czasu powstała pokaźna ilość prac, poświęconych temu zagadnieniu, jednak znakomita większość z nich, za przedmiot badania obrała sobie nie ludzi, a zwierzęta, ze wskazaniem na gryzonie. Pośród liczących się dziś źródeł, brak więc jednoznacznych, ugruntowanych i popartych kompleksowymi badaniami świadectw, odnoszących się do analizy odnośnego zjawiska u ludzi. Od czasu pacjenta H. M. na przeszkodzie wciąż stoi przede wszystkim brak nieinwazyjnej metody na wygodną, długo trwającą rejestrację wewnątrz czaszkowego potencjału elektrycznego. Dostępnym na chwilę obecną rozwiązaniem wciąż pozostają cierpiący na epilepsję pacjenci, przechodzący właśnie fazę zabiegów przedoperacyjnych, wymagających otwarcia czaszki i dostępu do gołego mózgu.

Opierając się więc w znacznej mierze na materiale doświadczalnym uzyskanym na zwierzętach, dalsze badania, jako okres najbardziej prawdopodobny, podczas którego zaobserwować można przejawy konsolidacji pamięci, określili czas stanów wyłączenia (ang. off-line), spoczynku i wyciszenia, to znaczy beczynnej przytomności i czas snu, szczególnie tak zwanego snu wolnofalowego [8].

## 7 Sen wolnofalowy.

Sen wolnofalowy (ang. slow-wave sleep, SWS), określany też jako sen nie będący snem REM, sen zwykły, nieparadoksalny, jest fazą snu głębokiego, podczas którego brak jest szybkich ruchów gałek ocznych. W zapisie czynności elektrycznej mózgu, rejestrowanych w okolicach kory czołowej i przedczołowej, dominuje wtedy wolny rytm, o częstotliwości z pasma delta w okolicach od 0 do 4 Hz, od którego faza ta wzięła swoją nazwę. Jednocześnie zmniejsza się zawartość fal teta o częstotliwości od około 5 do 10 Hz. Dokładna charakterystyka, służąca klasyfikacji tej fazy snu nie jest ustalona w sposób jednoznaczny i niepodważalny, może różnić się w zależności od przypadku. Obecnie, za Amerykańską Akademią do Spraw Medycyny Snu (ang. AASL) obowiązujące standardy zakładają, że jako sen wolnofalowy uznać można każdy, co najmniej 30 sekundowy odcinek, na którym zawartość pasma delta stanowi co najmniej 20% całej mocy sygnału [9].

Pojawia się zazwyczaj w krótkim czasie po zaśnięciu, przez cały okres snu przeplatając się potem z fazą snu paradoksalnego REM.

Częstość wolnej fali u ludzi wynosi przeważnie około 0,8 Hz.

Obie połówki cyklu wolnej fali, ujemna (ang. „up”) i dodatnia (ang. „down”), powstają w efekcie różnego, mikroskopowego zachowania dużych grup neuronów. Połówka dodatnia tworzy się gdy potencjały błonowe poszczególnych komórek, zarówno pobudzających jak i hamujących, znajdują się w stanie depolaryzacji, podczas połówki ujemnej komórki tkwią natomiast w hiperpolaryzacji. Makroskopowy stan ujemny cechuje się znacznym osłabieniem aktywności komórek, odpalają rzadko i tylko nieliczne [13].

Ze względu na swoją naturę, niezwykle wolny rytm i rozległy obszar propagacji, rozchodząca się szeroko wolna fala jest w stanie, w ramach jednego cyklu, wzbudzać obwody neuronów leżące w dużym od siebie oddaleniu, synchronizując ich aktywność. Uważa się, że w taki sposób przyczynia się do organizacji i wiązania ze sobą informacji, zapisanych w odległych zakątkach mózgu.

W zapisie czynności elektrycznej mięśni (ang. EMG) rejestrowanym w fazie snu wol-

nofalowego, pojawić się mogą oznaki aktywności, drobnych ruchów, w przeciwieństwie bowiem do fazy REM mięśnie nie ulegają bezwładowi.

Stan fizjologiczny, pod względem cech zapisu aktywności mózgu przypominający sen wolnofalowy, określane czasem stanem wolnofalowym, występuje także w trakcie czuwania, w okresach szczególnego wyciszenia i bezruchu.

Co więcej, wydaje się, że udało się wytypować pewien rodzaj zjawiska, precyzyjnie zlokalizowany w czasie, widoczny jako charakterystyczna struktura w zapisie lokalnego potencjału polowego, któremu towarzyszy główna, najbardziej spektakularna część całego procesu konsolidacji pamięci. Wśród całej gamy różnych rytmów występujących na obszarze hipokampu, wyselekcjonowano krótkie, sięgające około 80 milisekund oscylacje, o częstotliwości w paśmie powyżej 100 Hz, nazwane *ripple* (pol. zmarszczki). Towarzyszy im przeważnie jeszcze inna struktura, od której biorą zwykle swój początek, tak zwana ostra fala.

## 8 Kompleks ostra fala - *ripple*.

Fala wyładowań, współwystępujących jednocześnie w wielu miejscach pobudzających sieci komórek w rejonie CA3 hipokampu, rozchodzi się na okoliczne obszary, docierając między innymi aż do leżącej w pobliżu rejonu C1 warstwy promienistej (łac. stratum radiatum). Powoduje tam pobudzenie rozległej grupy neuronów, których skupiona w czasie, zbiorowa aktywność skutkuje widoczną w zapisie lokalnego potencjału polowego, nagle narastającą strukturą, która zwana jest ostrą falą. Zapis zewnątrzkomórkowy przedstawia ją jako silne odchylenie w stronę ujemnego potencjału, krótkie, trwające około 100 milisekund, ostro zakończone, to znaczy zaczynające słabnąć tuż po osiągnięciu wartości szczytowej. Posiada charakter aperiodyczny, powraca w różnych, nierównych odstępach, zwłaszcza podczas stanów znacznego obniżenia aktywności organizmu.

Sama ostra fala stanowi z kolei silny, pobudzający bodziec, który rozchodząc się w górę



hipokampu dotyka komórek piramidalnych w rejonie CA1 i zdolny jest wywołać produkcję epizodu szybkiej oscylacji, zjawiska o niezwykle wysokim stopniu synchronizacji, uznawanym za jeden z najbardziej imponujących wśród wszystkich oscylacji o wysokich częstotliwościach, jakie spotkać można w zapisach czynności elektrycznej mózgu ssaków. Oscylacja tego rodzaju zwana jest *ripple*, osiąga częstość wahającą się, w zależności od gatunku i warunkowań osobniczych, od około 100 do 160 Hz. Epizody *ripple* stwierdzono i opisano u myszy, szczurów, królików, małp i u ludzi [15].

Dokładny mechanizm powstawania epizodu *ripple*, wzajemny związek i sposób w jaki ostra fala przyczynia się do generacji charakterystycznej, szybkiej oscylacji w rejonie CA1, to pytania na które nie ma jak od tej pory jednej, powszechnie przyjętej odpowiedzi. Istnieją różne odrębne teorie, starające się znaleźć najbardziej odpowiednie wytłumaczenie, względem poczynionych do tej pory obserwacji. W literaturze spotkać można trzy, najpowszechniej rozpatrywane klasy modeli sieciowych, próbujące wyjaśnić i opisać powyższe zjawiska w oparciu o oddziaływania w lokalnych sieciach składających się bądź to z samych komórek piramidalnych, bądź uwzględniając także hamujące interneurony. Powszechnie, w różnych rozpatrywanych układach, interneurony pełnią rolę, w której kontrolują tempo działania komórek piramidalnych, odpowiedzialnych za potencjał widoczny jako *ripple* w zapisach zewnątrzkomórkowych [10] [12].

Wydaje się, że czynność w paśmie *ripple*, rejestrowana na obszarze hipokampu, przez elektrody znajdujące się w miejscach w pewnym oddaleniu od siebie, nie pochodzi z jednego wspólnego źródła. Nie przenosi się w różnych kierunkach na zasadzie przewodnictwa objętościowego, a raczej powstaje w każdej z tych lokalizacji niezależnie od siebie, dzięki rozległemu oddziaływaniu ostrej fali.

Zasadniczy, stwierdzony wpływ na częstość oscylacji *ripple*, ma siła pochodzącej z głębszych rejonów hipokampu ostrej fali. Częstość rośnie wraz z amplitudą pobudzającej fali, im fala mocniejsza, tym częstość wyższa. W obrębie tego samego rejonu, u tego samego osobnika, różnice nie są zwykle duże, choć mimo to zauważalne i istotne. Na samym początku, tuż po rozpoczęciu, częstość oscylacji jest najwyższa, a w miarę trwania zjawiska, zbliżając się ku końcowi, słabnie i zwalnia. W przypadku szczurów, zaobserwowano

spowolnienie oscylacji wynoszące od około 150 Hz do 120 Hz.

Całkowita moc danego *ripple* także jest wrażliwa, w sposób proporcjonalny, na siłę wywołującej ją ostrej fali i rośnie wraz z nią. Szczyt mocy chwilowej *ripple* przypada mniej więcej na moment gdy towarzysząca jej ostra fala osiąga swój wierzchołek lub tuż przed tym faktem.

Dokładna specyfika każdego z poszczególnych epizodów *ripple* może podlegać modyfikacjom, w zależności od czynników różnej natury. Powstając w rejonach CA1, CA3 bądź na obszarze kory węchowej, *ripple* różnić się mogą w częstotliwości [12].

Uważa się, że kompleks ostrej fali z *ripple* (ang. sharp wave-ripple, SWR) w jakiś sposób bierze udział w procesie utrwalania śladów pamięciowych, a być może, stanowi nawet swego rodzaju punkt kulminacyjny, wśród wszystkich zachodzących wówczas procesów składowych konsolidacji pamięci. Za podobnym stwierdzeniem przemawia wiele cech, jakimi się owe kompleksy charakteryzują [15] [11].

Niezależnie od dokładnej lokalizacji, swoją domniemaną, doniosłą rolę zawdzięczając *ripple* zjawiskom kryjącym się pod odzwierciedlonym w LFP, wyjątkowo charakterystycznym przebiegiem. Choć podczas czasu trwania całego epizodu *ripple* pojedyncze komórki piramidalne odpalają zwykle tylko jeden potencjał czynnościowy lub jedną salwę, to wzmożona, czasowa koordynacja aktywności poszczególnych neuronów, skutkuje zdarzeniem niezwykle skoordynowanym, angażującym całą lokalną populację. Liczba komórek potencjalnie uczestniczących w jednym epizodzie *ripple*, na obszarze regionów CA1 i CA3 hipokampu i okolic, sięga 50 – 100 tysięcy, co w porównaniu na przykład do oscylacji w paśmie teta, stanowi wzrost populacyjnej synchronizacji o kilka rzędów wielkości. Głównie dzięki tak silnemu, pojawiającemu się nagle, wzmocnieniu aktywności i synchronizacji całej populacji, *ripple* stanowią dogodny mechanizm mogący służyć do przenoszenia informacji i pobudzania plastyczności synaps [12].

Co więcej, plastyczności synaptycznej wśród pewnej grupy neuronów (ang. downstream neurons), sprzyja także naturalna częstotliwość i struktura przebiegu czasowego, jaką charakteryzuje się epizod *ripple*.

Kompleksy SWR wykazują naturę globalną, jako że odzwierciedlają nie tylko akty-

wację wielu mieszczących się w hipokampie podsieci ale również czynność poszczególnych komórek nerwowych. Niektóre z nich posiadają przy tym udowodnione, istotne znaczenie w kontekście makroskopowego zachowania osobnika. Za sztanarowy przykład niech posłużą rejestrowane wówczas sekwencje odtwarzania się aktywności pojedynczych komórek miejsca (ang. place cells), które wykazywały podobną aktywność podczas poprzedzających okresów pełnej przytomności osobnika, w trakcie poruszania się i odkrywania terenu.

Na znaczenie kompleksów dla uczenia i zapamiętywania wskazuje także fakt, że liczba obserwowanych epizodów wzrasta w sposób istotny po etapie uczenia, a podobne zwiększenie częstotliwości z jaką zaczynają się pojawiać, zdaje się być wiarygodnym zwiastunem późniejszego poprawnego przypominania, zarówno u szczurów jak i u ludzi.

## 9 Odtwarzanie.

Co niezmiernie istotne w zjawisku utrwalania pamięci, to okoliczność, że najefektywniej wydaje się zachodzić w okresach spoczynku, wtedy gdy znacznemu obniżeniu ulega zarówno ilość bodźców dochodzących ze środowiska zewnętrznego, jak i natężenie aktywności umysłowej związanej z przetwarzaniem nowych zbiorów danych. Główna faza procesu konsolidacji musi być rozłączna, nie może występować w tym samym czasie, co etap kodowania nowych śladów pamięciowych. Mózg nie może podlegać wtedy jakiegokolwiek rodzaju zwirom czy halucynacjom. Marzenia senne przychodzą przeważnie podczas snu typu REM, a sporadycznie bądź prawie nigdy podczas snu wolnofalowego, także sen typu wolnofalowego i pojawiające się w jego trakcie kompleksy ostra fala - *ripple*, są sposobnym okresem dla konsolidacji nabytych wcześniej śladów pamięciowych.

Jednym z mechanizmów, o którym podejrzewa się, że stanowi istotną część utrwalania nowo nabytych śladów pamięci, a który towarzyszy nierzadko kompleksom SWR, jest tak zwane odtwarzanie (ang. replay). Stanowi niezwykle sugestywne zjawisko, w którym grupy poszczególnych komórek ulegają aktywacji, w takiej kolejności jak to miało miejsce wcześniej, w trakcie czuwania. Podobne sekwencje rejestruje się dla komórek różnego

typu, znajdujących się w różnych strukturach mózgu, jak pierwszo- (pole V1) i drugorzędowa kora wzrokowa (pole V2), kora nowa, środkowa kora przedczołowa (ang. mPFC), warstwa brzuszna (ventral striatum), jednak ze wskazaniem głównie na hipokamp i jego rejony CA1 i CA3, dla których przeprowadzono jak do tej pory najwięcej badań. Jednym z typów komórek, u których stwierdzono powyższy sposób zachowania są leżące w hipokampie piramidalne komórki miejsca. Wzór odpalania kolejnych, zidentyfikowanych neuronów w trakcie kompleksów SWR przypomina w znacznym stopniu aktywność zarejestrowaną wcześniej, podczas etapu aktywnej eksploracji terenu. Pewna różnica tkwi w długości trwania takiego odtwarzania, bowiem epizody występujące w trakcie spoczynku są skondensowane w czasie. Odstęp pomiędzy aktywacją kolejnych komórek jest znacznie mniejszy, odtwarzanie jest szybsze niż aktywacja podczas czuwania (ang. on-line). Zaobserwowano także, że podobnie jak dla samych kompleksów SWR, natężenie, częstotliwość epizodów odtwarzania zależy od intensywności poprzedzających, odpowiadających im przeżyć bądź ilości powtórzeń danego zadania, wykonanych w stanie czuwania [14].

## 10 Aktywność całego mózgu w trakcie *ripple*.

Wśród licznych badań opartych wyłącznie na metodzie elektro-fizjologicznej, skupiających się na lokalnej aktywności danej populacji bądź na oddziaływaniach wzdłuż pewnych szlaków, autorzy artykułu [15] zaproponowali inne podejście, umożliwiające spojrzenie na zjawisko kompleksów SWR w sposób naprawdę globalny. Przedstawione rezultaty świadczyć mogą o ich faktycznej doniosłości i wadze, na tle całej gamy innych zdarzeń mózgowych.

Autorzy badania, stosując nowatorską technikę, łączącą różne metody jednoczesnego pomiaru fizjologicznej i elektrycznej czynności mózgowej, wykonali i przeprowadzili analizę mapy aktywności różnych rejonów mózgu, w czasie gdy w obszarze hipokampu produkowane są epizody *ripple*. Badanie opierało się na pomiarze sygnału zależnego od poziomu utlenowania krwi, BOLD, za pomocą funkcjonalnego rezonansu magnetycznego i

jednoczesnych, wieloelektrodowych rejestracjach lokalnego potencjału polowego z różnych punktów mózgu. Przebiegi czasowe uzyskanych sygnałów BOLD dopasowywano następnie do odpowiednich epizodów *ripple* i uśredniano po kolejnych realizacjach, aby uzyskać jeden, całościowy obraz aktywności mózgu na tle przebiegu *ripple*. Zaobserwowano wyraźny ciąg następujących po sobie zdarzeń, zmian w strukturze aktywności na dużych obszarach mózgu, zmieniający się rozkład, dobrze przestrzennie rozdzielonych obszarów, ulegających kolejno wyciszeniu lub pobudzeniu.

Okazuje się, że tuż przed wystąpieniem kompleksu SWR występuje znaczne wyciszenie rejonu wzgórza i struktur podkorowych, w tym zwojów podstawy, mostu i kory mózdzku, następnie idzie za tym wzmożenie aktywności hipokampu, a na końcu rejonów kory asocjacyjnej i pierwszorzędowej kory zmysłowej. Mimo ogólnego wzrostu aktywności kory asocjacyjnej, rejon VI ulega przy tym wyraźnemu zahamowaniu.

Proces utrwalania pamięci typu deklaratywnego, której jedną z podkategorii jest pamięć epizodyczna, może stać na przeszkodzie zachodzeniu procesu analogicznego, w odniesieniu do pamięci typu niedeklaratywnego i pamięci proceduralnej. Przetwarzanie pamięci obu typów nie zachodzi jednocześnie, na co wskazywać mogą uzyskane przez autorów wyniki, dotyczące zmian w aktywności struktur podkorowych. Stwierdzone w sygnale BOLD wyciszenie wspomnianych rejonów zwojów podstawy, znajdującego się w pniu mózgu mostu, jak i kory mózdzku, struktur związanych z mechanizmami plastyczności synaptycznej i systemem pamięci niedeklaratywnej, może być dowodem na taką właśnie zdolność przetwarzania przez mózg w danej chwili tylko jednego, określonego rodzaju pamięci.

Zmniejszenie aktywności wzgórza wskazywać może natomiast na dążenie do zwiększenia współczynnika stosunku sygnału właściwego do szumu, podczas wymiany informacji między korą, a hipokampem. Aktywność wzgórza wskazywać bowiem może na zaangażowanie w przetwarzanie informacji zmysłowej, a ograniczenie procesów niepotrzebnych bezpośrednio dla odbywającej się właśnie konsolidacji pamięci, mogłoby zostawić dla niej więcej przestrzeni i zwiększyć jej efektywność. Wzgórze może wobec tego spełniać w pewnym sensie rolę regulującą, w odpowiednim momencie wyciszać swoją aktywność i ustępować miejsca innemu, ważniejszemu wówczas procesowi.

Autorzy podkreślają, że podobne zależności i rozdział między korą a strukturami podkorowymi, nie występuje podczas epizodów w innych pasmach, gamma lub hpsigma. Także bezpośrednia stymulacja elektryczna pól w hipokampie, odpowiadającym miejscom występowaniu *ripple*, ani pomiar fMRI spoczynkowy oparty na umiejscowionych w hipokampie źródłach, nie przynoszą zbliżonych efektów. Zjawisko wydaje się być specyficzne i mieć szczególny związek z naturalnie powstającym epizodem kompleksu SWR.

Epizody *ripple*, jak dodatkowo pokazano, pojawiają się na ogół ściśle związane w fazie z przejściem od połówki ujemnej do połówki dodatniej lokalnych, wolnych oscylacji w paśmie delta. Lokalne oscylacje delta są z kolei fazowo związane z oscylacjami wolnej fali w korze nowej, organizującymi, jak dowodzą liczne badania, czasowe wzory aktywności obszarów kory i hipokampu. Wobec tego, owe występujące na obszarze hipokampu fale delta, mogą pełnić rolę mechanizmu synchronizującego występowanie kompleksów SWR z wolnymi falami w korze nowej. Co dość zastanawiające, jak zauważają autorzy, że synchronizacja współwystępuje, z zaburzeniem aktywności tak wielu innych struktur. Podobna obserwacja znajduje potwierdzenie także w innych badaniach, gdzie pokazano, że istnieje ścisły, zauważalny związek czasowy między występowaniem epizodów *ripple*, a wolnym rytmem charakterystycznym dla fazy snu wolnofalowego. Badając relacje fazowe, wskazuje się właśnie na końcowy etap ujemnej połówki cyklu wolnej fali. Natomiast jako mechanizm pośredniczący pomiędzy *ripple*, a wolną falą, podejrzewa się również występujące w korze wrzeciona snu [13].

## 11 Zaburzenia w formowaniu pamięci.

W wyniku pewnych chorób czy różnego rodzaju patologicznych zmian w mózgu, proces formowania pamięci może ulec upośledzeniu. Niezdolność do nabywania nowych śladów pamięciowych dotyka chociażby osoby cierpiące na chorobę Alzheimera. Objawy są przy tym bardzo podobne do tych jakie wykazywał pacjent H. M., co pozwala prawdopodobnych przyczyn szukać na obszarze hipokampu.

Okazuje się też, że wywołanie zbliżonych skutków przeprowadzić można w sposób sztuczny, poprzez umyślną ingerencję w pewne krytyczne punkty procesów zachodzących w mózgu.

Zaburzenie naturalnego przebiegu bądź całkowite wyeliminowanie epizodów *ripple*, poprzez stymulację elektryczną hipokampu, wydaje się odnosić taki właśnie efekt i wpływać destrukcyjnie na proces konsolidacji pamięci. W konsekwencji, zauważalnie spada efektywność i zdolność zapamiętywania nowych informacji. Przeprowadzono liczne badania, m. in. na szczurach, oparte na podobnym schemacie doświadczalnym, mające na celu zweryfikować ów domniemany, wiodący wpływ *ripple* na proces utrwalania pamięci. Podczas braku aktywności, bezruchu lub snu wolnofalowego, następującego po wcześniejszej fazie uczenia się, wykrywano w rejestracji na żywo kolejne, pojawiające się *ripple* i niezwłocznie po chwili detekcji każdej z nich, stymulowano docelowy region impulsem elektrycznym. Stanowiło to przeszkodę dla pełnego rozwinięcia się *ripple* i dusiło je niejako w samym zarodku. Podobne próby, choć nie ujawniają konkretnych, kryjących się za zjawiskiem mechanizmów, a ponadto działają inwazyjnie na znaczne grupy komórek i dynamikę ich oddziaływań, to ukazują jednak w pewien sposób związek przyczynowy między występowaniem *ripple*, a utrwalaniem się śladów pamięciowych. Brak natomiast jak do tej pory zakrojonych na szerszą skalę, analogicznych badań nad *ripple* w stanie czuwania. Mogłyby ukazać różnice bądź podobieństwa pomiędzy funkcją spełnianą przez *ripple* w stanie aktywności i w stanie spoczynku, podejrzewa się bowiem, że obie grupy mają odmienne zadanie do spełnienia [17].

## 12 Oddziaływanie kora - hipokamp.

Utrwalanie pamięci typu deklaratywnego, zależy od aktywnej, ścisłej współpracy i wymiany informacji pomiędzy sąsiadującymi ze sobą, anatomicznie powiązanymi strukturami, w obszarze środkowej części płata skroniowego i kory nowej w jej przedczołowej części.

Leżącą w najbliższym sąsiedztwie, stykającą się z hipokampem, strukturą do której prowadzą bezpośrednie, plastyczne połączenia z przyosiowego, wewnętrznego (ventral) obszaru CA1 jak i z różnych pól podporowych (subiculum) hipokampu, jest środkowa kora przedczołowa (ang. medial pre frontal cortex, mPFC). Struktura niezmiernie ważna, pełniąca wiele, nie w pełni poznanych funkcji. Uważa się, że uczestniczy ona między innymi w procesie podejmowania decyzji, wykonywania czynności zorientowanych na osiągnięcie konkretnego celu czy też w selekcji i wyborze istotnych w danych okolicznościach informacji [16].

Sądzi się, że hipokamp może pobudzać środkową korę przedczołową gdy akurat wymaga tego sytuacja, na przykład, podczas powtórnego napotkania podobnych okoliczności hipokamp może odtworzyć zakodowany wcześniej ślad pamięciowy i przekazać go do mPFC, aby możliwe było dostosowanie zachowania i osiągnięcie celu w sposób jak najefektywniejszy. Przypuszczalnie, towarzyszy temu odmiana epizodów *ripple*, występująca w stanie czuwania, na wczesnych etapach uczenia [14].

W trakcie wczesnego etapu kodowania dochodzącej ze środowiska informacji zmysłowej, hipokamp, w sposób niezwłoczny, wiąże pojawiające się w korze reprezentacje do lokalnych śladów pamięciowych. Przypuszcza się, że obwody komórkowe znajdujące się w hipokampie odgrywają największą rolę właśnie wtedy, na wczesnym etapie uczenia się i nabywania nowych informacji ze świata zewnętrznego. Później, w miarę upływu czasu stopień ich zaangażowania zmniejsza się, wzrasta natomiast znaczenie rejonów kory przedczołowej, zwłaszcza jej środkowej części (mPFC). Na poparcie takiej tezy istnieją dowody doświadczalne, wiążące uszkodzenia w obrębie konkretnych struktur mózgowych, z widoczną zmianą funkcjonowania organizmu. Pokazują, że o ile uszkodzenia tkanki nerwowej w obszarze hipokampu przysparzają u gryzoni poważnych trudności we wczesnej fazie uczenia, a mają niewielki wpływ w fazach późniejszych, to w przypadku kory przedczołowej skutek wydaje się być odwrotny, to znaczy zniszczenie fragmentu kory powoduje deficyt sprawności związanych z procesem uczenia, widoczny nie od razu, a dopiero na kolejnych etapach.

W okresie pośrednim musi zachodzić więc pewien szczególny lub też cały zespół sko-



ordynowanych procesów, prowadzących w efekcie do przekazania zarządu nad zgromadzonymi danymi, z hipokampu do kory przedczołowej. Zapisane informacje w pewien sposób przenoszą się do obwodów korowych, gdzie, raz utrwalone, mogą pozostawać już przez długi czas. Najprawdopodobniej nowo powstałe, nietrwałe jeszcze ślady pamięciowe są wtedy w sposób skoordynowany odtwarzane, jednocześnie w korze i w hipokampie, w celu pobudzenia i wzmocnienia połączeń w obrębie samej kory, odpowiadających za nowo powstałe, neuronalne reprezentacje nabytych wspomnień [16].

W obliczu faktu, że towarzyszy im tak wiele charakterystycznych, pokazanych doświadczalnie zjawisk, możliwe, że to właśnie epizody SWR służą jako środek pośredniczący w wymianie informacji pomiędzy hipokampem, a korą przedczołową, bądź też są bezpośrednim przejawem innych, pełniących taką funkcję procesów. Co istotne, ich występowanie na obszarze hipokampu skorelowane jest w czasie w przebiegu stanów gór - dół w zapisie lokalnego potencjału polowego w korze nowej, utożsamianych z wolnymi falami delta. Wolnej fali przypisuje się natomiast niebagatelną rolę we wspomaganiu komunikacji i wymianie informacji, pochodzącej z różnych regionów. Związek fazowy zachodzi prawdopodobnie na skutek silnej synchronizacji między potencjałem błonowym komórek przekaźnikowych (interneuronów) w hipokampie, a przebiegiem nadchodzącej wolnej oscylacji w potencjale polowym.

Współpraca hipokampu z innymi pomniejszymi strukturami, a przede wszystkim z korą przedczołową, niezbędna jest dla procesów związanych z uczeniem i przetwarzaniem kilku rodzajów pamięci. Uważa się, że podczas tak złożonego zjawiska, wzajemna interakcja, dialog pomiędzy odrębnymi strukturami zachodzić powinien na różnych poziomach. W istocie, obserwuje się przykłady oddziaływań o różnym stopniu złożoności, angażujące bądź to pojedyncze komórki, bądź też całe siatki rozciągniętych na duże obszary połączeń. Sądzi się, że pewne rytmy, widoczne w zapisach lokalnego potencjału polowego, odgrywają szczególną rolę w organizacji i koordynacji wzajemnych interakcji na najwyższym z poziomów.

Główne klasy rytmów rejestrowanych na obszarze hipokampu stanowią, rytm delta, czyli wolne oscylacje od 0 do 4 Hz; rytm teta z zakresie 4-10 Hz, występujący przeważnie

podczas okresów aktywności i snu REM, odgrywający, jak się powszechnie uważa ważną rolę w procesach uczenia się i pamięci; wysokoczęstotliwościowe oscylacje gamma, które dzieli się na kilka przedziałów, zasadniczo powyżej 20 Hz, występujące rozległe w różnych sytuacjach, podczas różnego typu zachowań i stanów, jednak przeważnie najczęściej razem z rytmem teta; wreszcie kompleksy ostra fala-*ripple*, z *ripple* rozpatrywanym jako odrębny rytm, pojawiające się zwłaszcza w okresach uspokojenia i snu wolnofalowego.

## 12.1 Fale teta.

Pasmem sygnału o niepoślednim znaczeniu dla rozpatrywanego przedmiotu jest rytm teta. Charakteryzuje się częstością oscylacji wahającą się w przedziale od 4, aż do, według niektórych klasyfikacji, 10 Hz. Waga i zakres funkcji pełnionych przez tego rodzaju oscylacje, aż do chwili obecnej nie został do końca zgłęбiony i prawdopodobnie wciąż kryją one więcej tajemnic aniżeli udało się do tej pory ujawnić. Pojawia się w czasie aktywności, podczas procesów wymagających uwagi i wysiłku intelektualnego, a także w trakcie snu typu REM (ang. Rapid Eye Movement, szybkich ruchów gałek ocznych). Gdy zaczyna się sen wolnofalowy, oscylacje szybsze, jak te w paśmie teta, z definicji słabną bądź znikają całkowicie, jednak w ogólności, ich obecność i zachowanie w trakcie specyficznych epizodów *ripple*, zarówno tych w czasie aktywności jak i w czasie spoczynku, nie została jeszcze dobrze poznana.

Fale teta, jako oscylacje stosunkowo wolne, koordynujące aktywność neuronów w wolnej skali czasowej, zdolne są regulować aktywność sieci neuronowych rozległych w przestrzeni, różnych komórek w miejscach oddalonych od siebie na znaczną odległość.

Typowa częstość rytmu, wynosząca około 6,5 Hz, odpowiada długości trwania pojedynczego cyklu sięgającej mniej więcej 150 ms, dzięki czemu nawet komórki znajdujące się w rejonach, pomiędzy którymi sygnał propaguje się ze znacznym opóźnieniem, mogą być aktywowane w ramach jednego, tego samego cyklu oscylacji. Uważa się, iż czas przepływu sygnału między hipokampem, a mPFC wzdłuż połączeń monosynaptycznych wynosi

około 15 ms. Prawdopodobnie więc rytm teta jest w stanie wpływać na bezpośrednie oddziaływanie między powyższymi strukturami, również drogą przechodzącą przez wiele połączeń międzykomórkowych.

Regulacja aktywności w korze za pośrednictwem rytmu teta, poparta jest wynikami badań, wskazujących na istotny, fazowy związek między aktywnością dużych grup pojedynczych komórek w mPFC, a równoczesnym rytmem teta w hipokampie [21]. W schemacie doświadczalnym prowadzącym do podobnych wniosków, zwierzęta stawiano przed zadaniami wymagającymi różnego rodzaju zachowań, zorientowanymi na osiągnięcie celu, angażującymi pamięć roboczą i zawierającymi elementy nawigacji przestrzennej. Stwierdzono, że iglice, wskazujące na aktywność konkretnych komórek w obszarze mPFC, występują przeważnie na około 50 ms po rozpoczęciu danego cyklu rytmu teta. Są przy tym bardziej liczne, skupione w czasie, właśnie wtedy gdy w hipokampie propaguje się rytm teta, niż gdy takiego rytmu brak. Zaobserwowano również, że podczas uczenia i na etapie sprawdzania nabytej wiedzy, w sytuacjach wymagających odwołania się do pamięci i podjęcia konkretnej decyzji, iglice komórek w mPFC były liczniejsze, a także zdecydowanie ściślej związane w fazie, podczas prób zakończonych powodzeniem, niż podczas decyzji wymuszonych czynnikiem zewnętrznym, bądź też gdy podjęta decyzja okazała się błędna. Odnosi się to również do mierzonej koherencji rytmu teta w obu strukturach, która ulega wzmocnieniu gdy osobnik nauczy się już i przyswoi sobie daną zasadę, którą to wiedzę musi potem spożytkować aby osiągnąć zamierzony cel.

Podobne efekty stwierdzono po zaaplikowaniu dopaminy w obszar mPFC, co może wskazywać na istotny, przyczynowy wpływ wejść do mPFC zależnych od tej właśnie substancji, na efektywny wzrost koherencji pomiędzy obiema strukturami w sytuacjach związanych z nauką.

Większość badań dostępnych w źródłach dotyczy relacji między mPFC, a grzbietową (ang. dorsal) częścią hipokampu, która pełni prawdopodobnie zgoła odmienne funkcje od części brzusznej (ang. ventral). Co szczególnie zastanawiające w kontekście przytoczonych powyżej wyników, to że część brzuszna, w przeciwieństwie do części grzbietowej, nie posiada bezpośrednich wejść do mPFC. Wskazuje się mimo to także na przypuszczalny, fazowy

związek między rytmem teta w wewnętrznej części hipokampu, a rytmem w mPFC, jednak w odmiennych okolicznościach. Miałby się ujawniać zwłaszcza w sytuacjach zwiększonego stresu czy niepokoju i łagodzić wpływ podobnych odczuć na zachowanie.

Istnieją próby wykazania szczegółowych mechanizmów komórkowych, odpowiedzialnych za zjawisko, w którym hipokamp niejako narzuca fazę rytmu teta na mPFC. Rejestruje się, równocześnie z rozchodzeniem się fal teta, aktywność komórek piramidalnych i interneuronów, wchodzących w skład hipokampu i mPFC. Okazuje się, że komórki piramidalne na obszarze mPFC odpalają przeważnie w okolicach tej samej fazy rytmu teta co komórki piramidalne w wewnętrznej (ang. ventral) części hipokampu, co może świadczyć o efektywnym, choć niekoniecznie bezpośrednim, oddziaływaniu komórek piramidalnych hipokampu na odpowiednie komórki w mPFC podczas fal teta.

Co więcej, rejestruje się także współwystępujące wyładowania komórek koszykowych, mających połączenia z ciałem i rejonami dendrytycznymi komórek piramidalnych mPFC, co może wskazywać na inhibicję o takim właśnie pochodzeniu, jako mechanizm regulujący aktywność komórek i sprzyjający w rezultacie selekcji istotnych w danych okolicznościach informacji.

Ustalenie się aktywności neuronów w fazie z przebiegiem fali teta, obejmującej swoim zasięgiem obszar, w którym się mieszczą, mogłoby oczywiście zajść w sposób zupełnie przypadkowy. Za przyczyną chociażby wewnętrznej, niezależnej od wpływu otoczenia rytmiczności w odpalaniu przez komórki kolejnych salw bądź potencjałów czynnościowych. Istnieją na szczęście środki aby podobny scenariusz, z dużym prawdopodobieństwem, wykluczyć.

Rytm teta określony jest w przybliżeniu na przedziale od około 4 do 10 Hz, a w trakcie swojego trwania nie jest jednolity i przez cały czas taki sam, częstość oscylacji nie jest stała, a ulega nieznacznym wahnięciom, może być trochę niższa, by po chwili przyspieszyć. Okazuje się, że pewne komórki w korze przedczołowej potrafią dostosować się do takich fluktuacji i pozostać zgodne w fazie z rytmem teta niezależnie od jego obecnej, chwilowej częstości. Inne komórki natomiast, funkcjonujące według swojego własnego precyzyjnego, rytmicznego zegara, rozmiijają się z przebiegiem rytmu teta, a wzajemne opóźnienie fazowe

ulega zmianie. Wskazuje to dość wymownie na zewnętrzny czynnik, jakim jest w tym przypadku przychodząca z hipokampu fala teta, na organizację aktywności komórek w korze przedczołowej [21].

Biorąc pod uwagę opóźnienie, z jakim poszczególne komórki mogą reagować na początek aktywności w hipokampie, wskazuje się na bezpośrednie połączenia między korą a hipokampem jako drogę, którą przenosić może się główna część aktywności.

Co stanowi istotną obserwację, to że choć znaczne grupy komórek kory przedczołowej zaczynają generować potencjały czynnościowe zgodnie z daną fazą fali teta, okazuje się, że niekoniecznie i nie w każdym przypadku musi prowadzić to do powstania zlokalizowanego w korze źródła odrębnego rytmu, o podobnej częstotliwości z pasma teta. Głównym motorem napędowym ustalania wzajemnego opóźnienia fazowego mogą być nie pobudzające wejścia z hipokampu na komórki kory, a jakiś rodzaj wejść hamujących, ponadto poszczególne komórki mogą ustalać swoją aktywność względem różnej fazy rytmu, możliwe też, że ułożenie odnośnych komórek nie jest równoległe i wobec tego powstają zlewy i źródła potencjału tworzące pole zamknięte. Wyjaśnień może być wiele. W każdym razie, wskazuje to na prawdopodobnie bardziej złożone pochodzenie fali teta w korze niż prosta, bezpośrednia adaptacja do podobnego przepływu z innej struktury. Uzmysławia także, że brak zauważalnej koherencji w określonym paśmie, tutaj akurat w paśmie teta, nie wyklucza takich oscylacji jako środka faktycznych oddziaływań.

W przypadku pewnych schorzeń neurologicznych, jak schizofrenia, znacznemu zaniżeniu ulega poziom możliwej synchronizacji pomiędzy rytmem teta w hipokampie i mPCA, a zarazem pojemność pamięci roboczej i zdolność do nabywania nowych wspomnień. Może to sugerować pewien przyczynowy związek i znaczenie takiej synchronizacji [16].

Mimo, że w pewnych okolicznościach faktycznie obserwuje się zwiększoną koherencję rytmu teta, pomiędzy obszarem środkowego płata skroniowego, a korą przedczołową, to sam fakt koherencji niesie jednak ze sobą informację niewystarczającą. Nie sposób na jego podstawie dowodzić określonego kierunku rozchodzenia się oscylacji czy, idąc dalej, jakiegoś przyczynowego oddziaływania. Podejmowano jednak pewne próby, mające na celu dokładniej ustalić sposób i kierunek oddziaływań za przyczyną rytmu teta.

Są dowody, oparte na dwukanałowym model autoregresyjnym i pojęciu przyczynowości w sensie Grangera, wskazujące na istotny przepływ rytmu teta od hipokampu, w obszar kory przedczołowej [20]. Podobne wyniki odnoszą się do wykonywanych przez zwierzęta zadań pamięciowych, a zauważalny poziom synchronizacji i ustalonej kierunkowości przepływu oscylacji dotyczy szczególnie okresów wymagających aktywnego odwoływania się do pamięci.

## 12.2 Szybka i wolna gamma.

Zarówno na obszarze hipokampu, zwłaszcza w rejonie CA1, jak i w mPFC, występują epizody wysokoczęstotliwościowych oscylacji gamma, wśród których wprowadza się uzasadnione pewnymi kryteriami, poparte obserwacjami rozróżnienie na dwie klasy, to jest fale gamma szybkie, przeważnie ponad 60 Hz i wolne, od około 20 do 60 Hz. Zaobserwowano, że amplituda fal gamma należących do obu klas modulowana jest fazą fal teta pochodzących z hipokampu. Przypuszczalnie, grupy komórek odpowiedzialne za widoczny w LFP rytm gamma, regulowane są w czasie i przestrzeni poprzez cykl teta, a kolejne grupy aktywowane są w kolejnych cyklach fal teta. Cykle fal gamma szybkich i wolnych występują jednak powiązane do innej fazy rytmu teta, funkcjonalnie mogą więc posiadać inne znaczenie.

Fale gamma typu szybkiego zlokalizowane w obszarze hipokampu, przejawiają koherencję z falami w środkowej korze węchowej hipokampu, strukturze przekazującej do hipokampu informacje na temat obecnego stanu środowiska zewnętrznego. Gdyby więc fale gamma pochodzące z mPFC były koherentne z falami w obu powyższych strukturach, mogłoby to świadczyć o wpływie szybkich oscylacji gamma propagujących się wzdłuż sieci złożonej z hipokampu, węchomózgowia i mPFC, na koordynację przepływu informacji dotyczących stanu środowiska, bądź kodowanie napływających stamtąd bodźców.

Z kolei wolne oscylacje gamma z rejonu CA1 wykazują koherencję z falami w rejonie CA3 odpowiedzialnym za przywoływanie wspomnień i przetwarzanie pamięci roboczej.

Zakładając związek wolnych fal gamma w mPFC z falami w powyższych strukturach, wolne fale gamma mogłyby przyczyniać się do przywoływaniu informacji, których nie ma już w zewnętrznym środowisku [16] [12] [17].

### 12.3 Fale z zakresu *ripple*.

W trakcie stanu określanego wolnofalowym, następuje synchronizacja wyładowań komórek w obszarze CA1 i epizodów wrzecion snu w mPFC, lekko opóźnionych, z epizodami ostra fala-*ripple*. Komórki aktywne podczas czuwania odtwarzają podobne sekwencje pobudzenia podczas epizodów SWR. Aktywowane powtórnie komórki obszaru CA1 pobudzają strukturę podporową hipokampu (subiculum) i w tym samym czasie również mPFC, które to dwie struktury z kolei mogą następnie pobudzić jakiś inny wspólny obiekt i w taki sposób ślady pamięciowe mogą stać się niezależne od hipokampu i przenieść się do mPFC [16].

### 12.4 Fale delta.

Oscylacje o częstości najniższej ze wszystkich rejestrowanych zarówno z powierzchni głowy jak i w postaci lokalnych potencjałów polowych, określa się mianem fal delta. Pokrywają pasmo częstości niemalże od zera aż do 4 Hz. Ścisłe wartości wahają się i zależą od definicji, miejsca lokalizacji czy uwarunkowań osobniczych lub gatunkowych. Występują zarówno na rozległych przestrzeniach kory, określane wtedy przeważnie jako wolne fale, jak i w strukturach zlokalizowanych głębiej, z uwzględnieniem hipokampu.

Osiągają zazwyczaj dużą moc, objawiając tym samym znaczny stopień synchronizacji neuronów, przejawiający się oscylacjami dochodzącymi nawet do 75 mV.

Występują przeważnie podczas głębokiego snu, zwanego stąd snem wolnofalowym, a także podczas medytacji czy stanów pogłębionego wyciszenia, uspokojenia organizmu, jak również w związku z pewnymi schorzeniami bądź uszkodzeniami mózgu. Zarówno postać,

kształt, struktura, jak i dokładna charakterystyka czasowo-częstotliwościowa różni się w zależności od przypadku, nie jest ustalona raz na zawsze i nie ma dokładnej zgodności między poszczególnymi realizacjami tego samego zjawiska. Fale, określane wciąż jako te same fale delta, potrafią być bądź to wolniejsze bądź też nieco szybsze i bardziej gwałtowne niż odnośne granice, określone dla dolnej lub górnej wartości. Zdarzają się też przebiegi o sile wyraźnie skromniejszej, nie tak mocne jak przyjęło się o nich sądzić.

Pochodzenie ich nie jest dokładnie określone, występując na obszarze kory, regulowane są wtedy najprawdopodobniej przez jądro nadskrzyżowaniowe. Swój początek mogą brać także ze wzgórza [18] [19].

Ze względu na swe wolne tempo, korowe fale delta potrafią nadzorować aktywność mózgu na znacznych obszarach, w wolnej skali czasowej. Jednak z tego samego powodu, choć uważa się, że kompleksy SWR są zsynchronizowane z fazą ich cyklu, to nie łatwo zaobserwować dynamikę zachowania rytmu delta na przestrzeni pojedynczego kompleksu. Trwanie całego kompleksu zamyka się zwykle w czasie mniej niż 0,1 jednego cyklu rytmu delta. Należą więc do innej skali czasowej.

## **12.5 Poziom pojedynczych komórek.**

Synchronizacja między hipokampem, a mPFC rozciąga się także na aktywność poszczególnych komórek, epizody SWR są bowiem związane w czasie z odpalaniem specyficznych neuronów w mPFC i warstwie wewnętrznej (łac. ventral striatum), które otrzymują bezpośrednie wejścia od rejonu CA1 i podpory hipokampu (łac. subiculum).

## **12.6 Kierunek oddziaływań.**

Zagadnieniem niezmiernie ważnym, poza stwierdzeniem faktu korelacji między regionami, jest także ustalenie faktycznego kierunku przepływu informacji. Która struktura, w jakich okolicznościach, podczas danego typu interakcji, służy za źródło, a która



jedynie odbiera napływające dane, przekazywane w postaci zmian potencjału elektrycznego. Czy w trakcie konsolidacji pamięci hipokamp w istocie jest swego rodzaju stacją nadawczą, przekazującą dane do kory przedczołowej. Ustalenie kierunkowości w odniesieniu do poszczególnych rytmów zawartych w sygnale, mogłoby sugerować pewne zależności przyczynowo-skutkowe i w efekcie do pewnego stopnia zweryfikować słuszność stawianych hipotez, rzucając światło na naturę konkretnych mechanizmów.

Na chwilę obecną, w poszczególnych przypadkach zdania są podzielone. Są dowody świadczące, że hipokamp rzeczywiście przewodzi ciało prądkowanemu i korze przedczołowej, inni wskazują z kolei na kierunek wręcz przeciwny. Wyładowania grup komórek w obszarze kory zmysłowo – ruchowej miałyby wywoływać kompleksy SWR w hipokampie, sugeruje się też, że zmiany stanów góra – dół podczas fal delta w korze przedczołowej, wpływają na prawdopodobieństwo zaistnienia zjawiska odtwarzania w hipokampie [13]. Wskazuje się też na wpływ regionu V1, którego aktywność poprzedza pobudzenia w hipokampie. Wzajemne oddziaływania hipokampu z innymi strukturami, przede wszystkim z korą przedczołową, jak wskazują przytoczone świadectwa, mogą przybierać różny kształt, a informacje mogą płynąć w obu kierunkach naraz bądź też kierunek zmieniać i płynąć raz od jednej struktury do drugiej, by za chwilę odwrócić bieg i ruszyć w kierunku przeciwnym. Panuje w tej materii cały wachlarz dosyć różnorodnych poglądów [16].

Oddziaływanie pomiędzy korą przedczołową, a hipokampem ulega zmianie w konkretnych, specyficznych stanach fizjologicznych, przy czym da się zauważyć niedostatek badań odnoszących się do ogólnej sytuacji podczas kompleksów SWR. Wobec obfitości materiału porównawczego, można posłużyć się nim do stwierdzenia czy i jaka zmiana aktywności mózgowej towarzyszy temu szczególnemu zjawisku jakim są kompleksy SWR.

## 13 Cele badania.

Wiele wskazuje na to, że równocześnie z pojawieniem się w zapisie LFP epizodu *ripple*, w trakcie, a także na krótko przed i po jej zakończeniu, w ścisłym otocze-

niu hipokampu, na obwodach łączących go z sąsiednimi strukturami, zachodzą niezwykle istotne fizjologicznie procesy. Wywierają efekt zarówno chwilowy, widoczny w zachowaniu pojedynczych komórek czy w aktywności całych rejonów mózgu, jak również globalny, zauważalny w skali funkcjonowania całego organizmu. Wobec tylu niezwykle spektakularnych zjawisk, zwracających uwagę na ten właśnie epizod w działaniu środkowego płata skroniowego, za główny przedmiot badania postawiono ściślejsze zbadanie oddziaływań pomiędzy zaangażowanymi strukturami. W jaki sposób wyglądają relacje hipokampu z innymi obszarami, zwłaszcza z korą przedczołową, w którą stronę przenoszą się informacje, czy to hipokamp jest ich głównym nadawcą, czy raczej odbiera tylko napływające skądś indziej dane. Czy po rozpoczęciu epizodu *ripple* aktywność neuronalna i wzajemne oddziaływania zmieniają charakter, czy daje się zaobserwować jakąś znaczącą różnicę względem okresu spokoju. Aby rozstrzygnąć lub chociaż rzucić więcej światła na powyższe kwestie, jako nośnik informacji i czynnik organizujący aktywność pomiędzy oddalonymi obszarami, analizie poddano przede wszystkim obecne w sygnałach fale, o częstościach z różnych pasm.

Ponadto, mając do dyspozycji zapisy potencjałów polowych, uzyskanych na zwierzętach realizujących model choroby Alzheimera, zdecydowano się przeprowadzić analizę porównawczą. Jednym z głównych objawów choroby Alzheimera jest utrata pamięci, zatem w czasie domniemanego jej formowania spodziewano się zaobserwować różnice, w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej, w pełni zdrowych. Przykładowym efektem mogłoby być chociażby osłabienie synchronizacji pomiędzy aktywnością danych struktur, zmiana kierunku przepływu informacji, brak wzmożonego oddziaływania hipokampu na okolicę.

Szczególne nacisk zamierzano położyć na okresy snu wolnofalowego. Precyzyjne i jednoznacznie wyselekcjonowanie okresów snu wolnofalowego bywa jednak kłopotliwe. Znaczne różnice międzysobnicze, brak ujednoliconych wytycznych odnośnie klasyfikacji tej fazy snu, zmienność cech zapisu LFP podczas jednej realizacji, znaczna niepewność automatycznych metod detekcji, potrzeba dużego doświadczenia przy detekcji wzrokowej, wszystko to może złożyć się na końcowy brak powodzenia zabiegu selekcji. Z uwagi na ten fakt, w przypadku nadmiernych trudności lub uzasadnionych wątpliwości, ponadto,

jako że *ripple* z natury występują przeważnie właśnie w chwilach uspokojenia organizmu i ograniczonej aktywności ruchowej, postanowiono uwzględnić wtedy każdy epizod, który udałooby się uchwycić w postaci nadającej się do poddania odpowiedniej analizie. Głównym przedmiotem zainteresowania były bowiem *ripple* w ogólności i towarzysząca im lokalna w czasie zmiana otaczającej aktywność neuronalnej. Nie wykluczono jednak z góry, że wśród znalezionych epizodów uda się wydzielić dwie lub więcej klas, ze względu na odmienną charakterystykę zmian.

Podczas analizy kierunku transmisji informacji neuronalnej, postanowiono skorzystać z metody kierunkowej funkcji przejścia (ang. Directed Transfer Function, DTF), opartej na parametrycznej analizie danych wielokanałowych.

## 14 Analiza parametryczna.

Dyskretny sygnał, dany na pewnym, w praktyce zawsze skończonym odcinku czasu, poddać można zabiegowi parametryzacji. W ramach określonego, odpowiednio dobranego modelu, znaleźć można parametry najlepiej oddające postać i przebieg sygnału. Następnie, zamiast opierać się na wszystkich, faktycznych próbkach oryginalnego szeregu czasowego, uzasadnione jest wyciągać pewne wnioski na temat sygnału tylko na podstawie estymowanych parametrów.

Posługiwanie się ograniczoną względem rozmiaru danych wyjściowych liczbą parametrów zazwyczaj jest wygodne i znacznie szybsze obliczeniowo. Ponadto, opisując dany sygnał przez model należący do pewnej znanej klasy, uzyskać można dzięki temu dodatkowe informacje na jego temat, niedostępne bezpośrednio we fragmencie sygnału o skończonej długości.

Popularnym modelem parametrycznym o szerokich zastosowaniach praktycznych jest model autoregresyjny. Dzięki swoim właściwościom dobrze pasuje do opisu wielu sygnałów różnego pochodzenia. Nadaje się, między innymi, do modelowania sygnału EEG, głównie za sprawą teoretycznego kształtu swojego widma mocy, składającego się, podobnie jak

faktyczne widmo EEG, z kilku dobrze określonych częstości na tle szumu.

## 15 Wielozmienny model autoregresyjny.

Zwykły, jednowymiarowy model autoregresyjny opisuje proces dyskretny, przybliżając jego wartość w każdej chwili czasu poprzez liniową kombinację wartości w chwilach poprzednich z dodatkiem składnika nieskorelowanego szumu. Rozszerzeniem modelu na większą liczbę wymiarów jest wielozmienny proces autoregresyjny (ang. Multivariate Autoregressive, MVAR), w pewnej chwili  $t$  dany jako:

$$X_t = \sum_{i=1}^p (A_i \times X_{t-i}) + \epsilon_t \quad (1)$$

gdzie  $\epsilon_t$  jest nieskorelowanym białym szumem o średniej równej 0, charakteryzującym się odwracalną macierzą kowariancji,  $A_i$  oznacza macierz współczynników modelu o wymiarach  $k \times k$ , gdzie  $k$  to liczba zmiennych, czyli na przykład kanałów rejestracji LFP, a  $x_{t-1}$  to transponowany wektor o długości równej liczbie kanałów, zawierający próbki sygnału w chwili  $t - i$  w każdym z kanałów [26].

Mimo, że do opisu sygnału, stanowiącego realizację danego procesu, użyty jest składnik stochastyczny  $\epsilon_t$ , to za pomocą przybliżonych parametrów uzyskać można faktyczne własności statystyczne sygnału takie jak wartość oczekiwana, wariancja czy widmo mocy.

Wielozmienny model AR zakłada, że jeśli pomiędzy dwoma sygnałami istnieje związek przyczynowy, wtedy część informacji zawartej w danym szeregu czasowym jesteśmy w stanie wytłumaczyć poprzez odwołanie się do innego szeregu. Pojęcie przyczynowości rozumie się tu w ujęciu Grangera, to znaczy, jeśli wykorzystanie wcześniejszych próbek pochodzących z jednego sygnału, do opisu obecnego stanu drugiego sygnału, przyczyni się do zmniejszenia niepewności predykcji, rozumianej jako część informacji niesionej przez ten sygnał, której natury nie udało się jak dotąd w żaden sposób wyjaśnić, wtedy pierwszy sygnał uznaje się za przyczynowy względem drugiego. Co istotne, przyczyna,

aby faktycznie została uznana za przyczynę, musi poprzedzać skutek w czasie. Definicja Grangera nie uznaje więc tak zwanej „przyczynowości natychmiastowej”, a jedynie wpływ próbek poprzednich.

Przebieg czasowy, aby kwalifikował się do poddania procedurze dopasowania modelu autoregresyjnego, spełniać musi pewne warunki. Wymaga się aby był stacjonarny i stabilny. Przy czym odnosi się to zarówno do samych przebiegów, jak i do realizowanego przez nie modelu AR. Stacjonarność w sensie szerokim, tak zwana słaba stacjonarność, oznacza, że ani pierwszy, ani drugi moment statystyczny, to jest średnia i kowariancja, nie mogą ulegać zmianom w czasie, to znaczy, że:

$$E(x_t) = \mu \quad (2)$$

dla wszystkich próbek czasu  $t$  i

$$E[(x_t - \mu)(x_{t-h} - \mu)] = \Gamma(h) = \Gamma(-h) \quad (3)$$

dla wszystkich próbek czasu  $t$  i dla  $h = 0, 1, 2, \dots$ , gdzie  $E$  oznacza wartość oczekiwaną sygnału, a  $\Gamma$  jest funkcją wyłącznie przesunięcia  $h$ . Stabilność natomiast zagwarantowana jest wówczas, gdy odwrotny wielomian charakterystyczny modelu autoregresyjnego nie posiada pierwiastków leżących wewnątrz bądź na zespolonym okręgu jednostkowym. Stabilność modelu jest kryterium wystarczającym dla uznania go za poprawny, bowiem stabilność zapewnia stacjonarność.

Opis sygnałów wielokanałowych za pomocą jednego, wielozmiennego modelu autoregresyjnego, jest punktem wyjścia dla metody DTF.

## 16 Metoda DTF.

Kierunkowa funkcja przejścia, (ang. Directed Transfer Function, DTF), pozwala znaleźć, wyznaczyć i ilościowo opisać zależności przyczynowe, ujęte w sensie Grangera,

występujące w danych wielokanałowych [24].

Analizując wzajemne relacje pomiędzy częściami składowymi złożonego systemu należy mieć na uwadze, że oddziaływania mogą rozchodzić się wzdłuż wielu różnych dróg, niekoniecznie wprost, ale nierzadko w sposób pośredni i z pozoru nieoczywisty. Aktywność pewnego wydzielonego obszaru mózgu, zawierającego wiele różnych obwodów i jednostek funkcjonalnych, odzwierciedlona w wielokanałowym zapisie LFP, stanowi przykład takiego układu. Porównywanie poszczególnych kanałów parami, w oderwaniu od całej reszty, może wobec tego dać zafałszowany obraz faktycznego stanu rzeczy. Choć na skutek koherencji i odpowiedniej relacji fazowej sygnałów, w danej parze kanałów jeden z nich będzie wyglądał na źródło aktywności drugiego, to niewykluczone, że istnieje jakiś trzeci, inny kanał, stanowiący faktyczne źródło dla obu kanałów z rozpatrywanej pary. Wobec tego, należy zawsze mieć na uwadze wszystkie potencjalne kierunki, z jakich przyjść może zmiana kształtu wzajemnych zależności. Właściwym podejściem w takiej sytuacji będzie jednoczesne uwzględnienie informacji pochodzących ze wszystkich kanałów należących do układu, co właśnie stanowi główną zaletę metody DTF. Pozwala ona dzięki temu na wyznaczenie wiarygodnej struktury oddziaływań, globalnej dla całego układu. Nie można oczywiście wykluczyć, że na skutek niedostatecznej adekwatności pomiaru, na przykład błędnego rozmieszczenia elektrod pomiarowych, uzyskany obraz oddziaływań nie będzie miarodajny dla faktycznie zachodzących procesów fizjologicznych, jednak stanowi to problem poza zasięgiem metody DTF.

Wartości funkcji DTF uzyskuje się biorąc elementy macierzy przejścia modelu autoregresyjnego. Macierz przejścia dana jest przez:

$$\hat{H}(z) = (\sum_{i=0}^p \hat{A}_i z^{-i})^{-1} \quad (4)$$

Macierz przejścia nie jest symetryczna, to znaczy przepływ z kanału  $i$  do kanału  $j$  jest inny niż przepływ w stronę przeciwną, co pozwala sądzić, że jej elementy będą poprawnym wskaźnikiem faktycznego kierunku propagacji sygnału.

Wartość funkcji DTF dana jest przez:

$$\gamma_{ij}(f) = \frac{|H_{ij}(f)|}{\sqrt{\sum_{m=1}^k |H_{im}(f)|^2}}, \quad (5)$$

gdzie normalizację stanowi wpływ do kanału  $i$  ze wszystkich pozostałych kanałów, uwzględniając kanał  $j$ .

Jako że metoda DTF opiera swoje działanie na korelacjach występujących w układzie, składnikiem zasadniczym, niezbędnym dla stwierdzenia przyczynowości jest opóźnienie w fazie. Jeśli sygnał z danego kanału ma oddziaływać na miejsce oddalone w przestrzeni, potrzeba czasu, aby mógł przebyć drogę dzielącą od siebie dwa punkty. W zależności od częstości rytmu, różne składowe sygnału dotrą na miejsce przesunięte o inną wartość fazy, względem poziomu wyjściowego. Faza zawiera się w przedziale od 0 do  $2\pi$ , a wobec tego przesunięcie o wartość większą wzięte zostanie modulo  $2\pi$ , co stanowi pewne ograniczenie metody, które należy mieć na uwadze.

W przypadku niniejszej pracy, dla LFP, zakładając najniższą prędkość rozchodzenia się fal mózgowych rzędu kilku  $\frac{\text{m}}{\text{s}}$  i oddalenie elektrod pomiarowych sięgające kilku milimetrów, dla rytmów o wyższej częstości opóźnienia fazowego przekraczającego  $2\pi$  nie można wykluczyć z całą pewnością.

Na przykład, fala propagująca się z prędkością  $1 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ , pomiędzy elektrodami odległymi o 1 cm, jeśli częstość jej rytmu byłaby wyższa niż 100 Hz, zanim przebyłaby całą drogę, upłynąłby ponad jeden cykl oscylacji i różnica faz zarejestrowanych w obu miejscach nie odpowiadałaby prawdzie.

Jest to jednak sytuacja skrajna i w obliczu braku skutecznych środków potrzebnych dla stwierdzenia, że rzeczywiście miała miejsce, pozostaje wierzyć, że faktyczny stosunek prędkości fali do częstości oscylacji był z reguły znacznie wyższy, nie stanowiąc źródła przekłamań.

## 17 Przebieg eksperymentów na zwierzętach.

Obszarem szczególnego zainteresowania był środkowy płat skroniowy i aktywność elektryczna na całej jego głębokości. Lokalne potencjały polowe rejestrowano za pomocą elektrod osadzonych na próbniku głębinowym, umieszczonym w płacie skroniowym, przechodzącym przez warstwę pierwszorzędowej kory mózgowej, sięgającym aż rejonu warstwy promienistej hipokampu (łac. stratum radiatum). Elektrody, w liczbie trzydziestu dwu, zbierały potencjał pola elektrycznego z zewnątrz, z otoczenia grup komórek, między innymi znajdujących się w hipokampie komórek piramidalnych i neuronów przekaźnikowych. Mimo, że w uzyskanych zapisach dominuje przebieg pola, to z racji bliskości, niejako zanurzenia elektrod w tkance mózgowej, widoczne są także ślady potencjałów czynnościowych pochodzące od pojedynczych komórek.

We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach, włącznie z rejestracjami poddany mi analizie w niniejszej pracy, obiekt badań stanowiły myszy laboratoryjne. Przy wyborze gatunku zwierząt uwzględniono czynniki mogące mieć istotny, korzystny wpływ zarówno na przebieg samych doświadczeń, jak i na uzyskane końcowe dane, ich ogólną jakość, zawartość zakłóceń w sygnale i powtarzalność. Jedną z zalet myszy jako gatunku w ogólności, dającą im wyraźną przewagę w tym względzie na przykład nad szczurami, jest ich zdecydowanie mniejsza siła fizyczna, większa łagodność, spokój i skłonność do biernego poddania się napotkanym okolicznościom. Poddawane zabiegom operacyjnego wszczepienia sond głębinowych i później, w trakcie właściwej rejestracji, są na ogół spokojniejsze, nie wrywają się i nie są w stanie sprzeciwić się z tak dużą siłą jak, nawet znieczulone szczury.

Wszystkie zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy, kontrolną i testową, po trzy myszy w każdej z nich. Następnie zwierzętom z grupy testowej w obszar środkowego płata skroniowego zaaplikowany został środek o nazwie amyloid beta ( $A\beta$ ). Całą procedurę przeprowadzono odpowiednio wcześniej, około 2 tygodnie, aby substancja miała wystarczająco dużo czasu, żeby zacząć działać.



Silikonowe sondy głębinowe zaimplantowane zostały w docelowym miejscu na kilka dni przed rozpoczęciem właściwych sesji pomiarowych, tak aby pozwolić zwierzęciu na zaadaptowanie się, przywyknienie i poddanie się niecodziennym warunkom, nie sprzyjającym bynajmniej osiągnięciu komfortu zarówno fizycznego jak i mentalnego.

Po odczekaniu kilku dni, podczas których zwierzęta miały szansę i powinny wrócić już do zwykłego swojego samopoczucia i względnie regularnego stanu psycho-fizycznego, przystąpiono do wdrożenia procedur mających na celu odpowiednie przygotowanie docelowych warunków doświadczalnych, po czym zwierzęta z obu grup poddano właściwej sesji pomiarowej. Myszy w trakcie przeprowadzanych rejestracji miały unieruchomioną głowę (ang. head restrained). Mierzono lokalne potencjały polowe (ang. LFP) na obszarze środkowego płata skroniowego. Każde ze zwierząt dostarczyło prawie 30 minutowego, 32 kanałowego ciągłego zbioru danych. Włączona aparatura rejestrująca podczas późniejszych analiz wykazała, że każda z myszy w trakcie badania znajdowała się w jednym z trzech stanów, którymi były sen typu REM, sen wolnofalowy lub też mniej lub bardziej wzmożona aktywność. Przeważały jednak okresy spokoju, przypominające stan pół-snu lub pewne ogólne otępienie.

## 18 Model choroby Alzheimera u zwierząt.

Substancja o nazwie amyloid beta, podana zwierzętom z grupy testowej, występuje w organizmach dotkniętych chorobą Alzheimera w różnych obszarach mózgu. Wysokie stężenie owej substancji, zwłaszcza w rejonie hipokampu, podejrzewa się o pewien wpływ na zaburzenia pamięci, właściwe dla przypadków choroby Alzheimera. Choć model zwierzęcy może nie w pełni odpowiadać zależnościom występującym u człowieka, mimo to stosuje się u nich ten sam środek  $A\beta$ , jako jeden z najlepiej poznanych czynników współwystępujących u ludzi z klinicznym przebiegiem choroby.

Skutek jaki wywiera  $A\beta$  na rozwój towarzyszącej Alzheimerowi demencji zależy prawdopodobnie od rozkładu stężenia tego środka w konkretnych lokalizacjach w mózgu, jak i

odpowiadającego im stopnia jego rozpuszczalności [23].

## 19 Analiza danych.

### 19.1 Wstępne przetwarzanie sygnałów.

Każda z rejestracji, dla trzech zwierząt z grupy testowej i trzech z grupy kontrolnej, zawierała 32 kanały zapisu LFP. Oryginalna częstota próbkowania sygnału analogowego wynosiła 20 000 Hz. Zanim przystąpiono do właściwych analiz wszystkie sygnały zostały przepróbkowane do częstoty niższej, wynoszącej 1250 Hz.

Nadmierne zagęszczenie próbek nie było potrzebne w kontekście badań jakie zamierzano przeprowadzić, pojedyncze potencjały czynnościowe nie stanowiły bowiem przedmiotu zainteresowania. Co więcej, było wręcz nie wskazane, zwłaszcza ze względu na analizę parametryczną jakiej miały zostać poddane sygnały, a która daje lepsze efekty w zastosowaniu do sygnałów o stosunkowo niższej częstocie próbkowania.

Sygnał w każdym z kanałów został przefiltrowany filtrem górnoprzepustowym Butterwortha odcinającym częstoty poniżej 0,5 Hz w celu wyeliminowania poziomu stałego napięcia DC.

Na podstawie obserwacji widma mocy poszczególnych rejestracji stwierdzono, iż obecność napięcia sieci elektrycznej, o częstocie 50 Hz, jest niemalże niewidoczna, a w każdym razie niezwykle słaba.

Wobec tego, jak również z braku kanałów zawierających bardziej neutralną aktywność, a także z powodu, że analizie zamierzano poddać bardzo krótkie fragmenty sygnałów, które mogłyby ulec nadmiernej deformacji, postanowiono zrezygnować ze stosowania jakichkolwiek dodatkowych montażu. W tej sytuacji mogłyby bowiem odnieść skutek odwrotny od zamierzonego.

## 19.2 Szukanie snu wolnofalowego.

Wśród rozlicznych kryteriów i metod klasyfikacji stanów fizjologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem snu wolnofalowego, panują znaczne rozbieżności. Pod względem czynności elektro-fizjologicznej, skład i względna zawartość czynników jaka odróżnia dany stan od innych i jaką każdy z nich powinien się charakteryzować, nie zawsze jest dobrze sprecyzowana. Zależy od gatunku, nieco inna jest na przykład dla ludzi, inna dla myszy, a jeszcze inna dla szczurów. Powszechnie akceptowane i stosowane wytyczne ewoluują w czasie, wraz z rozwojem nauki i stopniowym pogłębianiem szczegółowości badań.

Zanim przystąpiono do właściwych poszukiwań, przeprowadzono rozeznanie wśród dostępnych w źródłach metod, pozwalających na wydzielenie okresów snu, bądź przypominających sen, określane wolnofalowym. Przy braku nagrań wideo, jak i zapisów czynności elektrycznej mięśni (ang. EMG) u zwierząt podczas rejestracji, polegać można było jedynie na kryteriach opartych wyłącznie o charakterystykę fal mózgowych, czyli zawartość zapisów LFP.

Główną cechą snu wolnofalowego, od której też pochodzi jego nazwa, a z której korzysta się w zdecydowanej większości przypadków podczas klasyfikacji owej fazy, jest wysoki udział wolnych oscylacji z pasma delta w całym sygnale, rejestrowanym na obszarze środkowej kory przedczołowej. Jak już wcześniej wspomniano, przyjmuje się, że rytm o częstotliwości od nieco powyżej 0 do 3 Hz, powinien stanowić nie mniej niż 20% mocy całego chwilowego widma, bez dłuższych przerw na odcinku przynajmniej 30 sekund. Choć kryterium zawartości pasma delta bywa wystarczające, uwzględnia się oprócz tego także pasmo teta, które wraz z pojawieniem się fazy SWS, powinno w dużej mierze, w sposób zauważalny, słabnąć [27]. Zamiast rozpatrywać dane pasma niezależnie, w oderwaniu od innych, stosuje się nieraz także analizę stosunku mocy w obu pasmach, to jest moc delty w porównaniu do tety, który powinien utrzymywać się na pewnym, wysokim poziomie.

Dla każdej rejestracji, w oparciu o powyższe wytyczne, podjęto więc próbę klasyfikacji całego dostępnego zbioru danych, pokawałkowania i przyporządkowania każdego z fragmentów do jednej z trzech grup.

Biorąc w dużym uproszczeniu, w danej chwili zwierzę może znajdować się w jednym z trzech stanów. Może być przytomne i aktywne, może przebywać w śnie typu REM lub wreszcie może być pogrążone w śnie wolnofalowym. Na podstawie dotychczasowych, przyjętych w literaturze ustaleń, założyć można, że trzy powyższe, ogólnie zdefiniowane grupy, wyczerpują całą zmienność jakiej podlegać może całościowo ujęty stan psychofizjologiczny organizmu zwierzęcia.

Szczególny nacisk położono na wydzielenie okresów snu wolnofalowego, nie przywiązując dużej wagi do separacji stanów REM od stanów aktywności, co przy braku zapisów EMG stanowiłoby trudniejsze przedsięwzięcie, jako że charakterystyka LFP jest pod pewnymi względami w obu stanach dość podobna.

Stres spowodowany niekomfortową, niecodzienną sytuacją, jaką mimo wszelkich udogodnień są niewątpliwie dla zwierzęcia laboratoryjnego wewnątrz czaszkowe pomiary czynności elektrycznej mózgu, choć zniwelowany zabiegami przygotowawczymi, mógł wywrzeć pewien wpływ na postać uzyskanych danych i sposób przyporządkowania każdego z odcinków. Jakikolwiek bliższe zbadanie tej kwestii jest jednak poza zasięgiem niniejszej analizy i pozostaje mieć nadzieję, że naturalna zmienność jak i proporcje poszczególnych stanów nie zostały zaburzone w sposób nadmierny.

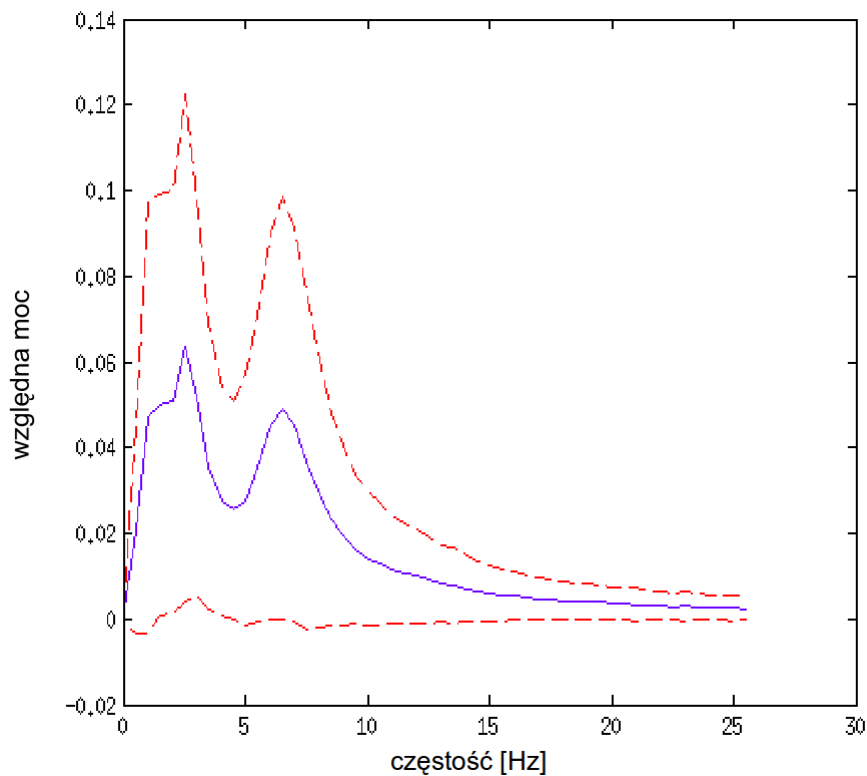
Umieszczenie konkretnych pasm, dokładny zakres częstości, to jest tzw. „widelki”, podlegają zmienności międzyosobniczej. Dążąc do precyzyjnego ustalenia składu sygnałów w zakresie poszczególnych pasm częstości, sprawdzono najpierw całościową charakterystykę danych, patrząc na dane na całej ich długości, od początku do końca rejestracji, niezależnie od możliwej niejednorodności stanów fizjologicznych.

Z racji, że poszczególne elektrody leżały w bardzo bliskiej odległości od siebie, rzędu zaledwie kilku milimetrów, z każdej z rejestracji zdecydowano się wziąć po jednym tylko kanale i analizie poddać cały, pochodzący z niego sygnał. Wyselekcjonowano kanały leżące na skraju kory przedczołowej, w najbliższym sąsiedztwie hipokampu. Oczekiwano, że w ten sposób uda się uchwycić zarówno korową wolną falę, jak i właściwy przede wszystkim hipokampowi rytm teta.

Każdy z wybranych sygnałów podzielono następnie na odcinki dwusekundowe, co po-

zwoiliło uzyskać rozdzielczość dającą dwie próbki sygnału, przypadające na jedną częstotliwość widma. W celu uzyskania większej rozdzielczości czasowej i lepszego odzwierciedlenia zmienności, kosztem nawet pewnej redundantności, kolejne odcinki zachodziły na siebie kawałkiem ćwierć sekundowym.

Dla każdego z uzyskanych w ten sposób fragmentów, aplikując wpierw do każdego z nich okno Hamminga, wyliczono następnie widmo gęstości mocy przy użyciu szybkiej transformaty Fouriera (ang. FFT). Widma uśredniono po całym zbiorze, a uzyskane w ten sposób widma średnie poddano ocenie. Fragment uzyskanego widma, wraz z odchyleniem standardowym, dla przykładowej rejestracji z grupy kontrolnej, przedstawia rysunek 1.



Rysunek 1: Uśrednione widmo mocy na podstawie całej rejestracji. Rejestracja z grupy kontrolnej.

Sytuacja dla sygnałów pochodzących z każdej z rejestracji wyglądała dość podobnie, nie zaobserwowano istotnych, jakościowych różnic.

Trzeba zauważyć, że odchylenia standardowe uzyskanych przebiegów dla każdej z częstości zawartych w widmie były znaczne, co wskazuje, że rozrzut jednostkowych wyników na przestrzeni całej rejestracji był dość duży.

Patrząc na cały przebieg widma, porównując poszczególne częstości, dwa pasma wyróżniały się szczególnie na tle całej towarzyszącej im reszty (rys. 1). Leżały niedaleko od siebie, przedzielone odcinającą się znacznie, schodzącą wyraźnie w dół doliną, to znaczy zbiorem częstości o wyraźnie niższej mocy. Najpierw, z lewej strony, patrząc od początku układu współrzędnych, napotkano pasmo w granicach wahających się od mniej więcej 0,7 do około 3 Hz, szczyt swój osiągające przeważnie około 1,5 Hz.

Był to zakres powszechnie określany jako pasmo delta, wyraźnie górujące nad okolicą.

Następnie idąc dalej, mijając obniżenie, dochodziło się do pasma drugiego, w zakresie od około 5,5 Hz do 8 Hz, odpowiadającego pasmu nazywanemu pasmem teta.

Taki, a nie inny skład całościowego widma nie był zaskoczeniem, spodziewano się bowiem, że zgodnie ze świadectwami zaczerpniętymi ze źródeł, opartymi na dotychczasowych badaniach, właśnie powyższe dwa pasma powinny odgrywać wiodącą rolę na tle całego przebiegu LFP rejestrowanego w podobnych warunkach.

Zgodność taka była satysfakcjonująca, pozwoliła także wyznaczyć dokładną lokalizację i ilościowy skład odnośnych pasm dla konkretnego osobnika. Indywidualne, odrębne sprawdzenie dla każdego ze zwierząt jest istotne ze względu na znaczną zmienność osobniczą jeśli chodzi o dokładne umiejscowienie pasm częstości sygnałów, tutaj zwłaszcza delta i teta. Pomiedzy gatunkami, a nawet poszczególnymi osobnikami w obrębie jednego gatunku, pasma znaleźć można znacznie przesunięte, a nawet oddalone od siebie i nie mające żadnych punktów styecznych, choć wciąż kwalifikowane jako to samo pasmo, określane tą samą nazwą. Przebieg mocy powyższych niskoczęstotliwościowych pasm odcinał się wyraźnie od pozostałych, ciężko byłoby wskazać jeszcze jakiegokolwiek inne poza nimi.

Zakres określany zwyczajowo jako pasmo gamma, to jest w szerokich, zmiennych granicach powyżej około 20, aż do około 60 Hz, nie zwracał uwagi niczym szczególnym. Postanowiono jednak mimo to, przy dalszym szczegółowym badaniu przebiegu ciągłego, wziąć także owe pasmo gamma, jako dodatkowy czynnik, pozwalający w miarę potrzeb

odróżnić stan snu REM, podczas którego, jak się powszechnie uważa, aktywność w tym paśmie ujawnia się dość często, od stanu aktywności, gdy pasma owego trudno uświadczyc.

Choć operacja wyciągania średniej ustaliła pasmo gamma na niskim poziomie, nie wykluczone, że w poszczególnych, krótkich fragmentach sygnału pasmo gamma mogło ujawniać swą przejściową aktywność.

Posiadając już sprecyzowane dokładnie granice interesujących pasm przystąpiono do właściwej analizy ich występowania na przestrzeni trwania całych sesji pomiarowych.

Choć wyróżniające się pasma miały szerokość nieco większą, do dalszej analizy postanowiono wybrać z każdego z nich tylko pewien wycinek, w danym paśmie się zawierający, o równej, takiej samej długości dla każdego z pasm. Porównywanie ze sobą względnego udziału pasm w całkowitej chwilowej mocy sygnału, podczas gdy pasma są różnej długości i na każde przypada inna liczba punktów, byłoby niewiarygodne i niewygodne, jako że za swego rodzaju hipotezę zerową przyjmujemy, iż każdy z punktów, reprezentujących kolejne częstotliwości, wnosi do całości równy ładunek mocy widmowej. Należałoby więc wciąż o tym pamiętać i nieustannie na każdym kroku analizy brać poprawkę na nierówną liczbę punktów w porównywanych ze sobą wielkościach.

Wobec tego wydzielono pasma mieszczące się w zakresach przedstawionych w tabeli 1.

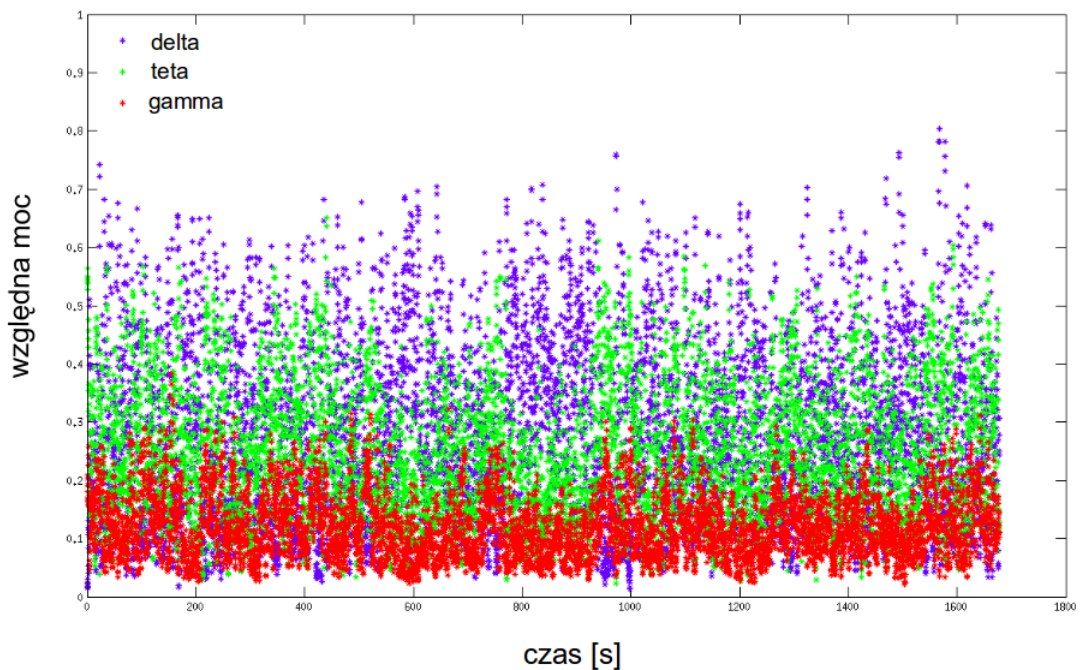
Tabela 1: Zakresy pasm delta i teta, wartości podane w Hz.

	Grupa kontrolna			Grupa testowa		
Nr zwierzęcia	1	2	3	1	2	3
Pasmo delta	0,7 - 3,2	1,0 - 3,5	0,7 - 3,2	1,5 - 4,0	1,2 - 3,7	0,5 - 3,0
Pasmo teta	5,0 - 7,5	5,5 - 8,0	5,7 - 8,2	5,0 - 7,5	5,0 - 7,5	3,0 - 5,5

Pasmo gamma pozostawiono w nieokrojonych ramach, jako że miało być zastosowane samodzielnie, a nie w odniesieniu do jakiegoś innego pasma referencyjnego. Analizie miała zostać poddana co najwyżej względna zmienność pasma gamma w czasie.

Z każdego z pasm do analizy wzięto wartość średnią po całym odpowiednim przedziale częstotliwości.

Kryterium jakie zastosowano, służące przede wszystkim wydzieleniu okresów stanu wolnofalowego spośród stanów innego rodzaju, to jest aktywności bądź snu paradoksalnego REM, polegało zasadniczo na określeniu względnego udziału pasma delta i pasma teta w całkowitej chwilowej mocy widmowej sygnału, w każdym kolejnym odcinku z osobna. Przebieg dla przykładowej rejestracji przedstawiono na rysunku 2, w postaci zależności względnej mocy danego pasma od czasu.



Rysunek 2: Zależność względnego udziału pasm delta, teta i gamma w widmie mocy od czasu. Rejestracja z grupy kontrolnej.

Klasyfikację uzyskaną na drodze w znacznej mierze automatycznej postanowiono skonfrontować dodatkowo i potwierdzić poprzez wzrokową analizę surowych danych, śledząc jednocześnie wszystkie kanały danej rejestracji, przede wszystkim pod kątem obecności wolnej fali i zachowania częstotliwości podobnych rytmowi teta. Zrezygnowano z równoczesnego



podglądu widma mocy, jako nieadekwatnego do przeprowadzonej wcześniej analizy automatycznej i polegając jedynie na własnym osądzie co do kształtu przebiegów czasowych uzyskano w reguły pozytywną weryfikację danych przedziałów.

Opierając się na posiadanej wiedzy o przypuszczalnej liczbie stanów, spróbowano także innego podejścia, wykorzystującego informację o wzajemnym stosunku poszczególnych pasm. Zwracając się do problemu od przeciwnej strony, zamierzano wykryć poziom względnej zawartości pasm, w tym wypadku zwłaszcza delta, teta i wolna gamma, stanowiący cezurę pozwalającą odseparować od siebie pod względem elektro-fizjologicznym różne stany i zarazem potwierdzić uzyskane powyżej rezultaty.

Za pracą [22], na każdym z odcinków, wydzielonych w sposób jak powyżej, wzięto dwa stosunki. Pierwszy z nich to wartość średnia w przedziale delta od 1 do 3 Hz, względem wartości średniej w zakresie zawierającym w sobie zarówno pasmo delta jak i pasmo teta, od 1 do 9 Hz. Drugim stosunkiem był zakres niskich częstotliwości, od 1 do 20 Hz, dzielony przedziałem częstotliwości zawierającym zarówno niskie częstotliwości jak i pasmo wolnej gammy, od 1 do 60 Hz. Tutaj przyjęto identyczne zakresy dla każdego ze zwierząt, zostały bowiem one zdefiniowane na tyle szeroko, że nie widziano potrzeby doszukiwania się drobnych różnic międzyosobniczych, bez jakościowego wpływu na całościowy obraz.

Oba stosunki powinny przyjmować wartości z zakresu od 0 do 1, przy czym przy doborze objętości pasma znajdującego się w liczniku każdego z nich, nie starano się osiągnąć żadnej konkretnej proporcji względem objętości pasma stojącego w mianowniku, a raczej jak najlepszą separację charakterystycznych pasm.

Duża wartość pierwszego ze stosunków świadczyłaby o dojściu do głosu przez wolne fale z zakresu pasma delta, natomiast na odwrót, na podstawie niewielkiej, bądź chociaż niższej niż przeciętnie, wartości stosunku drugiego, można by wnioskować o wysokim natężeniu częstotliwości z zakresu wolnej gammy.

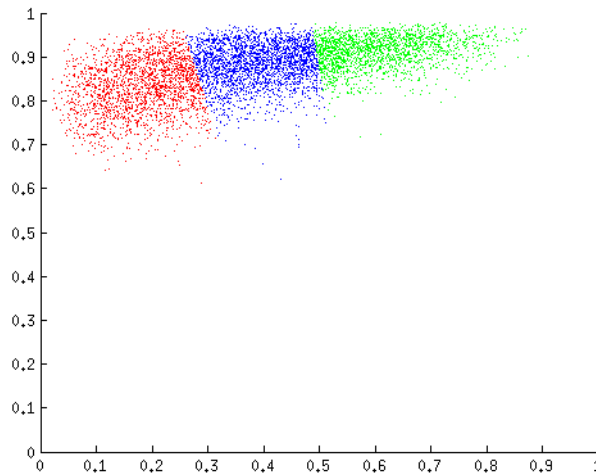
Uzyskane na każdym z odcinków punkty naniesiono następnie na płaszczyznę w przestrzeni dwuwymiarowej, gdzie na osi poziomej odłożono stosunek częstotliwości niskich, a na osi pionowej stosunek szerszy, obejmujący częstotliwości wysokie.

Po rozłożeniu punktów, na uzyskanym w ten sposób obrazie dwuwymiarowym, spodziewano się ujrzeć trzy rozłączne względem siebie grupy, a każdy punkt przyporządkowany do jednej z nich. Następnie, segregując w czasie punkt po punkcie, odcinek po odcinku, zamierzano wyznaczyć przebieg czasowy zmienności i następowania po sobie stanów, wolnofalowego, snu paradoksalnego i stanu aktywności.

Ilościowe, ściśle i jak najbardziej optymalne rozgraniczenie, to znaczy rozdział poszczególnych grup, starano się wyznaczyć przy pomocy analizy skupień używając iteracyjnej metody k-średnich.

Wybrana metoda opiera się na znalezieniu z góry założonej, znanej a priori liczby punktów zbioru, które stanowić będą centra grup i następnie przyporządkowaniu wszystkich punktów należących do zbioru do którejś z grup, tak żeby zminimalizować całkowitą odległość średnio-kwadratową każdego z punktów od centrum grupy do której należy. Prowadzi do tego droga iteracyjna, w każdej pętli algorytmu powtarza się dwa zasadnicze kroki polegające na znalezieniu nowych centrów będących środkiem ciężkości każdej z grup i nowego przyporządkowania punktów do któregoś z nowych centrów. Czynności powtarza się aż do zbiegnięcia wspomnianej, zbiorczej odległości.

Przeprowadzono analizę według powyższego schematu, ostateczny podział dla przykładowego zwierzęcia z grupy kontrolnej przedstawiono na rysunku 3. Poszczególne grupy oznaczone są innymi kolorami.



Rysunek 3: Klastrowanie stanów fizjologicznych metodą k-średnich. Rejestracja z gupy kontrolnej.

Jakościowo, postać uzyskanych wykresów nie różniła się pomiędzy rejestracjami.

Grupowanie, jak można stwierdzić gołym okiem, jest niezadowolające, nieostre, granica pomiędzy klastrami jest płynna i nie dość wyraźnie określona, a podział wydaje się sztuczny.

Rozrzut punktów w pionie, to jest wahania zawartości częstości z pasma gamma, jest niewielki, punkty skupiają się wokół jednej centralnej wartości.

Stosunek zaznaczony na osi poziomej wykazuje natomiast dosyć znaczną zmienność, punkty rozłożone są na dużej przestrzeni, osiągając zarówno wartości niskie jak i bardzo wysokie. Patrząc na kierunek poziomy, stwierdzić można także, że wiele jest punktów pośrednich, których przyporządkowanie do jednej bądź drugiej grupy, to znaczy do grupy znajdującej się po stronie wartości większych lub tej obejmującej wartości mniejsze, jest cokolwiek wątpliwe i poczynione w dużej mierze niejako na siłę, z konieczności podjęcia jakiejś decyzji przez zastosowany algorytm.

Podsumowując więc, rozdział, choć siłą rzeczy, w obliczu braku innych rozwiązań możliwych w posiadanym zbiorze danych oddający ogólne tendencje, to jednak wydaje się być nie dość przekonujący i nie oddający prawdziwego stanu rzeczy na tyle, aby go

uznać i opierając się wyłącznie na jego podstawie wnioskować o przynależności każdego z odcinków do któregoś ze stanów.

Przyczyn powyższego stanu rzeczy szukać można w źródłach zupełnie różnej natury.

Zaobserwowany brak wyraźniejszego rozdziału grup spowodowany mógł zostać poprzez zbyt małą, niewystarczającą ilość punktów doświadczalnych, czyli nazbyt krótką dostępną do analizy rejestrację. W mało licznym zbiorze punktów punkty pośrednie mogły mieć bowiem zbyt duży udział i nie udało się uzyskać wystarczająco wyraźnie zaznaczonej granicy.

Swój wpływ wywrzeć mogła także specyfika osobnicza, uwarunkowania badanych zwierząt, u których w zapisie czynności elektrycznej występuje wiele stanów pośrednich, przejściowych, mających faktycznie duży udział, bez wyraźnie dominującego któregoś z pasm. Konkretnie stany fizjologiczne mogły również nie manifestować się w sposób zupełnie jednoznaczny w zapisie LFP.

Brak ujawniających się w sposób wyraźniejszy oscylacji z zakresu wolnej gammy spowodowany mógł być niewspółmiernością mocy w tym paśmie do pasma, z którym było porównywane. Epizody szybszych oscylacji mogły być krótkie i przejściowe i w dodatku nie bardzo silne. Uważa się w dodatku, że oscylacje gamma często występują wtedy gdy oscylacje teta, a w takim wypadku pojawienie się szybkiej oscylacji byłoby w tak dobranym stosunku niejako ekranowane przez jednoczesny, silniejszy rytm o niższej częstotliwości. Z drugiej strony, sugerować może to też rzeczywisty brak lub rzadkość stanów snu paradoksalnego u zwierząt doświadczalnych.

Wobec zaistniałej sytuacji postanowiono zrezygnować z wyników klastrowania metodą k-średnich jako podstawy do klasyfikacji kolejnych odcinków sygnału i zamiast tego pozostać przy podziale uzyskanym wcześniej, na drodze analizy względnego wkładu mocy, pochodzącego od każdego z pasm z osobna. Przeprowadzona analiza skupień nie wnosi bowiem nowej jakości do już posiadanej wiedzy, co więcej, w pewnych względach może zaciemniać obraz i wydaje się nie dość dobrze nadawać do zbioru danych jakim dysponowano.

Pozostało wobec tego polegać na własnym oglądzie, który pozwolił w tym konkretnym

wypadku przeprowadzić weryfikację bardziej szczegółową.

Procentowy udział snu wolnofalowego u poszczególnych zwierząt przedstawiony jest w tabeli 2.

Tabela 2: Procentowa zawartość SWS u poszczególnych zwierząt.

Nr zwierzęcia	Grupa kontrolna			Grupa testowa		
	1	2	3	1	2	3
% całego czasu rejestracji	52	37	26	95	67	11

Ogółem, zwierzęta z grupy kontrolnej przebywały w stanie SWS przez  $(38 \pm 13)\%$ , natomiast zwierzęta z grupy testowej przez  $(58 \pm 43)\%$  czasu całej rejestracji.

Uwagę zwraca zwłaszcza bardzo duży rozrzut wyników w grupie testowej, który nie pozwala wyciągać żadnych zbyt daleko idących wniosków, na temat wpływu  $A\beta$  na zmienność stanów fizjologicznych.

Wyróżniają się dwie rejestracje z grupy testowej, jedna (nr 1) o wyjątkowej w swoich rozmiarach dominacji wolnej fali, a druga (nr 3), wręcz przeciwnie, o niewielkiej zawartości SWS.

U zwierzęcia nr 1 należącego do grupy testowej stwierdzić można było wyraźnie, że stan wolnofalowy stanowi największą część całej rejestracji, przerywany tylko z rzadka niedługimi okresami ożywienia i aktywności, poprzedzonymi przeważnie równie krótkim epizodem snu paradoksalnego. Po myszy laboratoryjnej, której dość znacznie ograniczono swobodę poruszania się, jak i różnorodność dochodzących bodźców zmysłowych, pozostawioną sobie samej, można by oczekiwać właśnie zbliżonej mieszanki stanów fizjologiczno-ruchowych, w podobnie nierównych proporcjach, ze znaczną dominacją stanu wolnofalowego. Zwierzę z unieruchomioną głową, nie przemieszczając się, nie ruszając zbyt wiele, przebywało przeważnie w spoczynku, swoistym wyciszeniu, bez gwałtownych napięć, wysiłku bądź stresu.

Przyczyna mogłaby tkwić także w działaniu środka  $A\beta$ , powodującego pewne uspokojenie czy wręcz otępienie organizmu, w sprzeczności z taką tezą stoi jednak charakterystyka

zwierzęcia nr 3 z grupy testowej.

Pozostałe rejestracje z kolei, jedna z grupy testowej i wszystkie trzy z grupy kontrolnej, przedstawiały się na całej swojej długości dosyć podobnie, bez aż tak wyraźnych jakościowych różnic w rozkładzie udziału któregoś z pasm.

Bardziej prawdopodobne więc, że za podobne różnice odpowiada naturalne usposobienie obu zwierząt, każde, na swój sposób, odmienne od pozostałych. Być może także, że obraz jaki uzyskano nie w pełni odpowiada prawdzie, bowiem długość rejestracji, wynosząca niecałe 30 minut, mogła być zbyt krótka, co mogło spowodować, że uzyskane zapisy są nie dość reprezentatywne. Oba wyróżniające się zwierzęta w trakcie badania przechodzić mogły akurat przez stany pewnego typu, których zwierzęta pozostałe doświadczały także, tyle, że kiedy indziej, w czasie nie objętym rejestracją.

### 19.3 Analiza epizodów *ripple*.

Z każdej z rejestracji wybrano po jednym kanale, stanowiącym podstawę do detekcji odcinków czasowych zawierających epizody *ripple*. Wyboru dokonano opierając się na wzrokowym oglądzie, który pozwolił stwierdzić, w którym z kanałów epizody *ripple* są najwyraźniejsze, a także na wiedzy o anatomicznej lokalizacji elektrod. We wszystkich przypadkach oba kryteria potwierdzały się wzajemnie, a właściwe kanały pochodziły z elektrod leżących w obrębie pola CA1 hipokampu.

Sposób wyszukiwania epizodów *ripple*, które posłużyć miały do dalszej analizy, ulegał zmianie w miarę pracy nad kolejnymi rejestracjami.

Początkowo szukano ich w sposób mieszany, to znaczy stosując metodę automatyczną, efekty której weryfikowano następnie poprzez wzrokowe badanie surowych danych. Procedura automatyczna polegała na zaaplikowaniu do całości sygnału w wybranym kanale, filtru pasmowo-przepustowego Butterwortha, od częstości 100 Hz do częstości 200 Hz, to jest w paśmie w którym powinny leżeć *ripple* i analizie sygnału znormalizowanego i podniesionego do kwadratu (ang. Normalized Squared Signal). Kwalifikowano fragmenty, w

których wartość obwiedni (ang. envelope) przebiegu czasowego przekraczała co najmniej dwukrotność odchylenia standardowego, utrzymywała się na takim poziomie przez co najmniej 30 milisekund i osiągała w międzyczasie co najmniej pięciokrotność odchylenia standardowego. Każdemu z wykrytych odcinków przyglądano się następnie w surowym zapisie danej rejestracji i sprawdzano czy faktycznie można uznać, że w tym czasie wystąpił epizod o określonych cechach.

Oceniając dany fragment jako stanowiący część konkretnego epizodu *ripple*, wyznaczając jego koniec i początek, kierowano się silnym odczuciem, popartym pewnym doświadczeniem, że forma przebiegu, jeśli chodzi o dynamikę drgań, wygląda na zbliżoną do postaci modelowej i wyróżnia się zdecydowanie na tle sąsiadującej z nim aktywności.

Wyniki niezadowalające, co do których istniały jakiekolwiek wątpliwości, odrzucano. Podobną procedurę zastosowano dla dwóch rejestracji – dla jednego zwierzęcia z grupy kontrolnej i dla jednego z grupy testowej. Stwierdzono jednak, na podstawie porównania wyników programu ze wzrokową analizą sygnału, iż jest to sposób nieefektywny, a użycie metody automatycznej nie niesie ze sobą w danym wypadku żadnych wymiernych korzyści. Otrzymano bowiem w wyniku jej działania wiele fragmentów, które w żadnym wypadku nie powinny zostać potraktowane jako *ripple* (ang. false positives), a liczne epizody na które natknęto się przy oglądaniu sygnału, wcale nie zostały przez nią wykryte (ang. false negatives).

Ponadto ramy czasowe poszczególnych epizodów nie pokrywały się na ogół z tym co można było stwierdzić naocznie, wyznaczony zakres był zazwyczaj zbyt krótki. Dostosowanie parametrów użytych funkcji i przyjęcie niższych progów aktywności przyzwalających na akceptację danego fragmentu odbywało się natomiast zazwyczaj kosztem większej liczby fałszywych trafień (ang. false positives).

Niezbędnym czynnikiem, stanowiącym o właściwej istocie *ripple*, jest towarzysząca jej ostra fala. Pojawia się głębiej w hipokampie, widać ją często w zapisie z innych elektrod, nie uwzględnionych przez zastosowaną metodę, a jej brak, podczas zdarzenia podobnego w swojej charakterystyce do *ripple*, świadczy o zgoła innej naturze danego zjawiska.

Choć *ripple* może zostać wzbudzone przez ostrą falę pochodzącą z obszaru, którego

aktywność nie dochodzi do żadnej z ułożonych w jednej linii elektrod, to jednak nierzadko widać ją współwystępującą z epizodem *ripple* o mniejszej mocy, i pomaga ona tym samym w pozytywnej weryfikacji danego kompleksu SWR.

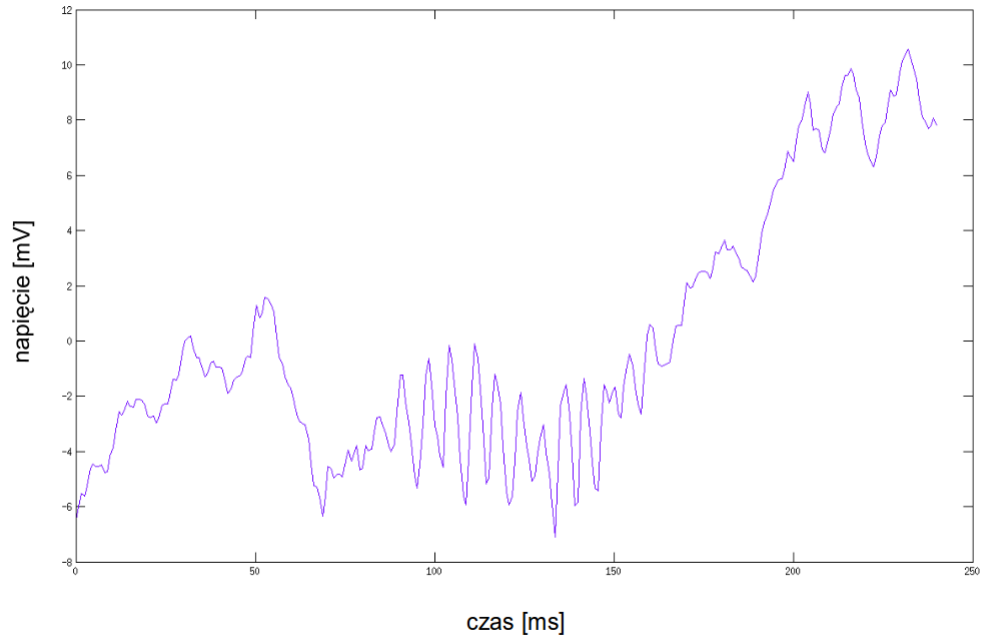
Same *ripple* pochodzą natomiast wprost z hipokampu, widać je zaledwie w kilku sąsiednich kanałach, leżących blisko źródła tej umiarkowanie silnej oscylacji. Podobny w kształcie przebieg LFP, rejestrowany przez wiele elektrod od hipokampu, aż po korę, wskazuje na aktywność silniejszą, propagującą się z pewnego oddalenia względem próbника, która nie powinna raczej zostać uznana za *ripple*.

Wobec niewielkiej przydatności metody automatycznej postanowiono zarzucić jej użycie i dla kolejnych rejestracji oprzeć się jedynie na wzrokowej selekcji epizodów. Badane sygnały były na tyle krótkie, a kompleksy SWR na tyle charakterystyczne i łatwe do rozpoznania, że prawidłowy wybór nie przedstawiał większych trudności.

Stwierdziwszy większą precyzję i w efekcie wyższość metody manualnej, zdecydowano się zastosować ją także do tych dwóch rejestracji, od których analizy rozpoczęto badanie, zarzucając zbiory uzyskane wcześniej, a budzące wątpliwości.

Postać przykładowego epizodu *ripple* na tle zwykłej aktywności LFP przedstawiono na rysunku 4.





Rysunek 4: Przykładowy epizod *ripple*.

Znaleziono ogółem 709 epizodów *ripple*, liczebności uzyskane w poszczególnych rejestracjach przedstawia tabela 3.

Tabela 3: Liczba znalezionych *ripple* u poszczególnych zwierząt.

	Grupa kontrolna			Grupa testowa		
Nr zwierzęcia	1	2	3	1	2	3
Liczba epizodów	117	115	105	149	90	133

Czas trwania pojedynczego epizodu na przestrzeni wszystkich rejestracji wynosił w przybliżeniu 63 ms, z odchyleniem standardowym 15 ms, najdłuższy znaleziony trwał przez 118 ms. Za dolną granicę, poniżej której dany epizod nie był kwalifikowany, choćby nawet kształt jego mógł być odpowiedni, kierując się zarówno źródłami zaczerpniętymi z literatury jak i względami praktycznymi przyjęto 30 ms. Górną natomiast ustalono

na 120 ms. Tak długo trwający epizod musiał się bowiem składać z dwóch lub więcej oddzielnych epizodów, następujących tuż po sobie, choć z pewną przerwą pomiędzy, to jednak zlewających się w jedną całość. Starano się dzięki temu uniknąć potraktowania takich krótkich, domniemanych odcinków między kolejnymi zdarzeniami jako należących do jednego całościowego epizodu.

Rozkład długości uzyskanych epizodów przedstawia tabela 4, wartości czasów podano w milisekundach.

Tabela 4: Średnie czasy trwania *ripple* u poszczególnych zwierząt.

	Grupa kontrolna			Grupa testowa		
Nr zwierzęcia	1	2	3	1	2	3
Czas trwania (ms)	58±14	63±15	70±15	62±14	65±16	60±13

Ażeby możliwe było przeprowadzenie odpowiedniej statystyki i porównywanie ze sobą poszczególnych epizodów, należało przyjąć jedną, arbitralną długość, aby ją przyłożyć do każdego ze znalezionych fragmentów.

Przy założeniu, że każde jednostkowe zdarzenie, to jest wystąpienie epizodu *ripple*, jest niezależną realizacją pewnego, za każdym razem zasadniczo tego samego procesu, ujednolicenie długości poszczególnych odcinków pozwala na wyciągnięcie wartości średnich. Zabieg taki uwypukla cechy wspólne dla całej grupy realizacji i niweluje składniki pochodzące w poszczególnych przypadkach z innych, nie związanych wprost z danym procesem źródeł. Przeważnie dopiero dysponując wielkościami uzyskanymi na dostatecznie dużej próbie wnioskować można o faktycznym charakterze zjawiska.

Długość jednostkowego fragmentu danych, zawierającego w sobie epizod lub odcinek po lub przez epizodem, ustalono na 80 milisekund.

Wybierając konkretną, taką a nie inną wartość, oparto się na powszechnie panującej i potwierdzonej doświadczalnie opinii, że czas trwania standardowego epizodu *ripple* wynosi właśnie mniej więcej owe 80 milisekund, a także, co miało z pewnością nie mniejszy wpływ na ostatecznie podjętą decyzję, na posiadanych danych i rozkładzie czasów trwania

znalezionych epizodów *ripple*.

Średni czas trwania wynoszący ponad 60 ms, a także ponad 80% przypadków trwających ponad 50 ms i jedynie niecałe 3% nie przekraczających 40 ms, pozwalają sądzić, że mimo oczywistych niedoskonałości takiego podejścia nie spowoduje ono nadmiernego zafałszowania wyników.

Celem było zbadanie tego co dzieje się w trakcie, a także wokół poszczególnych epizodów *ripple*. Aby więc zapewnić, że odcinek sygnału tuż przed lub tuż po danym epizodzie nie jest jednocześnie odcinkiem – odpowiednio – tuż po lub tuż przed innym epizodem, uwzględniono tylko epizody oddalone jeden od drugiego o nie mniej niż dwukrotność czasu trwania pojedynczego epizodu poddanego analizie, to jest o 160 ms.

Następnie, dysponując konkretnymi, dokładnie określonymi chwilami czasu określającymi występowanie *ripple*, przystąpiono do cięcia sygnałów na kawałki. Oddzielnie wycięto odcinki w trakcie trwania, tuż przed rozpoczęciem i tuż po zakończeniu każdego z epizodów. Każdy z uzyskanych odcinków, aby możliwe i wiarygodne było właściwe ich porównanie, powinien zawierać w sobie taką samą liczbę próbek czyli trwać tyle samo czasu, to jest owe przyjęte 80 milisekund.

Posiadając względnie dokładnie określone punkty rozpoczęcia i zakończenia każdego z epizodów jak i ową przyjętą arbitralnie wartość 80 milisekund, która miała pomieścić w sobie każdy z nich, przyjęto następującą procedurę cięcia sygnałów. Środek każdego z epizodów umiejscowiony został w punkcie znajdującym się w równej odległości od posiadanych momentów rozpoczęcia i zakończenia epizodu. Względem tego punktu brano następnie połowę docelowego odcinka czasu trwania całego epizodu, to jest połowę z 80 ms czyli 40 ms i tym samym wyznaczano początek na moment o 40 ms wcześniejszy niż środek i analogicznie koniec jako moment o 40 ms późniejszy niż środek. Od owych punktów odmierzano następnie po 80 milisekund w przód i w tył, uzyskując tym samym odcinki przed i po epizodzie *ripple*.

## 19.4 Występowanie *ripple* w różnych stanach fizjologicznych.

Tabela 5: Występowanie *ripple* w trakcie SWS.

Nr zwierzęcia	Grupa kontrolna			Grupa testowa		
	1	2	3	1	2	3
% <i>ripple</i> w SWS	44	51	36	95	83	16

Ogółem, średnio ( $54 \pm 30$ )% wszystkich epizodów *ripple* znalazło się w obrębie któregoś z odcinków snu wolnofalowego, z czego w grupie kontrolnej było to ( $44 \pm 8$ )%, a w grupie testowej ( $64 \pm 43$ )%. Całkowita różnica wynosi około 20%, a więc jest znaczna, można jednak zauważyć, że dość dokładnie odpowiada różnicy jaką zaobserwowano w całkowitym udziale snu wolnofalowego w obu grupach (tabela 2). Wskazuje to na podobny, równomierny rozkład występowania *ripple* w tym stanie fizjologicznym, bez względu na przynależność do jednej z grup.

Ze względu na znaczne różnice w udziale SWS występujące pomiędzy poszczególnymi rejestracjami, a także, co istotniejsze, pomiędzy obiema grupami, i w konsekwencji różną liczbę epizodów w tym stanie, we właściwych analizach postanowiono uwzględnić wszystkie dostępne epizody *ripple*.

## 19.5 Wybór kanałów do analizy.

Właściwą część analizy zdecydowano się przeprowadzić na podstawie czterech kanałów, dwóch rejestrowanych przez elektrody leżące w korze i dwóch w hipokampie, w obszarach CA1 i warstwy promienistej. Zaznaczyć należy, że dla poszczególnych zwierząt odpowiednie kanały niekoniecznie pochodziły z tych samych elektrod, w sensie pozycji na próbniku. Rozmieszczenie próbników mogło być nieznacznie inne u każdego ze zwierząt, odmienna mogła być także szczegółowa budowa anatomiczna struktur, do których próbnik wprowadzono, aby więc zniwelować wpływ podobnych czynników, przyjęto niezależną

podstawę do wyboru kanałów. Za punkt odniesienia potraktowano w każdym przypadku elektrodę, na której epizody *ripple* były najsilniejsze i licząc od tego miejsca wzięto jeden kanał oddalony od niej o pięć pozycji w dół, czyli w stronę obszaru warstwy promienistej hipokampu i trzy kanały w górę, to jest kanał oddalony o dwie pozycje w stronę kory i dwa kolejne, każdy oddalony od poprzedniego o siedem pozycji dalej w górę.

## 19.6 Decymacja i jej związek z DTF.

Przed przystąpieniem do analizy zakresu częstotści niższych, niezbędne okazało się przeprowadzenie decymacji wszystkich badanych sygnałów. Żeby przygotować dany sygnał do procedury decymacji, to jest przepróbkowywania, dokonano filtracji sygnału filtrem dolnoprzepustowym Butterwortha, pozbywając się częstotści wyższych niż 125 Hz, stanowiące częstotść Nyquista dla sygnału docelowego, to jest zawierającego 250 próbek w odcinku sekundowym. Tak przystosowany sygnał poddano następnie operacji przepróbkowania, zmniejszając częstotść próbkowania pięciokrotnie, do częstotści 250 Hz. Wartość nowej, niższej częstotści dobrano tak, żeby możliwie jak najbardziej oddalić od siebie każde dwie kolejne próbki sygnału, to znaczy zwiększyć odległość w czasie pomiędzy kolejnymi próbkami, przy jednoczesnym zachowaniu w stanie nienaruszonym całego zakresu częstotści sygnału, który był przedmiotem zainteresowania i poddany miał zostać badaniu. Rząd modelu autoregresyjnego użytego w metodzie kierunkowej funkcji przejścia DTF, żeby zachować ścisłość i dokładność obliczeniową, nie powinien być nadmiernie duży, powoduje to bowiem powstawanie sztucznych maksimów, nieodzwierciedlających faktycznej charakterystyki zależności sygnałów. Jednocześnie im większy rząd, oznaczający liczbę próbek, tym więcej informacji o sygnale zostaje uwzględnionych, a poniesiona strata staje się mniejsza. Oznacza to, że aby pogodzić ze sobą te, wydaje się sprzeczne, wymagania stawiane przez użytą metodę, niezbędne jest znalezienie swego rodzaju złotego środka.

Zauważyć można, że z punktu widzenia szeregu czasowego czas, to jest określona wartość zdefiniowana w pewnej jednostce, standardowo w sekundach, jest czymś wtórnym i

określonym arbitralnie względem zawartych w sygnale próbek. Miarą stosunku, wzajemnej relacji pomiędzy próbkami a czasem jest wartość częstości próbkowania.

Model autoregresyjny operując na szeregu czasowym jest na faktyczny czas w pewien sposób „ślepy”, nie zwraca uwagi na jednostkę czasu, a uwzględnia jedynie kolejne próbki.

Sprawia to, że stosując zabieg zmniejszenia częstości próbkowania, skutkujący oddaleniem od siebie w czasie kolejnych próbek sygnału możemy sprawić, że taka sama liczba próbek pokrywa teraz dłuższy odcinek czasu i tym samym pozwala ujrzeć przebieg zmienności sygnału na dłuższym przedziale. W przypadku rozpatrywania niższych częstości równa się to większej ilości informacji. W efekcie, nie uciekając się do niewskazanego w nie wystarczająco uzasadnionych przypadkach zwiększania rzędu modelu AR, możemy uwzględnić w obliczeniach większą ilość potrzebnych informacji.

Potrzeba taka zachodzi w zależności od stosunku częstości próbkowania do częstości rytmu, który podlegać ma badaniu. Przy takiej samej częstości próbkowania, im wolniejszy rytm tym mniejsza część jego cyklu zawarta w takiej samej liczbie próbek.

Najmniejsza liczba próbek w sygnale konieczna dla działania metody DTF musi być nie mniejsza niż rząd modelu powiększony o 1. W praktyce, aby uzyskać wystarczającą poprawność dopasowania modelu i wiarygodność wyników przyjmuje się, że liczba punktów danych powinna stanowić kilkukrotność liczby estymowanych parametrów. Jeśli  $r \times n \times k$  jest całkowitą liczbą punktów, gdzie  $r$  to liczba realizacji,  $n$  długość fragmentu danych, a  $k$  liczba kanałów, a liczba parametrów modelu wynosi  $p \times k^2$ , gdzie  $p$  to rząd modelu, to długość okna uzależniona jest wtedy od kombinacji przyjętego rzędu modelu i liczby uwzględnionych kanałów. Przykładowo, dla jednej realizacji, czterech kanałów i piątego rzędu, wskazana długość sygnału powinna przekroczyć mniej więcej sto próbek [25].

## 19.7 Stabilność modelu w metodzie DTF.

W obliczu uzasadnionych wątpliwości co do wiarygodności wstępnych wyników uzyskiwanych za pomocą metody DTF zastosowanej do wydzielonych fragmentów sygna-

łów, które to wyniki budziły nierzadko obawę co do swojej poprawności, podjęto dodatkowe środki ostrożności. Otóż zdecydowano się badać stabilność modelu autoregresyjnego, dopasowywanego za każdym razem do zbioru danych na potrzeby użycia przez metodę DTF.

Stabilność modelu oznacza, że sygnały realizujące dany proces AR trzymane są w pewnych ryzach i z czasem nie „wybuchną”, to znaczy nie rozbiegną się do nieskończoności, a zarazem gwarantuje ich stacjonarność, które to cechy są wymagane dla fizjologicznie poprawnych modeli AR.

Działania powyższe zmierzały w miarę możliwości do uniknięcia ryzyka przyjęcia błędnych wyników zwróconych na wyjściu metody DTF i potraktowania ich jako właściwych, mówiących o prawdziwej naturze sygnałów będących przedmiotem badania. Sprawdzanie stabilności modelu przeprowadzano równocześnie z każdym pojedynczym przypadkiem analizy wykonanej metodą DTF. W sytuacji gdy model okazał się być niestabilny, wynik działania metody niezwłocznie odrzucano, jako co najmniej niewiarygodny, budzący wątpliwości i będący potencjalnym źródłem przekłamań w interpretacji i mogący w efekcie prowadzić do wyciągnięcia fałszywych wniosków.

## 19.8 Analiza DTF.

Aby za pomocą metody DTF uzyskać miarodajne wyniki, częstość próbkowania sygnału powinna być dobrana odpowiednio do rozpatrywanego zakresu częstości. Z takiej racji zdecydowano się przeprowadzić badanie metodą DTF oddzielnie dla różnych przedziałów częstości, w międzyczasie poddając sygnał procedurze decymacji. Wybrano zakres częstości niższych, od 0 Hz aż do zakresu wolnej gammy, to jest 50 Hz, dla którego przepróbkowano sygnały do częstości 250 Hz, i osobno zakres zawierający szybszą gammę, od 50 Hz, aż do częstości odpowiadającej *ripple*, czyli 150 Hz, dla którego pozostawiono pierwotną częstość próbkowania wynoszącą 1250 Hz. Zwłaszcza w przypadku wolniejszych częstości znalezienie jak najkorzystniejszego stosunku częstości próbkowa-

nia, która powinna być wtedy jak najniższa, do liczby próbek w analizowanych odcinkach sygnału, których powinno być jak najwięcej, nie było zadaniem łatwym.

Początkowo próbowano zejść z próbkowaniem do poziomu 125 próbek na sekundę, co jednak skutkowało pozostawieniem jedynie około 10 próbek w analizowanych odcinkach. Tak niska liczba próbek uniemożliwiała stwierdzenie wolniejszych tendencji w sygnale, zarówno naocznie, próbki były bowiem rozrzucone zazwyczaj dość znacznie, jak i poprzez metodę DTF, która z reguły „nie widziała” nic poniżej granicy około 10 Hz. Zwiększono wobec tego częstość próbkowania, w nadziei uzyskania lepszego kompromisu między rozdzielczością czasową, a skutecznością detekcji istniejących oddziaływań.

Analizę DTF przeprowadzono dla każdego zwierzęcia osobno, wykorzystując wszystkie zakwalifikowane realizacje epizodów *ripple*, a także zbiorczo, w ramach obu grup.

Rozpoczęto od badania poszczególnych rejestracji. Rozpatrywano oddzielnie realizacje odpowiadające okresom przed, w trakcie i po epizodach *ripple*. Dla każdego z nich, na podstawie całego zbioru odpowiednich realizacji, przeprowadzono analizę DTF z wykorzystaniem procedury bootstrap. Znajdując w sposób iteracyjny statystyczny rozkład wartości średnich pochodzących z kolejnych, losowo wybranych podgrup wszystkich realizacji, pozwala ona wyznaczyć przedział, w którym, z określonym poziomem prawdopodobieństwa, zawiera się wynik średni, określony dla całej grupy realizacji jako całości.

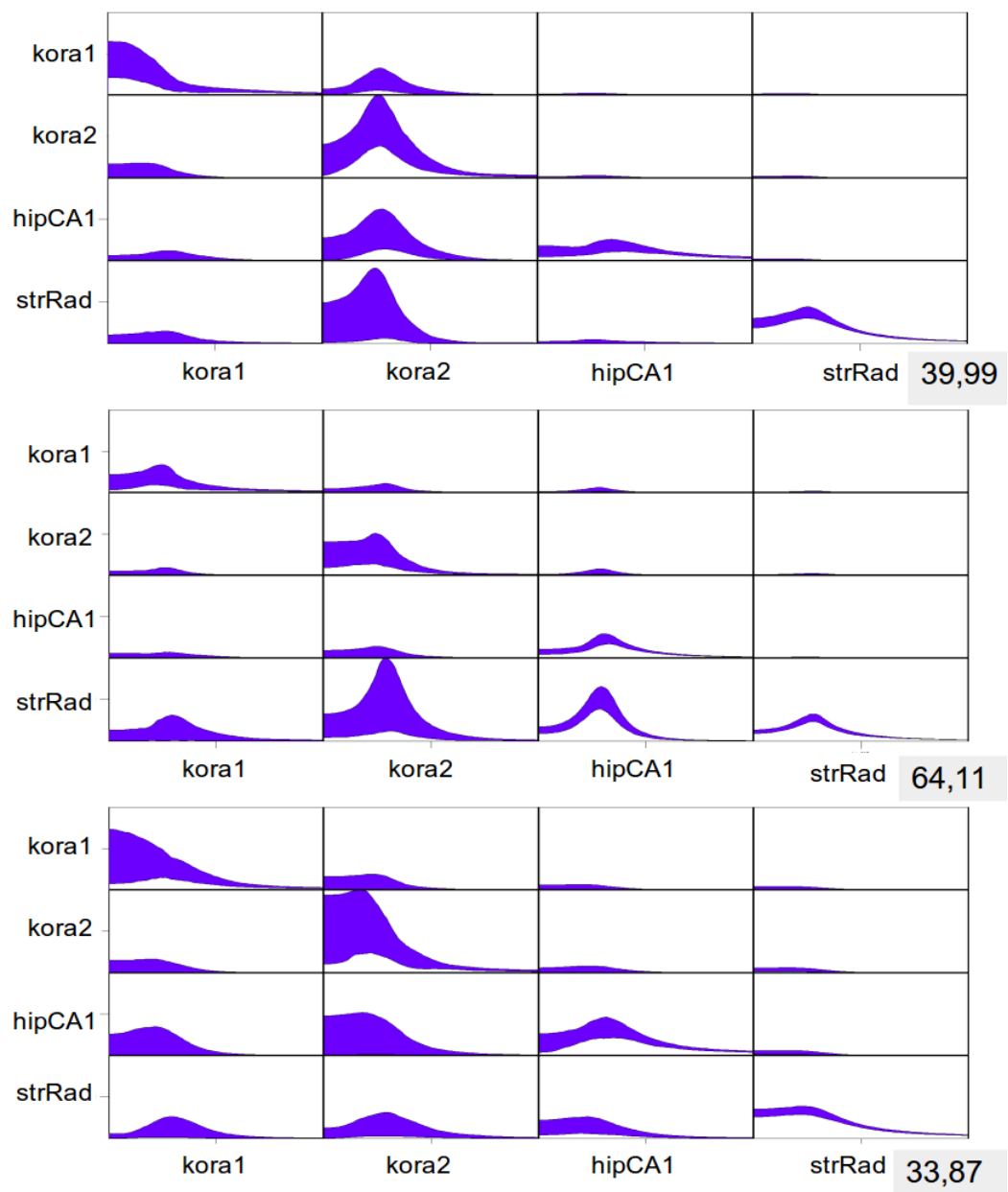
Wyniki dla obu zakresów częstości dla przykładowych zwierząt z grupy kontrolnej (zwierzę nr 1) i testowej (1) przedstawiają rysunki 5 - 8. Na każdym z rysunków umieszczono po trzy panele wykresów, odpowiadających kolejno od góry odcinkom przed, w trakcie i po *ripple*. Wykresy przedstawione są w postaci macierzy. Poza przekątną na każdym z wykresów widnieje miara oddziaływania kanału zaznaczonego pod daną kolumną, na kanał zaznaczony po lewej stronie danego rzędu, natomiast na przekątnej widnieją widma mocy poszczególnych kanałów uzyskane za pomocą metody DTF. Na każdym z wykresów na osi poziomej odłożono odpowiednie zakresy częstości, na osi pionowej wartość nieznormalizowanej funkcji DTF, a przebieg każdej z funkcji stanowi 90% przedział ufności dla średniej wartości DTF, uzyskany dzięki procedurze bootstrap. W dolnym rogu pod każdym z paneli podano skalę, właściwą dla wszystkich leżących na nim wykresów.



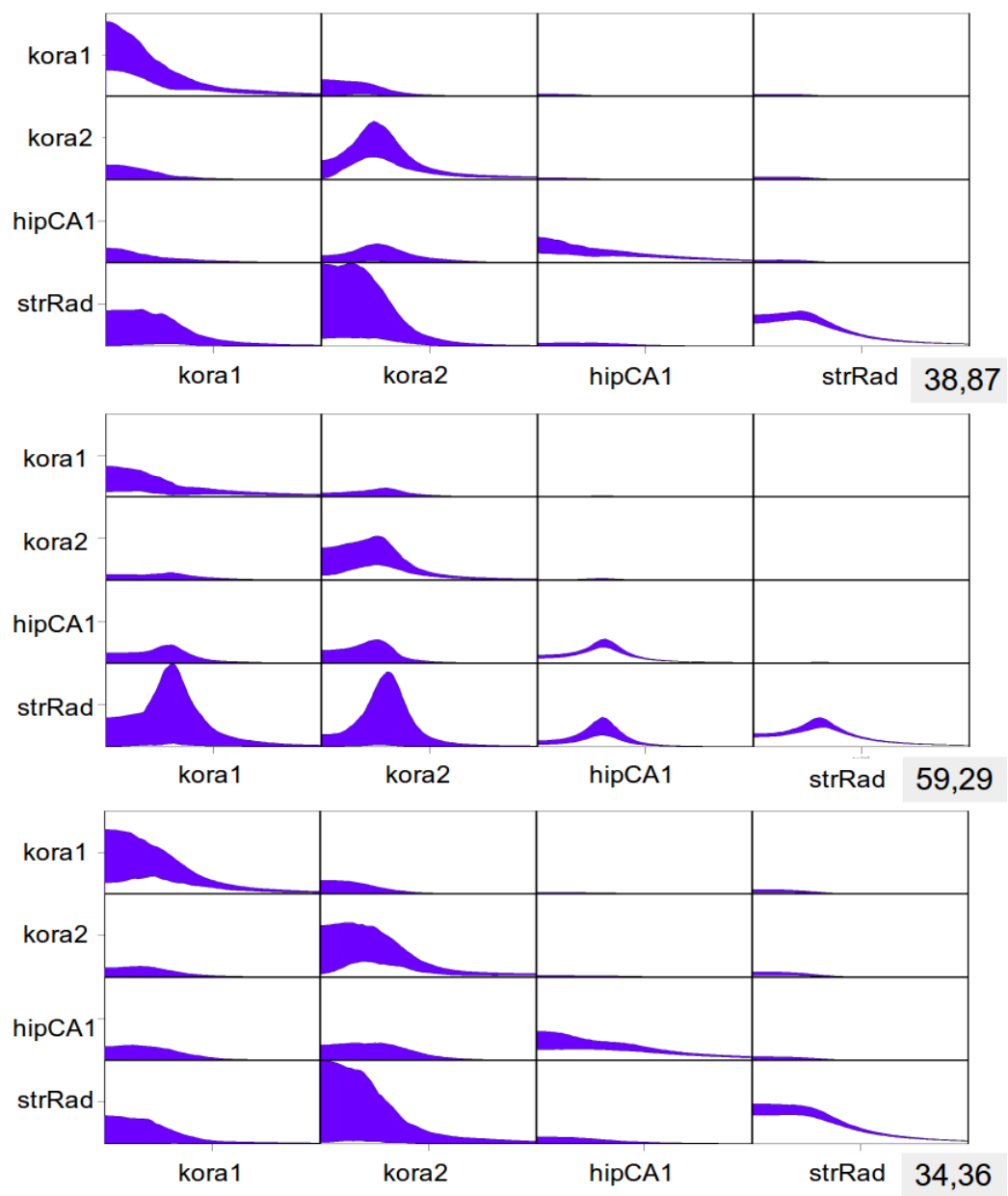
Zdecydowano się na rozpatrywanie funkcji DTF nieznormalizowanej, opisanej wzorem:

$$\gamma_{ij}(f) = |H_{ij}(f)| \quad (6)$$

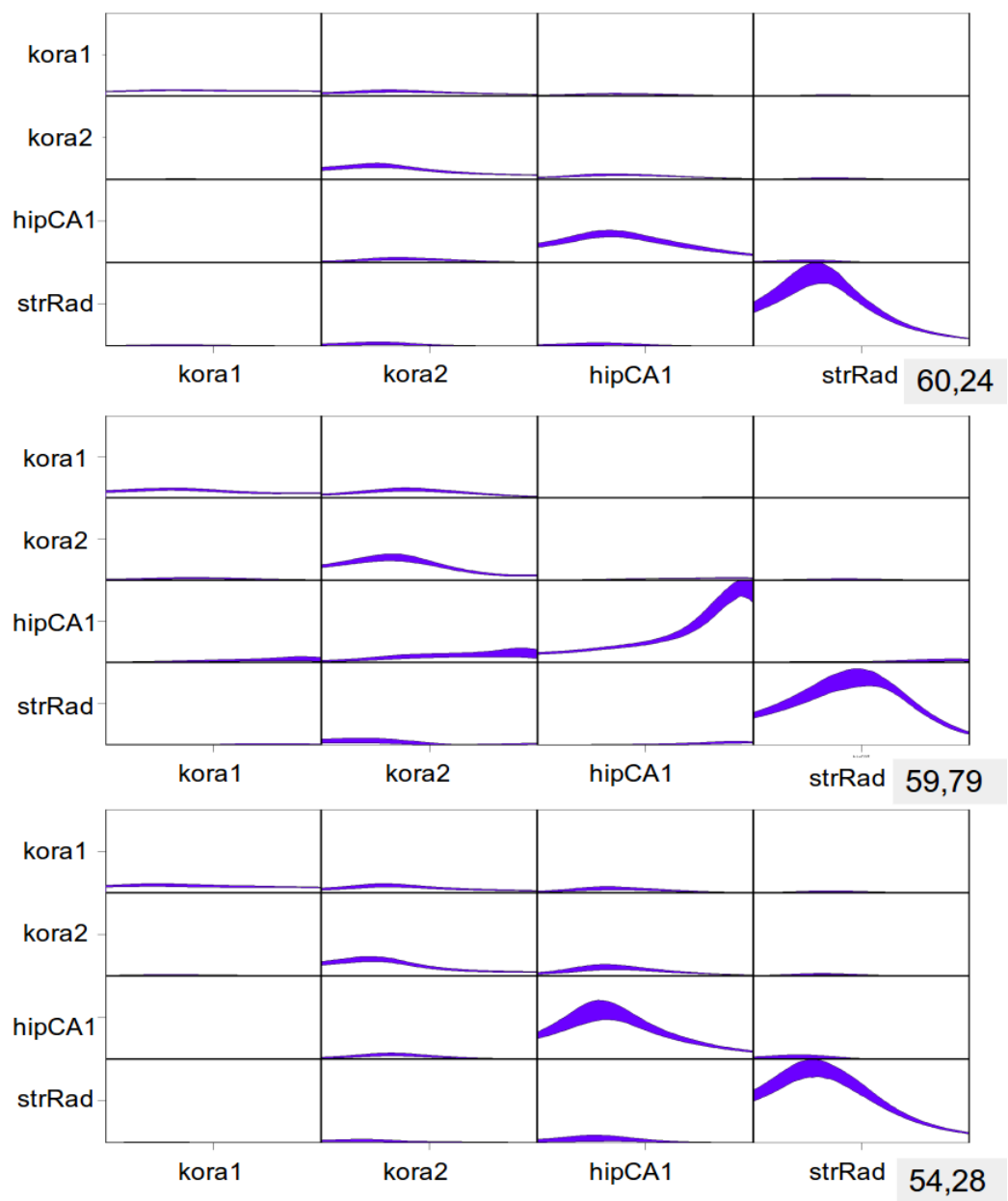
różniącej się od standardowego DTF (5) brakiem wyrazu normalizującego, jako mniej podatnej na częste zafałszowania faktycznego stanu rzeczy, pochodzące właśnie od owego stojącego w mianowniku wyrażenia. Jeśli bowiem zdarzy się tak, że oddziaływanie pewnego kanału na inny kanał, jest w zakresie danej częstości niewielkie i powinno w każdym razie zostać uznane za nieistotne, to gdy wartości oddziaływania wszystkich kanałów na ów kanał rozpatrywany, zsumowane razem ze sobą, są też niskie, to na skutek podzielenia pewnej wartości przez coś niewiele większego otrzymać można wartość stosunkowo dużą, dowolnie bliską 1, niezależnie dla różnych częstości widma. Jest to sytuacja niepożądana, a w przypadku gdy rozważa się lokalne potencjały polowe, występująca często i powodująca przekłamania w odniesieniu do względnego udziału różnych częstości.



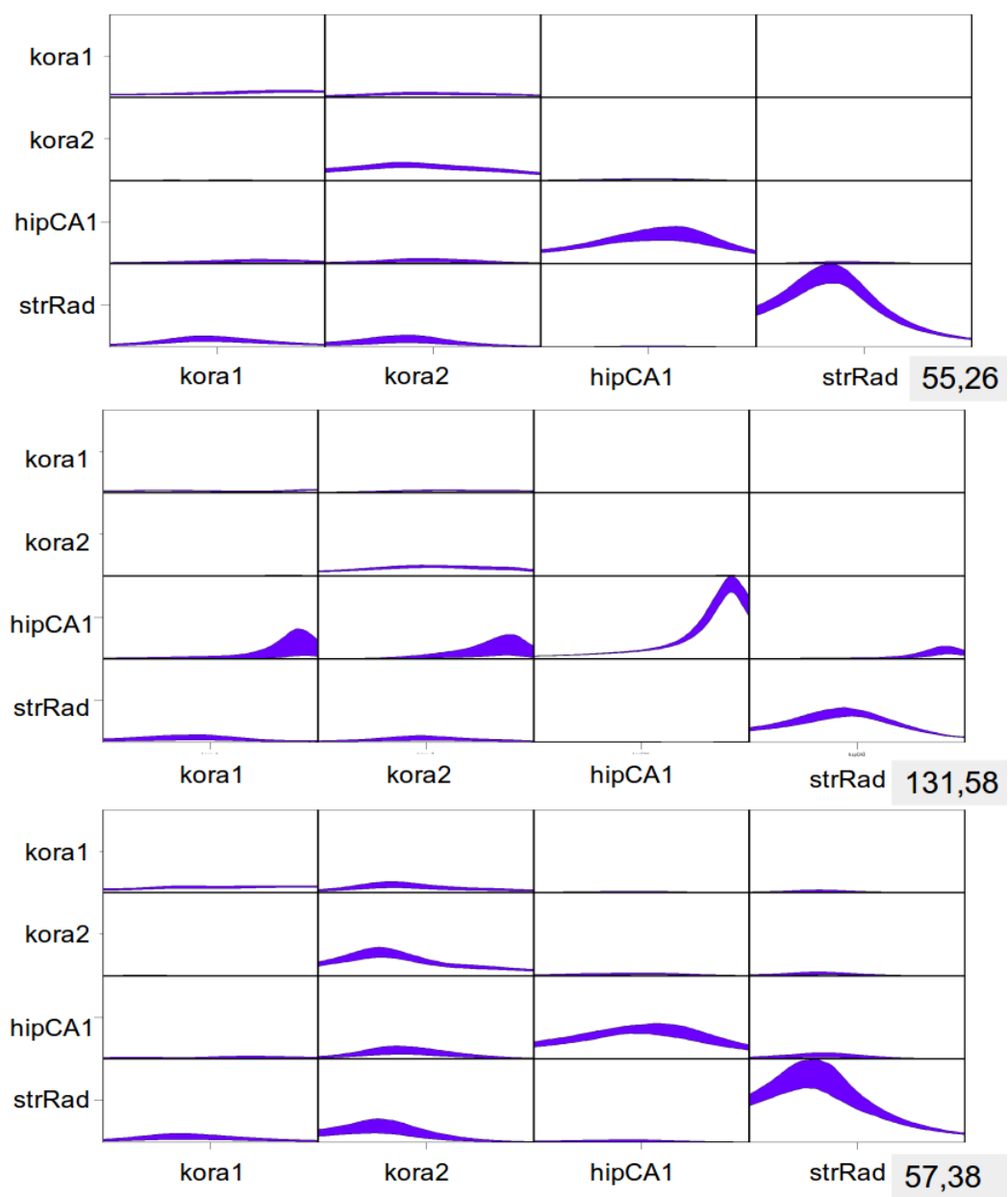
Rysunek 5: DTF dla pojedynczej rejestracji z grupy kontrolnej, zakres 0 - 50 Hz. Od góry - odcinek przed, w trakcie i po *ripple*.



Rysunek 6: DTF dla pojedynczej rejestracji z grupy testowej, zakres 0 - 50 Hz. Od góry - odcinek przed, w trakcie i po *ripple*.

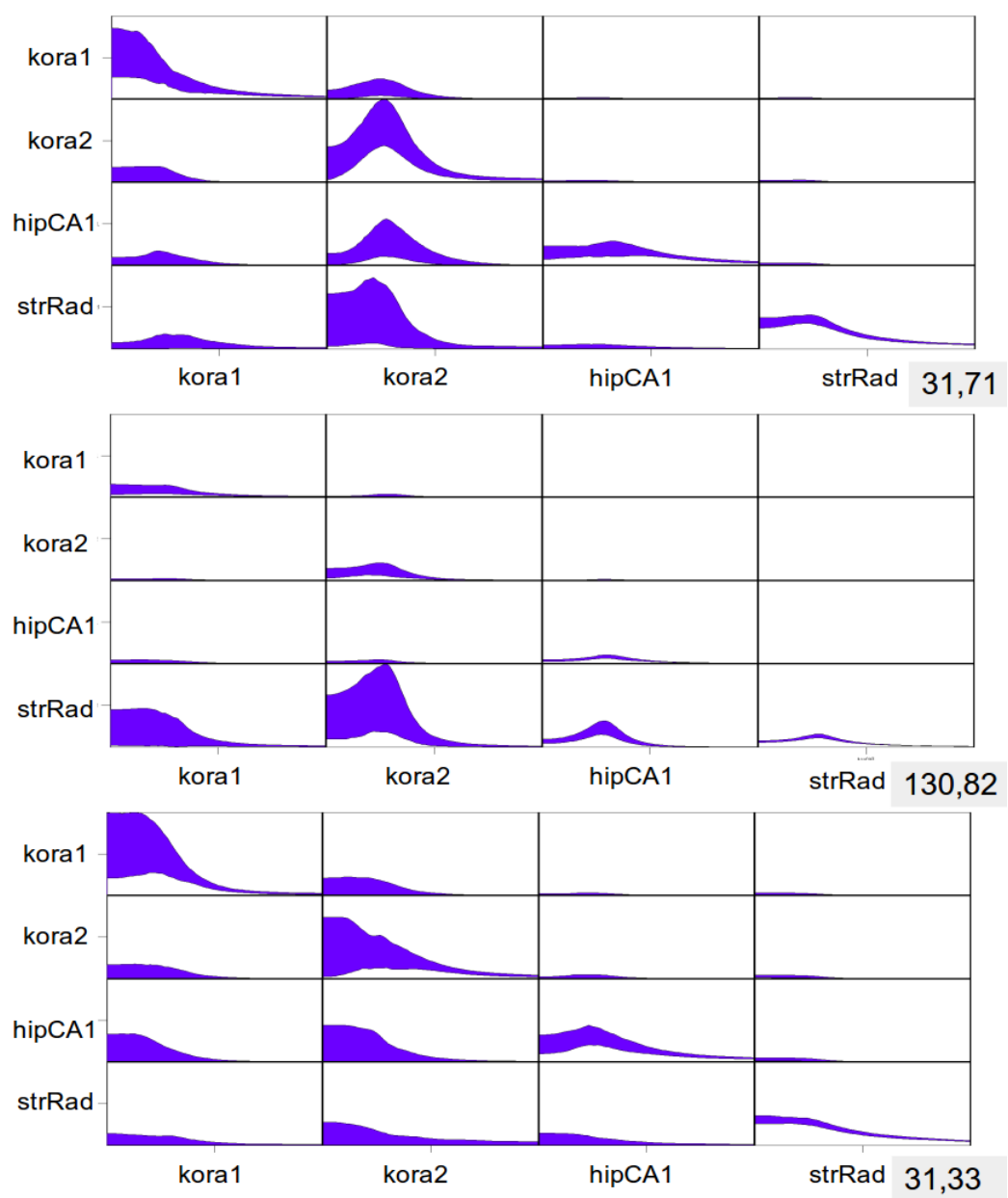


Rysunek 7: DTF dla pojedynczej rejestracji z grupy kontrolnej, zakres 50 - 150 Hz. Od góry - odcinek przed, w trakcie i po *ripple*.

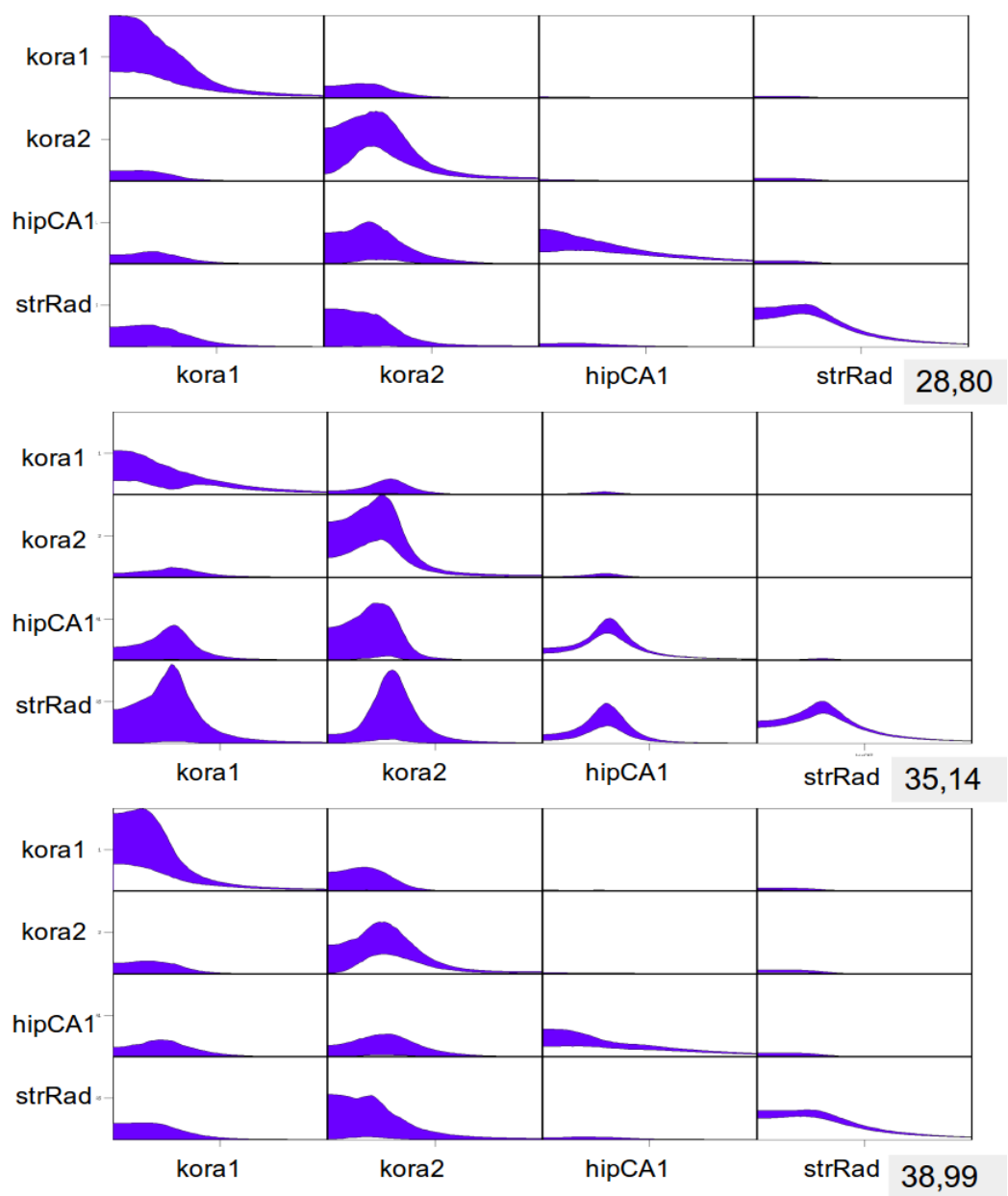


Rysunek 8: DTF dla pojedynczej rejestracji z grupy testowej, zakres 50 - 150 Hz. Od góry - odcinek przed, w trakcie i po *ripple*.

Następnie przeprowadzono podobną analizę, biorąc teraz realizacje uzyskane na wszystkich zwierzętach z danej grupy jako jedną całość. Uzasadnieniem dla zbiorczego potraktowania wielu rejestracji jest zakładany odrębny model realizowany przez poszczególne grupy, to znaczy podział na zwierzęta chore i zwierzęta zdrowe. Wykresy o budowie podobnej jak powyżej, oddzielnie dla grupy kontrolnej i dla grupy testowej, przedstawiono na rysunkach 9 - 12.

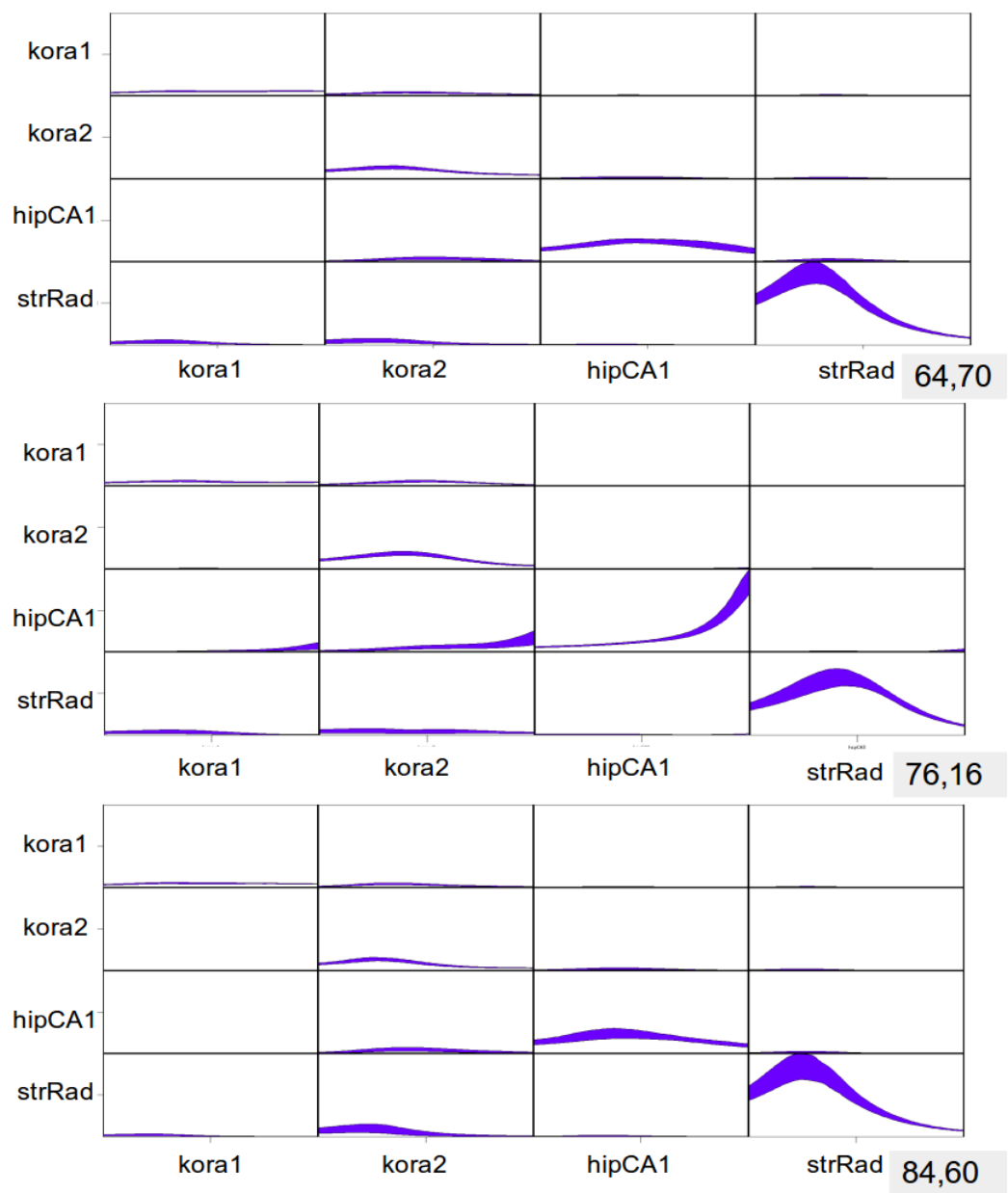


Rysunek 9: DTF dla grupy kontrolnej, zakres 0 - 50 Hz. Od góry - odcinek przed, w trakcie i po *ripple*.

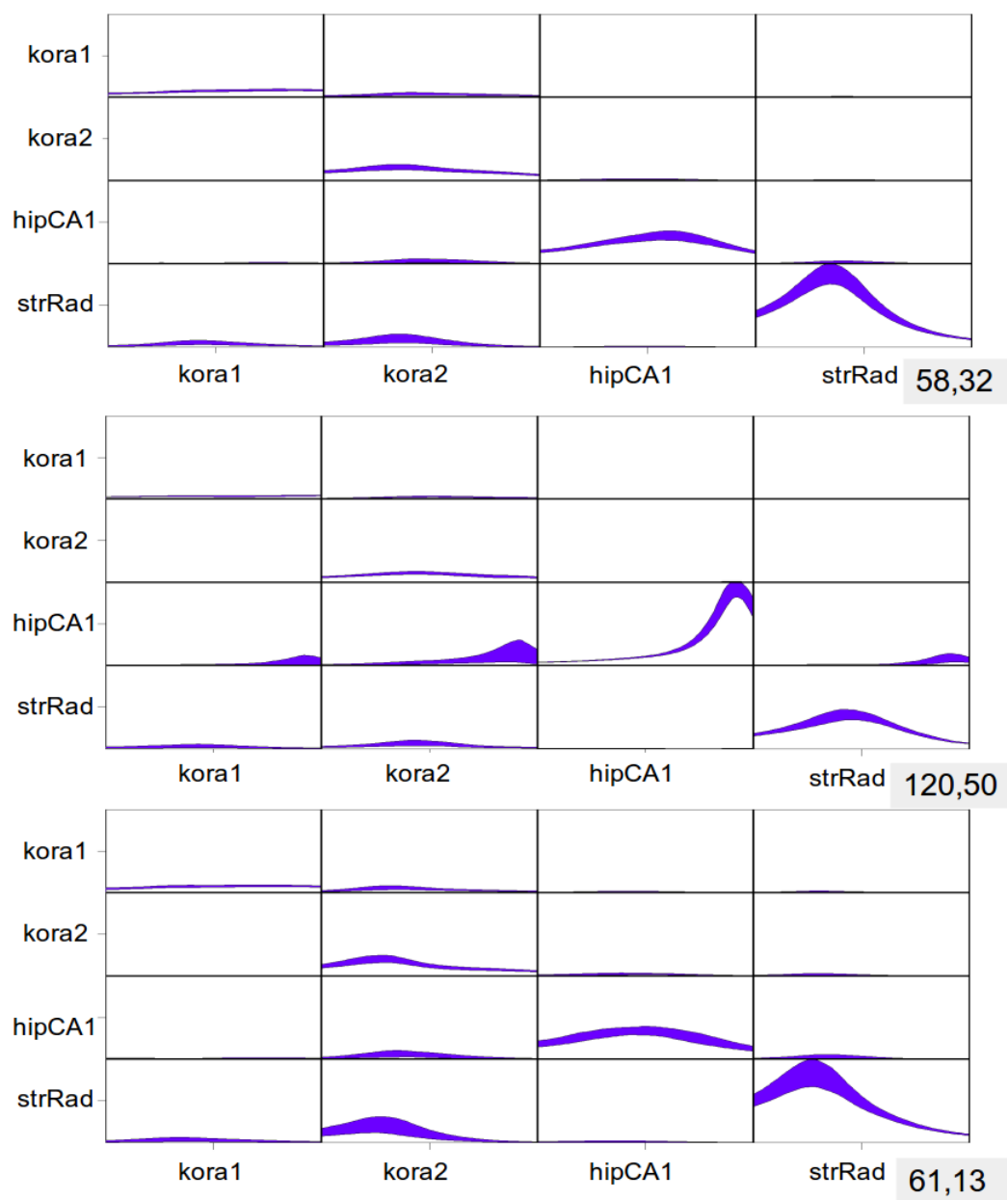


Rysunek 10: DTF dla grupy testowej, zakres 0 - 50 Hz. Od góry - odcinek przed, w trakcie i po *ripple*.





Rysunek 11: DTF dla grupy kontrolnej, zakres 50 - 150 Hz. Od góry - odcinek przed, w trakcie i po *ripple*.



Rysunek 12: DTF dla grupy testowej, zakres 50 - 150 Hz. Od góry - odcinek przed, w trakcie i po *ripple*.

## 20 Dyskusja.

Na przykładzie wykresów dla pojedynczych rejestracji (rys. 5 - 6) jak i wykresów dla całych grup (rys. 9 - 10), wydaje się, że zarówno w trakcie jak i w okolicach *ripple*, dla zakresu częstości niższych oddziaływanie pochodzi przeważnie od strony kory. Przedział częstości jaki wyróżnia się w większości przypadków pod względem wartości transmisji, to oscylacje około 10 - 12 Hz. Rozrzut wyników na jaki wskazuje szerokość przedziału ufności jest dla oddziaływania w tym kierunku jednak dość znaczny, tak więc sytuacja na przestrzeni realizacji nie była jednorodna i spójna. Przedział ten w większości przypadków zaczyna się już na wartości 0. Trudno wobec tego wnosić o stałym, powtarzalnym przepływie informacji w tym kierunku. Rysunki są jednak niesymetryczne, przedziały oznaczające oddziaływanie pochodzące od strony kory osiągają wartości wyraźnie wyższe niż te dla kierunku przeciwnego. Dotyczy to zwłaszcza oddziaływania z obu kanałów kory na kanał w głębokim hipokampie. W trakcie poszczególnych realizacji, jeśli jakieś oddziaływanie miało miejsce, przyczyną jego była więc zazwyczaj kora, ze wskazaniem na jej niższą warstwę. Jedynie w trakcie *ripple* widać pewną aktywność pochodzącą z warstwy CA1 hipokampu i kierującą się w dół hipokampu, w stronę warstwy promienistej.

W zakresie częstości 0 - 50 Hz nie stwierdzono wyraźnych jakościowych różnic w charakterystyce oddziaływań przed, po i na przestrzeni trwania *ripple*.

Podobnie zdaje się, że dynamika oddziaływań w grupie testowej miała zbliżony charakter do grupy kontrolnej, nie wykazując znaczących zmian, jeśli chodzi o kierunkowość przepływu informacji.

Stwierdzono za to wyraźny wzrost ogólnej siły oddziaływania, zwłaszcza kory na warstwę promienistą hipokampu w grupie kontrolnej w trakcie epizodu *ripple* (rys. 9). Siegał on niemal czterokrotności wartości na odcinkach przed i po *ripple*, a także na analogicznym odcinku w grupie testowej.

Dla zakresu wyższych częstości, na podstawie rysunków 7 - 8 i 11 - 12, można sądzić, że oddziaływanie wykazywało podobne tendencje, to znaczy zazwyczaj kora była jego

źródłem. Wyróżnia się zwłaszcza zakres szybkiej gammy, w okolicach powyżej 80 Hz. Rozrzut wyników był przy tym znacznie mniejszy, a poszczególne realizacje miały mniejszą moc, na co wskazują przedziały ufności, które są w większości dość wąskie i osiągają niewielkie wartości.

W trakcie *ripple* zauważyć można oddziaływanie z obu kanałów leżących w korze na kanał gdzie *ripple* były najsilniejsze, czyli warstwę CA1 hipokampu.

W ogólności jednak, zarówno na poszczególnych odcinkach, jak i pomiędzy grupami, także nie stwierdzono istotnych różnic.

Znaleziono więc pewien kierunkowy wpływ, pochodzący od strony kory, przeważnie z kanału położonego w warstwie głębszej, w pasmach 10 - 12 Hz i w paśmie szybkiej gammy około 80 - 100 Hz, który powtarzał się na odcinkach w pobliżu epizodu *ripple*. Podkreślić należy także wyraźny wzrost mocy, jaki ujawnił się w oddziaływaniu w przedziale 10 - 12 Hz, w grupie kontrolnej, w trakcie *ripple*.

Poza tym, nie udało się jednak wyznaczyć więcej regularności i stwierdzić aby jakiś określony wpływ miał pojawiać się szczególnie na którymś konkretnym odcinku czasu, w danych okolicznościach.

Wreszcie zauważyć należy, że na podstawie pewnych właściwości zaobserwowanych w wynikach uzyskanych za pomocą metody DTF, nabrano podejrzeń i wątpliwości co do ich wiarygodności.

Oddziaływanie występowało nieraz w zakresie częstości, który na widmie mocy poszczególnych kanałów zdawał się być znacznie słabszy lub wręcz nieomal nieobecny. Sytuacja taka miała miejsce na przykład na górnym panelu z rysunku 9, na wykresie pokazującym przepływ z głębszego kanału w korze do kanału w głębszym hipokampie.

Jednak nie wykluczone, jako że zastosowano nieznormalizowaną funkcję DTF, że skala wykresów pokazujących widma mocy mogła w poszczególnych wypadkach nie odpowiadać skali na wykresach przedstawiających oddziaływanie i temu właśnie można by przypisać taką rozbieżność.

Ponadto, tak konsekwentna obecność owego wzrostu w oddziaływaniu w przedziale 10 - 12 Hz, który pojawia się na większości wykresów dla różnych warunków jest trudna do

wyjaśnienia i dość nieoczekiwana. Częstość z tego pasma fizjologicznie odpowiada rytmowi  $\alpha$ , którego jednak na podstawie analizy składu widma mocy poszczególnych rejestracji (rozdział 19.2) w tym miejscu płata skroniowego nie spodziewano się znaleźć.

W przypadku odcinków w trakcie *ripple* częstość taka mogłaby jednak odpowiadać także ostrej fali, która była wtedy przeważnie obecna.

Co więcej, oddziaływanie często zdaje się pochodzić z kanału w którym dany rytm jest wyraźnie słabszy niż w kanale docelowym. Zaobserwować można to zwłaszcza podczas *ripple*, na przykład na rysunku 8, gdzie oba kanały kory wydają się wywierać wpływ na kanał w warstwie CA1 hipokampu w zakresie częstości *ripple*, podczas gdy patrząc na widmo mocy, oscylacja o takiej częstości najsilniejsza jest właśnie w kanale leżącym w hipokampie. Brak przy tym jakiegokolwiek przepływu w kierunku przeciwnym.

W wielu przypadkach można zaobserwować także sytuację, w której kilka kanałów jednocześnie wydaje się być kanałami źródłowymi w zakresie danej częstości. Ponadto, jak na rysunku 6, na odcinku w trakcie *ripple* oddziałują one zwłaszcza na jeden wybrany kanał, niejako pomijając kanały leżące pomiędzy nimi a owym wyróżnionym kanałem. Na owe pośrednie kanały wydają się bowiem nie oddziaływać wtedy aż tak silnie, a tego właśnie można by oczekiwać.

Należy przy tym podkreślić, że stabilność modeli autoregresyjnych służących w powyższych przypadkach metodzie DTF była spełniona.

## 21 Dlaczego DTF nie chciał działać.

Trudności przed jakimi stanęła metoda DTF mogły mieć dwie, niezależne względem siebie przyczyny.

Fragmenty sygnałów stanowiące przedmiot badania były stosunkowo krótkiej długości. W przypadku oscylacji o częstości szybkiej gammy, bądź konkretnie *ripple*, to jest około 140 Hz, w danym fragmencie mieściło się do 14 cykli, natomiast im niższa częstość rytmu, tym mniejsza jest liczba cykli przypadająca na odcinek sygnału, aż do fal delta, w czasie

zblizonym do 100 ms pokonujących zaledwie niecały pojedynczy cykl.

Ponadto stopień zaszumienia względem zawartości sygnału właściwego utrzymywał się na niewielkim poziomie na przestrzeni kolejnych analizowanych fragmentów. Poszczególne częstości obecne w sygnale dało się stwierdzić wyraźnie nierzadko nawet gołym okiem. Taką budowę przebiegów czasowych złożyć można na karb niezwykle małej liczby próbek tworzącej każdy z nich.

Wiele z fragmentów sygnału zawierało w sobie oscylacje o kilku odmiennych częstościach, różniących się amplitudą. Zdarzało się, że pomiędzy poszczególnymi kanałami występowały oscylacje o częstościach różnych, jednak leżących w widmie w niewielkiej od siebie odległości, przesunięte w fazie, z czego jedna o nieco silniejszej amplitudzie. Przyglądając się z bliska przebiegowi czasowemu nałożonych na siebie obu rytmów, mogłoby się wydawać iż raz jedna wyprzedza drugą, a za chwilę sytuacja się odwraca, wzajemne przesunięcie fazowe ulega zmianie i teraz ta która pozostawała do tej pory w tyle wysuwa się na prowadzenie. Przyglądając się bliżej analizowanym sygnałom, starając się zbadać wzajemne oddziaływanie kanałów, w zakresie rytmów pozostających do siebie w podobnym stosunku i używając w tym celu metody DTF, otrzymywano fałszywe rezultaty. Algorytm produkował wyniki wskazujące na przepływ rytmu o danej częstości z jednego kanału do drugiego, nawet mimo faktu, że w widmie mocy jednego z kanałów częstości takiej w ogóle nie było. Efekt zdawał się być czuły na różnicę amplitud, siła domniemanego oddziaływania była tym większa im większa różnica między amplitudami oscylacji w obu kanałach. Co więcej, choć oddziaływanie wyglądało na obustronne, obecne w zakresie obu częstości, to kierunek przepływu wskazywał na znaczniejszy wpływ tego kanału, w którym znajdował się rytm o niższej amplitudzie, na kanał z rytmem silniejszym.

W próbie wydzielenia poszczególnych częstości, wyjęcia ich niejako z widma mocy i eliminacji całej reszty na drodze pasmowo-przepustowej filtracji, tkwić mogłaby trudność nie do pokonania. Jak stwierdzono, sprawiające kłopoty częstości były w poszczególnych kanałach tak do siebie zbliżone, że żaden filtr nie byłby w stanie usunąć jednej z nich, zachowując przy tym drugą w stanie nie nazbyt naruszonym. Jeśli udałoby się tego dokonać, możliwa byłaby precyzyjna między-kanałowa analiza poszczególnych, precyzyjnie

zdefiniowanych pasm. Z drugiej strony, poziom szumu tła zostałby w ten sposób sprowadzony niemal do zera, co z punktu widzenia użytej metody byłoby niepożądane.

Metoda DTF daje najlepsze, najbardziej klarowne wyniki w zastosowaniu do sygnałów o dużym udziale szumu, stosunkowo długim czasie trwania, zawierających oscylacje z zakresu kilku częstotliwości. Powodem, dla którego w odniesieniu do posiadanych danych wynik analizy metodą DTF zdarzał się być niejednoznaczny, bądź wręcz fałszujący prawdziwą naturę wzajemnych relacji między kanałami, była prawdopodobnie charakterystyka poszczególnych odcinków sygnału. Bardzo krótko trwające, nieznacznie zaszumione, często złożone z przeplatających się oscylacji o zmiennym opóźnieniu fazowym, kawałki sygnału o takich cechach mogą wykazywać znaczne korelacje, które, jeśliby wziąć odcinek dłuższy, mogłyby zostać w dużej mierze lub nawet w całości zniwelowane.

Tak krótki fragment, sięgający nie więcej niż 100 ms, nie daje jednak takiej szansy aby nieistotny, przejściowy wpływ zdążył się uśrednić i rozmyć, przez co metoda DTF, oparta na analizie korelacji, daje wynik taki jak potrafi, czyli w tym przypadku, w świetle tego jak powinny wyglądać faktyczne oddziaływania, nie satysfakcjonujący.

Chodziło właśnie o jak najwyższą rozdzielczość czasową, zobrazowanie interakcji cechujących się dynamiką zmienności na krótkich odcinkach czasu. Niełatwo jednak odróżnić istotne, krótko trwające zdarzenie od jednorazowego, specyficznego przebiegu, mogącego wprowadzić metodę DTF w błąd.

Wydaje się, że aby dokładniej zrozumieć napotkany przypadek, zagadnienie wymaga osobnego, pogłębionego zbadania, wykraczającego jednak poza zakres niniejszej pracy.

Podjęto mimo to pewne próby zmierzające w kierunku wyjaśnienia niektórych jego aspektów, przeprowadzając symulacje.

## 22 Symulacje.

Zaobserwowano, że niejednokrotnie kierunek oddziaływań wskazywany przez metodę DTF jest przeciwny do tego, którego można by się spodziewać, sugerując się widmem

mocy sygnałów w konkretnych kanałach. Rozpatrując daną częstość, w obrębie której stwierdzano wyraźny kierunkowy przepływ, okazywało się, że w kanale, który miałby być kanałem docelowym, moc takiej częstości była nieraz bardzo silna, natomiast we wszystkich kanałach źródłowych, aktywność w paśmie wokół niej była słaba, niemal niezauważalna. Aktywność silniejsza dopiero po przebyciu pewnej drogi, niż u swojego źródła, wydaje się być trudna do wytłumaczenia.

Ponadto, wydawać by się mogło, że jeśli wszystkie kanały leżą w jednej linii i jest wśród nich jakiś kanał źródłowy dla danego rytmu, to oddziaływanie powinno pochodzić od tego tylko jednego kanału, a rozchodzić się wzdłuż kolejnych elektrod i wraz z odległością słabnąć. Zauważono natomiast, że często jest inaczej i istnieje jednocześnie kilka kanałów źródłowych. Co więcej, zdarzało się, że jeśli para kanałów wydaje się oddziaływać na trzeci, leżący nie pomiędzy nimi lecz dalej na zewnątrz, to brak jest oddziaływania przez skrajny kanał źródłowy, na kanał leżący pośrodku.

Uzasadnieniem fizjologicznym dla takiej postaci oddziaływań, mogłaby być aktywność o określonej częstości generowana przez pewną grupę komórek, leżącą w „polu widzenia” tylko jednej z elektrod, a następnie rozchodząca się wzdłuż połączeń synaptycznych, niejako z pominięciem pewnego obszaru i pobudzająca w końcu z daną częstością inną grupę komórek. Taka docelowa sieć może zacząć wytwarzać potem własną aktywność, niewykluczone, że nawet silniejszą, która będzie rejestrowana przez inną elektrodę, na przykład tę leżącą na drugim końcu próbника.

Abstrahując jednak od dokładnego podłoża fizjologicznego, które przyczyniło się do powstania sygnałów o danych właściwościach, a którego nie znano, zamierzano przede wszystkim nieco dokładniej wyjaśnić okoliczności w jakich uzyskano określone wzorce oddziaływania.

Za cel postawiono więc sobie odtworzenie charakteru wyników otrzymywanych za pomocą metody DTF na sygnałach doświadczalnych, przy możliwie wiarygodnym naśladowaniu relacji stwierdzonych w tych sygnałach.

Symulowano sygnały o zmiennej, w tym dużej, różnicy amplitud, o nieznaczej zawartości szumu i różnych częstościach. Następnie badano kierunki oddziaływań w różnych



zestawieniach i wariantach sygnałów, za pomocą metody DTF.

W pewnych warunkach udało się uzyskać podobny, poszukiwany, przypuszczalnie niewłaściwy kierunek oddziaływań.

Miało to miejsce gdy oscylacje w jednym z sygnałów były słabsze i o innej, aczkolwiek zbliżonej częstotliwości. Wyglądało wtedy na to, że sygnał słabszy jest źródłem aktywności dla kanału silniejszego, przy czym oddziaływanie zachodzi w paśmie częstotliwości oscylacji silniejszej.

Efekt zachodził bez względu na długość sygnałów, dla przykładu, przy częstotliwości próbkowania 125 Hz i częstotliwościach oscylacji odpowiednio 2 Hz i 2,5 Hz, zarówno dla sygnałów 1 s jak i takich sięgających 5 s. Dolną granicą wydawała się być jedna oscylacja wolniejszego rytmu, która musiała wystąpić w danym fragmencie sygnału aby podobny efekt miał miejsce.

Przy wyrównywaniu się amplitud w obu kanałach, oddziaływanie wydawało się stawać dwukierunkowe.

Jako że w danych doświadczalnych, w wielu przypadkach istotnie zaobserwowano w poszczególnych kanałach słabe oscylacje o częstotliwościach podobnych do silnej oscylacji występującej w jednym z kanałów, takie wyjaśnienie mogłoby posłużyć do interpretacji pozornego oddziaływania w fałszywym kierunku. Zwłaszcza w przypadku oscylacji w paśmie *ripple*, gdzie różnica amplitud była znaczna.

Także zaobserwowany brak lub jedynie nieznaczne pozorne oddziaływanie na kanały pośrednie można by wywieść z podobnej przyczyny. Jeśli w którymś z tych kanałów leżących pomiędzy istniała oscylacja o zbliżonej częstotliwości, to musiała być równie słaba co w owym innym pozornym kanale źródłowym i wobec tego, na mocy powyższych rozważań, wpływ nie został stwierdzony lub był znacznie mniejszy niż ten pomiędzy poszczególnymi kanałami źródłowym, a ich kanałem docelowym.

## 23 Podsumowanie.

Procesowi konsolidacji pamięci towarzyszy najprawdopodobniej przepływ informacji pomiędzy różnymi strukturami mózgowymi, ze szczególnym uwzględnieniem hipokampu i kory przedczołowej. Sądzi się, że ma to miejsce zwłaszcza podczas występujących w hipokampie epizodów *ripple*. Zbadanie różnych aspektów takiego przepływu, w tym dokładnego kierunku, wzdłuż którego zachodzi, jest wobec tego niezmiernie ważne. Jednym ze sposobów oddziaływania mogą być oscylacje o różnych częstościach obecne w zapisie LFP. W niniejszej pracy usiłowano zbadać ich zachowanie i wzajemne relacje, wykorzystując do tego celu metodę DTF.

Przeprowadzona za jej pomocą analiza nie wykazała istotnych, zauważalnych różnic w charakterze oddziaływań pomiędzy korą a hipokampem w trakcie, a także przed i po oscylacjach typu *ripple*, zlokalizowanych w hipokampie. Nie stwierdzono także jakościowych zmian w przypadku zwierząt z grupy testowej z podanym środkiem  $A\beta$  w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Zauważono natomiast pewne oddziaływanie pochodzące z kory w pasmach 10 - 12 Hz i w paśmie wysokiej gammy 80 - 100 Hz pojawiające się na różnych odcinkach czasu u różnych zwierząt. Oddziaływanie w paśmie 10 - 12 Hz ulegało przy tym nasileniu zwłaszcza w trakcie epizodów *ripple*, u zwierząt należących do grupy kontrolnej.

W międzyczasie ujawniły się także pewne trudności w zastosowaniu metody do danych doświadczalnych. Mogą one sugerować, iż metoda DTF nie jest odpowiednia dla tego rodzaju danych, to znaczy bardzo krótkich fragmentów sygnału zawierających wiele częstości o dużych różnicach amplitudy i stosunkowo niewielkiej zawartości szumu.

Wykonano także symulacje stanowiące próbę wskazania potencjalnych źródeł problemów, z którymi to nie była w stanie poradzić sobie metoda DTF.

Ostatecznie, uzyskane rezultaty sugerują przede wszystkim zachowanie daleko idącej ostrożności, jaka wskazana jest podczas użycia metody DTF, bo choć może dawać ona nadzieje na uzyskanie jasnych odpowiedzi na wiele nurtujących pytań, co do przyczynowości

i kierunku przepływu informacji w sygnałach wielokanałowych, to zakres jej stosowności wydaje się być ograniczony. Powinno się to jednak stać jeszcze przedmiotem bardziej szczegółowych badań.

# Literatura

- [1] W. B. Scoville and B. Milner. *Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions*. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 20: 11-21, 1958.
- [2] L. R. Squire. *The legacy of patient H.M. for neuroscience*. Neuron 61(1): 6–9, 2009.
- [3] J. Annese, N. M. Schenker-Ahmed, H. Bartsch, P. Maechler, C. Sheh, N. Thomas, J. Kayano, A. Ghatan, N. Bresler, M. P. Frosch, R. Klaming and S. Corkin. *Postmortem examination of patient H.M.'s brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction*. Nature Communications 5: 3122, 2014.
- [4] G. A. Miller. *The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information*. The Psychological Review, 63: 81-97, 1956.
- [5] J. E. Lisman and M. A. P. Idiart. *Storage of 7 +- 2 short-term memories in oscillatory subcycles*. Science, 267: 1512-1515, 1995.
- [6] R. C. Atkinson and R. M. Shiffrin. *The control processes of short term memory*. Technical Report, 173, 1971.
- [7] M. W. Brown and J. P. Aggleton. *Recognition memory: what are the roles of perirhinal cortex and hippocampus?* Nature Reviews Neuroscience, 2(1): 51-61, 2001.
- [8] S. Diekelmann. *Sleep for cognitive enhancement*. Frontiers for Systems Neuroscience 8: 46, 2014.
- [9] D. Moser, P. Anderer, G. Gruber, S. Parapatics, E. Loretz, M. Boeck, G. Kloesch, E. Heller, A. Schmidt, H. Danker-Hopfe, B. Saletu, J. Zeitlhofer, G. Dorffner. *Sleep classification according to AASM and Rechtschaffen Kales: effects on sleep scoring parameters*. Sleep, 32(2), 139-149, 2009.

- [10] E. Stark, L. Roux, R. Eichler, Y. Senzai, S. Royer, and G. Buzsaki. *Pyramidal cell-interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations*. *Neuron* 83: 467–480, 2014.
- [11] G. Girardeau and M. Zugaro. *Hippocampal ripples and memory consolidation*. *Current Opinion in Neurobiology*, 21: 452–459, 2011.
- [12] G. Buzsaki and F. L. Silva. *High frequency oscillations in the intact brain*. *Progress in Neurobiology*. 98(3): 241–249, 2012.
- [13] M. Molle, O. Yeshenko, L. Marshall, S. J. Sara and J. Born. *Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep*. *Journal of Neurophysiology* 96: 62-70, 2006.
- [14] L. Buhry, A. H. Azizi and S. Cheng. *Reactivation, replay and preplay: how it all fit together*. *Neural Plasticity* 203462: 11 pages, 2011.
- [15] N. K. Logothetis, O. Eschenko, Y. Murayama, M. Augath, T. Steudel, H. C. Evrard, M. Besserve and A. Oeltermann. *Hippocampal-cortical interaction during periods of subcortical silence*. *Nature* 491(7425): 547-53, 2012.
- [16] L. L. Colgin. *Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony*. *Current Opinion in Neurobiology* 21: 467-474, 2011.
- [17] M. F. Carr, M. P. Karlsson and L. M. Frank. *Transient slow gamma synchrony underlies hippocampal memory replay*. *Neuron* 75(4): 700–713, 2012.
- [18] D. Gervasoni, S.-C. Lin, S. Ribeiro, E. S. Soares, J. Pantoja and M. A. L. Nicolelis. *Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions*. *The Journal of Neuroscience*, 24(49): 11137–11147, 2004.
- [19] K. Benchenane, P. H. Tiesinga and F. P. Battaglia. *Oscillations in the prefrontal cortex: a gateway to memory and attention*. *Current Opinion in Neurobiology* 21: 1–11, 2011.

- [20] K. L. Anderson, R. Rajagovindan, G. A. Ghacibeh, K. J. Meador and M. Ding. *Theta oscillations mediate interaction between prefrontal cortex and medial temporal lobe in human memory*. Cerebral Cortex 20(7): 1604-1612, 2010.
- [21] A. G. Siapas, E. V. Lubenov and M. A. Wilson. *Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations*. Neuron, 46: 141–151, 2005.
- [22] K. Dzirasa, S. Ribeiro, R. Costa, L. M. Santos, S.-C. Lin, A. Grosmark, T. D. Sotnikova, R.R. Gainetdinov, M. G. Caron and M. A. L. Nicolelis. *Dopaminergic control of sleep–wake states*. The Journal of Neuroscience 26(41): 10577-10589, 2006.
- [23] M. P. Murphy and H. LeVine III. *Alzheimer’s disease and the -amyloid peptide*. Journal of Alzheimer’s Disease, 19(1): 311, 2010.
- [24] M. J. Kamiński and K. J. Blinowska. *A new method of the description of the information flow in the brain structures*. Biological Cybernetics 65: 203-210, 1991.
- [25] M. Kamiński and H. Liang. *Causal influence: advances in neurosignal analysis*. Critical Reviews in Biomedical Engineering 33(4): 347–430, 2005.
- [26] Materiały dydaktyczne dla studentów kierunku Zastosowania Fizyki w Biologii i Medycynie. <https://brain.fuw.edu.pl/edu>.
- [27] M. Pignatelli, F. Lebreton, Y. H. Cho, X. Leinekugel. *„Ectopic” theta oscillations and interictal activity during slow-wave state in the R6/1mouse model of Huntington’s disease*. Neurobiology of Disease, 48: 409-417, 2012.