

מעבדת רישום חוץ תאי

מהלך המעבדה:

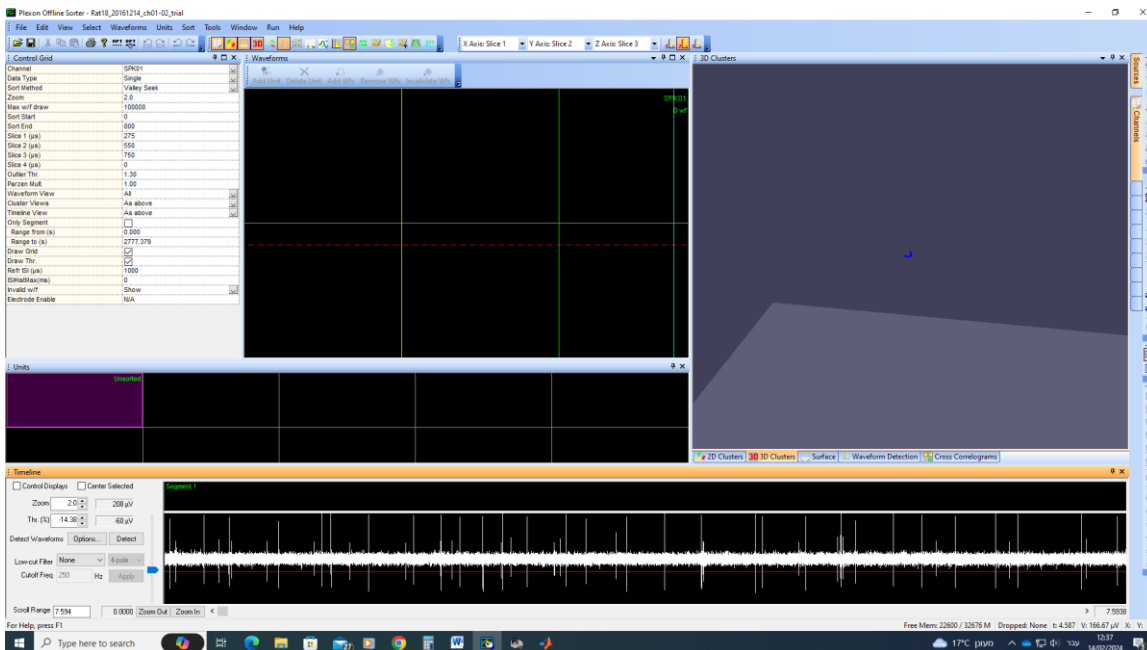
חלק ראשון – הדגמה של מערכת הרישום והיכרות עם מושגים בסיסיים באנליזה של רישום חוץ תאי.

1. נטען במערכת הרישום קובץ הדגמה. קובץ ההדגמה כולל סיגנל שנרשם מפעילות מוחית של חיה. המערכת תציג על המסך את הפעילות המתקבלת. כל מתח חשמלי שעובר את הסף שנקבע יוצג על המערכת. זהו רישום המדמה רישום online.
2. נסו לזהות צורות גל שחוזרות על עצמם. כמה תאים שונים מיוצגים בקובץ?
3. נסו לשנות את הסף. איך השינוי משפיע על צורות הגל? האם עכשיו ניתן להפריד ביניהם בצורה טובה יותר? נסו למצוא את הסף האידיאלי להפרדה של התאים מהרעש ואחד מהשני. אותה הפעילות נרשמת בכל הערוצים ולכן ניתן להשוות את התוצאה המתקבלת ממיקומים שונים של הסף בערוצים השונים.
4. ננסה לעשות ניתוח בכלים מתמטיים מהירים כמו Cross correlation ו- PCA לבדיקת התאמה לקבוצות תאים.

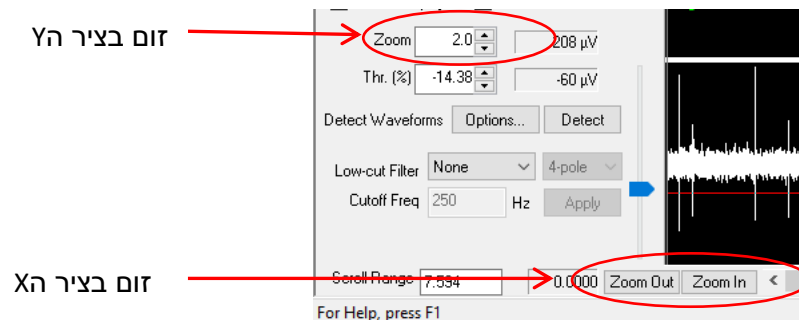
חלק שני – ניתוח נתונים מחיה מתנהגת.

בחלק זה תשתמשו בתוכנה ייעודית כדי לחלץ זמני ספייקים של תאים מתוך רישום חוץ תאי שנרשם מחיה מתנהגת. את זמני הספייקים שתחלצו תשמרו לצורך בחינת פעילות התאים.

1. פתחו את תוכנת offline sorter.
2. טענו את הקובץ הרצוי.
3. בלשונית channels בצד ימין לבחור את הערוץ הרצוי. אתם אמורים לראות בתחתית המסך את הסיגנל.



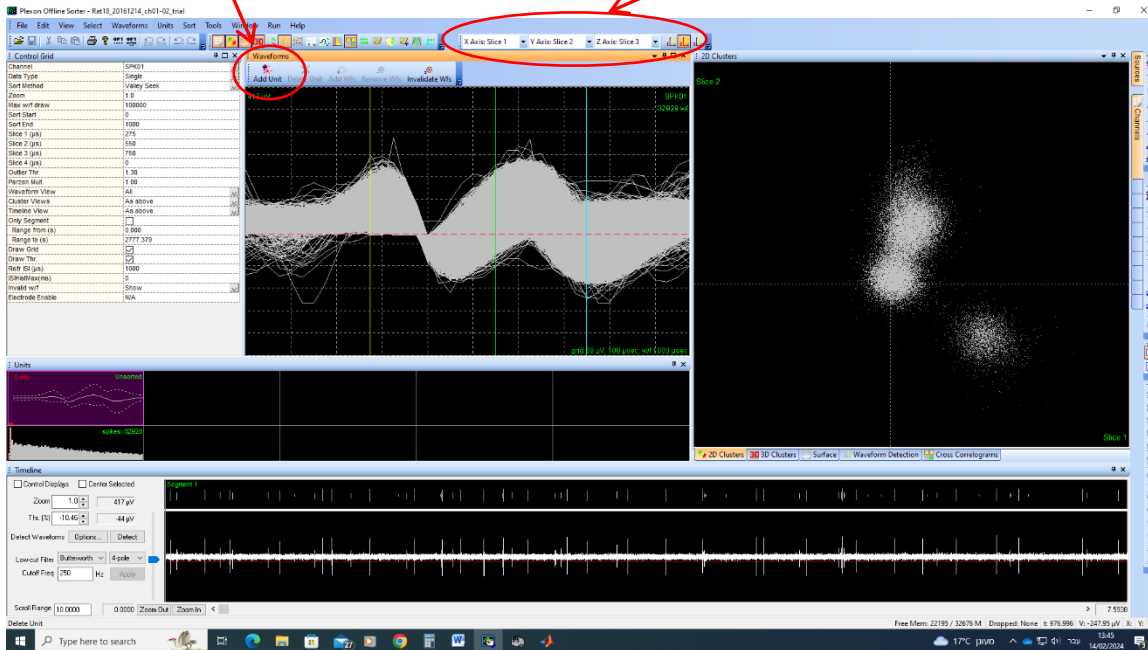
4. בחלק השמאלי התחתון של המסך אפשר לשלוט על התצוגה של הסיגנל ועל מיקום הסף. הסתכלו על הסיגנל וזהו את הספייקים.



5. העבירו high pass filter על הסיגנל: תחת Low cut filter בחרו Butterworth. מה קרה לסיגנל?
6. קבעו את הסף הרצוי (הקו האדום) כך שיתפוס את כל הספייקים.
7. בחירת פרמטרים לצורות הגל שיתקבלו: לחצו על לחצן Options שליד הכותרת Detect waveforms. ייפתח חלון שבו ניתן לקבוע את הפרמטרים של צורת הגל – אורך צורת הגל שתוצג, אורך הזמן לפני חציית הסף והזמן המינימלי בין שני ספייקים. ניתן להשאיר את הפרמטרים כמו שהם בשלב הראשוני.
8. לחצו Detect. המערכת תזהה את כל הספייקים שחצו את הסף ותציג אותם בחלק העליון של המסך.
9. בחנו את צורות הגל שהתקבלו. האם ניתן לראות את צורות הגל במלואן? האם ניתן לזהות צורות גל שחוזרות על עצמן? האם ניתן להפריד את הספייקים מרעש הרקע? במידה ואתם חושבים שיש בסיגנל כמה תאים שונים, האם ניתן לזהות איזה צורות גל שייכות לאיזה תא? במידה ולא, שנו את הפרמטרים של צורות הגל ו\או את הסף ולחצו detect שוב. המשיכו עד שהתוצאות משביעות רצון.
10. תחת הלשוניות 2d clusters ו3d clusters ניתן לראות ייצוג של צורות הגל השונות כנקודות במרחב - PCA. בדקו האם אתם מצליחים לזהות את קבוצות התאים השונות ואת רעש הרקע. ניתן לשנות את הפרמטרים שעל פיהם הנקודות מוצגות.

הוספת תא

שינוי הפרמטרים של הקלאסטרים



11. בעזרת כפתור Add unit סמנו את צורות הגל שאתם חושבים ששייכות לאותו התא. ניתן לסמן גם על צורות הגל עצמן וגם על הקלאסטרים.

12. בדקו האם התוצאה שקיבלתם הגיונית. ניתן לתקן באמצעות הכפתורים add WFs שמוסיף צורות גל ליחידה שבחרתם וremove WFs שמוריד ממנה צורות גל.

13. במידה ואתם חושבים שזהו אותו תא (צורתם והתנהגותם דומה אך מוזזת במרחב הזמן) תוכלו לבצע איחוד על ידי Unit → combine.

14. בדקו האם התנהגות התא הגיונית באופציית ה cross correlation, בדקו האם התקופה הרפרקטורית מתאימה להתנהגות התא \ מספר התאים והקורולציה ביניהם.

15. לצורך נוחות תמיד תוכלו לעשות הוספת יחידה (add unit) והוספת כל הגלים שלא מוינו לתאים ← זה יתן לכם את כלל הרעש הקיים. ממנו תוכלו להסיר את הגלים שלא תמאימים לרעש. אותם גלים יתווספו ל unsorted ואותם תוכלו להוסיף לתאים שמיינתם כבר.

16. לאחר סיום המיון יש לשמור את התוצאות ולייצא אותם לקובץ שאיתו תוכלו לעשות את האנליזות המתקדמות. ייצוא הקובץ יבוצע לפורמט NEX. קראו לי טרם הייצוא שאוודא שאין תקלות.

17. פתחו את קובץ ה NEX, סמנו את כלל המשתנים, לחצו על matlab בשורה העליונה ← send selected variables, ושמרו את הקובץ כ mat עם שם הערוץ. קובץ זה ישמש אתכם לעבודה בבית. עשו זאת עבור כל ערוץ ברגע שסיימתם.

יש לחזור על התהליך עבור כל אחד מהסיגנלים לפחות פעמיים על ידי שני אנשים שונים. שימו לב לוודא את כמות התאים הממויינים ולוודא כי התא נראה דומה למיון השני – זאת אינדיקציה לנכונות המידע ודרך לאמת אותו.

הוראות לכתיבת דו"ח מעבדה- רישום חוץ תאי

כאמור, אחת מן המטרות המרכזיות של מעבדה זו היא להכיר לכם את עולם האלקטרופיזיולוגיה ולהדגים כיצד מתרחש בו התהליך הניסויי. המטרה של כתיבת הדו"ח היא לאפשר לכם להתנסות גם בתהליך המשלים את הניסוי והוא ניתוח הנתונים, דיווח על תוצאות ודיון בהן.

על הדו"ח להיות מוגש בפורמט של מאמר לפי הסעיפים הבאים:

1. **כותרת (5 נקודות)**- חשבו על כותרת מתאימה המשקפת את הניסוי והתוצאות שיוצגו בדו"ח.
2. **הקדמה (10 נקודות)**- על ההקדמה להיות בהיקף של עד עמוד אחד ולכלול חומר רקע קצר, תיאור קצר של הניסוי שהתבצע ושל התוצאות שהתקבלו.
3. **שיטות (10 נקודות)**- פרטו את השיטות בהן השתמשתם, מה נעשה בניסוי, באילו כלים השתמשתם על מנת לבצע את ניתוח הנתונים.
4. **תוצאות (50 נקודות)**- בפרק זה עליכם לדווח על תוצאות הניסוי. על פרק התוצאות לכלול גרפים והסבר מילולי של התוצאות שתתבקשו לדווח עליהן – ראו פרוט בהמשך המסמך. על הגרפים לכלול כותרות ראשיות וכותרות צירים. שימו לב שאתם מציינים גם את היחידות בהן השתמשתם (לדוגמא- אם כותרת הציר היא זמן- עליכם לציין האם הזמן נמדד בשניות, מילישניות, דקות, וכו'). במידה ויש תתי גרפים שימו לב כי היחידות הן אותו הדבר. בנוסף, ציינו עבור כל גרף את מספר הקובץ אליו הוא משוייך ואת הפרמטרים השונים בהם השתמשתם (לדוגמא- גובה הסף לזיהוי פוטנציאלי הפעולה וכו')
5. **דיון (20 נקודות)**- בפרק זה עליכם לנסות להסיק מה ניתן ללמוד מהתוצאות, מה משמעותן. דונו ביתרונות ובחסרונות של הניסוי שבוצע על כל שלביו והציעו רעיונות למחקר המשך בהתבסס על התוצאות שקיבלתם.
6. **נספחים (5 נקודות)**- צרפו את קוד ה-matlab/python אותו כתבתם לצורך ניתוח הנתונים, הקפידו לתעד את הקוד.

עליכם לכתוב את הדו"ח כדווח לקורא שאינו יודע מה התבצע בניסוי. ספרו בבהירות מה עשיתם וכיצד, הסבירו את הגרפים ודונו בתוצאות. רשמו את הדו"ח בצורה מובנת, תמציתית, המכילה גרפים ברורים עם תיאור.

בכתיבת הדו"ח הניחו כי יש בידכם תוצאות אידיאליות (שיטות מתאימות, מספיק חזרות וכו'). את מגבלות הניסוי באם היו והשגותיכם בנוגע לתוצאות יש לפרט בחלק הדיון כסעיף נפרד.

ניתוח הנתונים

עליכם להשתמש בנתונים שניתחתם במהלך המעבדה. עליכם לשמור את זמני הספייקים וצורות הגל שמצאתם במהלך המעבדה וגם את הסיגנל המקורי. תדר הדגימה של הסיגנלים הוא 40,000 דגימות בשניה.

בנוסף לנתונים שתשמרו תקבלו גם קובץ מטלב עם סיגנל LFP של כל אחד מהערוצים לצורך ביצוע האנליזה הספקטרלית. לסיגנל LFP תדירות דגימה של 1000 דגימות לשניה.

כתיבת הפונקציות

הקוד בו תשתמשו לצורך ביצוע האנליזות ייכתב ב-matlab או ב-python. על הקוד להיות כתוב בצורת פונקציות סגורות (ולא סקריפטים) לפי הפירוט הבא.

הוראות כלליות לכתיבת הפונקציות:

- השתמשו בשמות משתנים ברורים.
- כתבו את הפונקציה כך שתהיה כללית עד כמה שניתן.
- הגדירו משתנים עבור הפרמטרים השונים, כך שתוכלו לשנותם בקלות.
- שבצו בקוד הערות להסבר.

זכרו כי שמרתם את הקובץ כ-Mat, כעת עליכם לפתוח אותו בסביבת העבודה שלכם. בשביל לעשות זאת, בפיתוח התקינו את ספריית pynexfile והשתמשו בפונקציית NexFile.

1. התקינו את הספרייה במחשב במידה והיא לא קיימת ← `pip install scipy`
2. תוכלו להיעזר בקוד הבא:

```
import scipy.io
#Specify the path to your .MAT file . remmebr the \\ format
mat_file_path = 'path_to_file\\file_name.mat'

#Load the .MAT file

data = scipy.io.loadmat(mat_file_path)
#Good luck!
```

1. הצגת הסיגנל:

כתבו פונקציה בשם "plotSignal" המקבלת את הסיגנל הגולמי (raw data) של ערוץ (הקפידו לבחור ערוץ בו קיימת פעילות של התאים). הפונקציה צריכה ליצור סיגנל מפולטר לתדרים גבוהים וסיגנל מפולטר לתדרים נמוכים. על הפונקציה לייצר figure עם שלושה sub plots ובהם גרפים של מתח (מיקרו-וולט) כפונקציה של הזמן (בשניות) של הסיגנל המקורי והסיגנלים המפולטרים. הסתכלו על מקטעי זמן קצרים מתוך הסיגנל הכולל שקיבלתם בכדי לראות הבדלים בין הסיגנלים השונים. ניתן להשתמש בפונקציות highpass ו lowpass במטלב על מנת ליצור את הסיגנלים המפולטרים. בפיתוח תוכלו לבנות את הפונקציות הללו באמצעות שימוש בספרייה scipy.signal.

- תארו את ההבדלים בין הסיגנלים והסבירו איך משפיע הפילטר על הסיגנל המקורי.

2. הצגת צורת הגל של פוטנציאל הפעולה:

כתבו פונקציה בשם "plotSpikes" המקבלת את צורות הגל שהתקבלו ב-offline sorter. הציגו חלק מצורות הגל של פוטנציאלי הפעולה שהתקבלו, יש להציג 50-100 צורות גל באופן אקראי. הציגו גם את הגל הממוצע על אותו גרף בצורה מובדלת מהגלים הבודדים.

- האם כלל הגלים של פוטנציאלי הפעולה שונים אחד מהשני בהרבה?
- האם הגל הממוצע מיצג בצורה ברורה את כלל אוכלוסיית פוטנציאלי הפעולה?
- השוו את צורות הגל בין התנאים השונים של הניסוי באותו ערוץ. האם צורות הגל השתנו בצורה משמעותית? האם אתם מעריכים שהנתונים נלקחו מאותו הניירון?
- השוו בין צורות הגל שמוינו על ידי אנשים שונים באותו ערוץ. האם הצורות דומות אחת לשנייה? ממה נובעים ההבדלים (במידה ויש)?

3. חישוב קצב ירי:

כתבו פונקציה בשם "firingRate" המקבלת זמנים של פוטנציאלי פעולה, קצב הדגימה, ואת משך ההקלטה ומחשבת קצב ירי על ידי יצירת spike-train וחלונות זמן לא חופפים. על הפונקציה לצייר גרף ובו קצב ירי (spikes/s) כפונקציה של הזמן. פרמטר בו עליכם לעשות שימוש הוא גודל החלון עבורו מחושב קצב הירי.

- הדגימו כיצד משפיע גודל החלון על חישוב קצב הירי. בחרו גודל חלון שמתאר היטב את קצב הירי במהלך הניסוי והציגו דוגמאות לחלונות זמן נוספים שלדעתכם לא מעבירים את המידע בצורה טובה.

לאחר בחירת החלון המועדף השתמשו בפונקציה שכתבתם על מנת לענות על השאלות הבאות:

- האם קצב הירי משתנה במהלך הניסוי?
- האם קצב הירי שונה בין מצב של מנוחה למצב של תנועה?
- חשבו מה קצב הירי הממוצע בכל אחד משלבי הניסוי ובצעו מבחן סטטיסטי מתאים על מנת להשוות בין קצבי הירי במצבים השונים. שימו לב כי מבחן סטטיסטי ניתן לבצע על מדגם ולא פרט בודד, על כן חלקו את קצב הירי לבינים ותוכלו להשוות בצורה זו בין מדגמי הירי בזמנים נתונים. צרו היסטוגרמה של הבדלי קצב הירי. האם קצב הירי שונה סיגניפיקנטית?
- האם יש הבדל בין אנליזה שנעשתה על ידי אנשים שונים? בדקו האם קצב הירי שונה בין הניתוח שנעשה על ידי אנשים שונים בקבוצה. מה קצב הירי הממוצע שהתקבל בכל אחת מהאנליזות? האם יש ביניהם הבדל סיגניפיקנטי? השתמשו בגודל חלון זה כדי לחשב את קצב הירי בשני המקרים.

4. חישוב ספקטרום וספקטרוגרמה של LFP

כיתבו פונקציה בשם "LFP_spectrum" המקבלת את סיגנל ה LFP שקיבלתם מהמנחה ותדר הדגימה שלו ומחשבת ומציגה את גרפי הספקטרום והספקטרוגרמה של ה LFP. לחישוב הספקטרום השתמשו בשיטת pwelch. ב matlab השתמשו בפונקציית pwelch ובפיתון ניתן להשתמש ב scipy.signal.welch. ערכים מומלצים לחישוב הספקטרום $NFFT = 8192$, חלון hann באורך 600, וחפיפה של רבע מאורך החלון. לחישוב הספקטרוגרמה השתמשו באותם הפרמטרים, ב matlab ניתן להשתמש בפונקציית spectrogram לחישוב הספקטרוגרמה, ניתן להשתמש בקוד הבא:

```
NFFT = 8192;
win=hann(600);
n_overlap=round(length(win)*0.25);
[s f t]=spectrogram(LFP,win,n_overlap,5000,Fs);
s1=abs(s);
figure()
imagesc(t,f,s1)
axis xy
ylim([1 30]);
set(gca,'CLim',[3 15])
```

בפיתון ניתן להשתמש בספריית: scipy.signal, matplotlib.pyplot, numpy ולהרחיב את הקוד שניתן:

```
def LFP_spectrum(LFP, Fs):
    # Parameters
    NFFT = 8192
    window = scipy.signal.get_window('hann', 600)
    overlap = int(len(window) * 0.25)
    # Spectrum (Welch's Method) :
    freqs, power = scipy.signal.welch(LFP, fs=Fs, window=window,
nperseg=len(window), noverlap=overlap, nfft=NFFT)
    plt.figure()
    plt.plot(freqs, 10 * np.log10(power))
    # add : plt.xlabel,plt.ylabel, title...
    # Spectrogram:
    freqs, times, spec = scipy.signal.spectrogram(LFP, fs=Fs, window=window,
noverlap=overlap, nfft=NFFT)
    plt.figure()
    plt.imshow(10 * np.log10(np.abs(spec)), aspect='auto', extent=[times.min(),
times.max(), freqs.min(), freqs.max()], origin='lower')
    plt.ylim(1, 30)
    plt.colorbar(label='Power (dB)')
    # add plt lables and title and show it all.
```

כאשר Fs הוא תדר הדגימה.

- האם ישנם הבדלים בתכולת התדר של הסיגנל במצבי פעילות שונים של החיה? הציגו את התוצאות שקיבלתם בתנאי הניסוי השונים ותארו את הדומה והשונה ביניהם.

את הדו"ח יש להגיש שבועיים ממועד המעבדה.

בהצלחה!