

Marjan Zaletel¹

Analiza živčnožilne sklopitve z vidnimi evociranimi potenciali in doplersko sonografijo

The Analysis of Neurovascular Coupling by Visual Evoked Potentials and Doppler Sonography

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: cerebrovaskularni obtok, evocirani potenciali vidni, ultrasonografija doplerska transkranična, srednja možganska arterija, zadnja možganska arterija, hitrost krvnega pretoka

Živčnožilna sklopitev je pojem, ki opredeljuje značilnost povezave med možganskim pretokom in živčno dejavnostjo. Zaenkrat ni uveljavljene metode, s katero bi analizirali živčnožilno sklopitev pri ljudeh. V študiji smo skušali ugotoviti, ali lahko analiziramo živčnožilno sklopitev tako, da sočasno merimo vidne evocirane možganske odgovore krvnega pretoka (VEOP) s transkranično doplersko sonografijo (TCD) in vidne evocirane potenciale (VEP). V raziskavo smo vključili 30 zdravih preiskovancev, starih $38,0 \pm 9,6$ let obeh spolov. Srednjo arterijsko hitrost v levi srednji možganski arteriji (v_m ACM) in desni zadnji možganski arteriji (v_m ACP) smo merili s TCD. VEP smo izmerili iz zatilnih odvodov. Električno nevrnsko dejavnost smo spreminjali s spreminjanjem vidnega kontrasta. Povezave smo testirali z linearno regresijo. Ugotovili smo, da so VEOP 100-% vidnega kontrasta večji od VEOP 10-% vidnega kontrasta ($p < 0,01$). VEOP 10-% vidnega kontrasta so bili večji od VEOP 1-% vidnega kontrasta ($p < 0,01$). VEP 100-% vidnega kontrasta so bili v primerjavi z VEP 10-% vidnega kontrasta večji ($p < 0,01$). VEP 10-% vidnega kontrasta so bili večji od VEP 1-% vidnega kontrasta ($p < 0,01$). VEP in VEOP so bili pri zdravih preiskovancih zmerno statistično pomembno povezani ($r = 0,66$; $p < 0,01$).

Na temelju rezultatov smo zaključili, da lahko s sočasnim merjenjem VEOP in VEP analiziramo živčnožilno sklopitev pri zdravih preiskovancih.

ABSTRACT

KEY WORDS: cerebrovascular circulation, evoked potentials visual, ultrasonography Doppler transcranial, middle cerebral artery, posterior cerebral artery, blood flow velocity

The term neurovascular coupling denotes the relationship between neuronal activity and regional cerebral blood flow. A method that would enable analysis of neurovascular coupling in humans is still to be discovered. The aim of our study was to establish whether it is possible to analyze neurovascular coupling noninvasively by simultaneously measuring visual evoked potentials (VEP) and visually evoked cerebral blood flow responses (VEFR) by transcranial Doppler (TCD). The records were made from 30 healthy volunteers of both sexes aged 38.0 ± 9.6 years. The mean arterial velocity in the left middle cerebral artery (v_m MCA) and the mean arterial velocity in the right posterior cerebral artery (v_m PCA) were monitored by using TCD. The VEPs were recorded from occipital leads. Neuronal activity was changed

¹ Asist. dr. Marjan Zaletel, dr. med., Klinični oddelek za nevrologijo, SPS Nevrološka klinika, Zaloška 7, SI – 1525 Ljubljana.

by changing visual contrast. The relationship between VEP and VEFR was tested using linear regression analysis. The VEFRs at 100% visual contrast were higher than those at 10% visual contrast ($p < 0.01$) and the VEFRs at 10% visual contrast higher than those at 1% visual contrast ($p < 0.01$). In addition, the VEPs at 100% visual contrast were higher than those at 10% visual contrast ($p < 0.01$) and the VEPs at 10% visual contrast higher than those at 1% visual contrast ($p < 0.01$). The relationship between the VEPs in the VEFR was moderate and significant ($r = 0.66$; $p < 0.01$). It was concluded that simultaneous measuring of VEPs and VEFRs enable us to analyze neurovascular coupling in healthy subjects.

UVOD

Dejavnost živčevja, možganska presnova in regionalni možganski krvni pretok (rMKP) so medsebojno sklopljeni. Znano je namreč, da povečano živčno dejavnost spremljata povečan rMKP in možganska presnova (1). Živčnožilna sklopitev je tudi pojav, ki ga opredeljuje značilnost povezave med možganskim pretokom in živčno dejavnostjo in je pomembna za vzdrževanje in prilagajanje možganske presnove funkcijskim potrebam nevronov, torej za nemoteno delovanje možganov.

Poznavanje živčnožilne sklopitve je pomembno v nevrofiziologiji in klinični nevrologiji. Razlaga rezultatov visokotehnoloških metod, kot sta pozitronska emisijska tomografija (PET) in funkcijsko magnetno resonančno slikanje (fMR), s katerimi lahko proučujemo delovanje možganov, namreč temelji na tesni sklopitvi med živčevjem in možganskim žiljem. Pri nekaterih možganskožilnih obolenjih je živčnožilna sklopitev lahko motena, kar lahko pripelje do propada živčnih celic ali do funkcijskih motenj. Torej bi proučevanje živčnožilne sklopitve pri ljudeh lahko omogočilo razumevanje osnovnih patofizioloških procesov pri nevroloških boleznih in izboljšalo zdravljenje le-teh.

MEHANIZEM ŽIVČNOŽILNE SKLOPITVE

Pred več kot stoletjem je angleški nevrofiziolog Sherrington pokazal na poskusni živali, da se rMKP poveča v predelu temenskega režnja ob aktiviranju somatosenzoričnega predela možganske skorje (2). Razmišljal je o tem, da imajo možgani notranji mehanizem, ki v določenem možganskem področju prilagaja možganski krvni pretok živčni dejavnosti. Po njegovem mnenju so dejavniki sklopitve

med živčno dejavnostjo in rMKP kemični produkti možganske presnove, ki se tvorijo ob aktivaciji nevronov. Natančno delovanje živčnožilne sklopitve in njeni mehanizmi pa še do danes niso pojasnjeni.

V zadnjih sto letih so intenzivno raziskovali dejavnike živčnožilne sklopitve. Razvrstili so jih v dve veliki skupini. V prvo spadajo molekule in ioni, ki se prehodno kopičijo po živčni dejavnosti nevronov v zunajceličnem prostoru. Imenujemo jih vazoaktivni presnovki. V drugo skupino spadajo vazoaktivni prenašalci, ki se sproščajo ob aktivaciji živčnih poti. V skupini vazoaktivnih presnovkov so najpomembnejši tisti, ki se sproščajo iz delujočih nevronov, kot so ioni H^+ in K^+ , adenozin in laktat. Vendar same spremembe v koncentraciji teh snovi v zunajceličnem prostoru ne morejo zadovoljivo povečati rMKP. Počasno kopičenje teh snovi in difundiranje prek velikih razdalj ne omogočata hitre in natančne živčnožilne sklopitve. Delovanje snovi iz druge skupine, tj. vazoaktivnih prenašalcev, bi to lahko omogočilo. Znano je, da je možganska mikrocirkulacija bogato prepletena z živčnimi vlakni ekstrinzičnega in intrinzičnega izvora. Ekstrinzičnega izvora so avtonomna vlakna, kot so simpatična vlakna, intrinzična vlakna pa so internevroni in poti iz možganskega debla. V možganski mikrocirkulaciji so odkrili tudi receptorje za tiste neurotransmitorje, ki jih oživčujejo. Topično (lokalno) dajanje monoaminov, kot sta serotonin in norepinefrin, ter neuropeptidov, kot so vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), neuropeptid Y, peptid v zvezi z genom za kalcitonin (GRP) ter substanca P, povzročijo odzive možganskih žil. Kljub anatomskim in farmakološkim podatkom, da je nevrogeni mehanizem pomemben pri nadzoru možganskega krvnega obtoka, še nimamo dokončnega dokaza, ki bi potrdil nevrogeno hipotezo (3).

V zadnjem času se vse bolj uveljavlja koncept živčnožilne enote, ki ga sestavljajo nevron, astrocit in možganska žila. Novejše raziskave so namreč ugotovile, da so astrociti pomembna sestavina živčnožilne sklopitve. Znano je namreč, da so astrocitni podaljški v tesnem stiku z živčnimi sinapsami na eni strani in možganskimi arteriolami na drugi strani. Znotrajcelično nihanje koncentracije kalcija $[Ca^{2+}]$ v astrocitih spremlja sproščanje glutamata v sinaptične špranje. Tako draženje astrocitov z agonisti glutamata poveča $[Ca^{2+}]$ v astrocitih. To povečanje pa povzroči razširitev možganskih arteriol (1).

V zadnjem času omenjajo dušikov oksid (NO) kot posrednik v živčnožilni sklopitvi. NO se tvori v nevronih in v možganski glji pod vplivom različnih neurotransmitorjev, ki se sproščajo iz depolariziranih aferentnih vlaken v aktiviranem delu možganov. NO je močan vazodilatator, zaradi kratkega razpolovnega časa pa je njegovo delovanje prostorsko in časovno omejeno. Zanimiva je ugotovitev, da inhibicija NO-sintaze s 7-nitroindazolom prepreči porast možganskega pretoka v somatosenzorični skorji, ki ga sicer povzroči draženje dlak (4). Torej se zdi, da je NO modulator in ne posrednik živčnožilne sklopitve.

Zaenkrat ni uveljavljene metode, s katero bi na neinvaziven način ocenili živčnožilno sklopitev pri ljudeh. V ta namen bi morali sočasno meriti živčno dejavnost in rMKP ter spreminjati živčno dejavnost. Iz dosedanjih raziskav je znano, da lahko s transkranialnimi Dopplerjem (TCD) opazujemo rMKP v povirju zadnje možganske arterije. Ugotovili so, da se signal TCD odziva na aktivacijo možganske skorje. Dražili so s kognitivnimi in vidnimi dražljaji (5, 6). Odzive so opazovali v srednji in zadnji možganski arteriji. Draženje vidne skorje z vidnimi dražljaji pa je povzročilo večje in ponovljivejše odgovore kot kognitivni dražljaji (7). Odgovore na vidne dražljaje so imenovali vidne evocirane možganske odgovore krvnega pretoka (VEOP). Iz nevrofiziologije pa je znano, da lahko intenzivnost živčne dejavnosti vidne skorje pri ljudeh merimo neinvazivno z vidnimi evociranimi potenciali (VEP). Sočasno z merjenjem VEP in VEOP lahko na neinvaziven način spreminjamo intenzivnost živčne dejavnosti tako, da spreminjamo kontrast vidnega dražljaja.

Temeljne raziskave na nevronih so namreč pokazale, da je frekvenca proženja akcijskih potencialov tem večja, čim večji je vidni kontrast (8).

Namen našega raziskovalnega dela je bil ugotoviti, ali lahko s sočasnim merjenjem VEP in VEOP na neinvaziven način analiziramo živčnožilno povezavo pri ljudeh. V ta namen smo spreminjali vidni kontrast. Predpostavljali smo, da večji vidni kontrast močneje aktivira ustrezne živčne strukture v možganski skorji. Iskali smo povezavo med vidnim kontrastom in kazalcema živčne dejavnosti, tj. VEP in VEOP. Če bi odkrili to povezavo, bi lahko analizirali tudi tisto med VEOP in VEP. Slednja bi služila kot parameter živčnožilne sklopitve pri ljudeh. Skušali smo odgovoriti na vprašanje, ali so amplitude VEP in amplitude VEOP pri zdravih preiskovancih medsebojno pozitivno linearno povezane.

PREISKOVANCI IN METODE

Preiskovanci

V klinični raziskavi je sodelovalo 30 zdravih preiskovancev obeh spolov. Povprečna starost je bila $38,0 \pm 9,6$ (od 22 do 55) let. V skupini je bilo 8 moških in 22 (73%) žensk. Med zdrave preiskovance smo uvrstili vse, ki niso imeli nikakršnih težav in niso navajali kroničnega glavobola na ciljano vprašanje. Imeli so normalen nevrološki in internistični klinični status ter angiosonološki izvid vratnih arterij. Vsem smo izmerili normalen krvni tlak s povprečnim srednjim arterijskim tlakom (SAT) $90,1 \pm 2,1$ mmHg in srčno frekvenco (SF) $72,2 \pm 7,1$ min⁻¹.

Osnovne meritve

Srednjo arterijsko hitrost (v_m) v žilah na bazi lobanje smo merili s TCD. Sondo 2 MHz smo s posebnim nosilcem namestili nad senčnično akustična okna. Skozi levo akustično okno smo spremljali v_m v srednji možganski arteriji (v_{mACM}), skozi desno pa v_m v desni zadnji možganski arteriji (v_{mACP}). Vedno smo snemali arterijsko hitrost krvi v P2-segmentu zadnje možganske arterije. Uporabili smo TCD Multi-Dop X4 (DWL, Sipplingen, Nemčija). Sočasno smo spremljali srednji arterijski tlak (SAT) z merilnikom za stalno merjenje

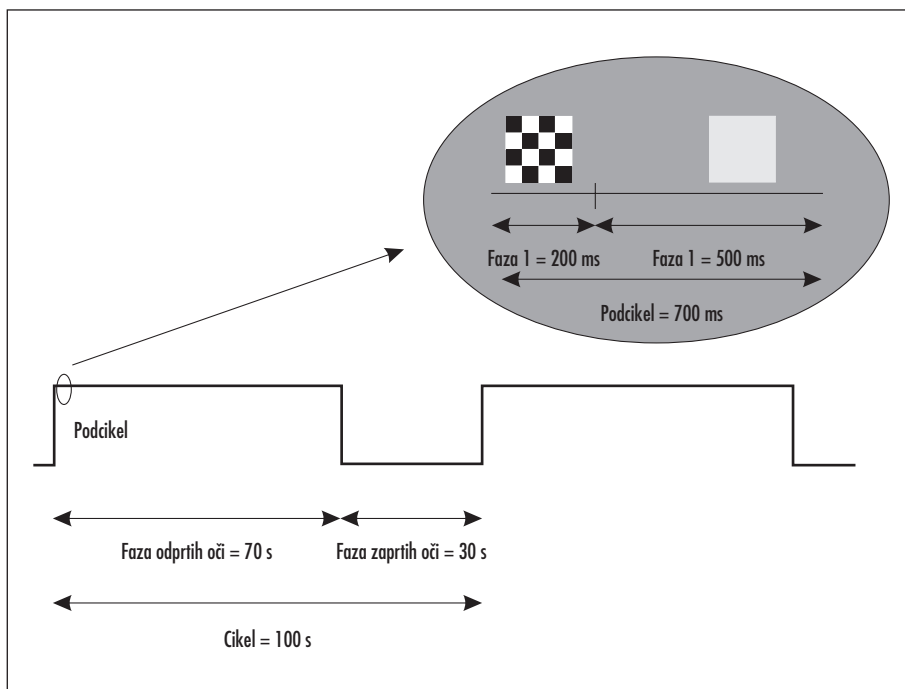
krvnega tlaka (Colin 7000, Komaki-City, Japonska). Koncentracijo ogljikovega dioksida v izdihanem zraku (*End-tidal CO₂ - Et-CO₂*) smo merili z infrardečim kapnografom (Capnodig, Draege, Lübeck, Nemčija). SF smo določili z računalniškim programom TCD8 iz doplerskega signala. Vidne evocirane potenciale s celotnim poljem smo odjemali z elektrodami Ag/AgCl. Elektrode smo postavili po navodilih Mednarodnega združenja za klinično nevrofiziologijo (9). Uporabili smo tri aktivne elektrode. Elektrodo Oz smo postavili nad inion. Razdalja od iniona je znašala 10% razdalje med inionom in nazionom. Elektrodi O1 in O2 smo postavili levo in desno od iniona. Razdalja vsake elektrode od iniona je znašala 10% obsega glave. Referenčno elektrodo Fz smo namestili frontalno od verteksa. Razdalja od verteksa je znašala 20% razdalje med inionom in nazionom. Signal smo ojačili z ojačevalnim sistemom, ki je imel linearni frekvenčni odgovor med 1 in 250 Hz in ojačenje 1:120.000. Signal se je prikazoval na osciloskopu. Čas analize je bil 600 ms. Občutljivost sistema je bila 10 μ V/raz-

delek. Signal smo digitalizirali in vodili v računalniku za povprečevanje. Pred zapisom na računalniški disk smo povprečili 100 ciklov in jih prikazali na osciloskopu.

Potek poskusa

Poskus je potekal v temnem, zvočno in električno izoliranem prostoru. Njegov potek smo preiskovancu natančno razložili. Preiskovanec je med izvajanjem sedel v udobnem naslonjaču, ki je bil oddaljen 1 m od računalniškega zaslona, na katerem se je prikazoval vidni dražljaj. Vidni kot je znašal 22°. Preiskovanec je vseskozi gledal rdečo točko na zaslonu. Na naš ukaz je odpiral in zapiral oči.

Za svetlobni dražljaj smo uporabili šahovnico. Prostorska frekvenca je bila 1,6 cikla na stopinjo. Povprečna svetilnost šahovnice je bila 28 cd/m² in se med poskusom ni spreminjala. Spreminjali pa smo kontrast šahovnice. Uporabili smo 100-, 10- in 1%-kontrast. Vidni kontrast smo opredelili po enačbi $K = (L_{\text{belo}} - L_{\text{črno}}) / (L_{\text{belo}} + L_{\text{črno}})$. Zaradi časovne zakasnitve med VEP in VEOP smo dražljaj prikazovali na poseben način (slika 1).



Slika 1. Prikazovanje vidnega dražljaja.

Bolnike smo ciklično dražili. Dolžina ciklusa je bila 100 s. Razdeljen je bil v dve fazi, v prvi je imel preiskovanec odprte oči (faza odprtih oči), v drugi pa zaprte oči (faza zaprtih oči). Faza odprtih oči je trajala 70 s, zaprtih pa 30 s. Ves čas ciklusa smo merili v_m ACM, v_m ACP, SAT, SF in Et-CO₂. Fazo odprtih oči smo razdelili na podcikluse, ki so trajali po 700 ms. Vsak podciklus je imel še dve fazi: v prvi se je prikazovala šahovnica (faza šahovnice) in je trajala 200 ms; v drugi se je prikazoval enostavni dražljaj enake povprečne svetilnosti kot šahovnica. Ta faza je trajala 500 ms. VEP smo snemali v fazi šahovnice. Cikluse smo pri vsakem kontrastu petkrat ponovili.

Multimodalni zapis so sestavljali naslednji signali: v_m ACM, v_m ACP, SAT, SF in Et-CO₂ (slika 1). Zapis prikazuje tudi cikluse (s kvadrati na spodnjem delu zapisa). Shranili smo ga na računalnik in naknadno obdelali (*offline*) z računalniškim programom TCD8. Ta namreč omogoča oceno povprečne amplitude signalov na multimodalnem zapisu z metodo povprečnega integrala po enačbi, ki je v primeru za v_m zapisana:

$$v_m = \int v dt / t_0 - t_{70}$$

Tako smo določili povprečne integrale za v_m ACM, v_m ACP, SAT, SF in Et-CO₂ za obdobje pred draženjem (osnovne razmere) in za vsako fazo odprtih oči pri 1-, 10- in 100% vidnem kontrastu ter za vsakega posebej izračunali pet povprečnih amplitud. Nato smo izračunali povpreček petih meritev za v_m ACM, v_m ACP, SAT, SF, in Et-CO₂ faze odprtih oči 1-, 10- in 100% vidnega kontrasta. Dobili smo v_m ACM, v_m ACP, SAT, SF, in Et-CO₂ 1-, 10- in 100% vidnega kontrasta.

Na računalniškem disku smo jih shranili v obliki povprečenj 100 VEP, ki smo jih naknadno analizirali (*offline*). Najprej smo seštelili vsa povprečja, ki smo jih izmerili pri določenem vidnem kontrastu. Tako smo dobili VEP, ki je vseboval do 500 povprečij. S podprogramom smo določili povprečno absolutno amplitudo signala VEP po enačbi:

$$|\bar{A}| = \Sigma |A| / n,$$

kjer je $|\bar{A}|$ povprečna absolutna amplituda, $|A|$ absolutna amplituda in n število amplitud v določenem časovnem intervalu. Povprečno

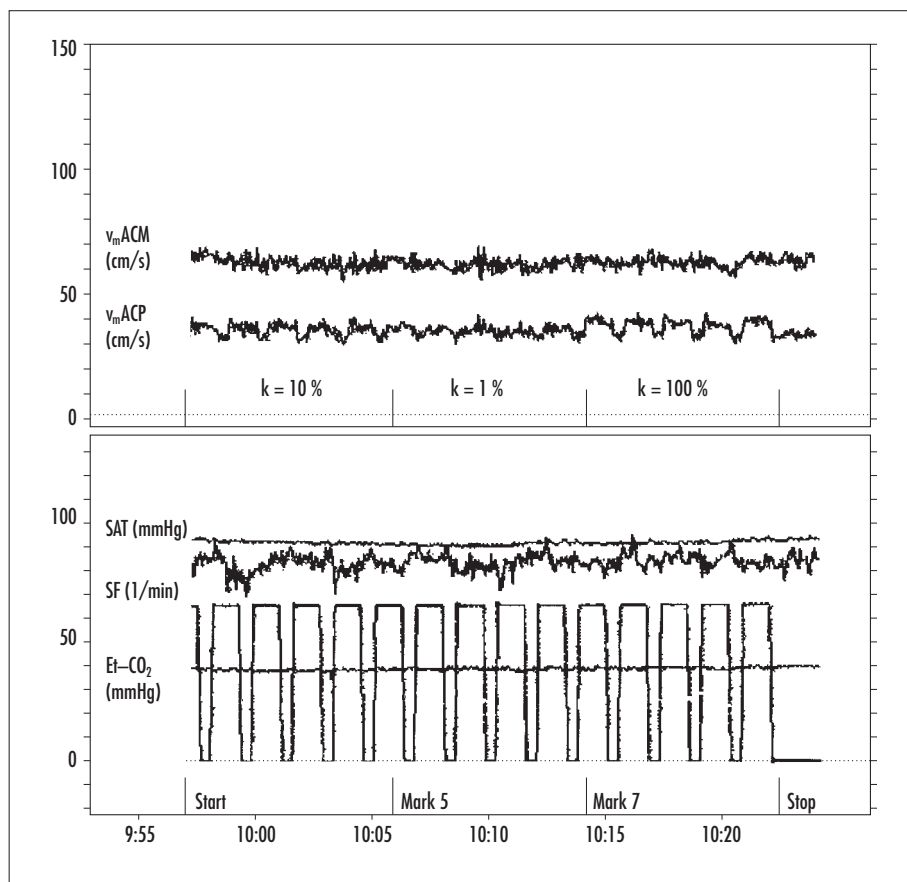
absolutno amplitudo za VEP 1-, 10- in 100% vidnega kontrasta smo izračunali v intervalu od 50 do 200 ms. V intervalu med 0 in 50 ms smo izračunali povprečno absolutno amplitudo rezidualnega šuma.

Za statično analizo smo uporabili računalniški program SPSS. Z analizo variance za ponavljajoče se meritve (ANOVA) smo analizirali razlike med več kot dvema skupinama odvisnih spremenljivk. S parnim t-testom smo analizirali razlike med dvema skupinama odvisnih spremenljivk. S Studentovim t-testom smo analizirali razlike med dvema skupinama neodvisnih spremenljivk. Z linearno regresijsko metodo smo analizirali povezavo med dvema spremenljivkama.

REZULTATI

Najprej smo analizirali v_m ACM, v_m ACP, SAT, Et-CO₂ in SF. Na sliki 1 prikazujemo tipičen multimodalni zapis v_m ACM, v_m ACP, SAT, Et-CO₂ in SF (multimodalni zapis) pri zdravem preiskovancu, starem 24 let (slika 2). V prvih 5 ciklikih smo dražili z 10%, v drugih 5 ciklikih z 1% in v zadnjih 5 ciklikih s 100% vidnim kontrastom. Na multimodalnem zapisu so jasno vidni odzivi v_m ACP, ki sovpadajo s fazo odprtih oči. To fazo ponazarjajo pravokotniki v skrajnem spodnjem delu multimodalnega zapisa. v_m ACM, MAP, SF in Et-CO₂ ne kažejo odzivov na vidni dražljaj. VEOP izraža razlika med v_m ACP bazalnega stanja v fazi zaprtih oči in v_m ACP 1-, 10- in 100% vidnega kontrasta v fazi odprtih oči. Lahko opazimo, da so VEOP pri določenem vidnem kontrastu dobro ponovljivi, tako po obliki kot po amplitudi. VEOP 100% vidnega kontrasta imajo najvišjo amplitudo. VEOP 10% vidnega kontrasta imajo manjšo amplitudo kot VEOP 100% vidnega kontrasta. Najmanjšo amplitudo imajo VEOP 1% vidnega kontrasta. Značilno za VEOP je, da se njihova amplituda spreminja s spreminjanjem vidnega kontrasta. VEOP se med 70-sekundnim svetlobnim draženjem ne habituirajo, njihove amplitude pa nihajo okoli povprečnih vrednosti.

Povprečne vrednosti v_m ACP, v_m ACM, SAT, SF in Et-CO₂ osnovnih razmer in povprečne vrednosti v_m ACP, v_m ACM, SAT, SF in Et-CO₂ 1-, 10- in 100% vidnega kontrasta pri-



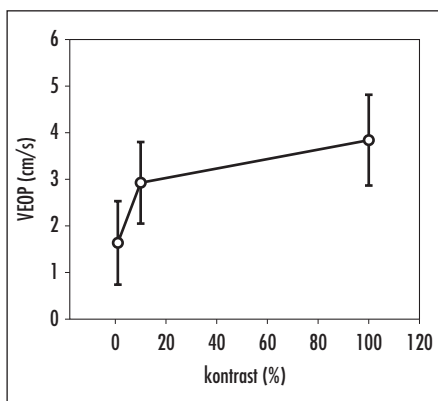
Slika 2. Multimodalni zapis v_{mACP} , v_{mACM} , SAT, Et-CO₂ in SF pri zdravem preiskovancu dobljen pri treh različnih vidnih kontrastih. v_{mACM} – hitrost krvi v srednji možganski arteriji, v_{mACP} – hitrosti krvi v zadnji možganski arteriji, SAT – srednji arterijski tlak, SF – srčna frekvenca, Et-CO₂ – koncentracija ogljikovega dioksida v izdihanem zraku na koncu izdih.

Tabela 1. Povprečne vrednosti v_{mACP} , v_{mACM} , MAP, SF in Et-CO₂ osnovnih razmer in v_{mACP} , v_{mACM} , MAP, SF in Et-CO₂ 100-, 10- in 1-% vidnega kontrasta. v_{mACM} – hitrost krvi v srednji možganski arteriji, v_{mACP} – hitrosti krvi v zadnji možganski arteriji, SAT – srednji arterijski tlak, SF – srčna frekvenca, Et-CO₂ – koncentracija ogljikovega dioksida v izdihanem zraku na koncu izdih; * statistično značilno večje vrednosti kot pri osnovnih razmerah ($p < 0,01$).

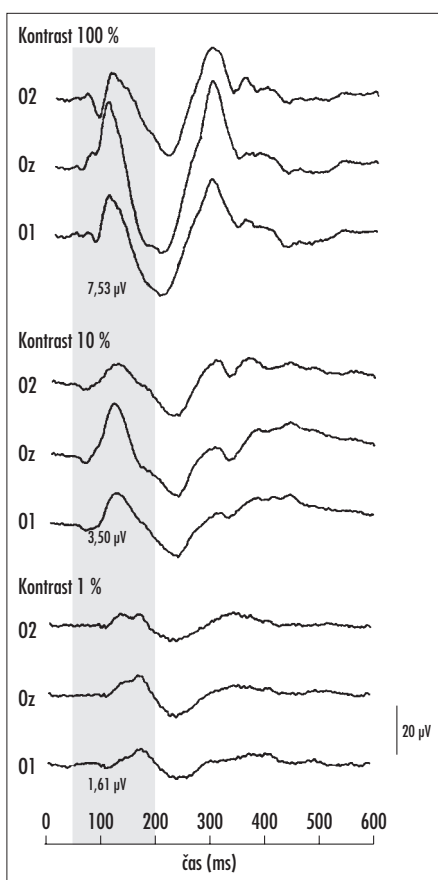
Vidni kontrast	v_{mACP} (cm/s)	v_{mACM} (cm/s)	SAT (mmHg)	SF (1/min)	Et-CO ₂ (mmHg)
Bazalno (oči zaprte)	34,7 ± 6,1	57,3 ± 10,9	90,10 ± 2,1	72,4 ± 7,2	37,3 ± 1,7
100-%	38,5 ± 6,5*	57,1 ± 11,5	89,8 ± 2,5	72,6 ± 7,0	37,2 ± 1,9
10-%	37,6 ± 6,6*	56,6 ± 11,9	89,8 ± 2,4	72,1 ± 6,7	36,8 ± 2,1
1-%	36,2 ± 6,4*	56,4 ± 11,8	89,8 ± 2,4	71,9 ± 6,6	37,2 ± 1,9

kazujemo v tabeli 1. Vrednosti posamezne spremenljivke smo analizirali s testom ANOVA za ponavljajoče se meritve, ki je pokazala, da so razlike v_{mACP} bazalnih razmer in v_{mACP}

1-, 10- in 100-% vidnega kontrasta med posameznimi meritvami statistično značilne ($p < 0,01$). S parnim t-testom smo ugotavljali razlike med zaporedno izmerjenimi v_{mACP} .



Slika 3. Odvisnost vidnih evociranih možganskih odgovorov krvnega pretoka (VEOP) od vidnega kontrasta. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti in standardni odkloni VEOP pri 1-, 10- in 100-% vidnem kontrastu.



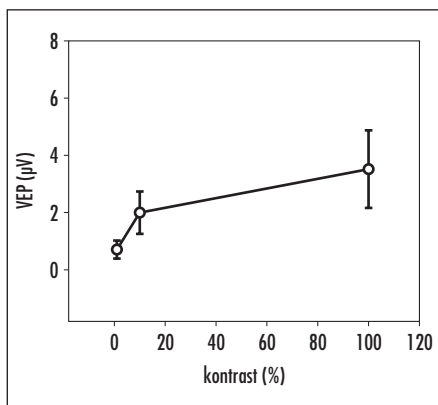
Slika 4. Zapis vidnih evociranih potencialov (VEP) v treh zatilnih odvodih (O1, O2 in Oz) dobljenih pri treh različnih vidnih kontrastih.

Upoštevali smo popravek po Bonferroniju. Ugotovili smo, da so v_{m_ACP} 100-% ($p < 0,01$), 10-% ($p < 0,01$) in 1-% ($p < 0,01$) vidnega kontrasta statistično pomembno večje od v_{m_ACP} osnovnih razmer, in sicer za 10,9 %, 8,3 % in 4,3 %. ANOVA za ponavljajoče se meritve je tudi pokazala, da razlike med posameznimi zaporednimi meritvami v_{m_ACM} ($p = 0,11$), SAT ($p = 0,22$), SF ($p = 0,17$) in Et-CO₂ ($p = 0,18$) niso statistično pomembne.

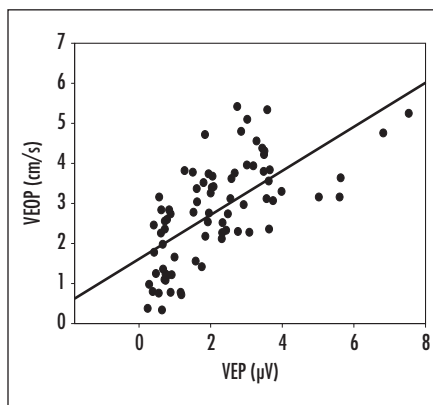
Z metodo ANOVA za ponavljajoče se meritve smo analizirali razlike med VEOP z 1-, 10- in 100-% vidnim kontrastom. Analiza je pokazala, da se posamezne meritve za VEOP statistično medsebojno pomembno razlikujejo ($p < 0,01$). Parni t-test je pokazal, da so VEOP 100-% vidnega kontrasta za 36 % večji kot ob 10-% vidnem kontrastu ($p < 0,01$). VEOP 10-% vidnega kontrasta pa so za 81 % večji kot ob 1-% vidnem kontrastu ($p < 0,01$). Srednje vrednosti s standardnimi odkloni prikazujemo na sliki 3.

Na sliki 4 predstavljamo zapis VEP, ki smo ga dobili pri istem preiskovancu kot multimodalni zapis. Prvi sklop evociranih potencialov (zgoraj) ponazarjajo VEP 100-% vidnega kontrasta, drugi sklop (v sredini) pa VEP 10-% vidnega kontrasta in tretji sklop (spodaj) so VEP 1-% vidnega kontrasta. V vsakem sklopu so trije VEP, ki smo jih izmerili v zatilnih (okcipitalnih) odvodih: O2, Oz in O1. Številke pod vsakim sklopom so vrednosti povprečne absolutne amplitude VEP v odvodu O1 in intervalu med 50 in 200 ms. Zapisi VEP kažejo, da se oblika potencialov med draženjem z različnimi vidnimi kontrasti ne spremeni, spremenijo pa se njihove amplitude. Največje amplitude VEP so po draženju s 100-% vidnim kontrastom, najmanjše pa po draženju z 1-% vidnim kontrastom. Amplitude VEP po 10-% vidnem kontrastu so manjše kot pri 100-%, a večje kot pri 1-% vidnem kontrastu. Tudi analiza absolutnih amplitud kaže, da je povprečna absolutna amplituda največja pri 100-% vidnem kontrastu in najmanjša pri 1-%. V območju med 0 in 50 ms se nahaja rezidualni šum po povprečenju VEP.

Z metodo ANOVA za ponavljajoče se meritve smo analizirali razlike med VEP 1-, 10- in 100-% vidnega kontrasta. Analiza z metodo ANOVA za ponavljajoče se meritve je pokazala, da se meritve VEP statistično



Slika 5. Odvisnost vidnih evociranih potencialov (VEP) od vidnega kontrasta. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti in standardne deviacije VEP pri 1-, 10- in 100-% vidnem kontrastu.



Slika 6. Diagram razprsanja med vidnimi evociranimi potenciali (VEP) in vidnimi evociranimi možganskimi odgovori krvnega pretoka (VEOP). Spremenljivki sta med seboj statistično pomembno ($p < 0,01$) in zmerno povezani ($r = 0,66$).

pomembno razlikujejo ($p < 0,01$). Parni t-test z upoštevanjem popravka po Bonferroniju je pokazal, da so VEP 100-% vidnega kontrasta v primerjavi z VEP 10-% vidnega kontrasta statistično značilno višji za 76 % ($p < 0,01$). VEP 10-% vidnega kontrasta so bili statistično značilno višji za 184 % od VEP 1-% vidnega kontrasta ($p < 0,01$). Srednje vrednosti s standardnimi odkloni prikazujemo na sliki 5.

Z linearno regresijo smo analizirali povezanost med VEOP in VEP (slika 6). Ugotovili smo, da sta spremenljivki med seboj statistično pomembno povezani ($p < 0,01$). Moč povezave pa je bila zmerna ($r = 0,66$).

RAZPRAVA

V pričujočem raziskovalnem delu smo želeli izdelati metodo za neinvazivno proučevanje živčnožilne sklopitve pri ljudeh. V ta namen smo skušali sočasno meriti rMKP in živčno dejavnost. V začetnih analizah smo ugotovili, da vidni kontrast vpliva na VEOP. Več raziskovalnih skupin je izmerilo VEOP (5, 10). Potrdili so domnevo, da lahko s TCD izmerimo spremembo rMKP v povirju ACP po vzburjanju vidne skorje z vidnim dražljajem. V raziskavi smo rMKP v vidni skorji vzburjali s kompleksnim vidnim dražljajem – šahovnico. Značilnosti tega vidnega dražljaja je opredeljeval protokol, ki ga običajno uporabljajo za vzburjanje VEP (9). V teh razmerah smo pri vseh preiskovancih izmerili VEOP.

Njihove značilnosti so bile enake tistim, kot jih navaja literatura (10) VEOP, ki smo jih izmerili pri 1-, 10- in 100-% vidnem kontrastu, ne kažejo habituacije, kar je v skladu z rezultati predhodne študije (10). Naši rezultati, ki kažejo odvisnost VEOP od vidnega kontrasta, so v skladu z izsledkom raziskav, ki kažejo, da vidni kontrast vpliva na signal fMR (11). Povezava med signalom fMR in vidnim kontrastom kaže podobne značilnosti kot med frekvenco proženja nevronov in vidnim kontrastom, tj. velike spremembe signala fMR pri majhnih vidnih kontrastih oz. majhne pri velikih vidnih kontrastih. Kaže, da fMR odseva spremembe v živčni dejavnosti nevronov. Kot smo že omenili, ni jasne povezave med signalom fMR in rMKP. Znano pa je, da so VEOP posledica spremembe rMKP med dejavnostjo nevronov v vidni skorji.

Intenzivnost živčne dejavnosti vidne skorje smo merili z amplitudo VEP. Podobno kot frekvenca proženja nevronov tudi amplituda VEP kaže odvisnost od vidnega kontrasta. Pri majhnih vidnih kontrastih je sprememba amplitud VEP glede na spremembo vidnega kontrasta velika. Pri velikih kontrastih je sprememba amplitud VEP glede na spremembo vidnega kontrasta majhna (12). Doslej še nihče ni testiral povezanosti med frekvenco proženja nevronov in amplitudo VEP. Glede na značilnosti povezave med amplitudo VEP in vidnim kontrastom bi lahko sklepali, da so

spremembe VEP posledica spremembe živčne dejavnosti nevronov.

V naši raziskavi je bila ključna analiza povezanosti med VEP in VEOP. Linearna regresija je pokazala, da sta VEP in VEOP pozitivno povezana. Večje VEP spremljajo večji VEOP. Torej sta tudi rMKP in živčna dejavnost v vidni skorji medsebojno povezana. Ta povezava podpira koncept živčnožilne sklopitve, ki so jo dokazali pri živalskih modelih (13). Živčnožilno sklopitev na podganah so analizirali tako, da so aktivirali somatosenzorično možgansko skorjo z draženjem veje petega možganskega živca in sočasno opazovali spremembe potencialov polja ter rMKP merili z doplerskim laserjem (14). Za dražljaj so uporabili električni tok spremenljive jakosti. Poskus so ponavljali pri različnih jakostih električnega toka. Na ta način so spreminjali živčno dejavnost v somatosenzoričnem predelu možganske skorje. Analizirali so povezavo med potenciali polja in rMKP, ki nudi podatke o živčnožilni sklopitvi. Poskus je pokazal, da obstaja živčnožilna sklopitev v določenem intervalu živčne dejavnosti možganske skorje, v katerem naj bi bila živčna dejavnost premo sorazmerna z rMKP. Študija je torej dokazala, da je mogoče v živo analizirati živčnožilno sklopitev. Tudi druge študije na živalih so potrdile opisane ugotovitve (15).

Povezanost med živčno dejavnostjo in rMKP pa je ugotovila novejša študija, ki je proučevala povezanost med SEP in BOLD fMR pri ljudeh (16). V tej raziskavi so analizirali povezanost med največjo dejavnostjo v enem vokslu in amplitudami N20 in P25 SEP. Ugotovili so linearno povezanost med spremenljivkama. Skleпали so, da signal BOLD fMR odraža električno dejavnost možganske skorje. Ugotovili so, da je 95 % rMKP lahko posledica posinaptične dejavnosti. Največji del energije v nevronih se porabi za vzdrževanje

ionskega gradienta v zvezi s sinaptično dejavnostjo, dosti manj pa v zvezi s prevajanjem akcijskega potenciala (15). V tej raziskavi pa SEP in fMR niso merili sočasno. Povezanost med živčno dejavnostjo in rMKP so ugotavljali tudi tako, da so sočasno snemali VEP in signal bližnje infrardeče spektroskopije (NIRS), ki je služil kot parameter žilnega odgovora. Za spreminjanje živčne dejavnosti so uporabili pojav habituacije. Ugotovili so linearno povezanost med signalom NIRS in amplitudo VEP (P100N135) (17). Ugotovitev, da sta rMKP in živčna dejavnost povezana, ni presenetljiva. Pomembna novost pa je, da je živčnožilno povezavo mogoče analizirati s sočasno meritvijo VEP in doplerskega signala. Sočasnost teh meritev lahko omogoči večjo natančnost pri analizi živčnožilne sklopitve kot s fMR. Poleg tega sta BOLD-tehnika fMR in NIRS odvisni od koncentracije oksigeniranega hemoglobina v možganovini. Na spremembo koncentracije oksigeniranega kisika najbolj vplivajo hitrost krvnega pretoka, volumen krvi in poraba kisika (18). Torej na signal, ki jih merita omenjeni metodi, ne vplivajo samo hemodinamski parametri, ampak tudi presnova kisika. S TCD merimo le hitrost krvnega pretoka. Zato je signal TCD izključno hemodinamski parameter. Kaže, da je TCD primernejša metoda za analizo živčnožilne sklopitve kot fMR in NIRS.

ZAKLJUČEK

Na temelju dobljenih rezultatov in analiz lahko zaključimo, da lahko s sočasnim snemanjem signala TCD in VEP analiziramo živčnožilno sklopitev pri zdravih ljudeh. Metodologijo bi lahko uporabili za analizo živčnožilne sklopitve pri boleznih živčevja in nevroloških funkcijskih stanjih, kot sta migrena in epilepsija.

LITERATURA

1. Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 2003; 6: 43–50.
2. Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. *Science* 1999; 283: 496–7.
3. Sandor P. Nervous control of the cerebrovascular system: doubts and facts. *Neurochem Int* 1999; 35: 237–59.
4. Cholet N, Seylaz J, Lacombe P, Bonvento G. Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 1191–201.
5. Aaslid R. Visually evoked dynamic blood flow response of the human cerebral circulation. *Stroke* 1987; 18: 771–5.

6. Knecht S, Deppe M, Ringelstein EB, Wirtz M, Lohmann H, Draeger B, et al. Reproducibility of functional transcranial Doppler sonography in determining hemispheric language lateralization. *Stroke* 1998; 29: 1155-9.
7. Sturzenegger M, Newell DW, Aaslid R. Visually evoked blood flow response assessed by simultaneous two-channel transcranial Doppler using flow velocity averaging. *Stroke* 1996; 27: 2256-61.
8. Martinez-Trujillo J, Treue S. Attentional modulation strength in cortical area MT depends on stimulus contrast. *Neuron* 2002; 35: 365-70.
9. Harding GF, Odom JV, Spileers W, Spekreijse H. Standard for visual evoked potentials 1995. The International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Vision Res* 1996; 36: 3567-72.
10. Panczel G, Daffertshofer M, Ries S, Spiegel D, Hennerici M. Age and stimulus dependency of visually evoked cerebral blood flow responses. *Stroke* 1999; 30: 619-23.
11. Heeger DJ, Ress D. What does fMRI tell us about neuronal activity? *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 142-51.
12. Di Russo F, Spinelli D. Electrophysiological evidence for an early attentional mechanism in visual processing in humans. *Vision Res* 1999; 39: 2975-85.
13. Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 1994; 117: 199-210.
14. Norup Nielsen A, Lauritzen M. Coupling and uncoupling of activity-dependent increases of neuronal activity and blood flow in rat somatosensory cortex. *J Physiol* 2001; 533: 773-85.
15. Mathiesen C, Caesar K, Lauritzen M. Temporal coupling between neuronal activity and blood flow in rat cerebellar cortex as indicated by field potential analysis. *J Physiol* 2000; 523: 235-46.
16. Arthurs OJ, Boniface SJ. What aspect of the fMRI BOLD signal best reflects the underlying electrophysiology in human somatosensory cortex? *Clin Neurophysiol* 2003; 114: 1203-9.
17. Obrig H, Israel H, Kohl-Bareis M, Uludag K, Wenzel R, Muller B, et al. Habituation of the visually evoked potential and its vascular response: implications for neurovascular coupling in the healthy adult. *Neuroimage* 2002; 17: 1-18.
18. Toronov V, Walker S, Gupta R, Choi JH, Gratton E, Hueber D, et al. The roles of changes in deoxyhemoglobin concentration and regional cerebral blood volume in the fMRI BOLD signal. *Neuroimage* 2003; 19: 1521-31.

Prispelo 4. 10. 2004