

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Srđan Ž. Kesić

**PRIMENA HIGUČIJEVE FRAKTALNE
DIMENZIJE I METODE NEZAVISNIH
KOMPONENATA U ANALIZI SPONTANE
BIOELEKTRIČNE AKTIVNOSTI Br
NEURONA VINOGRADSKOG PUŽA POD
DELOVANJEM KONSTANTNOG
MAGNETNOG POLJA I UABAINA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Srđan Ž. Kesić

**APPLICATION OF HIGUCHI FRACTAL
DIMENSION AND INDEPENDENT
COMPONENT METHOD IN ANALYSIS OF
GARDEN SNAIL Br NEURON BURSTING
ACTIVITY MODULATED BY STATIC
MAGNETIC FIELD AND OUABAIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentori:

Dr Slađana Spasić, viši naučni saradnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Dr Pavle Anđus, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Slađana Spasić, viši naučni saradnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Dr Pavle Anđus, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Branka Janać, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu

Dr Marko Đorđević, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Eksperimentalna istraživanja za potrebe ovog rada izvedena su u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se:

Mentorima,

dr Slađani Spasić, bez čijeg znanja matematike i velikog razumevanja njene primene u biologiji, svesrdne stručne i prijateljske pomoći, dobre volje i ohrabrenja ova disertacija ne bi bila moguća,

dr Pavlu Anđusu na pomoći i savetima,

dr Ljiljani Nikolić, bez čijih eksperimenata i pomoći oko razumevanja neurofiziologije Br neurona vinogradskog puža u fiziološkim i patološkim stanjima, ova disertacija ne bi bila moguća,

dr Branki Janać na pomoći i razumevanju kao rukovodioca projekta na kojem je disertacija urađena,

dr Aleksandru Saviću na dobronamernoju pomoći i savetima,

dr Zlatku Proliću, na podršci u ključnim trenucima nakon prelaska na projekat na kojem je disertacija urađena.

Zahvaljujem se svojim roditeljima ocu Žarku i majci Milki koji su me podržavali tokom čitavog mog obrazovanja, bratu Igoru, kao i svojoj devojci Jeleni na podršci i razumevanju.

Primena Higučijeve fraktalne dimenzije i metode nezavisnih komponenata u analizi spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona vinogradskog puža pod delovanjem konstantnog magnetnog polja i uabaina

Rezime

Nelinearne i napredne statističke metode, pored linearnih metoda, zauzimaju sve značajnije mesto u analizi fizioloških signala, posebno u svetlu nelinearnog i haotičnog ponašanja bioloških sistema. Stoga je zajednička upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije i analize nezavisnih komponenata (ICA), značajan i nov pristup u analizi signala a posebno u analizi aktivnosti jednog neurona. Najprepoznatljiviji tip spontane bioelektrične aktivnosti neurona beskičmenjaka i kičmenjaka jeste pojava akcionih potencijala u paketićima.

U radu je po prvi put primenjen, jedinstven i inovativan pristup u razdvajanju komponenata spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona vinogradskog puža i to na akcione potencijale (AP), intervale između akcionih potencijala (ISI) i tihe intervale bez aktivnosti (IBI) uz pomoć Higučijeve fraktalne dimenzije i aproksimacije Gausovim funkcijama. Taj metodološki pristup je omogućio praćenje uticaja konstantnog magnetnog polja i uabaina inhibitora Na^+/K^+ pumpe na promene u kompleksnosti spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona. Sa druge strane, po prvi put je testirana upotreba ICA metode u različitim eksperimentalnim uslovima po AP, ISI i IBI komponentama spontane bioelektrične aktivnosti.

Na taj način, u ovom radu demonstrirana je snaga zajedničke upotrebe navedenih metoda uz predlog da se proširi njihova upotreba za potrebe analize spontano aktivnih neurona različitih vrsta u fiziološkim i patološkim stanjima.

Ključne reči: Higučijeva fraktalna dimenzija, ICA, Br neuron, Konstantno magnetno polje, Uabain

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurofiziologija sa biofizikom

UDK broj: [57.087.1:577.352.5]:[591.481.8:594.38]:577.34(043.3)

Application of Higuchi fractal dimension and independent component method in analysis of garden snail Br neuron bursting activity modulated by static magnetic field and ouabain

Abstract

Nonlinear and advanced statistical methods, in addition to linear methods, occupy a prominent place in the analysis of physiological signals, especially in light of the non-linear and chaotic behavior of biological systems. Therefore, the use of Higuchi fractal dimension and independent component analysis (ICA), represents a new approach to signal analysis, especially regarding the activities of one neuron. The most recognizable type of spontaneous bioelectric activity in neurons of invertebrates as well as vertebrates is the appearance of bursting activity.

This study presents a unique and innovative approach to the separation of the components of spontaneous bioelectric activity of the garden snail Br neuron - action potential (AP), interspike interval (ISI) and interburst interval (IBI), by using Higuchi's fractal dimension and Gaussian fitting functions. This methodological approach allows monitoring of the effect of static magnetic field and the inhibitor of the Na^+/K^+ pump, ouabain, on the changes in the complexity of the spontaneous bioelectric activity of the Br neuron. On the other hand, for the first time ICA method was tested in different experimental conditions on AP, ISI and IBI components of spontaneous bioelectric activity.

This study demonstrates the power of the common use of the above mentioned methods and proposes to extend their use for the purpose of analyzing spontaneously active neurons of different species in physiological and pathological conditions.

Key words: Higuchi fractal dimension, ICA, Br neuron, Static magnetic field, Ouabain

Field of science: Biology

Narrow field of science: Neurophysiology and Biophysics

UDC number: [57.087.1:577.352.5]:[591.481.8:594.38]:577.34(043.3)

SADRŽAJ

REZIME

ABSTRACT

1. UVOD	1
1.1 Nelinearni i multivarijacioni statistički pristupi u analizi elektrofizioloških signala	1
1.2. Higučijeva fraktalna dimenzija	2
1.3. Primena Higučijeve fraktalne dimenzije u elektrofiziologiji	4
1.4. Analiza nezavisnih komponenata	6
1.5. Primena analize nezavisnih komponenata u elektrofiziologiji	7
1.6. Zajednička upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije i analize nezavisnih komponenata u elektrofiziologiji	8
2. Bioelektrična aktivnost neurona	9
2.1. Spontana bioelektrična aktivnost neurona	9
2.2. Spontana bioelektrična aktivnost Br neurona vinogradskog puža	11
2.3. Uloga Na^+/K^+ pumpe u nastanku spontane bioelektrične aktivnosti neurona	12
2.4. Uloga uabaina u modulaciji spontane bioelektrične aktivnosti neurona	13
3. Magnetno polje i živi organizmi	14
3.1. Svojstva magnetnog polja	14
3.2. Uticaj konstantnog magnetnog polja na žive organizme	16

3.3. Delovanje konstantnog magnetnog polja na nervni sistem različitih organizama	17
---	----

4. CILJ ISTRAŽIVANJA

5. MATERIJAL I METODE

5.1 Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenata	21
--	----

5.1.1. Izolacija i identifikacija Br neurona vinogradskog puža	21
--	----

5.1.2. Izlaganje Br neurona puža konstantnom magnetnom polju	22
--	----

5.1.3. Tretman Br neurona puža sa uabainom	23
--	----

5.2. Elektrofiziološki eksperimenti	24
-------------------------------------	----

5.3. Fraktalna analiza elektrofizioloških signala	26
---	----

5.3.1. Higučijeva fraktalna dimenzija	26
---------------------------------------	----

5.3.2. Empirijska raspodela Higučijeve fraktalne dimenzije	29
--	----

5.3.3. Aproksimacija srednjih vrednosti empirijske raspodele <i>FD</i> Gausovom funkcijom	30
---	----

5.4. Statističke metode u analizi elektrofizioloških signala	32
--	----

5.4.1. Analiza nezavisnih komponenata – ICA	32
---	----

5.4.2. Metoda glavnih komponenata – PCA	34
---	----

5.4.3. Neparametarske statističke metode	35
--	----

6. REZULTATI

6.1. Higučijeva fraktalna dimenzija spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona puža	37
---	----

6.1.1. Higučijeva fraktalna dimenzija spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona pod uticajem magnetnog polja indukcije 2,7 i 10 mT	37
---	----

6.1.2. Higučijeva fraktalna dimenzija bioelektrične aktivnosti Br neurona	38
---	----

pod delovanjem uabaina i magnetnog polja indukcije 10 mT	
6.2. Razlaganje složene bioelektrične aktivnosti Br neurona na komponente uz pomoć Higučijeve fraktalne dimenzije	40
6.3. Uticaj magnetnog polja na promenu kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona	42
6.4. Uloga uabaina u promenama kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona pre i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT	45
6.5. Analiza nezavisnih komponenata spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona puža	48
6.5.1. Uticaj magnetnog polja na spontanu bioelektričnu aktivnost Br neurona detektovan metodom nezavisnih komponenata	48
6.5.2. Uticaj uabaina i magnetnog polja na bioelektričnu aktivnost Br neurona detektovan metodom nezavisnih komponenata	50
7. DISKUSIJA	52
7.1. Higučijeva fraktalna dimenzija kao nov i efikasan metod za razdvajanje komponenata spontane bioelektrične aktivnosti neurona	52
7.2. Spontana bioelektrična aktivnost neurona u fiziološkim i patološkim stanjima	54
7.3. Uticaj magnetnog polja na promene fraktalne kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona	55
7.4. Uloga uabaina u modulaciji fraktalne kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona	57
7.5. Zajednička upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije i analize nezavisnih komponenata u otkrivanju efekta magnetnog polja indukcije 2,7 mT, 10 mT i uabaina	59
8. ZNAČAJ RADA	62

9. ZAKLJUČCI	65
10. LITERATURA	68
11. BIOGRAFIJA	87
12. IZJAVE	94

“Da li će se ikada dogoditi da matematičari znaju dovoljno o fiziologiji mozga a neurofiziolozi dovoljno o matematičkim otkrićima kako bi bila moguća efikasna zajednička saradnja?”

Žak Adamar (Jacques Hadamard), francuski matematičar

1. UVOD

1.1. Nelinearni i multivarijacioni statistički pristupi u analizi elektrofizioloških signala

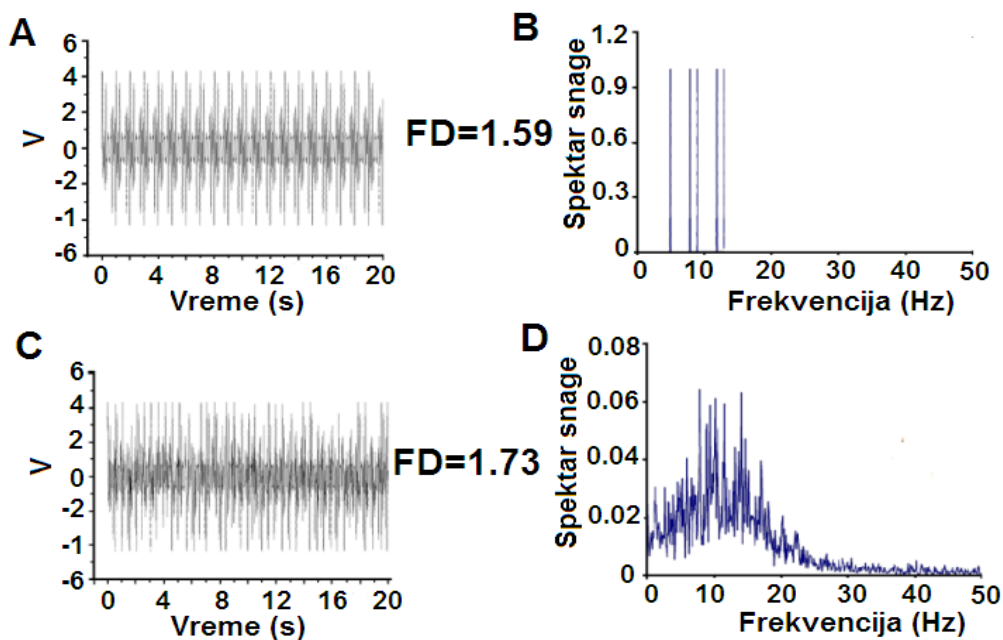
Veoma je malo studija koje se odnose na nelinearnu analizu spontano aktivnih neurona, posebno imajući u vidu činjenicu da su biološki signali nelinearne prirode. Poslednjih nekoliko decenija, koncepti i tehnike nelinearne dinamike se sve više koriste u različitim oblastima biomedicinskih istraživanja, od molekularnog do ekosistemskog nivoa (*Goldberger i sar. 2001, 2002, Glass 2001, Werner 2005, Gardiner i sar. 2010*). Izgleda da je haotično ponašanje neizbežno u prirodnim sistemima, bilo da se sastoje od jednostavnih ili mnoštva kompleksnih podsistema (*Rabinovich 2006*). Haotično ponašanje se može zapaziti na svakom nivou biološke organizacije živih organizama. Tako se i kompleksnost mozga može sagledati samo ako se prethodno u bilo kakvo objašnjenje uključi nelinearna, nestacionarna i adaptivna priroda neuronskih elemenata koji grade nervni sistem životinja (*Koch i Laurent 1999*). Biološki procesi na različitim nivoima organizacije odlikuju se stalnim promenama u vremenu. Ta vremenska promenljivost (nestacionarnost) rezultat je interakcije unutrašnjih i spoljašnjih faktora i regulatornih procesa koji održavaju homeostazu organizma (*Glass 2001, Eke i sar. 2002*). Eksperimentalni podaci dobijeni intraćelijskim registrovanjem električne aktivnosti različitih pojedinačnih neurona ukazuju na njihovo haotično ponašanje tokom vremena (*Abarbanel i sar. 1996*). Spontana neuronska aktivnost unutar centralne ganglije vinogradskog puža (*Helix pomatia*) izazvana mirisnim stimulusima se odlikuje nestacionarnošću (*Schütt i sar. 2002*), kao i neuronski signali rečnih rakova u bilo kojoj fazi ciklusa budnost/spavanje (*Mendoza-Angeles i sar. 2007*). Nelinearna analiza membranskog potencijala izolovane ćelije stomatogastričnog centralnog generatora ponašanja raka ukazuje na haotično ponašanje (*Abarbanel i sar. 1996*). Aktivnost Br neurona okoloždrelnog ganglijskog kompleksa vinogradskog puža (*Helix pomatia*) je visoko nestacionarna (*Spasić i sar. 2011c*). Aktivnost jednog hipokampalnog neurona praćena intraćelijskom registracijom tokom sinaptičke stimulacije najbolje se opisuje

nelinearnim modelom višeg stepena (*Lu i sar. 2011*). Dendritsko drvo neurona koje prima najviše informacija sadrži veliki broj jonskih kanala čija se aktivacija može opisati metodama nelineare dinamike (*Remme i sar. 2009*). Nelinearna dinamika i fraktali služe za analizu jonskih struja što može da pomogne u određivanju fizičkih svojstava jonskih kanala (*Liebovitch i Todorov 1996, Liebovitch i sar. 2001*). Neke studije su potvrdile da se najprepoznatljiviji oblik bioelektrične aktivnosti neurona, paketići akcionih potencijala, karakterišu haotičnim ponašanjem (*Mpitsos i sar. 1988, Canavier i sar. 1990*). U tim radovima, nelinearna analiza signala i nelinearne teorijske simulacije pokazale su se kao najbolje rešenje za opisivanje spontane bioelektrične aktivnosti neurona. Nelinearni pristup u analizi signala daje mogućnost da se precizno kvantifikuju vremenski zavisne promene u haotičnom ponašanju neurona. S obzirom da mnogi faktori utiču na tok bioloških fenomena pored analize promena u vremenskom domenu neophodno je utvrditi i koji su to izvori koji utiču na složenost ispitivanih signala. U tom svetlu jako je bitna zajednička primena nelinearnih i složenih statističkih metoda u analizi elektrofizioloških signala, kao što je slučaj sa Higučijevom fraktalnom dimenzijom (*eng. fractal dimension, FD*) i analizom nezavisnih komponenata (*eng. independent component analysis, ICA*).

1.2. Higučijeva fraktalna dimenzija

Fraktalna dimenzija predstavlja meru geometrijske kompleksnosti nekog objekta. Može se reći da u analizi signala fraktalna dimenzija predstavlja meru kompleksnosti nekog veštačkog ili fiziološkog signala. Svaki jednostavni proces koji se ponavlja beskonačno postaje veoma kompleksan proces, a ta činjenica je osnova za opisivanje fraktala u prirodi (*Naik i sar. 2011*). Higučijeva fraktalna dimenzija predstavlja nelinearnu meru kompleksnosti signala u vremenskom domenu (*Higuchi 1988*). Sama metoda nastala je iz teorije haosa. Higučijev metod se pokazao kao dobar numerički pristup za brzu kompjutersku procenu nelinearnosti signala (*Accardo i sar. 1997, Spasić i sar. 2008, Raghavendra i Narayana-Dutt 2009, Spasić 2010*). U analizama signala se koristi samostalno ili u kombinaciji sa drugim matematičkim i statističkim metodama kao što je

to slučaj sa analizom nezavisnih komponenata (*Spasić i sar. 2011c, Chouvarda i sar. 2011*) ili npr. "pattern" entropijom (*Klonowski 2000*). Higučijeva fraktalna dimenzija omogućava brzo kompjutersko praćenje i karakterizaciju različitih karakteristika signala što je preduslov za detektovanje skrivenih informacija koje se nalaze u fiziološkim vremenskim serijama (*Raghavendra i Narayana - Dutt 2010*). Računanje fraktalne dimenzije je brzo i jednostavno uz veliku osetljivost metode za detekciju malih promena u signalima biološkog porekla. Linearne metode analize signala kao što su brza Furijeova transformacija (*eng. fast fourier transformation, FFT*) i analiza talasićima (*eng. wavelet transformation, WT*) precizne su samo ako su signali stacionarni, dok je za upotrebu Higučijeve fraktalne dimenzije nebitno da li je analizirani signal stacionaran, nestacionaran, deterministički ili stohastički (Slika 1) (*Spasić i sar. 2008, 2011c, Klonowski 2009*). Navedene osobine pružaju veliku prednost Higučijevom metodu u analizi signala veštačkog i biološkog porekla. Higučijev metod koji se koristi za analizu stacionarnih signala, veoma je lako modifikovati za analizu visoko nestacionarnih signala (*Spasić i sar. 2011c*). Najviše korišćene metode za računanje fraktalnih dimenzija signala temelje se na radovima Higučija, Kaca i Petrosijana (*Higuchi 1988, Katz 1988, Petrosian 1995*). Najpreciznija procena *FD* se postiže primenom Higučijeve metode (*Esteller i sar. 2001, Raghavendra i Narayana-Dutt 2009*).



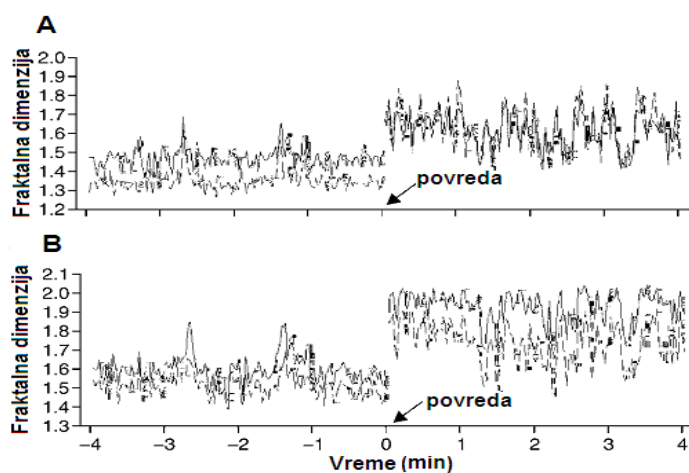
Slika 1. (A) Stacionarni i (C) nestacionarni signal prikazani u vremenskom domenu i (B i D) njihovi spektri snage dobijeni Brzom Furijeovom transformacijom. FD su srednje vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije za oba tipa signala (Klonowski 2009).

1.3. Primena Higučijeve fraktalne dimenzije u elektrofiziologiji

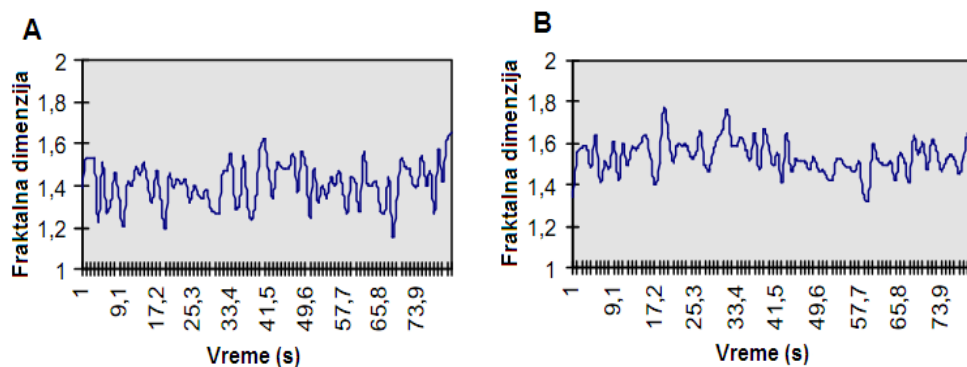
Higučijeva fraktalna dimenzija se pokazala kao veoma korisna metoda u istraživanjima efekta konstantnog magnetnog polja na aktivnost jednog neurona (Spasić i sar. 2011c, 2011d). Složeni elektroencefalografski (EEG) signali koji su rezultat aktivnosti velikih grupa neurona ispitivani su Higučijevom fraktalnom dimenzijom u uslovima anestezije (Anier 2004, Klonowski i sar. 2006, Ferentes i sar. 2007, Spasić i sar. 2011a i 2011b), analgezije (Kumar i sar. 2012), animalnog modela neurodegenerativnih bolesti izazvanih Al intoksikacijom (Keković i sar. 2010), traumatske povrede mozga (Slika 2) (Spasić i sar. 2005, 2008; Spasić 2010), itd. Elektroencefalografska aktivnost sa površine skalpa čoveka takođe je analizirana fraktalnom dimenzijom kod pacijenata obolelih od šizofrenije (Raghavendra i sar. 2009, Sabeti i sar. 2009), Alchajmerove bolesti (Staudinger i Polikar 2011), uticaja magnetnog polja na ljudski mozak kontrolnih

subjekata (Klonowski 2000), kao i pre i tokom auditorne stimulacije zdravih ispitanika (Georgiev i sar. 2009).

Higučijeva fraktalna dimenzija se sve više koristi u analizi podataka dobijenih modernim tehnikama neurooslikavanja kao što je to slučaj sa magnetoencefalografijom kod pacijenata obolelih od Alchajmerove demencije (Gomez i sar. 2009, Gomez i Hornero 2010). Metoda je podesna za detektovanje epileptičnih napada u elektroencefalogramu obolelih ljudi (Paivinenen i sar. 2005, Klonowski i sar. 2010) i detekciju početka epileptičnih događaja (Khoa i sar. 2012), analizu EEG signala pacijenata obolelih od sezonskog afektivnog poremećaja (Slika 3) (Ciszewski i sar. 1999, Klonowski i sar. 1999), ali i za praćenje različitih faza spavanja kod zdravih ljudi (Peiris i sar. 2005, Klonowski i sar. 2010, Chouvarda i sar. 2011). Higučijeva fraktalna dimenzija EEG signala pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti ima manje vrednosti od pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti što sugerise upotrebu metode i u diskriminaciji različitih neurodegenerativnih poremećaja mozga ili stepena progresije oboljenja (Stam i sar. 1995). Dakle, iz svega navedenog, možemo da zaključimo da se poslednjih dvadesetak godina upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije u biomedicinskim naukama povećava, jer sve više istraživača iz osnovnih i primenjenih nauka shvata važnost i mogućnosti upotrebe navedene metode u svakodnevnoj naučnoj praksi.



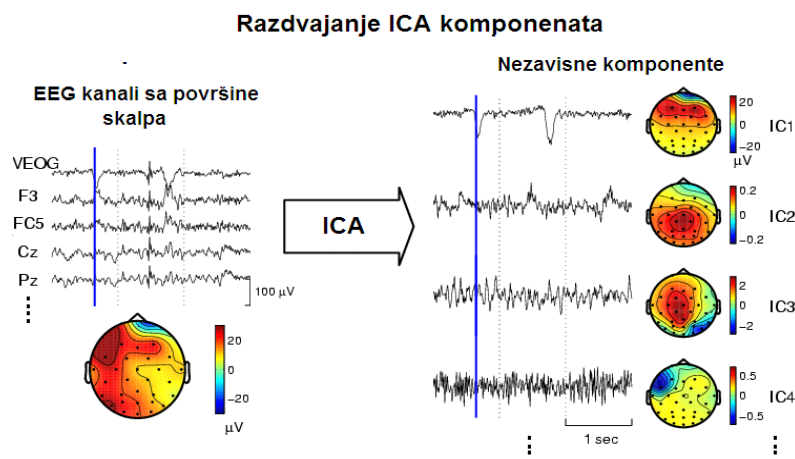
Slika 2. Fraktalna dimenzija: (A) EEG signala kore velikog mozga pre i nakon traumatske povrede velikog mozga pacova i (B) EEG signala kore malog mozga pre i nakon traumatske povrede velikog mozga (Spasić i sar. 2005).



Slika 3. Fraktalna dimenzija EEG signala za vremenski interval od 80 s kod pacijenta sa sezonskim afektivnim poremećajem pre **(A)** i posle **(B)** fototerapije (*Klonowski i sar.1999*).

1.4. Analiza nezavisnih komponenata

Analiza nezavisnih komponenata (ICA) je statistička multivarijaciona metoda koja može da opiše višedimenzionalne podatke nastale kombinovanjem nepoznatih skrivenih promenljivih (*Comon 1994, Bingham i Hyvarinen 2000, Hyvarinen i Oja 2000, Stone 2002*). Osnova za procenu nezavisnosti komponenata kod ICA metode leži u “negausovskim“ karakteristikama komponenata. U osnovi ICA metode se nalazi pretpostavka statističke nezavisnosti linearne kombinacije signala. Nastala je kao generalizacija PCA (*eng. Principal Component Analysis, PCA*). Postoji veći broj ICA algoritama kojima je zajednički proces ekstrahovanja linearno pomešanih signala (*Onton i sar. 2006*). Najefikasniji ICA algoritam je *FastICA* kojeg je razvio Hyvarinen (*Hyvarinen 2001*). Pored primene Higučijeve fraktalne dimenzije, kojom se mogu pratiti promene kompleksnosti signala, da bismo utvrdili izvore kompleksnosti signala, neophodno je upotrebiti i multivarijacionu statističku metodu analize nezavisnih komponenata. Primer koraka u analizi nezavisnih komponenata EEG signala čoveka prikazan je na Slici 4.

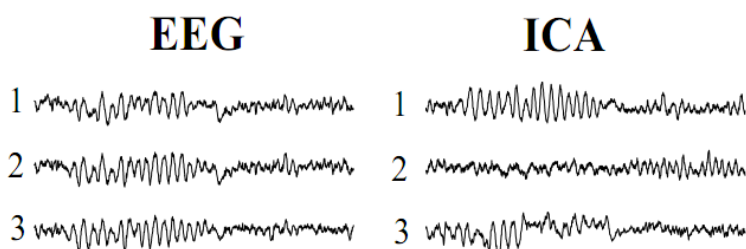


Slika 4. Prikaz koraka u primeni ICA metode tokom uklanjanja artefakata iz EEG signala čoveka (<http://scn.ucsd.edu/~jung/artifact.html>).

1.5. Primena analize nezavisnih komponenata u elektrofiziologiji

ICA metoda omogućava ekstrakciju nezavisnih izvora aktivnosti iz mnoštva snimljenih signala, identifikaciju i izolovanje aktivnosti pojedinačnih neurona od ostatka neuronske populacije kada se koristi višekanalno snimanje (*Lewicki 1998, Brown i sar. 2001, Takahashi i sar. 2002, James i Gibson 2003, James i Hesse 2005*), istraživanje efekta konstantnog magnetnog polja na električnu aktivnost pojedinačnih neurona (*Spasić i sar. 2011c*), kao i analizu elektroencefalografskih podataka (*Makeig i sar. 1996, Eichele i sar. 2009*). Primer rezultata analize EEG signala uz pomoć ICA metode je prikazan na Slici 5. Takođe uz pomoć ICA metode moguće je pratiti i promene u EEG aktivnosti mozga nastale kao posledica kognitivnih i neurodegenerativnih poremećaja (*Melissant i sar. 2005*). Kao metoda podesna je za kvantifikaciju interakcija između određenih grupa neurona (*Laubach i sar. 1999*). U poligrafskom registrovanju EEG signala čoveka ICA je veoma korisna u detekciji razlika između evociranih potencijala (*eng. evoked responses, ERP*) kod dve grupe zdravih individua (*Onton i sar. 2006*). ICA ima značajnu ulogu u tumačenju rezultata dobijenih funkcionalnim oslikavanjem mozga upotrebom magnetoencefalografije (MRE) (*Vigario i sar. 2000, Tang i sar. 2002*), fMRI signala zdravih subjekata (*Kiviniemi i sar. 2003, Eichele i sar. 2009*) i ljudi obolelih od

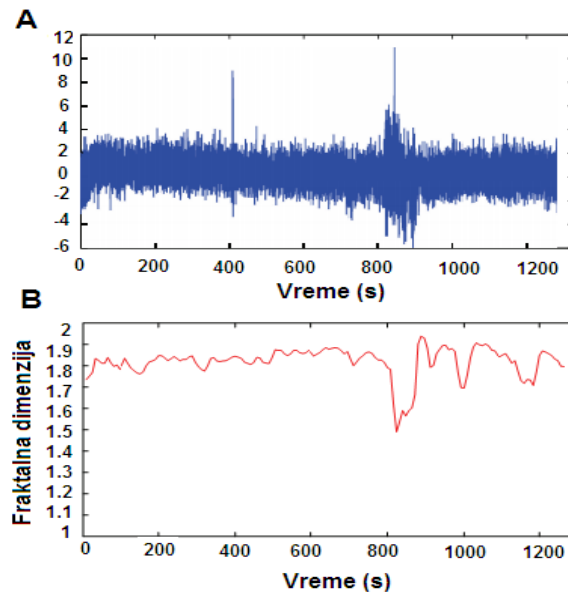
Alchajmerove demencije (*Celone i sar. 2006*), kao i u otkrivanju brzih neuronskih signala iz motornog korteksa uz pomoć NIRS metode (*eng. near infrared spectroscopy*) (*Morren i sar. 2004*). ICA metoda i metoda glavnih komponentata (PCA) se sve češće koriste u analizama funkcionalne povezanosti određenih neuronskih mreža kao i njihovih međusobnih interakcija (*Ramnani i sar. 2004*).



Slika 5. Primeri EEG signala čoveka (levo) i transformacija istih podataka uz pomoć analize nezavisnih komponentata (desno) (*Makeig i sar. 1996*).

1.6. Zajednička upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije i analize nezavisnih komponentata u elektrofiziologiji

Higučijev metod za izračunavanje fraktalne dimenzije može se koristiti za preprocesovanje podataka pre primene ICA metode i na taj način, zajedničkom upotrebom ICA metode i Higučijeve fraktalne dimenzije, ostvaruje se komplementaran pristup u analizi podataka i dobijanje novih informacija. Tako je Higučijeva fraktalna dimenzija u kombinaciji sa ICA uspešno primenjena u otkrivanju efekta konstantnog magnetnog polja na spontanu bioelektričnu aktivnost neurona puža (*Spasić i sar. 2011c*), kao i događaja koji prethode početku epilepsije (Slika 6) (*Khoa i sar. 2012*). Kombinovana upotreba fraktalne dimenzije i ICA metode omogućila je otkrivanje promena u strukturi signala površinskog elektromiograma čoveka tokom finih pokreta tela (*Naik i sar. 2011*), dok je snaga i komplementarnost navedenih metoda dokazana u studijama interfejsa računara i mozga (*Yeo i Lee 2001*). Primena ICA metode i Higučijeve fraktalne dimenzije smanjuje artefakte iz EEG signala što je nužan preduslov za bilo koju drugu analizu EEG signala u kliničkoj praksi (*Samavati i sar. 2012*).



Slika 6. (A) Glavna nezavisna komponenta koja sadrži vidljiv talas epileptičnog događaja i (B) vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije navedenog događaja prikazane u vremenu (Khoa i sar. 2011).

2. BIOELEKTRIČNA AKTIVNOST NEURONA

2.1. Spontana bioelektrična aktivnost neurona

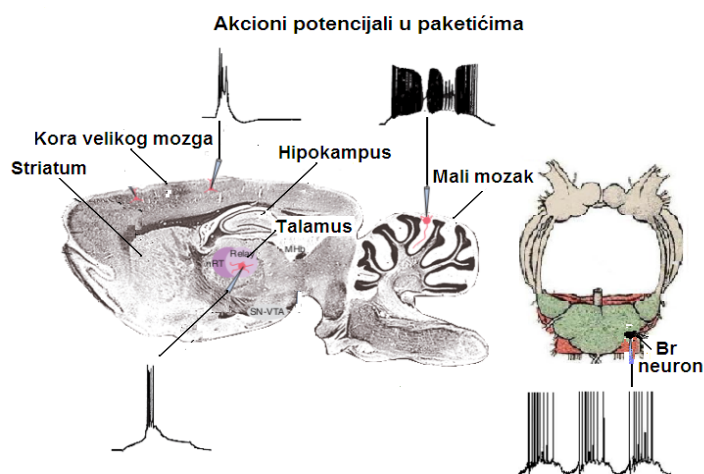
Nervne ćelije odlikuju različiti oblici bioelektrične aktivnosti. Jedan isti neuron može da karakteriše više različitih oblika aktivnosti kao što je generisanje pojedinačnih ili ponavljajućih pulseva, nastajanje akcionih potencijala u paketićima itd. Najprepoznatljiviji tip bioelektrične aktivnosti neurona jeste pojava akcionih potencijala u paketićima (*eng. bursting activity*). Ovaj vid spontane neuronske aktivnosti igra veoma značajnu ulogu u mnogim biološkim sistemima. Biofizički posmatrano, nastajanje akcionih potencijala u paketićima je rezultat negativne povratne sprege koja u vremenskoj skali deluje sporije nego što je to slučaj sa stvaranjem pojedinačnih akcionih potencijala pri čemu je negativna povratna sprega svojsvo jednog neurona ili rezultat neuronskih interakcija (Rinzel i Huguet 2013). U nervnom sistemu kičmenjaka i beskičmenjaka spontana bioelektrična aktivnost u

vidu akcionih potencijala u paketićima je povezana sa nekim od najvažnijih fizioloških funkcija kao što su respiracija (*Pena 2008*) i regulacija aktivnosti srca (*Levy i sar. 1981*). U centralnom nervnom sistemu sisara neuroni koji stvaraju akcione potencijale u paketićima mogu se pronaći u filogenetski različitim delovima: neokorteksu (*Tsodyks i sar. 1999, Le Bon-Jego i Yuste 2007, Yassin i sar. 2010*), striatumu (*Legendy i Salcman 1985*), talamusu (*Bal i McCormic 1993; Fuentealba i Steriade 2005*), malom mozgu (*Aizenman i Linden 1999, Raman i sar. 2000*), hipofizi (*Stojilković 2006*) i hipotalamusu (*Llinas i Alonso 1992*) (Slika 7).

Akcione potencijale (*eng. action potential, spike, AP*) u paketićima čini niz akcionih potencijala nastalih depolarizacijom membranskog potencijala koji su međusobno odvojeni tihim periodima bez stvaranja akcionih potencijala (*eng. interburst interval, IBI*) (*Marsat i sar. 2012*). U okviru paketića akcioni potencijali su međusobno razdvojeni ISI (*eng. interspike interval, ISI*) segmentima koje karakteriše hiperpolarišuća faza oscilacija membranskog potencijala. Za nastanak paketića mogu da budu odgovorni snažni sinaptički ulazi. Međutim u mnogim slučajevima paketići akcionih potencijala nastaju zbog specijalizovane unutrašnje provodljivosti neurona (*Llinas 1988, Lisman 1997*). Pored opisane bimodalne spontane bioelektrične aktivnosti kod Purkinjeovih ćelija malog mozga u “in vitro” uslovima može se pronaći trimodalni oblik spontane aktivnosti: tonično stvaranje akcionih potencijala, pojava akcionih potencijala u paketićima i period bez aktivnosti (*Forrest i sar. 2012*).

U centralnom nervnom sistemu sisara, neki neuroni, kao što su kortikalni i talamički, poseduju sposobnost nastanka spontane aktivnosti sa ili bez postojanja sinaptičkih ulaza (*Fuentealba i Steriade 2005, Dehaene i Changeux 2005, Llinas 2005*). Ritmička oscilatorna aktivnost talamokortikalnih neurona uključena je u procese koji vode uspostavljanju ciklusa budnost-spavanje kao i formiranje svesti (*Llinas 2005*). Paketići akcionih potencijala imaju posebnu ulogu u neuronskoj signalizaciji jer pružaju mnogo precizniju informaciju nego pojedinačni akcioni potencijali (*Lisman 1997, Hausser i sar. 2004*). S obzirom da su paketići akcionih potencijala slični (talasni oblik akcionih potencijala), informacija koja je u njima sadržana zavisi od “interspike” intervala kojima su razdvojeni akcioni potencijali (*Rabinovich 2006*). Na taj način se vremenskim

tajmingom, povećava reproduktivnost i pouzdanost u međuneuronskoj komunikaciji (Rabinovich 2006). Tokom razvića paketići akcionih potencijala svojstva su mnogih neuronskih mreža unutar struktura kao što su retina, hipokampus, mali mozak i kičmena moždina sa značajnom ulogom u uspostavljanju veza između neurona (Blankenship i sar. 2010).



Slika 7. Spontana bioelektrična aktivnost različitih struktura mozga pacova kao i Br neurona vinogradskog puža (*H. pomatia*). (Preuzeto i adaptirano iz Byrne i Roberts 2004, Nikolić i sar. 2008)

2.2. Spontana bioelektrična aktivnost Br neurona vinogradskog puža

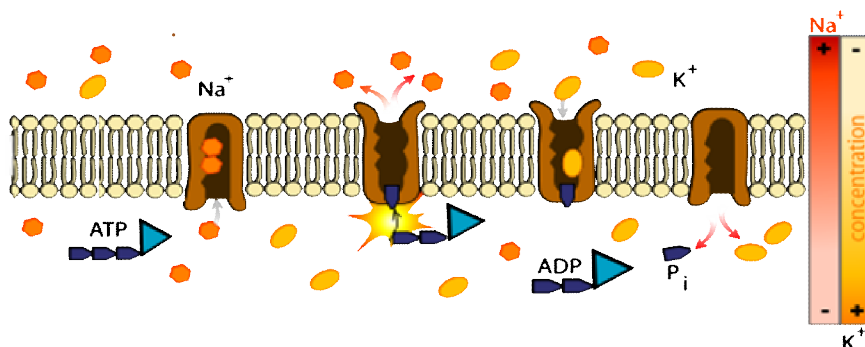
Neuroni beskičmenjaka su se pokazali kao dobar model sistem za razumevanje kako funkcioniše centralni nervni sistem kičmenjaka u fiziološkim i patološkim stanjima, jer su jako pristupačni za eksperimentisanje i istraživanje osnovnih mehanizama koji se nalaze u osnovi nadražljivosti (Lewis i sar.1986). Spontano aktivni neuroni mekušaca stvaraju paketiće akcionih potencijala koji se karakterišu periodima intenzivne aktivnosti nakon kojih slede tihi periodi bez nastanka akcionih potencijala (Alving 1968, Kerkut i sar. 1975, Nikolić i sar. 2008, 2012). Br neuron koji se nalazi u okoloždrelnom ganglijskom kompleksu vinogradskog puža je velikih dimenzija (200-500 μm). Zauzima konstantnu

poziciju na površini ganglije i stalan tip sinaptičkih veza. Br neuroni ritmički i regularno stvaraju paketiće akcionih potencijala koji su međusobno razdvojeni intervalima bez akcionih potencijala i strogo rečeno odlikuje ih bimodalni oblik neuronske aktivnosti (Slika 7) (*Vadasz i Salanki 1976, Kononenko 2000*). Br neuron učestvuje u regulaciji različitih homeostatskih i adaptivnih mehanizama puža (*Jahan-Parwar i saradnici 1969, Rittenhouse i Price 1985, Alevizos i sar. 1991*). Stoga je Br neuron idealan eksperimentalni objekat za ispitivanje mehanizama nastanka i održavanja spontane bioelektrične aktivnosti kao i njene modulacije različitim fizičkim i hemijskim faktorima.

2.3. Uloga Na^+/K^+ pumpe u nastanku spontane bioelektrične aktivnosti neurona

Natrijum – kalijum – adenozin trifosfataza (Na^+/K^+ pumpa) je odgovorna za uspostavljanje i održavanje membranskog potencijala mirovanja i nalazi se u plazma membranama svih viših eukariota uključujući i neurone puža (*Carpenter i sar. 1968, Gloor 2007*). Na^+/K^+ pumpa uz pomoć energije dobijene hidrolizom ATP iz ćelije izbacuje 3 Na^+ jona a ubacuje 2 K^+ jona nasuprot njihovom elektrohemijском gradijentu (Slika 8). Elektrohemijски gradijent Na^+ i K^+ jona nastao aktivnošću Na^+/K^+ pumpe je neophodan za održavanje i obnavljanje potencijala mirovanja nadražljivih ćelija, transport hranljivih materija u ćeliju spregnut sa Na^+ jonima kao i za održavanje osmotskog balansa (*Rossier i sar. 1987, Benarroch 2011, Gadsby i sar. 2012*). Povećana aktivnost Na^+/K^+ pumpe dovodi do hiperpolarizacije membrane što služi kao negativna povratna sprega koja štiti neurone od preterane ekscitacije (*Munacata i sar. 1998*). Sa druge strane Na^+/K^+ pumpa reguliše oblik akcionih potencijala kod beskičmenjaka i kičmenjaka (*Gadsby i sar. 1979, Pulver i sar. 2010, Nikolić i sar. 2012*). Na^+/K^+ pumpa ima ključnu ulogu u modulaciji paketića akcionih potencijala Br neurona puža (*Nikolić i sar. 2012*) kao i u kontroli aktivnosti bimodalne i trimodalne bioelektrične aktivnosti Purkinjeovih ćelija (*Forrest i sar. 2012*). Najnovija istraživanja ukazuju na ulogu koju Na^+/K^+ pumpa ima u integraciji “spike” aktivnosti gde uz pomoć provodljivosti K^+ jona učestvuje u uspostavljanju

kratkotrajne motoričke memorije larve voćne mušice (*Glanzman 2010*). Sa druge strane pored hemijskih agenasa kao što je uabain, različiti fizički faktori mogu da utiču na funkciju Na^+/K^+ pumpe. Tako npr. magnetno polje niskih frekvencija povećava protok naelektrisanih čestica kroz Na^+/K^+ pumpu, dok električno polje u fiziološkim uslovima inhibira aktivnost Na^+/K^+ pumpe (*Blank 1995, 2005*).



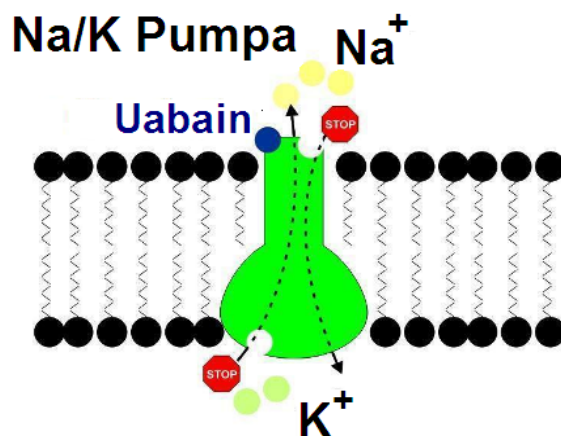
Slika 8. Mehanizam kojim Na^+/K^+ pumpa omogućava održavanje gradijenta koncentracije Na^+ i K^+ jona. (http://www.bionet-skola.com/w/%C4%86elijska_membrana)

2.4. Uloga uabaina u modulaciji spontane bioelektrične aktivnosti neurona

Uabain je kardijačni glikozid koji selektivno deluje na ekstraćelijsku površinu Na^+/K^+ pumpe dovodeći do inhibicije njene aktivnosti, što ima za posledicu povećanje intraćelijske koncentracije natrijumovih jona i na kraju povećanje koncentracije kalijumovih jona (*Prassas i sar. 2008*). Vezivanje uabaina za Na^+/K^+ pumpu dovodi do aktivacije citoplazmatičnih kinaza koje fosforilacijom aktiviraju signalne puteve ali i do povećanja produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i intraćelijske koncentracije kalijumovih jona (*Xie i Cai 2003*). Uabain može da utiče na snagu mišićne kontrakcije srčanog mišića izazivajući tkz. pozitivni inotropni efekat (*Koch-Weser i Blinks 1962*). Mikromolarne i milimolarne koncentracije uabaina dovode do inhibicije aktivnosti Na^+/K^+ pumpe, dok nanomolarne koncentracije stimulišu aktivnost pumpe (*Gao i sar. 2008*).

Poznato je da disfunkcija Na^+/K^+ pumpe dovodi do pojave različitih poremećaja u funkciji kardiovaskularnog i nervnog sistema kao i do pojave niza metaboličkih

poremećaja (*Rose i sar. 1994, Benarroch 2011*). Aktivno mesto na Na^+/K^+ pumpi za koje se vežu kardiotionični steroidi u koje spada i uabain visoko je konzervirano tokom evolucije što govori o fiziološkom značaju ovog vezivnog mesta (*Lingrel 2010*). Uabain se proizvodi endogeno u adrenalnim žlezdama i hipotalamusu gde cirkuliše i može da se veže za aktivno mesto na Na^+/K^+ pumpi u određenim situacijama kada se povećano luči npr. u ACTH indukovanoj hipertenziji ili na kraju trudnoće kada se krvni pritisak vraća na normalan nivo (*Lingrel 2010*). Sve veći broj studija ukazuje na antikancerogeni efekat uabaina posebno kada se radi o raku dojke (*Chen i sar. 2006*) i prostate (*Huang i sar. 2004*). Šematski prikaz mesta vezivanja glikozida uabaina na Na^+/K^+ pumpi je prikazan na Slici 9.



Slika 9. Šematski prikaz vezivnog mesta i funkcionisanja Na^+/K^+ pumpe nakon izlaganja neurona kardijskom glikozidu uabainu.

3. MAGNETNO POLJE I ŽIVI ORGANIZMI

3.1. Svojstva magnetnog polja

Magnetno polje nastaje oko svakog provodnika električne struje, pri kretanju naelektrisanih objekata i kod namagnetisanih objekata (stalni magneti). Magnetno polje može biti konstantno ili promenljivo. Konstantno magnetno polje (MP) nastaje oko

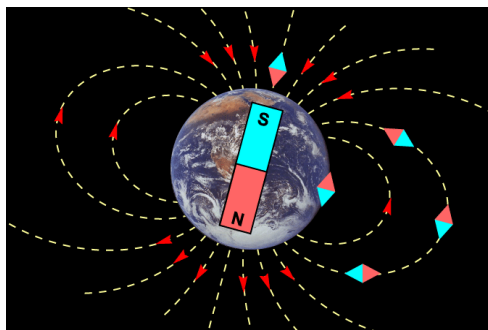
provodnika jednosmerne struje i oko trajno namagnetisanih objekata, dok promenljivo magnetno polje nastaje oko izvora naizmenične struje i karakteriše se vremenskom promenljivošću (*Giambattista i sar. 2004*). Veličine koje opisuju magnetno polje su jačina magnetnog polja H izražena kao amper po metru ($A\ m^{-1}$) i magnetna indukcija B u Teslama ($T=V\ s\ m^{-2}$) (*Glaser 2001, Giambattista i sar. 2004*).

Formula za izračunavanje magnetne indukcije je:

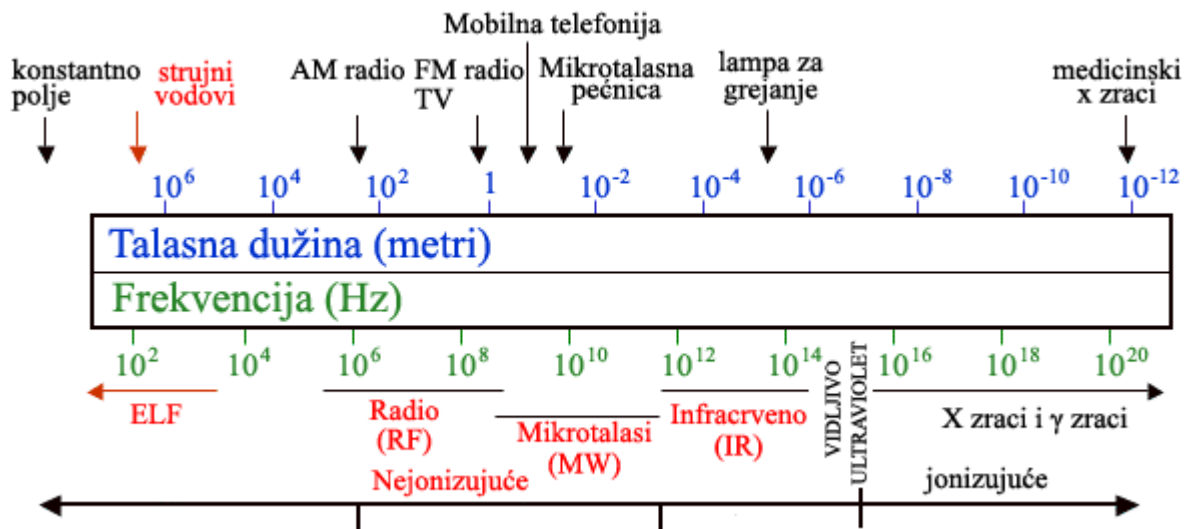
$$B = \mu \mu_0 H \quad (1)$$

gde je μ - magnetna permeabilnost, a $\mu_0 = 1,256 \cdot 10^{-6}\ V\ s^{-1}\ A\ m^{-1}$ predstavlja magnetnu permeabilnost vakuma. Permeabilnost je propusnost nekog materijala za magnetno polje.

Geomagnetna aktivnost zemlje nastala kao rezultat procesa u zemljinom jezgru iznosi od 30 do 70 μT u zavisnosti od geografske širine i dužine (Slika 10) (*Hashish i sar. 2007*). U prirodnoj sredini izvori magnetnog polja pored zemljinog jezgra su pražnjenja u atmosferi, solarna i lunarna aktivnost. Konstantna magnetna polja se dele na slaba $< 1\ mT$, umereno jaka $1\ mT - 1\ T$ i jaka $1\ T - 5\ T$. U prirodnoj sredini MP polje varira u opsegu od $0,03\ mT$ do $0,1\ mT$. Razvojem savremenih tehnologija kao što je slučaj sa magnetnom rezonancom (MRI), mobilnom telefonijom i raznim električnim aparatima, magnetna indukcija u životnoj sredini dostiže nekoliko hiljada mT (*Feychting 2005, Hashish i sar. 2008*). Vrednosti magnetnog polja ispod električnih vodova kreću se oko $0,02\ mT$, dok mali magneti koji se nalaze u različitim uređajima (audio i video pa do magnetna za frižidere) indukuju konstantno magnetno polje od $1\ mT$ do $10\ mT$ (*Hashish i sar. 2008*). Na Slici 11 prikazan je elektromagnetni spektar konstantnog i promenljivog magnetnog polja.



Slika 10. Zemljino magnetno polje. Strelice označavaju smer kretanja linija magnetnog polja. (http://stargazers.gsfc.nasa.gov/students/magnet_in_space_sp.htm)



Slika 11. Elektromagnetni spektar gde su prikazana jonizujuća i nejonizujuća zračenja. Na slici se vidi koji deo spektra zauzima konstantno i promenljivo magnetno polje ekstremno niskih frekvencija. (adaptirano iz

<http://www.mcw.edu/radiationoncology/ourdepartment/radiationbiology.htm>).

3.2. Uticaj konstantnog magnetnog polja na žive organizme

Danas je više nego ikad aktuelizovano pitanje štetnih ali i korisnih efekata izlaganja živih organizama konstantnom i promenljivom magnetnom polju. S obzirom na istraživačke napore širom sveta, jako malo se zna o štetnim posledicama izlaganja magnetnom polju (*Dini and Abbro 2005; Leszczynski 2005*). Magnetno polje umerene indukcije (1 mT - 1 T) može da utiče na biološke procese na svim nivoima organizacije, posebno na procese koji su povezani sa funkcionisanjem membranskih kanala (*Rosen 2003a, Tenuzzo i sar. 2006, Tolosa i sar. 2011*). Konstantno magnetno polje različitih indukcija osim što izaziva promene u funkcionisanju nervnog sistema takođe dovodi do poremećaja u radu neuroendokrinog, kardiovaskularnog i reproduktivnog sistema (*Okano and Ohkubo 2005, Saunders 2005*), a poseduje značajan genotoksični, karcinogeni i teratogeni potencijal (*Juutilainen i Lang 1997*). Postoje nebrojeni dokazi da magnetno

polje može da utiče na procese koji dovode do pojave kancera ili utiču na njegovu progresiju (*Miyakoshi 2005*). Izlaganje magnetnom polju 6 mT utiče na proces apoptoze u zavisnosti od ćelijskog tipa i vremena izlaganja kao i na fagocitozu apoptoskih ćelija (*Tenuzzo i sar. 2006, Dini i Panzarini 2010*).

Neke savremene studije ukazuju na korisnu stranu delovanja magnetnog polja. Spektar upotrebe u medicinske svrhe kreće se od ublažavanja bolova (antinociceptivno delovanje) do poboljšanja oporavka nakon povrede perifernih neurona. Međutim, mehanizam pomoću kojeg se ostvaruju terapijski efekti delovanja konstantnog magnetnog polja nisu poznati (*Weintraub i sar. 2003, Kelleher i sar. 2006, Gyires i sar. 2008, Wang i sar. 2010a*). Akutno izlaganje magnetnom polju 10 mT ili 70 mT, odmah nakon edema indukovano histaminom, dovodi do značajne redukcije nastajanja edema kod pacova (*Morris i sar. 2008*), dok magnetno polje 5,5 mT smanjuje farmakološki indukovanu vazokonstrikciju i vazodilataciju dovodeći do povećanja ili smanjenja krvnog pritiska kod zečeva (*Okano i Ohkubo 2005*). Iz navedenog se jasno vidi da magnetno polje od nekoliko mT, *in vivo* i *in vitro*, može da ima direktan efekat na različite ćelije i sisteme organa životinja.

3.3. Delovanje konstantnog magnetnog polja na nervni sistem različitih organizama

Mnogi eksperimentalni podaci govore o uticaju magnetnog polja na nervni sistem različitih organizama. Izlaganje magnetnom polju u rasponu magnetne indukcije od 4,74 mT do 43,45 mT dovodi do povećanja amplitude akcionih potencijala u lateralnom gigantskom neuronu slatkovodnog raka, dok izlaganje nervne lestvice u trajanju od 30 min magnetnom polju 8,08 mT pojačava ekscitatorne postsinaptičke potencijale (EPSP) u električnim i hemijskim sinapsama lateralnog gigantskog neurona (*Ye i sar. 2004, 2008*). Promene u neuronskoj ekscitabilnosti i frekvenciji akcionih potencijala puža (*Helix aspera*) su zavisne od indukcije, trajanja i tipa izlaganja (pojedinačno i kontinuirano ili ponavljajuće i kumulativno) magnetnom polju (*Moghadam i sar. 2011*). Magnetno polje

od 0,9 mT i 1,8 mT izaziva epileptičnu aktivnost kod pacijenata koji boluju od epilepsije a podvrgnuti su prehirurškoj proceni (*Fuller i sar. 1995*) i dovodi do promena u paroksizimalnoj aktivnosti moždanih talasa (*Dobson i sar. 2000*).

Magnetno polje indukcije 20 mT menja EEG aktivnost kod zečeva (*Rosen 2003a*). Izlaganje magnetnom polju 2,7 mT dovodi do povećanja amplituda akcionih potencijala i smanjenja trajanja AP kod Br neurona vinogradskog puža (*Helix pomatia*), dok 10 mT uzrokuje promene u hiperpolarizaciji membrane, povećanje amplitude akcionih potencijala i smanjenje učesća i trajanja AP (*Nikolić i sar. 2008*). Izlaganje neurona strižibube (*Morimus funereus*) konstantnom magnetnom polju indukcije 2 mT tokom 5 minuta dovodi do promena i u ekscitaciji i inhibiciji (*Todorović i sar. 2007*). Magnetno polje indukcije 10 mT ima izražen inhibitorski uticaj na električnu aktivnost neurona *in vitro* (*McLean i sar. 1995, Trabulsi i sar. 1996*). Uticaj konstantnog magnetnog polja na nervni sistem se ostvaruje i preko oksidativnog oštećenja DNK velikog mozga i hipokampusu pacova (*Amara i sar. 2011*).

4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovi cilj ovog istraživanja je da se pokažu mogućnosti i prednosti upotrebe Higučijeve fraktalne dimenzije i analize nezavisnih komponenata u analizi signala dobijenih intraćelijskom registracijom Br neurona vinogradskog puža (*Helix pomatia*) pre, tokom i nakon delovanja magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT, kao i uabaina inhibitora Na^+/K^+ pumpe.

Iz opisanog cilja proizašli su sledeći zadaci rada:

1. Do sada, nije bilo pokušaja da se primenom Higučijeve fraktalne dimenzije izvrši razlaganje složene bioelektrične aktivnosti spontano aktivnih neurona na akcione potencijale unutar paketića (AP), intervale između akcionih potencijala (ISI) i tihe intervale kojima su međusobno razdvojeni paketići (IBI). Primenom Higučijeve fraktalne dimenzije uz pomoć formiranih normalizovanih srednjih vrednosti empirijske distribucije FD i aproksimacije Gausovim funkcijama razdvojila bi se svaka komponenta složene bioelektrične aktivnosti Br neurona puža: AP, ISI i IBI.
2. Uspešno razdvajanje, omogućiće praćenje efekta magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT na promene fraktalne kompleksnosti signala, tj. efekta na svaku od razdvojenih komponenata složene bioelektrične aktivnosti. Pratiće se promene svake od pojedinačnih AP, ISI i IBI komponenata pre, tokom i neposredno nakon izlaganja konstantnom magnetnom polju. Potom će se ispitati uporedni efekat magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT na promene u AP, ISI i IBI komponentama Br neurona.
3. Primenom kardijačnog glikozida uabaina, inhibitora Na^+/K^+ pumpe, pratiće se promene u kompleksnosti spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona pre i nakon izlaganja magnetnom polju 10 mT imajući u vidu činjenicu da je povećana aktivnost Na^+/K^+ pumpe nakon izlaganja navedenom polju.

4. Primeniće se metoda analize nezavisnih komponenata na novom skupu podataka kako bi se procenila mogućnost njene upotrebe u analizi pojedinačne neuronske aktivnosti. ICA metoda će omogućiti pronalaženje izvora fraktalne kompleksnosti tokom izlaganja Br neurona magnetnom polju indukcije 2,7 mT, i 10 mT kao i uabainu. Takođe, sagledaće se vrednost zajedničke upotrebe Higučijeve fraktalne dimenzije i ICA metode u otkrivanju promena u strukturi signala nastalih delovanjem magnetnog polja i uabaina.

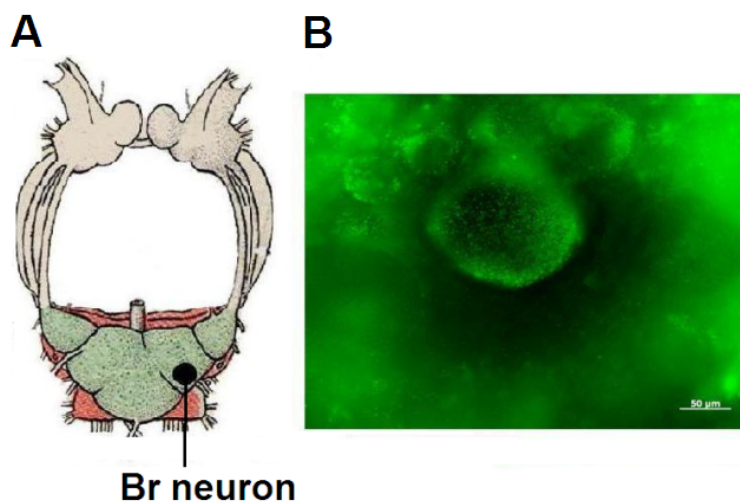
5. MATERIJAL I METODE

5.1. Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenata

Svi eksperimenti korišćeni u ovoj disertaciji urađeni su na izolovanim preparatima Br neurona okoloždrelnog kompleksa vinogradskog puža (*Helix pomatia*; *Pulmonata: Helicidae*). Električna aktivnost izolovanih Br neurona je, uz pomoć metode intraćelijskog registrovanja, snimana u kontrolnim uslovima, tokom i nakon delovanja magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT, kao i pod dejstvom uabaina neposredno nakon kontrolnog snimanja i uabaina nakon izlaganja magnetnom polju 10 mT.

5.1.1. Izolacija i identifikacija Br neurona vinogradskog puža

Pre disekcije i elektrofiziološke registracije puževi su držani u plastičnim kutijama na temperaturi od 22°C. Tok disekcije je bio sledeći: uklanjanje ljuštore, isecanje dorzalne anteriorne površine stopala puža i izolacija okoloždrelnog ganglijskog kompleksa koji je potom premešten u Silgard (Sylgard 184 Encapsulating Resin, Electronic materials Department Dow Corning Corporation, Midland, Michigan, USA) komoru za registraciju koja sadrži cirkulišući fiziološki rastvor. Fiziološki rastvor koji je prilagođen sastavu i pH vrednosti ekstraćelijske tečnosti puža se sastojao od 80 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 4 mM KCl, i 5 mM Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (proizvođač Merck). Potom su sa površine neurona pažljivo sklonjena vezivna tkiva uz upotrebu oftamoloških makaza i bez upotrebe proteolitičkih enzima. Identifikacija Br neurona je urađena pod binokularnim mikroskopom. Br neuron je lokalizovan u donjem delu desnog parijetalnog ganglionona (Slika 12A). Izolovan Br neuron je histološki verifikovan uz pomoć Lucifer žutog bojenja (Slika 12B) (*Schulze-Bonhage i sar. 1993*).



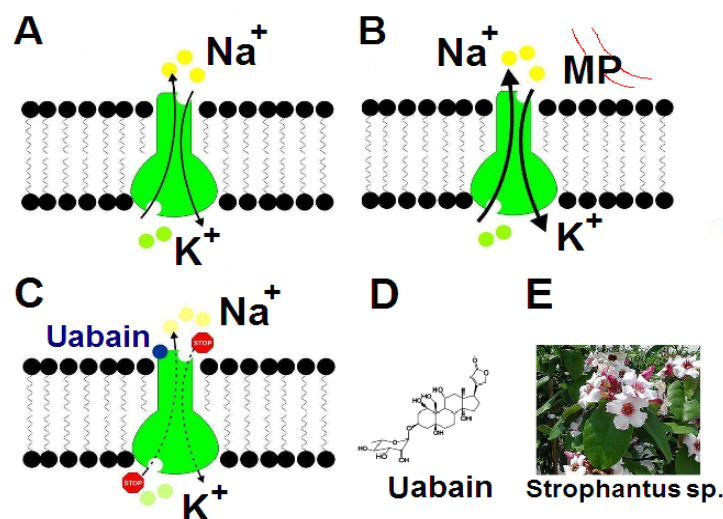
Slika 12. (A) Pozicija Br neurona unutar okoloždrelnog ganglijskog kompleksa vinogradskog puža (*H. pomatia*). (B) Histološka identifikacija Br neurona uz pomoć Lucifer žutog bojenja.

5.1.2. Izlaganje Br neurona puža konstantnom magnetnom polju

Trajni magneti koji emituju magnetna polja 2,7 mT i 10 mT, postavljeni su na ručno izrađeni nosač ispod centra komore za snimanje, sa severnim polom postavljenim paralelno sa vertikalnom komponentom geomagnetnog polja, približno 3 mm od dna komore. Feritni magneti dimenzija 6 mm x 7 mm i oblika valjka 4,5 cm i visine 3,7 cm su stvarali umereno jako magnetno polje. Magnetna indukcija polja je direktno merena na površini okoloždrelnog ganglijskog kompleksa, unutar komore za registraciju uz pomoć GMO5 gausometra i PT2837 sonde (*Hirsst, Magnetic Instruments Ltd, Cornwall, UK*). Magnetna indukcija lokalnog geomagnetnog polja, tokom trajanja eksperimenta iznosila je 47,51 μ T. Ove vrednosti su merene pomoću GSM 10 protonskog magnetometra u Geomagnetnoj observatoriji Beograd. Br neuroni su izlagani magnetnom polju 2,7 mT i 10 mT. Unutar komore za registraciju, magnetna indukcija je bila nepromenljiva sa prosečnim vrednostima od 2,71 mT \pm 0,03 mT i 10 mT \pm 0,21 mT.

5.1.3. Tretman Br neurona puža sa uabainom

Kardijačni glikozid uabain, inhibitor Na^+/K^+ pumpe je rastvoren u fiziološkom rastvoru puža. Koncentracija uabaina u rastvoru je iznosila 10^{-4} M. Pomoću gravitaciono zavisne perfuzije rastvoreni uabain je dodan u komoru za snimanje. Za kontrolno registrovanje Br neurona ($n = 7$) korišćena je perfuzija sa fiziološkim rastvorom tokom 5 min (kontrolni snimci) nakon čega su neuroni tretirani uabainom tokom 7 min. Kad su u pitanju Br neuroni izloženi magnetnom polju ($n = 6$), najpre su perfundovani fiziološkim rastvorom tokom 5 min (kontrolni uslov), izlagani magnetnom polju 10 mT u trajanju od 15 min i nakon toga tretirani uabainom tokom 7 min. Br neuroni su tretirani uabainom nakon izlaganja magnetnom polju jer je prethodnim merenjima pokazano da efekat magnetnog polja traje 20 min nakon izlaganja (Nikolić i sar. 2008). Na Slici 13 vidi se šematski prikaz funkcionisanja Na^+/K^+ pumpe u normalnim fiziološkim uslovima tokom delovanja konstantnog magnetnog polja 10 mT i nakon vezivanja inhibitora uabaina.

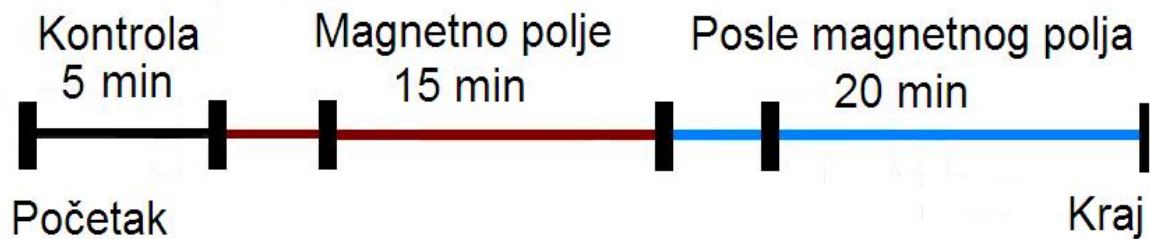


Slika 13. (A) Pojednostavljen šematski prikaz Na^+/K^+ pumpe. (B) Šematski prikaz delovanja umereno jakog magnetnog polja 10 mT na funkcionisanje Na^+/K^+ pumpe gde podebljane strelice simbolizuju porast aktivnosti pumpe. (C) Inhibitorski uticaj kardijačnog glikozida uabaina na funkcionisanje Na^+/K^+ pumpe gde isprekidane linije simbolizuju smanjenje aktivnosti pumpe. (D) Strukturna hemijska formula uabaina. (E) Biljna vrsta roda *Strophantus* iz koje se izoluje uabain.

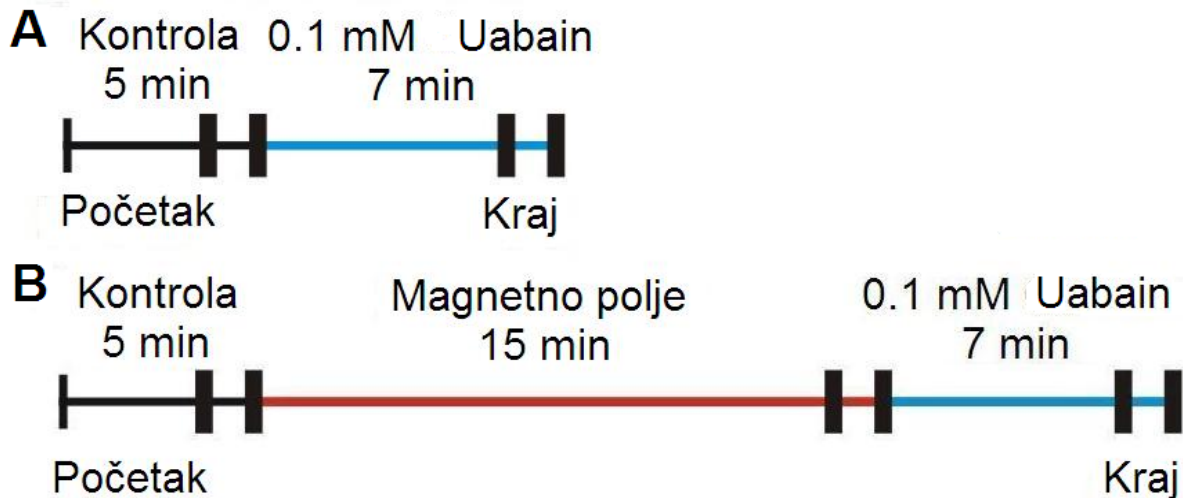
5.2. Elektrofiziološki eksperimenti

Za intraćelijsko registrovanje korišćen je pojačivač SEC-2 M (Jozsef Atilla University, Szeged). Signali su uzorkovani pri frekvenciji od 1 KHz da bi potom bili digitalizovani uz pomoću 16-bitnog A/D pretvarača (*MiniDigi 1A, Axon Instruments*). Signali su zapisivani na računaru uz pomoć Axoscope programa (*Axon instruments*). Elektrode za intraćelijsko registrovanje otpora 15-18 M Ω su napravljene su od borosilikatnog stakla sa filamentom (*B120F-4 WPI, Sarasota, FL, USA*) na vertikalnom izvlačkaču u jednom koraku (*Model 700C, David Kopf Inst., Tujunga CA*) i ispunjene sa 1 M kalijum citratom. Referentna elektroda je bila Ag/AgCl žica povezana sa komoricom za registrovanje uz pomoć agarškog mosta. Tokom registrovanja korišćen je niskopropusni filter sa frekvencijom isecanja od 200 Hz. Na početku registrovanja trebalo je sačekati oko 30 min kako bi se bioelektrična aktivnost stabilizovala minimalno na 5 min.

Za prvu grupu eksperimenata koja je uključivala izlaganje Br neurona magnetnom polju 2,7 mT i 10 mT, elektrofiziološko registrovanje u kontrolnim uslovima sprovedeno je na jedanaest životinja (n = 11) u trajanju od po 5 min. Potom, registrovanje je nastavljeno tokom izlaganja magnetnom polju 2,7 mT i 10 mT u trajanju od po 15 min i nakon prestanka izlaganju, u trajanju od 20 min. Eksperimenti koji su se odnosili na magnetno polje 2,7 mT urađeni su na šest eksperimentalnih životinja (n = 6) dok su za tretman sa 10 mT magnetnim poljem eksperimenti urađeni na pet eksperimentalnih životinja (n = 5). Šematski prikaz eksperimentalnog toka pre, tokom i nakon izlaganja magnetnom polju 2,7 mT i 10 mT je prikazan na Slici 14. U drugoj grupi eksperimenata uabain je uveden u komoricu u trajanju od 7 min nakon kontrolnog registrovanja kod sedam životinja (n = 7) (5 min) i nakon delovanja magnetnog polja 10 mT (15 min) kod šest životinja (n = 6) (Slika 15).



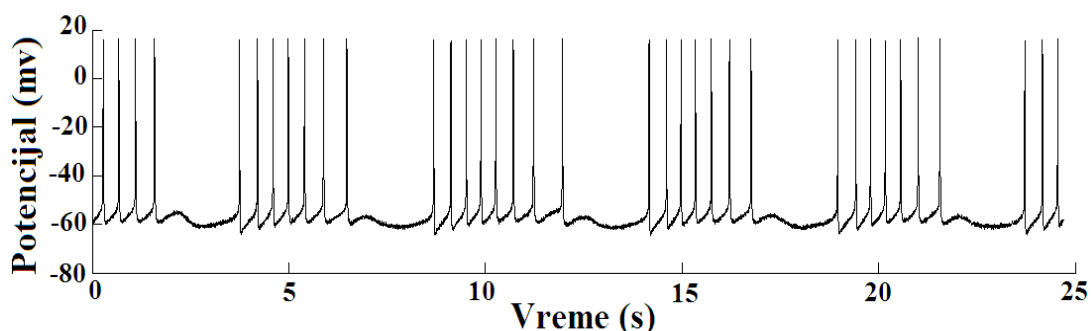
Slika 14. Vremenski tok elektrofiziološke registracije signala u kontrolnim uslovima, tokom i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije (MP) 2,7 mT ($n = 6$) i 10 mT ($n = 5$). Punim vertikalnim linijama označene su vremenske sekvence uzete za fraktalnu analizu (preuzeto iz *Nikolić 2012*).



Slika 15. Vremenski tok elektrofiziološke registracije signala za drugu grupu eksperimenata: **(A)** u kontrolnim uslovima i uslovima dodatog uabaina kod sedam životinja (Uabain) ($n = 7$) **(B)** u kontrolnim uslovima ($n = 5$), tokom izlaganja magnetnom polju (MP) 10 mT ($n = 6$) i nakon dodatog uabaina (Uabain PMP) kod šest životinja ($n = 6$). Punim vertikalnim linijama označene su vremenske sekvence uzete za fraktalnu analizu (preuzeto iz *Nikolić 2012*).

Fraktalna i ICA analiza prve eksperimentalne grupe urađena je za prvih pet minuta svakog eksperimentalnog uslova, pre, tokom i nakon izlaganja magnetnom polju 2,7 mT i 10 mT. U drugoj grupi za potrebe fraktalne i analize nezavisnih komponenta korišćen je

poslednji minut svakog eksperimentalnog uslova: pre, tokom dodavanja uabaina, kao i dodavanja uabaina nakon delovanja magnetnog polja 10 mT. Na Slici 16 je prikazano 25 s intraćelijskog zapisa spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona tokom kontrolnog registrovanja.



Slika 16. Primer intraćelijskog zapisa spontane bioelektrične aktivnosti jednog Br neurona okoloždrelnog ganglijskog kompleksa vinogradskog puža (60 s epoha) u kontrolnim uslovima.

5.3. Fraktalna analiza elektrofizioloških signala

5.3.1. Higučijeva fraktalna dimenzija

Higučijeva fraktalna dimenzija predstavlja nelineranu meru kompleksnosti signala u vremenskom domenu (*Higuči 1988, Spasić i sar. 2005, 2008, 2011*). Signali se analiziraju u vremenskim sekvencama $x(1), x(2), \dots, x(N)$ da bi se potom konstruisala nova vremenska serija X_k^m definisana navedenom jednačinom:

$$X_k^m : x(m), x(m+k), x(m+2k), \dots, x(m + \text{int}[(N-m/k)k]) \quad (2)$$

za $m=1, 2, \dots, k$, m – inicijalno vreme, $k = 2, \dots, k_{\max}$, k – vremenski interval, int – celobrojni deo realnog broja. Dužina, $L_m(k)$ računata je za svaku od ukupno k vremenskih serija za krive X_k^m :

$$L_m(k) = \frac{1}{k} \left[\left(\sum_{i=1}^{\text{int}\left[\frac{N-m}{k}\right]} |x(m+ik) - x(m+(i-1)k)| \right) \frac{N-1}{\text{int}\left[\frac{N-m}{k}\right]k} \right] \quad (3)$$

$L_m(k)$ je usrednjeno za svako m dajući srednju vrednost krive dužine $L(k)$ za svako $k = 2, \dots, k_{\max}$:

$$L(k) = \frac{\sum_{m=1}^k L_m(k)}{k} \quad (4)$$

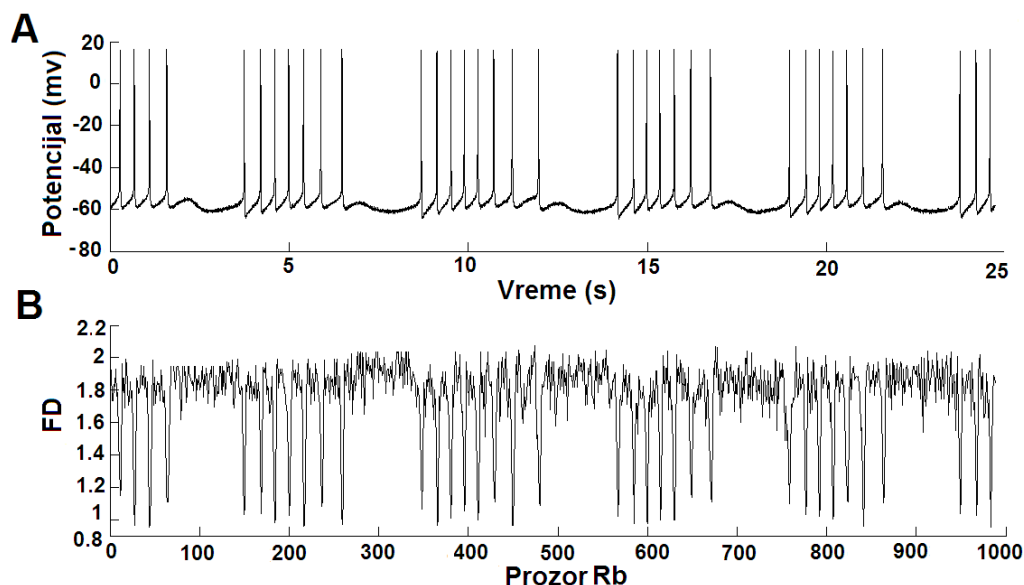
Zatim je fraktalna dimenzija određena kao nagib najbolje prilagođene regresione prave dobijene metodom najmanjih kvadrata gde su na y-osi vrednosti $\ln(L(k))$, a na x-osi vrednosti $\ln(1/k)$:

$$FD = \ln(L(k)) / \ln(1/k) \quad (5)$$

U ovim istraživanjima je Higučijev metod, koji se obično koristi za analizu stacionarnih signala, modifikovan za potrebe analize visoko nestacionarnih signala kao što je slučaj sa spontanom bioelektričnom aktivnošću Br neurona. Higučijev algoritam je napravljen i primenjen u MATLAB 6.5 softveru. Izabran je parametar $N = 25$ koji je ekvivalentan jednoj epohi trajanja 0.025 s kako bi se izborili sa nestacionarnošću signala, a parametar $k_{\max} = 8$. Signali su podeljeni na 12 000 epoha (prozora). Vrednosti fraktalnih dimenzija su izračunate za svaku epohu, bez preklapanja prozora. FD je metrika čija bi teoretska vrednost trebalo da se kreće u interval $[1, 2]$. Međutim u praksi Higučijeva fraktalna dimenzija može da ima vrednosti koje se malo nalaze van granica interval $[1, 2]$ jer je u pitanju procena numeričkom metodom. U cilju lakše interpretacije vrednosti FD , može se reći da je FD povezana sa “geometrijskom” kompleksnošću krive. FD vrednost glatke krive je procenjena na približno 1, dok je procena vrednosti FD belog šuma 2. Takođe se može reći da je porast frekvencije signala direktno proporcionalan povećanju FD . Stoga, u istraživanju ćemo pokazati da je vrednost FD akcionih potencijala u

paketićima u proseku oko 1, intervala između svakog susednog AP u paketiću približno 1,5 a tihih intervala između susednih paketića $> 1,8$.

Vrednosti fraktalne dimenzije su izračunate za signale dobijene intraćelijskim registrovanjem pre, tokom i posle izlaganja magnetnom polju 2,7 mT (ukupno 18 signala - 6 signala po uslovu), i 10 mT (ukupno 15 signala- 5 signala po uslovu). U drugoj grupi eksperimenata vrednosti fraktalne dimenzije su računane za navedene eksperimente: 14 signala u kontroli i u uslovu dodatog uabaina kod 7 puževa (tri puža su isključena iz formiranja empirijskih raspodela *FD*), 15 signala za kontrolu pre delovanja magnetnog polja, magnetno polje (MP) i uslov posle delovanja magnetnog polja (PMP) iz 5 puževa, kao i 18 signala za kontrolu pre MP-a i uabaina, magnetno polje (MP) i uabain nakon delovanja magnetnog polja (Uabain PMP) iz 6 puževa (jedna životinja je isključena iz formiranja empirijskih raspodela *FD*). U cilju dokazivanja izmenjenog efekta uabaina na modulisanje kompleksnosti spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona nakon delovanja magnetnog polja i isključivanja kasnog delovanja magnetnog polja (PMP) za poređenje u drugoj grupi eksperimenata uključeni su jednodominantni signali pre (Kontrola 2), tokom (MP 2) i posle delovanja magnetnog polja 10 mT (PMP 2), iz prve grupe eksperimenata. Na Slici 17 se može videti 25 s spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona u kontrolnim uslovima (A) i odgovarajuće vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije (B). Sva izračunavanja Higučijeve fraktalne dimenzije izvršena su pomoću softvera urađenog u MATLAB 6.5 programu i algoritma čiji je autor dr Slađana Spasić. Ovaj softver je verifikovan kroz publikacije (*Spasić i sar. 2005, 2008, 2011, Spasić 2010*).

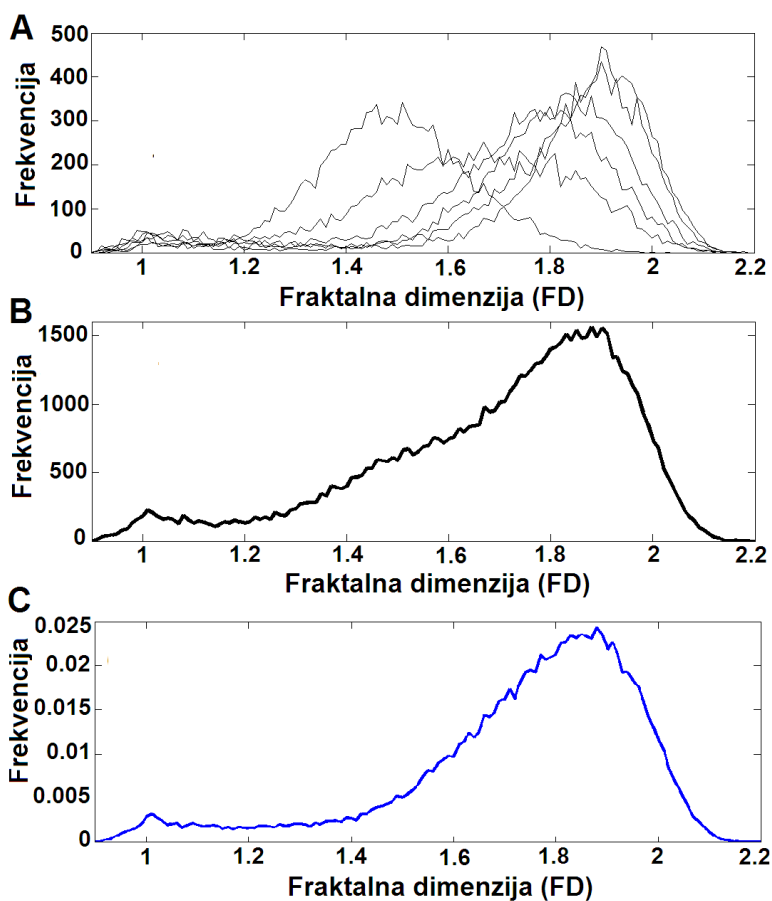


Slika 17. (A) Primer intraćelijskog zapisa spontane bioelektrične aktivnosti jednog Br neurona okoloždrelnog ganglijskog kompleksa vinogradskog puža (25 s epoha) u kontrolnim uslovima **(B)** i odgovarajuće vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije.

5.3.2. Empirijska raspodela Higučijeve fraktalne dimenzije

Nakon izračunatih vrednosti fraktalne dimenzije za svaki prozor formirana je empirijska raspodela vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije za svaki pojedinačni signal (Slika 18A). Potom je izvršeno usrednjavanje vrednosti empirijske raspodele FD za svaki eksperimentalni uslov i na taj način su formirane srednje vrednosti empirijske raspodele FD (Slika 18B). Normalizacija srednjih vrednosti empirijske FD raspodele je izvršena tako što su za svaki eksperimentalni uslov podeljene frekvencije sa sumom svih frekvencija (u ovom kontekstu radi se o frekvenciji u statističkom smislu, dakle o broju pojavljivanja neke vrednosti) za dati uslov (Slika 18C). Za formiranje normalizovanih srednjih vrednosti empirijske FD raspodele za drugu grupu eksperimenata sa uabainom i magnetnim poljem i njihovo poređenje sa eksperimentima sa magnetnim poljem indukcije 10 mT iz prve grupe, formirane su eksperimentalne grupe iz odeljka 5.2 i imenovane na sledeći način: kontrola pre dodavanja uabaina - Kontrola 1; uabain dodat nakon kontrolnog registrovanja - Uabain; pre, tokom i nakon izlaganja magnetnom polju 10 mT -

Kontrola 2; MP 2 i PMP 2; kontrolno registrovanje, izlaganje magnetnom polju 10 mT, te potom dodavanje uabaina - Kontrola 3; MP 3; Uabain PMP.

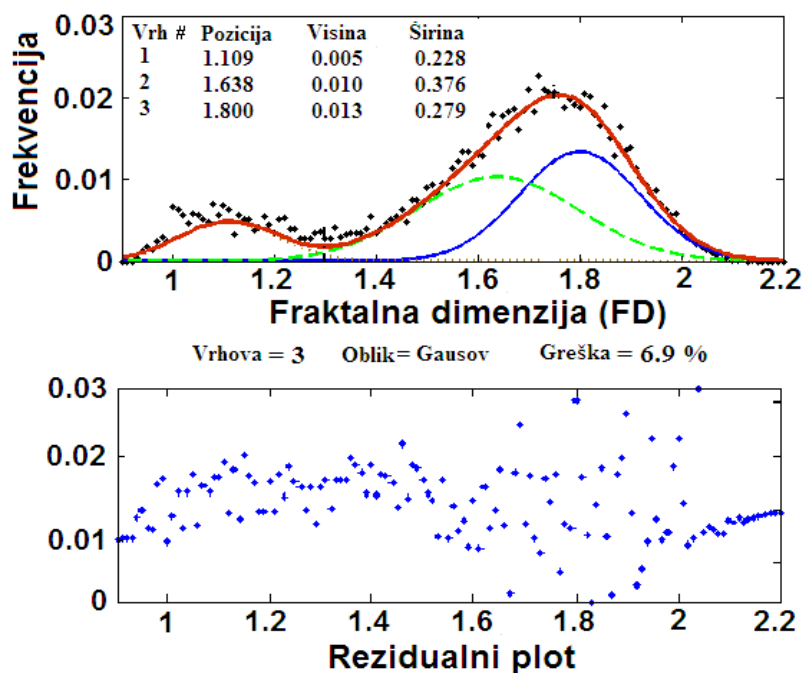


Slika 18. (A) Empirijske raspodele FD kod šest pojedinačnih puževa u kontroli, (B) empirijska raspodela FD dobijena usrednjavanjem empirijskih raspodela FD sa slike A i (C) normalizovane srednje vrednosti empirijske raspodele FD .

5.3.3. Aproximacija srednjih vrednosti empirijske raspodele FD Gausovom funkcijom

U svrhu razdvajanja i jasnog empirijskog razgraničenja između AP, ISI, i IBI komponentata spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona puža izvršena je aproksimacija empirijske distribucije FD za svaki pojedinačan signal Gausovim funkcijama. Za te

potrebe korišćenje *peak fit* (<http://www.mathworks.com/matlabcentral>) program u MATLAB softveru. Tom prilikom, nakon primene Gausovog modela, izolovane su tri Gausove funkcije sa svojim maksimumima (Slika 19). Aproksimacija sa tri Gausove funkcije je dala veoma dobar rezultat sa malim greškama. Pozicije vrhova (maksimuma Gausovih funkcija) su omogućile određivanje srednje vrednosti *FD* kao i širine svake (AP, ISI, i IBI) komponente u signalu što je omogućilo uspostavljanje jasnih granica između njih (Slika 19). Kvantifikacija površina koje zauzimaju komponentne složene bioelektrične aktivnosti (AP, ISI, i IBI) u normalizovanim srednjim empirijskim raspodelama *FD* za svaki eksperimentalni uslov izvršena je uz pomoć kumulativne funkcije raspodele. Kumulativna raspodela verovatnoće je funkcija koja se koristi u teoriji verovatnoće. Označava se sa F_x . To je funkcija koja za svaki realan broj x , određuje verovatnoću da je slučajna promenljiva X uzela vrednost manju ili jednaku x .



Slika 19. Primer Gausove aproksimacije jednog signala vinogradskog puža gde se vide tri Gausove funkcije koje na najbolji način opisuju podatke normalizovane empirijske raspodele *FD*. Slika je nastala kao rezultat primene *peakfit* programa u MATLAB-u.

5.4. Statističke metode u analizi elektrofizioloških signala

5.4.1. Analiza nezavisnih komponenata – ICA

Analiza nezavisnih komponenata (*eng. independent component analysis, ICA*) je multivarijaciona statistička metoda koja za cilj ima opisivanje niza podataka nastalih kombinovanjem nepoznatih skrivenih promenljivih. Takođe se može reći da ICA metod omogućava izolovanje nezavisnih izvora iz veštačkog ili biološkog signala (*Hyvarinen i sar. 2001, Spasić i sar. 2011c*). Pretpostavka metode jeste da se signal sastoji od linearne kombinacije statistički nezavisnih signala. ICA metoda je nastala generalizacijom metode glavnih komponenata (*eng. principal component analysis, PCA*). Postoje dva tipa ICA metode u zavisnosti da li su oblici komponenata poznati pre početka analize ili ne. Prvi tip ICA metode koji se sastoji od vektora nepoznate forme se označava kao slepo razdvajanje komponenata (*eng. blind source separation, BSS*) i nastao je iz potrebe izdvajanja glasova iz bučnog okruženja. Drugi tip ICA metode koristi vektore poznate forme. Za potrebe analize elektrofizioloških signala podesnije je koristiti drugi tip ICA metode. ICA metoda pretpostavlja negausovske karakteristike komponenata kao osnovu za procenu nezavisnosti komponenata. Kada postoji jedan određen broj multivarijacionih merenja, neophodno je pronaći manji broj nekorelisanih promenljivih tj. novi skup osnovnih vektora.

Ako postoji p nezavisnih signala $s_1(t), s_2(t), \dots, s_p(t)$, tada se za n posmatranih eksperimentalnih signala $x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)$ u vremenu $t \in \{t_0, t_1, \dots, t_{\max}\} = T$ može napisati formula koja predstavlja njihovu linearnu kombinaciju:

$$x_i(t) = \alpha_{i1}s_1(t) + \alpha_{i2}s_2(t) + \dots + \alpha_{ip}s_p(t), \quad (6)$$

za svako $i = 1, \dots, n$ gde je n broj eksperimentalnih podataka (signala).

Matrični prikaz navedenog glasi:

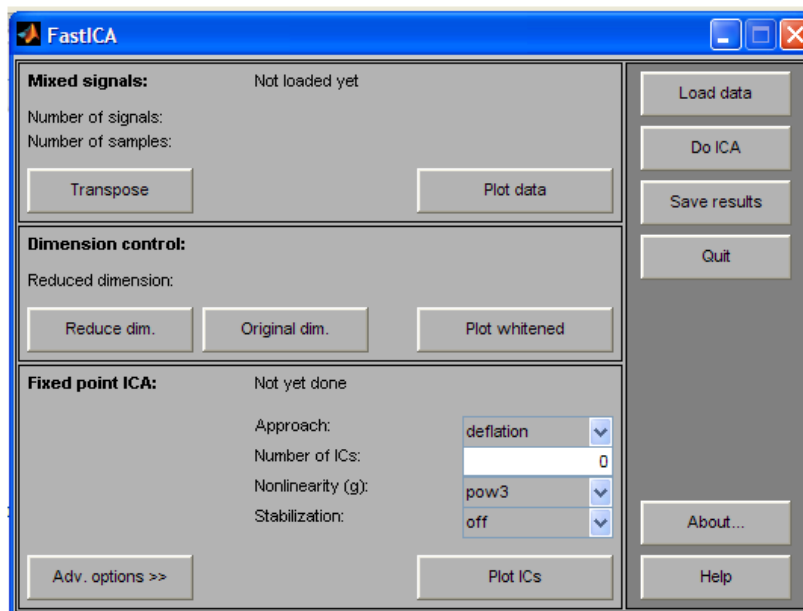
$$\mathbf{x}(t) = \mathbf{A}\mathbf{s}(t), \forall t \in T, \quad (7)$$

gde je $\mathbf{x}(t) = (x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t))^T$ vektor dimenzije $n \times 1$ koji predstavlja n posmatranih signala; \mathbf{A} predstavlja $n \times p$ dimenzionu miksujuću matricu, koja sadrži linearnu kombinaciju koeficijenata; $\mathbf{s}(t) = (s_1(t), s_2(t), \dots, s_p(t))^T$ je vektor dimenzije $p \times 1$ koji predstavlja signale dobijene iz p izvora, gde je $p \leq n$. Problem se sastoji u otkrivanju niza izvornih vektora $\{\mathbf{s}(t) : t \in T\}$ samo uz pomoć posmatranih signala $\{\mathbf{x}(t) : t \in T\}$. Problem se može formulisati i preko računanja razdvajajuće matrice \mathbf{W} dimenzije

$$p \times n:$$

$$\mathbf{u}(t) = \mathbf{W}\mathbf{x}(t) \quad (8)$$

sa tačnošću do na multiplikativnu konstantu i permutaciju vektora $\mathbf{s}(t)$ izvornih signala. ICA algoritam preko nemiksujuće matrice \mathbf{W} omogućava statističku nezavisnost procenjenih signala $\mathbf{u}(t)$. Takođe, ovim metodom se može izračunati manje komponentata nego što je posmatranih signala i u tom slučaju je $p < n$. U ovim istraživanjima broj promenljivih n se odnosi na broj životinja npr. ako je broj životinja bio pet biće 5 promenljivih tj. $n = 5$ (u slučaju magnetnog polja 10 mT), a broj komponentata je iznosio $p = 2$. Za procenu broja komponentata koristila se metoda glavnih komponentata (PCA). ICA je računata uz pomoć *FastICA* algoritma (*Hyvarinen i sar. 2001*) u MATLAB-u i na taj način su utvrđene statistički nezavisne komponente u fraktalnoj kompleksnosti signala (Slika 20).

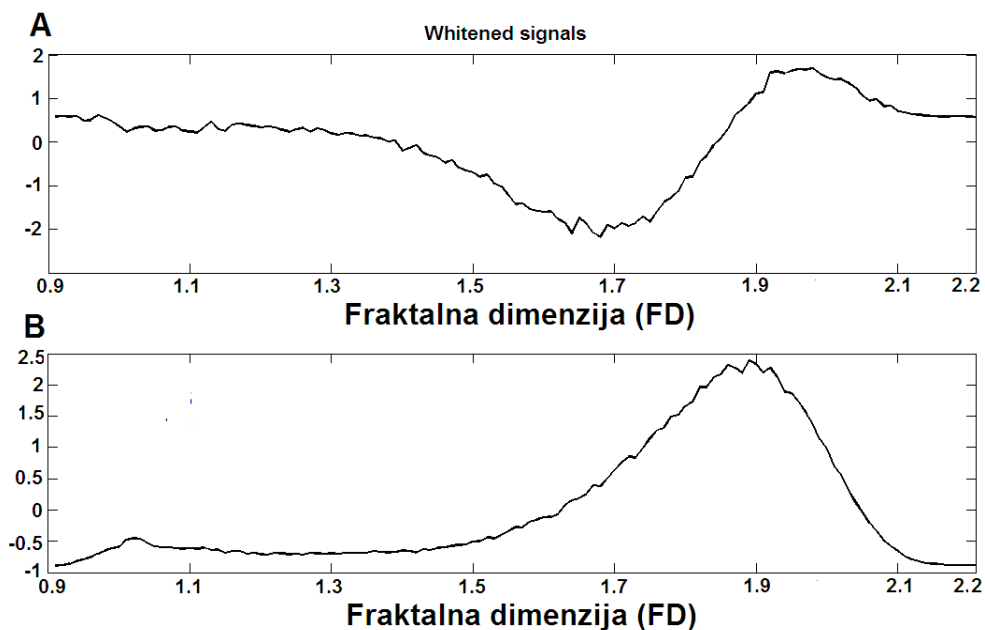


Slika 20. Izgled radnog prozora *FastICA* programa u MATLAB-u, korišćenog za potrebe analize nezavisnih komponentata (ICA).

5.4.2. Metoda glavnih komponentata – PCA

Jedna od najpopularnijih multivarijacionih statističkih tehnika jeste metoda glavnih komponentata (*eng. principal component analysis, PCA*). Metoda glavnih komponentata je klasična tehnika u složenoj statističkoj analizi koja omogućava redukciju i analizu podataka (*Bugli i Lambert 2006, Abdi i Williams 2010, Wang 2010b*). PCA metoda analizira podatke posmatranih fenomena preko nekoliko zavisnih promenljivih koje su međusobno korelisane. Osnovni cilj metode jeste da izvuče nove informacije iz skupa podataka i da ih predstavi preko novog skupa ortogonalnih promenljivih koje se označavaju kao glavne komponente (*Abdi i Williams 2010*). PCA maksimizuje varijansu podataka projektovanih duž ortogonalne ose projekcije (*Spasić i sar. 2011c*). Prva komponenta uključuje maksimum varijabilnosti podataka tj. što je to više moguće, a svaka naredna ortogonalna komponenta uključuje što je moguće više varijabilnosti preostalih podataka (*Spasić i sar. 2011c*). PCA je u elektrofiziologiji uspešno primenjena u redukciji dimenzionalnosti podataka kao korak koji prethodi ICA analizi (*Spasić i sar. 2011c*). Takođe, za potrebe ovih istraživanja PCA je korišćena za redukciju dimenzije u tzv.

procesu izbeljivanja (*eng. whitening*) (Slika 21). Proces izbeljivanja normalizuje varijansu posmatranih signala u cilju sjedinjavanja i redukovanja dimenzije podataka.

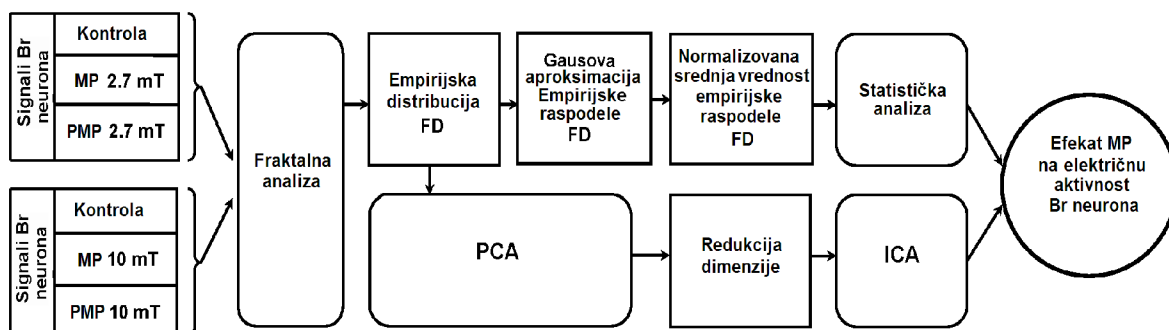


Slika 21. Primer signala dobijenih upotrebom metode glavnih komponentata (PCA) za redukciju dimenzije u kontrolnim uslovima ($n = 6$).

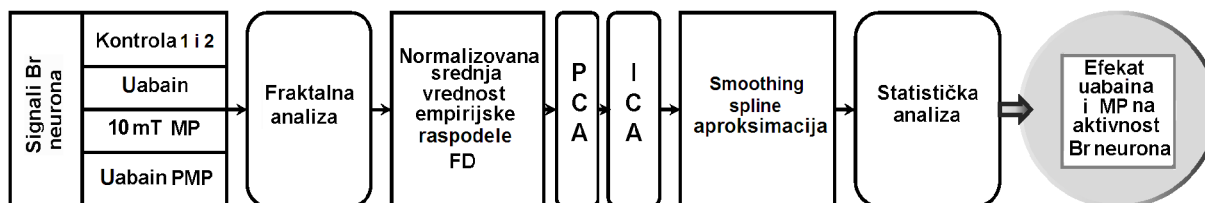
5.4.3. Neparametarske statističke metode

Razlike u normalizovanim srednjim vrednostima empirijske raspodele FD (oblik raspodele) pre, tokom i posle izlaganja Br neurona konstantnim magnetnim poljima 2,7 mT i 10 mT testirane su neparametarskim Kolmogorov-Smirnovim testom za dva nezavisna uzorka uz pomoć SPSS 13.0 softvera. Razlike između raspodela za sve eksperimentalne uslove testirane su unutar kao i između magnetnih polja 2,7 mT i 10 mT. Za potrebe drugog dela eksperimenata, razlike između vrednosti kumulativne funkcije raspodele, što je predstavljalo proporcionalno učešće AP, ISI i IBI komponentata (%) u normalizovanim srednjim vrednostima empirijske raspodele FD , su testirane neparametarskom Fridmanovim ANOVA testom i Vilkoksonovim testom za dva zavisna

uzorka. Kompletni pregled svih upotrebljenih tehnika u analizi signala i procedura njihove primene za dve grupe eksperimenata su prikazane na Slikama 22 i 23.



Slika 22. Šematski prikaz primenjenog modela u analizi signala za eksperimente pre, tokom i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 2,7 mT i 10 mT.



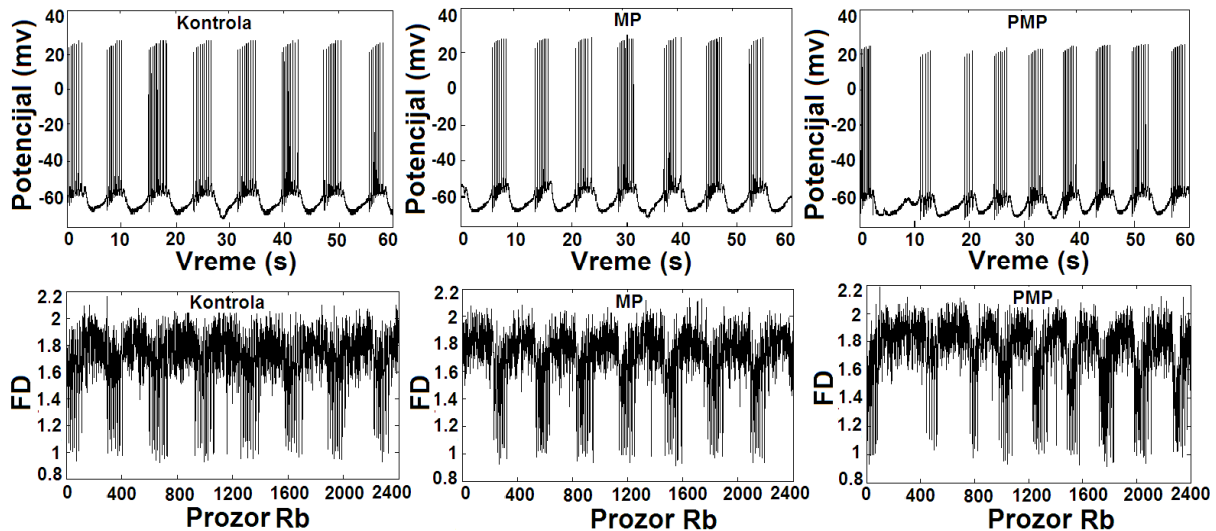
Slika 23. Šematski prikaz primenjenog modela u analizi signala za eksperimente sa uabainom pre i nakon delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT.

6. REZULTATI

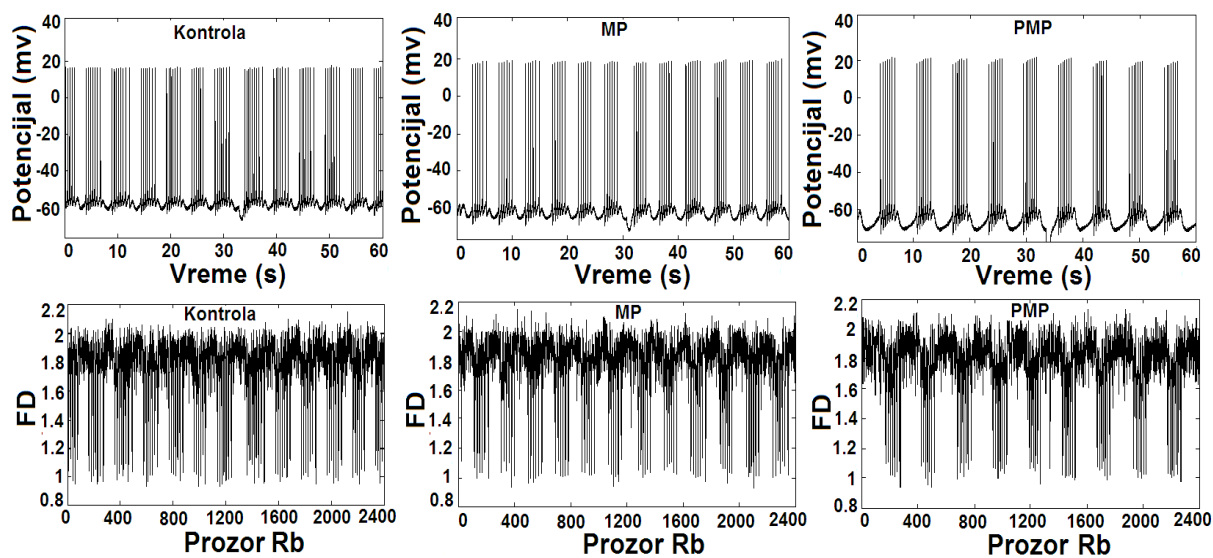
6.1. Higučijeva fraktalna dimenzija spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona puža

6.1.1. Higučijeva fraktalna dimenzija spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona pod uticajem magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT

Korišćenjem Higučijevog metoda, izračunate su fraktalne dimenzije za sledeće eksperimentalne uslove: pre, tokom i posle izlaganja magnetnom polju 2,7 mT (18 signala, 6 puževa) (Slika 24), i 10 mT (15 signala, 5 puževa) (Slika 25). Izračunavanje vrednosti fraktalnih dimenzija na celim signalima su prvi korak pre formiranja empirijskih raspodela *FD* i primene ICA metode.



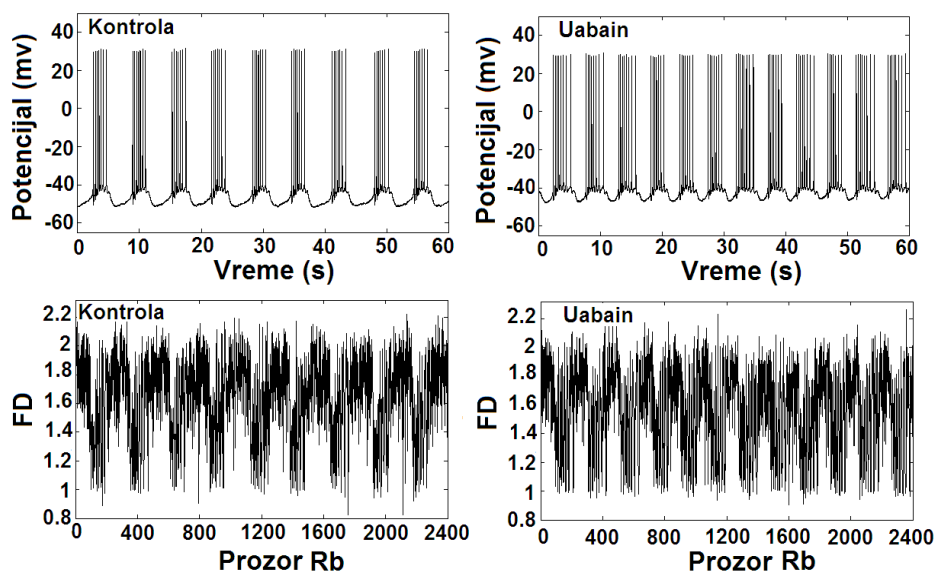
Slika 24. Tipična elektrofiziološka aktivnost jednog Br neurona okolodrelnog ganglijskog kompleksa vinogradskog puža (*H. pomatia*) (60 s epoha) i odgovarajuće vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije u kontroli (leva kolona), tokom (MP, srednja kolona) i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 2,7 mT (PMP, desna kolona).



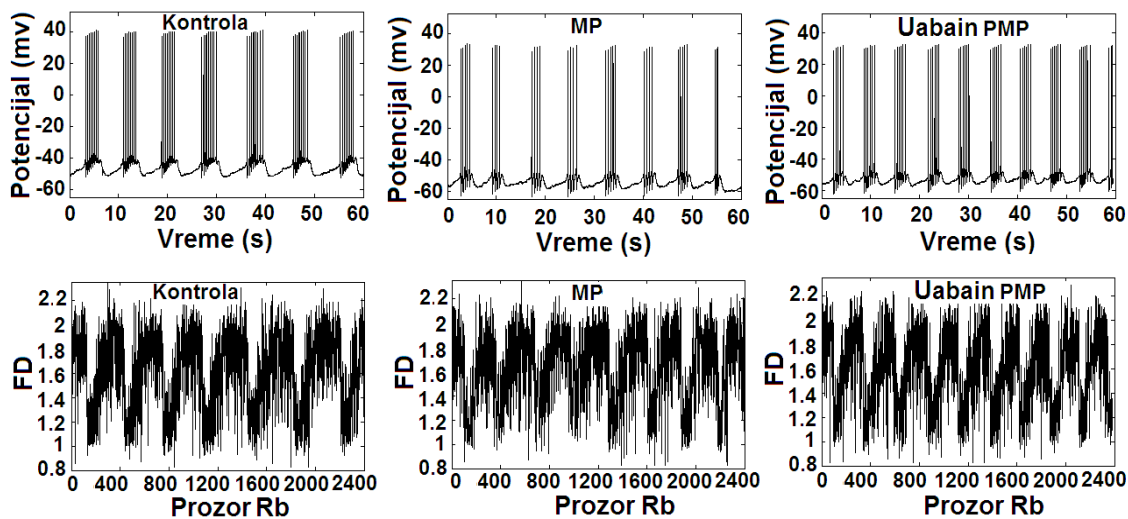
Slika 25. Tipična elektrofiziološka aktivnost jednog Br neurona okoždrelnog ganglijskog kompleksa vinogradskog puža (*H. pomatia*) (60 s epoha) i odgovarajuće vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije u kontroli (leva kolona), tokom (MP, srednja kolona) i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT (PMP, desna kolona).

6.1.2. Higučijeva fraktalna dimenzija bioelektrične aktivnosti Br neurona pod delovanjem uabaina i magnetnog polja indukcije 10 mT

Higučijeva fraktalna dimenzija za potrebe eksperimenata sa uabainom je izračunata pre i nakon dodavanja uabaina (14 signala, 7 puževa), kao i pre, tokom izlaganja magnetnom polju 10 mT, te nakon dodavanja uabaina (18 signala, 6 puževa). Rezultati dobijeni primenom Higučijevog metoda prikazani su na Slikama 26. i 27.



Slika 26. Tipična elektrofiziološka aktivnost jednog Br neurona okoždrelnog ganglijskog kompleksa vinogradskog puža (*H. pomatia*) (60 s epoha) i odgovarajuće vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije u kontroli (leva kolona), i nakon dodavanja kardijačnog glikozida uabaina (Uabain, desna kolona).

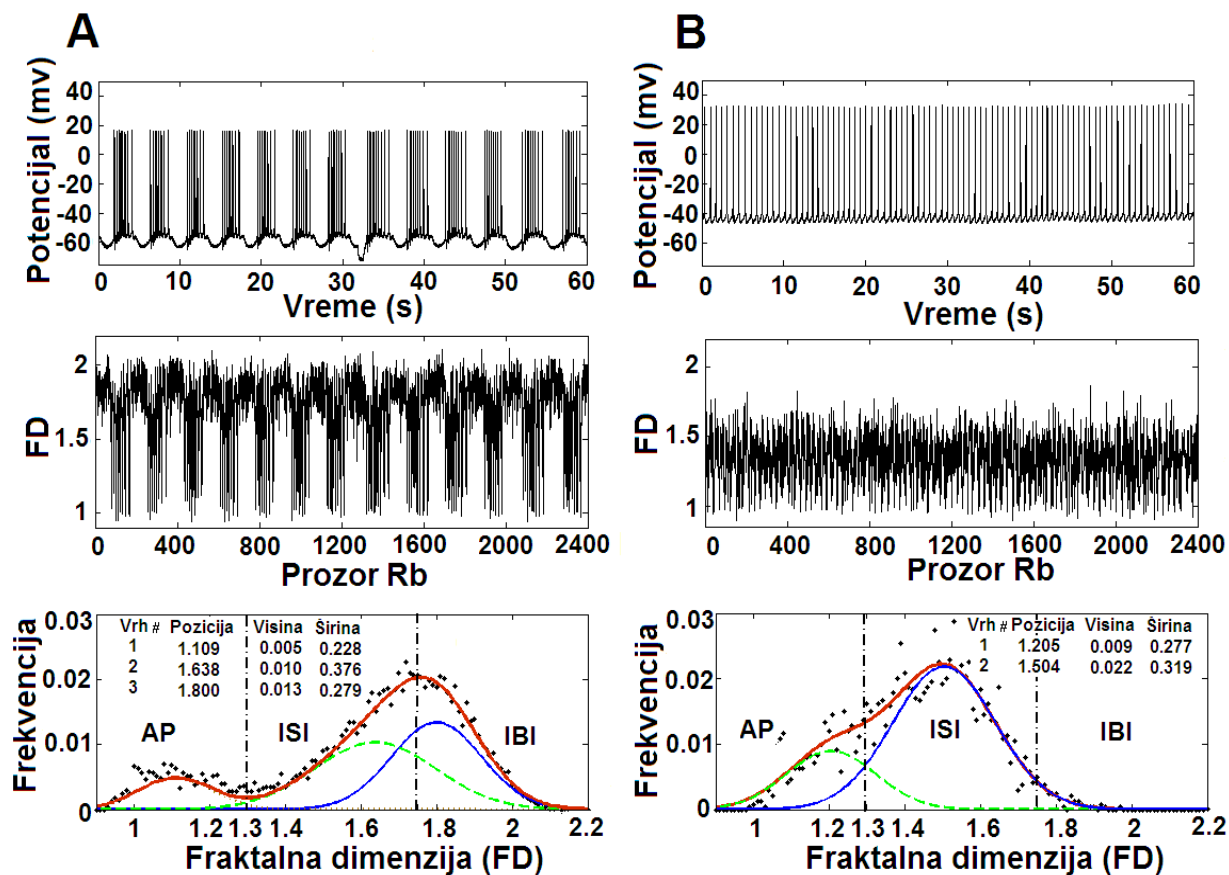


Slika 27. Tipična elektrofiziološka aktivnost jednog Br neurona okoždrelnog ganglijskog kompleksa vinogradskog puža (*H. pomatia*) (60 s epoha) i odgovarajuće vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije u kontroli (leva kolona), tokom izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT (MP, srednja kolona) i potom dodatog kardijačnog glikozida uabaina (Uabain PMP, desna kolona).

6.2. Razlaganje složene bioelektrične aktivnosti Br neurona na komponente uz pomoć Higučijeve fraktalne dimenzije

U cilju preciznog određivanja promena u kompleksnosti složene bioelektrične aktivnosti Br neurona nastalih delovanjem konstantnog magnetnog polja indukcije 2,7 mT, 10 mT i uabaina, prvo je neophodno precizno definisati AP, ISI i IBI komponente uz pomoć empirijske distribucije Higučijeve FD i aproksimacije Gausovim funkcijama. Za potrebe razlaganja (dekonvolucije) signala korišćen je 60 s kontrolni snimak aktivnosti Br neurona gde su uz pomoć empirijske distribucije FD i Gausovih funkcija izolovana tri vrha koja odgovaraju AP, ISI i IBI komponentama (Slika 28). Kao što se može videti na Slici 28A (poslednja slika) vrednosti $FD < 1,2$ karakterišu periode sa akcionim potencijalima u paketićima. Da bi se razdvojili periodi bez aktivnosti unutar paketića (ISI) od akcionih potencijala (AP), za granicu između njih uzeta je vrednost $FD = 1,3$ na mestu gde se seku dve Gausove funkcije. Granicu između ISI i tihog perioda između paketića (IBI) određena je približno na osnovu preseka druge dve Gausove funkcije za $FD = 1,75$. Na kraju procesa razlaganja komponentata utvrđene su sledeće granice u empirijskoj raspodeli fraktalne dimenzije: vrednosti FD u intervalu $[0,8, 1,3]$ pripadaju nastalim akcionim potencijalima, vrednosti u intervalu $[1,3, 1,75]$ odgovaraju ISI periodu dok interval $[1,75, 2,2]$ označava IBI aktivnost (Slika 28A).

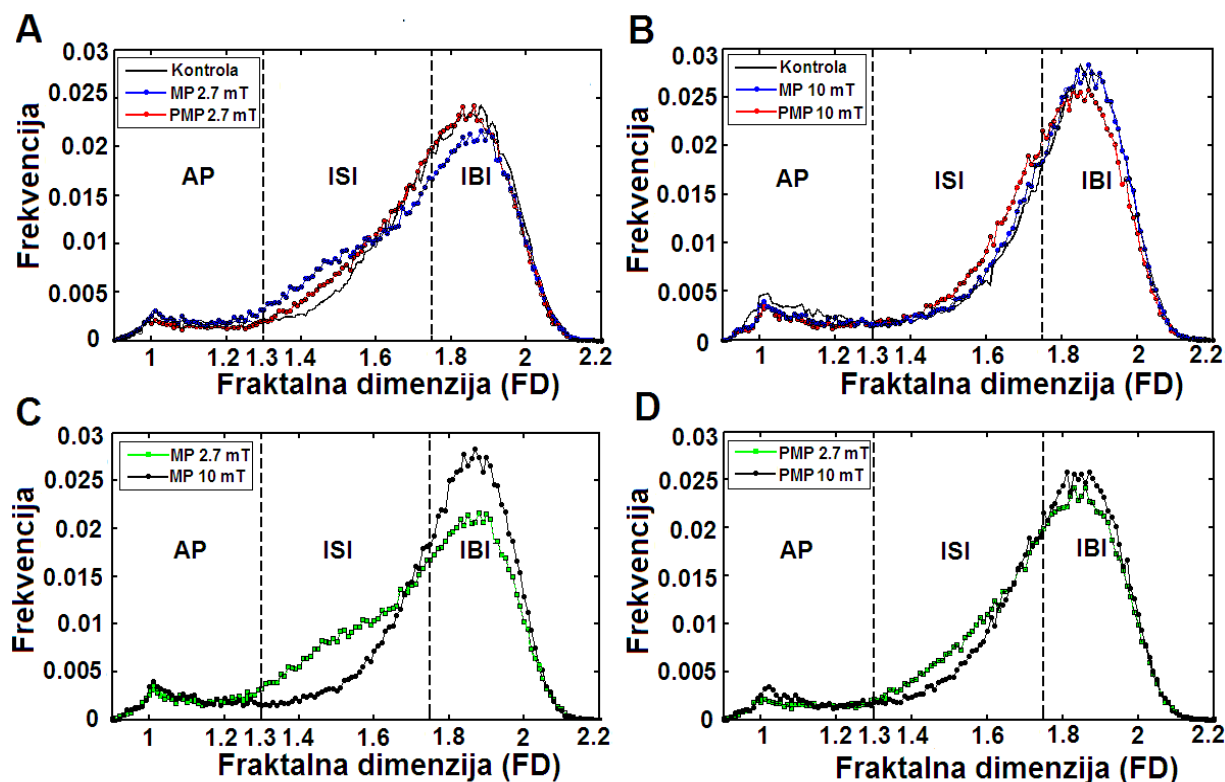
Sa druge strane, da bismo bili sigurni u ispravnost razlaganja AP, ISI i IBI komponentata aktivnosti Br neurona, dodatno je analizirana bioelektrična aktivnost Br neurona koju karakteriše postojanje AP i ISI, a bez IBI aktivnosti (Slika 28B). U ovom uslovu bilo je moguće izolovati samo dva Gausova vrha (dve funkcije) (Slika 28B, poslednja slika). Pozicija prvog vrha je iznosila $FD = 1,205$, a drugog $FD = 1,504$ što je potvrdilo ispravnost dodeljivanja FD intervala IBI komponenti. S obzirom da nije bilo IBI aktivnosti u signalu, istovremeno nije bilo izolovanog vrha u empirijskoj distribuciji FD . Donja granica za IBI segment u empirijskoj distribuciji FD je iznosila između 1,7 i 1,8 (Slika 28B, poslednja slika).



Slika 28. (A) Tipična spontana bioelektrična aktivnost Br neurona (60 s epoha) u kontrolnim uslovima, odgovarajuće vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije u vremenskom domenu, i normalizovana empirijska raspodela FD (od vrha ka dnu). (B) elektrofiziološka aktivnost Br neurona (60 s epoha) u kontrolnim uslovima bez “interburst” (IBI) perioda, odgovarajuće vrednosti Higučijeve fraktalne dimenzije, i normalizovana empirijska raspodela FD (od vrha ka dnu). Na donjem panelu su prikazani izolovani Gausovi vrhovi (pozicija, visina i širina vrha) u normalizovanoj empirijskoj raspodeli FD , dobijeni aproksimacijom Gausovim funkcijama.

6.3. Uticaj magnetnog polja na promenu kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona

Nakon formiranja normalizovanih srednjih empirijskih raspodela *FD* i razlaganja složene bioelektrične aktivnosti Br neurona, praćen je uticaj umereno jakog magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT na promene zastupljenosti AP, ISI i IBI komponenata u signalu. Formirane empirijske raspodele sa jasno utvrđenim granicama između komponenata, omogućile su testiranje razlika između normalizovanih srednjih vrednosti raspodela *FD* i izračunavanje procentualnog učešća AP, ISI i IBI za svaki eksperimentalni uslov. Statističko testiranje i vrednosti kumulativne funkcije raspodele su pokazali da unutar grupa izlaganih delovanju konstantnog magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT dolazi do promena u kompleksnosti spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona. Analize su pokazale da obe indukcije umereno jakog magnetnog polja utiču na promene zastupljenosti akcionih potencijala u paketićima (AP i ISI komponente) (Slika 29, Tabele 1, 2, 3). Slabije polje indukcije 2,7 mT dovodi do značajnih promena u ISI komponenti u signalu. Ono što se može zapaziti u empirijskoj raspodeli *FD* jeste statistički značajno smanjenje zastupljenosti ISI komponente u poređenju sa kontrolnim uslovima (Slika 29A, Tabele 1, 2, 3). Jače magnetno polje indukcije 10 mT svoj uticaj na aktivnost Br neurona ostvaruje prvenstveno delujući na značajnu promenu zastupljenosti AP komponente (Slika 29B, Tabela 1, 2, 3). Prikupljeni podaci govore u prilog tome da oba ispitivana magnetna polja ne menjaju značajno učešće IBI komponente spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona. Takođe, rezultati govore da je u periodu neposredno nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 2,7 mT i 10 mT (PMP) uticaj na promene kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona jasno vidljiv i postojan. Posebno, može se primetiti da magnetna polja sa slabijom i jačom magnetnom indukcijom, dovode do statistički značajnih promena u učešću AP komponente u normalizovanoj empirijskoj raspodeli *FD* (Slika 28A, B; Tabela 1, 2, 3).



Slika 29. (A) Normalizovana srednja vrednost empirijske raspodele FD u kontroli, tokom (MP) i posle izlaganja (PMP) konstantnom magnetnom polju indukcije 2,7 mT za šest puževa. (B) Normalizovana srednja vrednost empirijske raspodele FD u kontroli, tokom (MP) i posle izlaganja (PMP) konstantnom magnetnom polju indukcije 10 mT za pet puževa. (C) Poređenje između normalizovanih srednjih vrednosti empirijske raspodele FD tokom izlaganja konstantnom magnetnom polju indukcije 2,7 mT i 10 mT i (D) posle izlaganja navedenim indukcijama magnetnog polja.

Poređenjem normalizovanih srednjih vrednosti empirijske raspodele FD između magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT primećen je isti trend promena u AP intervalu kao i razlike u kompleksnosti ISI i IBI komponenata tokom izlaganja magnetnom polju (Slika 29C; Tabela 1, 2, 3). U poređenju sa slabijim, magnetno polje indukcije 10 mT dovodi do značajne redukcije zastupljenosti ISI komponente kao i do povećanja zastupljenosti IBI komponente u empirijskoj raspodeli. Posle izlaganja magnetnom polju,

promene u svim komponentama su sledile isti trend kao u toku delovanja MP osim činjenice da su bile manje izražene (Slika 29D; Tabele 1, 2, 3).

Tabela 1: Rezultati Kolmogorov-Smirnovog testa za dva nezavisna uzorka. Crvenim su označene p - vrednosti koje ukazuju na statistički značajne razlike među testiranim grupama.

Unutar grupa	2,7 mT			10 mT		
	AP	ISI	IBI	AP	ISI	IBI
p - vrednost						
Kontrola vs. MP	$p = 0,28$	$p = 0,03$	$p = 0,14$	$p = 0,02$	$p = 0,65$	$p > 0,99$
Kontrola vs. PMP	$p < 10^{-4}$	$p = 0,48$	$p > 0,99$	$p < 10^{-4}$	$p = 0,48$	$p = 0,33$
MP vs. PMP	$p < 10^{-4}$	$p = 0,48$	$p = 0,08$	$p = 0,28$	$p = 0,65$	$p = 0,22$
Između grupa	AP	ISI	IBI			
MP - 2,7 mT vs. 10 mT	$p = 0,59$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-3}$			
PMP - 2,7 mT vs. 10 mT	$p = 0,17$	$p = 0,22$	$p = 0,22$			

Tabela 2: Proporcionalno učešće (%) AP, ISI i IBI komponenata u normalizovanim srednjim vrednostima empirijske distribucije FD pre (Kontrola), tokom (MP) i posle izlaganja (PMP) konstantnom magnetnom polju indukcije 2,7 mT i 10 mT.

	2,7 mT			10 mT		
	AP	ISI	IBI	AP	ISI	IBI
Kontrola	7,33 %	36,78 %	55,89 %	10,29 %	27,09 %	62,62 %
MP	7,84 %	41,94 %	50,22 %	7,82 %	29,13 %	63,05 %
PMP	5,70 %	40,92 %	53,38 %	6,79 %	35,21 %	58,00 %

Tabela 3: Razlike u proporcionalnom učešću (%) AP, ISI i IBI komponenata u normalizovanim srednjim vrednostima empirijske distribucije *FD* pre (Kontrola), tokom (MP) i posle izlaganja (PMP) konstantnom magnetnom polju indukcije 2,7 mT i 10 mT.

	2,7 mT			10 mT		
	AP	ISI	IBI	AP	ISI	IBI
Kontrola - MP	-0,51 %	-5,16 %	5,67 %	2,47 %	-2,04 %	-0,43 %
Kontrola - PMP	1,63 %	-4,14 %	2,51 %	3,50 %	-8,12 %	4,62 %
MP - PMP	2,14 %	1,02 %	-3,16 %	1,03 %	-6,08 %	5,05 %

6.4. Uloga uabaina u promenama kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona pre i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT

Uloga uabaina u modulisanju kompleksnosti spontane bioelektrične aktivnosti ispitivana je uz pomoć tri eksperimentalne grupe na sledeći način: kontrolno registrovanje (Kontrola 1, $n = 4$), dodavanje uabaina neposredno nakon kontrolnog registrovanja (Uabain, $n = 4$), registrovanje pre (Kontrola 2, $n = 5$), tokom (MP 2, $n = 5$) kao i posle delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT (PMP 2, $n = 5$), i najzad registrovanje pre (Kontrola 3, $n = 5$), tokom delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT (MP 3, $n = 5$) i posle dodavanja uabaina (Uabain PMP). Osim aproksimacije Gausovim funkcijama kojim je omogućeno razdvajanje na komponente složene bioelektrične aktivnosti, sve vrednosti normalizovanih srednjih vrednosti empirijske distribucije *FD* aproksimirane su glatkim splajn funkcijama u cilju otklanjanja šuma iz signala. Izračunata su proporcionalna učešća (%) AP, ISI i IBI komponenata u normalizovanim srednjim vrednostima empirijske raspodele *FD*, a razlike među njima su potom statistički testirane. Statistička analiza proporcionalnog učešća (%) AP, ISI i IBI komponenata Vilkoksonovim testom za dva zavisna uzorka je pokazala razliku između Kontrole 1 i Uabaina u zastupljenosti AP ($Z = -5,418$, $p < 10^{-4}$), ISI ($Z = -5,841$, $p < 10^{-4}$) i IBI komponenata (Slika 30A, B).

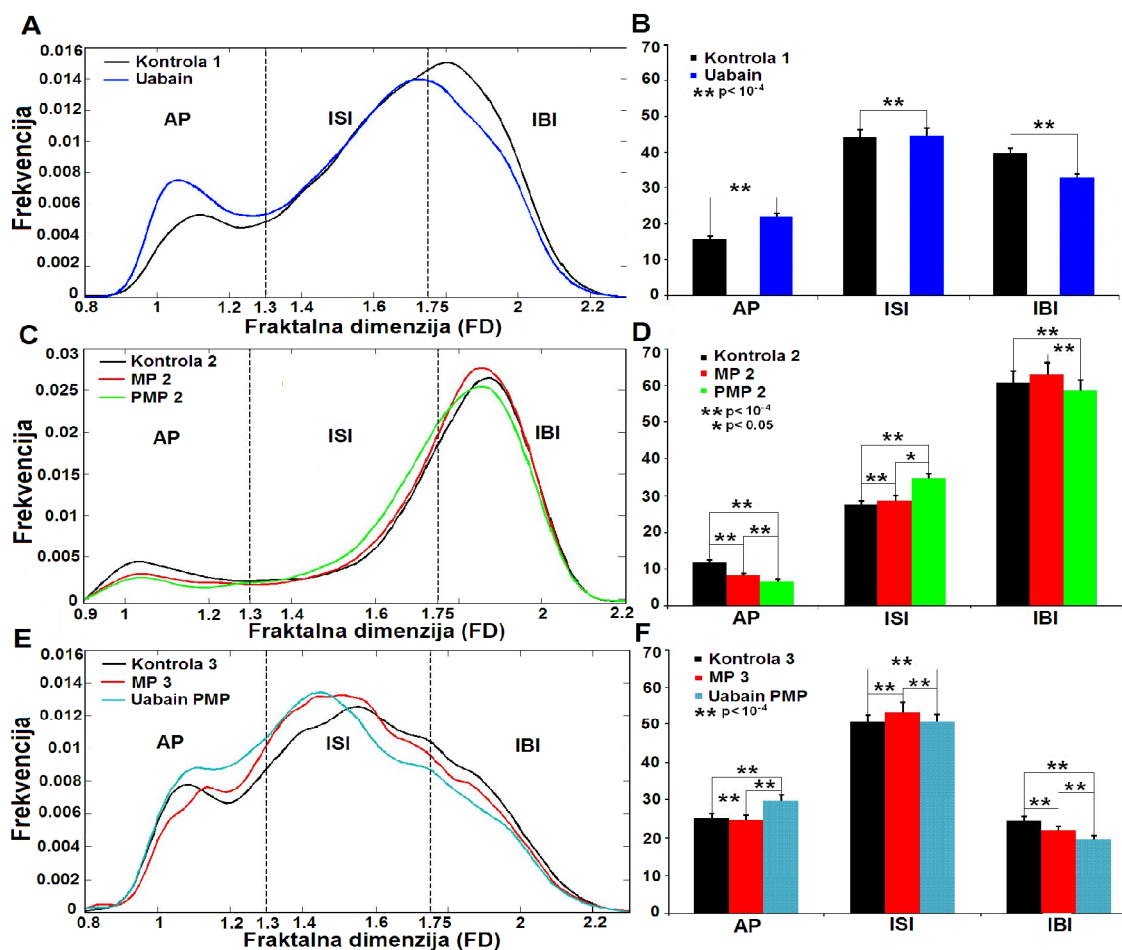
U drugoj eksperimentalnoj grupi dokazane su statističke razlike u AP komponenti između Kontrole 2 i MP 2 ($Z = -5,540, p < 10^{-4}$), Kontrole 2 i PMP 2 ($Z = -5,540, p < 10^{-4}$) kao i MP 2 i PMP 2 ($Z = -5,566, p < 10^{-4}$). U ISI komponenti dokazane su razlike između Kontrole 2 i MP 2 ($Z = -5,442, p < 10^{-4}$), Kontrole 2 i PMP 2 ($Z = -4,549, p < 10^{-4}$) i najzad između MP 2 i PMP 2 ($Z = -2,093, p = 0,036$) (Slika 30C, D). Statistički značajne razlike nije bilo između Kontrole 2 i MP 2 u IBI komponenti ($Z = -0,401, p = 0,689$), ali je postojala statistički značajna razlika između Kontrole 2 i PMP 2 ($Z = -4,792, p < 10^{-4}$) i MP 2 u odnosu na PMP 2 ($Z = -5,108, p < 10^{-4}$) (Slika 30C, D; Tabela 4).

U trećoj eksperimentalnoj grupi postojala je statistički značajna razlika u AP komponenti između Kontrole 3 i MP 3 ($Z = -4,996, p < 10^{-4}$), Kontrole 3 i Uabain PMP ($Z = -6,215, p < 10^{-4}$) i MP 3 u odnosu na Uabain PMP ($Z = -5,315, p < 10^{-4}$) kao i u ISI komponenti između Kontrole 3 i MP 3 ($Z = -5,774, p < 10^{-4}$), Kontrole 3 i Uabain PMP ($Z = -5,841, p < 10^{-4}$) i PMP 3 u odnosu na Uabain PMP ($Z = -5,841, p < 10^{-4}$). U procentualnom učešću IBI komponente dokazane su razlike između Kontrole 3 i MP 3 ($Z = -5,806, p < 10^{-4}$), Kontrole 3 i Uabain PMP ($Z = -6,451, p < 10^{-4}$) i MP 3 u odnosu na Uabain PMP ($Z = -6,433, p < 10^{-4}$) (Slika 30E, F, Tabela 4).

Normalizovana empirijska raspodela *FD* je pokazala da uabain u prvoj eksperimentalnoj grupi povećava učešće AP i ISI komponentata na račun smanjenja učešća IBI komponente. U drugoj eksperimentalnoj grupi, u poređenju sa kontrolnim uslovima, magnetno polje indukcije 10 mT redukuje zastupljenost AP, a povećava zastupljenost ISI komponente dok u PMP periodu zastupljenost AP se smanjuje uz dalje povećanje ISI i smanjenje zastupljenost IBI komponentata.

U okviru treće eksperimentalne grupe magnetno polje indukcije 10 mT smanjuje učešće AP, povećava učešće ISI i smanjuje učešće IBI komponentata u poređenju sa kontrolnim uslovom dok uabain nakon delovanja magnetnog polja povećava AP, ISI, a smanjuje IBI učešće. Poređenje MP 3 i Uabain PMP uslova pokazalo je značajno povećanje u učešću AP na račun smanjenja učešća u ISI i IBI komponentama. Kao što se može videti, uabain nakon izlaganja magnetnom polju u poređenju sa svojom kontrolom dovodi do manjeg povećanja učešća AP i smanjenja učešća IBI komponentata, što je

posledica delovanja magnetnog polja na bioelektričnu aktivnost Br neurona (Slika 30E, F; Tabela 4).



Slika 30. (A) Normalizovane srednje vrednosti empirijske raspodele *FD* prve grupe u kontroli (Kontrola 1), nakon dodavanja uabaina sa (B) odgovarajućim vrednostima kumulativne funkcije raspodele izražene u procentima (%). (C) Normalizovane srednje vrednosti empirijske raspodele *FD* u kontroli (Kontrola 2), tokom (MP 2) i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT (PMP 2) sa (D) odgovarajućim vrednostima kumulativne funkcije raspodele (%). (E) Normalizovane srednje vrednosti empirijske raspodele *FD* treće grupe u kontroli (Kontrola 3), tokom izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT (MP 3) nakon čega je dodan uabain (Uabain PMP) sa (F) pratećim vrednostima kumulativne funkcije raspodele (%).

Tabela 4: Proporcionalno učešće (%) AP, ISI, i IBI komponentata u normalizovanim srednjim empirijskim distribucijama *FD* za sve eksperimentalne uslove.

	AP	ISI	IBI
Kontrola 1	15,88 %	44,52 %	39,60 %
Uabain	22,04 %	44,92 %	33,04 %
Kontrola 2	11,69 %	27,35 %	60,96 %
MP 2	8,14 %	28,71 %	63,15 %
PMP 2	6,67 %	34,53 %	58,80 %
Kontrola 3	25,06 %	50,41 %	24,53 %
MP 3	24,61 %	53,47 %	21,92 %
Uabain PMP	29,73 %	50,53 %	19,74 %

6.5. Analiza nezavisnih komponentata spontane bioelektrične aktivnosti

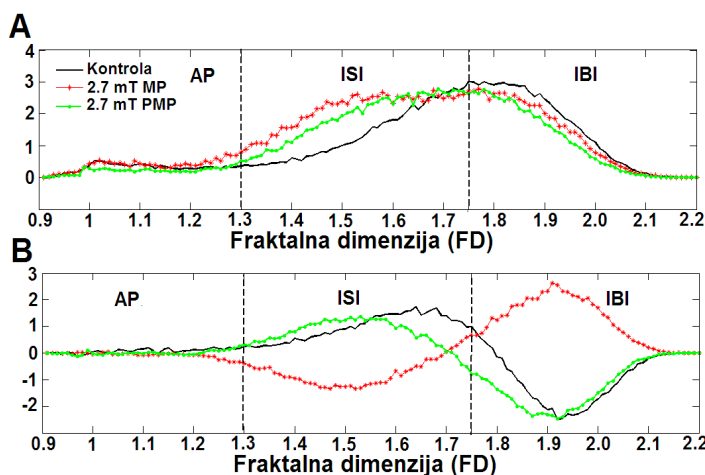
Br neurona puža

6.5.1. Uticaj magnetnog polja na spontanu bioelektričnu aktivnost Br neurona detektovan metodom nezavisnih komponentata

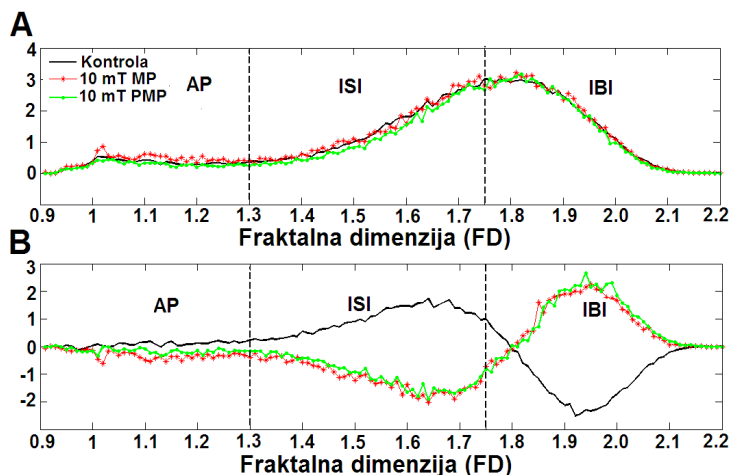
Analiza nezavisnih komponentata je izvedena upomoću *FastICA* algoritma za kontrolne uslove ($n = 11$), (zbog statističke prirode ICA metode dve kontrole su spojene u jednu grupu), tokom i posle izlaganja magnetnom polju indukcije 2,7 mT ($n = 6$) i 10 mT ($n = 5$). Argument koji opravdava korektnost spajanja kontrola, jeste u tome da se vrednosti rezultata ICA analize nakon spajanja svih kontrolnih životinja ne razlikuju od npr. rezultata dobijenih samo testiranjem kontrolne grupe za eksperimente sa magnetnim poljem indukcije 2,7 mT (*Spasić i sa. 2011c*), Pojam komponenta nastao kao rezultat primene ICA metode ne treba mešati sa AP, ISI i IBI komponentama bioelektrične aktivnosti Br neurona. Zbog toga će se u nastavku ovog poglavlja AP, ISI i IBI komponente označavati kao AP, ISI i IBI segmenti signala. Metoda je testirana na većem

broju kontrolnih životinja kako bi se dokazala njena efikasnost. Nakon primene *FastICA* algoritma izdvojene su dve nezavisne ICA komponente za svaki eksperimentalni uslov (prva i druga komponenta) (Slika 31 i Slika 32). Efekat slabijeg magnetnog polja indukcije 2,7 mT na bioelektričnu aktivnost Br neurona je reverzibilan što se može videti ako se posmatra druga ICA komponenta (Slika 31B), dok jače magnetno polje indukcije 10 mT dovodi do trajnih promena u fraktalnoj kompleksnosti signala (Slika 32B). Tokom delovanja slabijeg polja vidljive su razlike u odnosu na kontrolne uslove i period neposredno nakon prestanka delovanja polja koje su posebno izražene u ISI i IBI segmentu signala. Razlike između kontrole, magnetnog polja i perioda posle izlaganja magnetnom polju primetne su u ISI i IBI segmentima prve ICA komponente (Slika 31A), ali u sva tri uslova slede isti smer tako da se prva komponenta može označiti kao komponenta plastičnosti za razliku od druge komponente koja pokazuje reverzibilnost tj. elastičnost (Slika 31B) (*Spasić i sar.* 2011).

Međutim kada je prisutno jače magnetno polje indukcije 10 mT i prva (Slika 32A) i druga ICA komponenta (Slika 32B) tokom i nakon delovanja polja pokazuju ireverzibilan tok promena bez elastičnosti, gde se obe komponente mogu označiti kao komponente plastičnosti. Promene nakon delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT u drugoj ICA komponenti (Slika 32B) dešavaju se u sva tri segmenta signala AP, ISI i IBI što govori o proporcionalnosti uticaja shodno primenjenoj magnetnoj indukciji.



Slika 31. (A) Prva i (B) druga nezavisna komponenta pre, tokom i nakon delovanja magnetnog polja indukcije 2,7 mT.

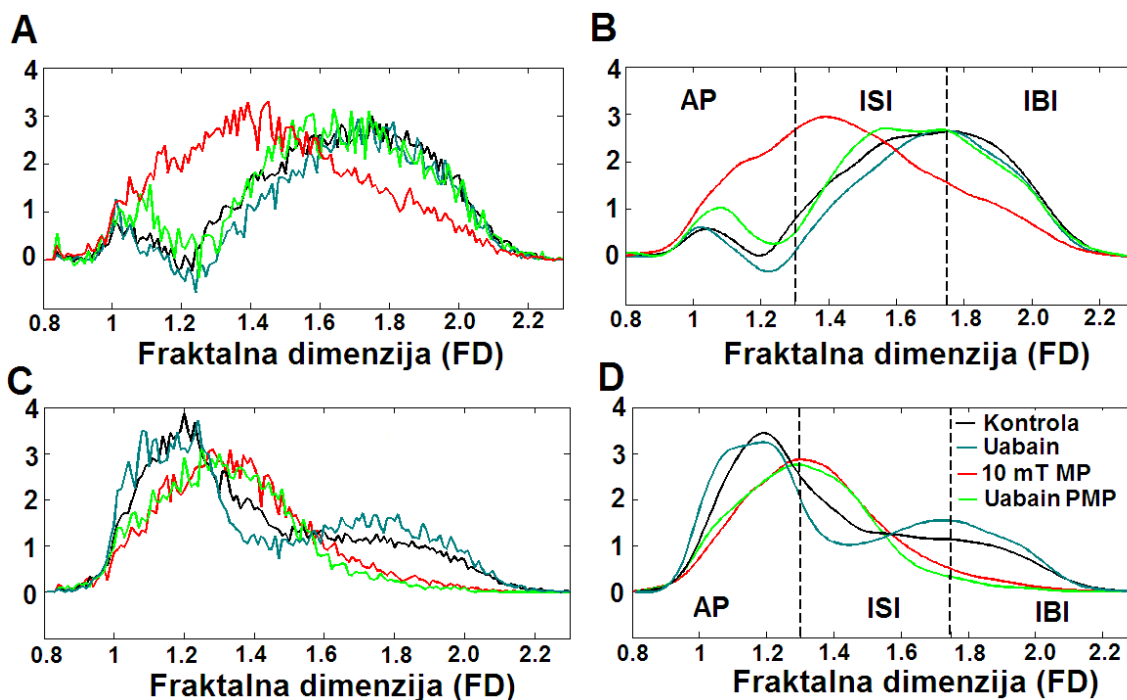


Slika 32. (A) Prva i (B) druga nezavisna komponenta pre, tokom i nakon delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT.

6.5.2. Uticaj uabaina i magnetnog polja na bioelektričnu aktivnost Br neurona detektovan metodom nezavisnih komponenata

Analiza nezavisnih komponenata je urađena je na trinaest kontrolnih signala ($n = 13$), nakon dodavanja uabaina ($n = 7$), tokom delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT ($n = 6$) kao i u uslovima uabaina nakon izlaganja magnetnom polju ($n = 6$). Prikazani su rezultati ICA analize pre (Slika 33A, C) i nakon aproksimacije glatkom splajn funkcijom (Slika 33B, D). Izdvojene su po dve nezavisne ICA komponente za sve eksperimentalne uslove (Slika 33). Prva ICA komponenta ukazuje da magnetno polje indukcije 10 mT deluje na bioelektričnu aktivnost Br neurona suprotno kontroli, uabainu i uabainu nakon delovanja magnetnog polja u AP, ISI i IBI segmentima signala (Slika 33B) što je u saglasnosti sa efektom magnetnog polja iz prethodnih eksperimenata (Slika 32B). Druga ICA komponenta pokazuje da je takođe u uslovu uabaina nakon delovanja magnetnog polja (Uabain PMP) aktivnost neurona izmenjena i da sledi promene nastale delovanjem magnetnog polja (Slika 33D), nasuprot kontroli i uabainu. Iz svega iznetog se mogu doneti dva zaključka: prva ICA komponenta sugerise da je intenzitet primenjenog magnetnog polja dovoljan da promeni normalnu bioelektričnu aktivnost Br neurona, a druga komponenta pokazuje da je modulisanje spontane bioelektrične aktivnosti uabainom

izmenjeno nakon delovanja magnetnog polja. Dakle i ICA metoda razotkriva na sličan način ono što se moglo zaključiti iz normalizovanih empirijskih raspodela FD , što ide u prilog analitičkoj snazi zajedničke upotrebe obe metode u analizi signala.



Slika 33. Prva nezavisna komponenta (A) pre i (B) nakon aproksimacije glatkim splajnom za kontrolu, uabain, magnetno polje indukcije 10 mT i uabain PMP kao i druga nezavisna komponenta (C) pre i (D) nakon aproksimacije za iste eksperimentalne uslove.

7. DISKUSIJA

7.1. Higučijeva fraktalna dimenzija kao nov i efikasan metod za razdvajanje komponenata spontane bioelektrične aktivnosti neurona

Izračunavanje fraktalne dimenzije je relativno jednostavno i efikasno jer se prilikom analize u programu može učitati ceo signal ili deo signala pri čemu se dobija srednja vrednost i standardna devijacija fraktalne dimenzije. Na taj način se veoma lako mogu utvrditi varijacije u signalima biološkog porekla (*Spasić i sar. 2008, 2011, Klonowski i sar. 2006, Raghavendra i Narayana - Dutt 2009, 2010*). Higučijeva fraktalna dimenzija se može koristiti samostalno u analizi signala, ali i zajedno sa drugim matematičkim i statističkim pristupima u analizi, što je potvrđeno u ovim i drugim istraživanjima. Kao što je već navedeno veliki broj procesa u živim organizmima pa tako i u nervnom sistemu puževa, je po svojoj prirodi visoko nestacionarna (*Eke i sar, 2002, Schütt i sar. 2002, Mendoza-Angeles i sar. 2007*). S obzirom na nelinearnost i nestacionarnost signala dobijenog registrovanjem neuronske aktivnosti jednog neurona, metode nelinearne dinamike mogu da pruže tačnu informaciju u pogledu onoga što se dešava tokom fiziološke i patološke električne aktivnosti neurona (*Rabinovich i Abarbanel 1998, Herz i sar. 2006, Rabinovich 2006, Remme i sar. 2009, Lu i sar. 2011, Rinzel i Huguet 2013*). Takođe, stvaranje akcionih potencijala u paketićima (bursting aktivnost) se može smatrati procesom sa mnoštvom vremenski zavisnih dinamičkih elemenata čija je priroda nelinearna (*Rinzel i Huguet 2013*) što opravdava i primenu Higučijeve fraktalne analize u ovim istraživanjima. U takvim slučajevima nelinearna analiza i razvijene statističke metode imaju prednost nad klasičnim linearnim metodama u analizama fizioloških signala. U radovima *Klonowski i sar, 2006, 2010, Klonowski 2009, 2011, Spasić i sar, 2008, 2011c, Raghavendra i Narayana – Dutt 2009, 2010, Hinrikus i sar, 2011*, pokazano je da Higučijeva fraktalna dimenzija, uz određene modifikacije, predstavlja podjednako dobru meru u karakterizaciji signala biološkog porekla u vremenskom domenu, bilo da su oni po svojoj prirodi stacionarni ili ne. Stoga, primena

Higučijeve fraktalne dimenzije za potrebe kvantifikacije dinamičke i u vremenu promenljive bioelektrične aktivnosti Br neurona u predstavljenim istraživanjima, ima veliku prednost u odnosu nelinearne metode kao što je analiza pomoću talasića i Furijeove transformacije kada se radi o preciznosti i vremenu neophodnom za analizu signala.

U svakodnevnoj naučnoj praksi, postoji izražena potreba za razdvajanjem komponenata koje čine jedan elektrofiziološki signal. Postoji veliki broj softverskih paketa koji omogućavaju “offline” analizu parametara bioelektrične aktivnosti neurona. Međutim s obzirom da je neophodno vreme da bi se izdvojili paketići sa akcionim potencijalima od perioda neaktivnosti neurona kao i intervali između svakog AP, postoji stalna potreba za rešenjima koji smanjuju brzinu razdvajanja komponenata, a podjednako su efikasna. U ovim istraživanjima pokazali smo da je jedan takav način primena Higučijeve fraktalne dimenzije u razdvajanju komponenata spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona (Slika 28). Upotrebom fraktalne dimenzije ne samo da se postiže brzo razdvajanje AP, ISI i IBI komponenata nego se istovremeno analiziraju i promene kompleksnosti signala na način na koji se postiže maksimalna preciznost s obzirom na tačnost metode u kvantifikaciji različitih formi signala. Može se slobodno reći da se fraktalnom dimenzijom podjednako tretiraju svi delovi signala uprkos njihovim različitim statističkim osobinama i biološkom značenju. Do sada se u klasičnoj analizi bioelektrične aktivnosti neurona, period bez aktivnosti između svakog paketića (IBI) određivao samo preko parametra trajanja. Međutim Higučijeva fraktalna dimenzija opisuje složenu, promenljivu aktivnost ovog perioda na isti način kao i varijacije u akcionim potencijalima u paketićima. Isto se može reći i za period između svakog nastalog akcionog potencijala u paketiću (ISI) koji je na ovaj način opisan.

Prvi pokušaj da se uz pomoć Higučijeve fraktalne dimenzije razdvoje neke od komponenata bioelektrične aktivnosti Br neurona jeste u istraživanjima koja su sprovedi *Spasić i sar. (2011c)*. U tom istraživanju su po prvi put razdvojeni paketići akcionih potencijala od tihih perioda između njih (IBI), ali bez jasno preciziranih granica između AP i ISI komponenata. Međutim ova istraživanja su po prvi put omogućila razdvajanje svih komponenata bioelektrične aktivnosti Br neurona. Dakle uz pomoć normalizovanih srednjih empirijskih distribucija *FD* i njihove aproksimacije Gausovim krivim, uspešno su

razdvojene AP, ISI i IBI komponente spontane bioelektrične aktivnosti (Slika 28). Koliko je do sada poznato, ovo je prva uspešna primena Higučijeve fraktalne dimenzije kao metode za razdvajanje različitih komponenta bilo kojeg spontano aktivnog neurona. Stoga, veliki deo ovih istraživanja predstavljaju metodološki doprinos analizi spontane bioelektrične aktivnosti bez obzira da li je poreklom iz beskičmenjaka ili kičmenjaka. Takođe u ovim istraživanjima je po prvi put urađena jednostavna, ali efikasna transformacija već primenjenih empirijskih raspodela (*Spasić i sar. 2011c*) u normalizovane srednje empirijske raspodele kojima je dalje omogućen proces “dekonvolucije” signala. U cilju implementacije i primene navedenog metodološkog pristupa, ali i saznavanja novih činjenica vezanih za uticaj magnetnog polja i uabaina na aktivnost Br neurona, ispitivan je uticaj magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT kao i inhibitora Na^+/K^+ pumpe bez i u prisustvu magnetnog polja indukcije 10 mT. Takođe, razdvajanje i definisanje intervala koji čine spontanu bioelektričnu aktivnost, pomoglo je i u opisivanju rezultata dobijenih analizom nezavisnih komponenta (Slike 31, 32, 33). Dakle, u pitanju je još jedan metodološki doprinos razdvajanja komponenta složene bioelektrične aktivnosti primenom Higučijeve fraktalne dimenzije kao preprocesirajuće tehnike za primenu ICA metode u elektrofiziologiji.

7.2. Spontana bioelektrična aktivnost neurona u fiziološkim i patološkim stanjima

Neuroni beskičmenjaka su se pokazali kao dobar model za razumevanje načina na koji funkcioniše centralni nervni sistem kičmenjaka u fiziološkim i patološkim stanjima, jer su veoma pristupačni za eksperimentisanje i istraživanje osnovnih mehanizama koji se nalaze u osnovi nadražljivosti (*Lewis i sar. 1986*). Tako je i Br neuron svojom veličinom, pristupačnošću i stalnošću sinaptičkih veza idealan model sistem za proučavanje nastanka, održavanja i modulisanja spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona. Spontana bioelektrična aktivnost se javlja kod velikog broja neuronskih mreža, a jako se malo zna o njenom poreklu i funkcionalnoj ulozi (*Mazzoni i sar. 2007*). Prvo je opisana kod beskičmenjaka (*Alving 1968*) da bi se u poslednjih par desetina godina otkrila i opisala

uloga koju spontana aktivnost ima kod kičmenjaka i čoveka. Pojava spontane bioelektrične aktivnosti neurona bez prisustva sinaptičke transmisije rezultat je biofizičkih svojstava membrane (*Llinas 1988*), a njen značaj se ogleda u transformaciji sinaptičkih ulaza u “šiljak” izlaz čime se postiže plastičnost kao i visoka preciznost u prenosu informacija unutar i između neuronskih mreža (*Hausser i Clark 1997, Hausser i saradnici 2004*). Spontana aktivnost mnogih neuronskih regiona beskičmenjaka i kičmenjaka je evolutivno očuvana (*Yamamoto i López-Bendito, 2012*). Spontana bioelektrična aktivnost dve potpuno različite neuronske mreže u intaktnoj gangliji pijavice i disociranoj hipokampalnoj kulturi neurona pacova pokazuje niz zajedničkih svojstava (*Mazzoni i sar. 2007*). Navedene činjenice svakako idu u prilog istraživanjima koja se odvijaju na neuronima beskičmenjaka jer omogućavaju sagledavanje istih ili sličnih puteva nastanka i promena u funkcionisanju spontane bioelektrične aktivnosti kod kičmenjaka i čoveka. Fiziološki mehanizmi koji stvaraju i modulišu akcione potencijale u paketićima kod beskičmenjaka i kičmenjaka, prisutni su u neuronima centralnog nervnog sistema (CNS) gde mogu da učestvuju u pojavi abnormalne ritmične aktivnosti, što ima za posledicu pojavu epilepsije (*Lewis i sar, 1986, McCormick, 2002*) kao i velikog broja drugih neuroloških i psihijatrijskih oboljenja (*Llinas 2005*).

U ovim istraživanjima cilj je bio da se prouči uticaj konstantnog magnetnog polja umerene indukcije, kao faktora zagađenja životne sredine, na promene bioelektrične aktivnosti Br neurona kako bi se što bolje sagledali štetni ili pozitivni efekti na zdravlje ljudi i životinja. Svakako, prvi doprinos naših istraživanja spontane bioelektrične aktivnosti leži u iznalaženju dobrog analitičkog aparata kojim se postiže kako razdvajanje komponenata tako i praćenje njihovih promena u fiziološkim i patološkim stanjima.

7.3. Uticaj magnetnog polja na promene fraktalne kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona

Konstantno magnetno polje umerene indukcije od nekoliko mT utiče na aktivnost pojedinačnih neurona, čitavih grupa neurona i drugih ćelija organizma menjajući njihova svojstva i aktivnost (*Fuller i sar. 1995, McLean i sar. 1995, Todorović i sar. 2007, Ye i*

sar. 2004, 2008, Nikolić i sar. 2008, 2012). Rezultati naših istraživanja govore u prilog tome s obzirom da ispitivano konstantno magnetno polje indukcije 2,7 mT i 10 mT dovodi do promena u zastupljenosti akcionih potencijala u paketićima (AP), kao i intervala koji razdvajaju akcione potencijale (ISI) u normalizovanim srednjim empirijskim raspodelama *FD* (Slika 29). Slabije polje indukcije 2,7 mT povećava učešće ISI komponente, dok jače polje indukcije 10 mT smanjuje učešće AP, uz povećanje učešća ISI komponente u normalizovanim empirijskim raspodelama *FD*. Nijedna od istraživanih magnetnih indukcija ne menja značajno zastupljenost IBI komponent. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ispitivanim promenama parametara bioelektrične aktivnosti Br neurona vinogradskog puža (*Helix pomatia*) u studiji koju su sprovedi Nikolić i sar. (2008). U navedenoj studiji slabije magnetno polje indukcije 2,7 mT uslovalo je povećanje amplitude akcionih potencijala, kao i trajanje akcionih potencijala u paketićima, dok je jače polje indukcije 10 mT uslovalo povećanje hiperpolarizacije i amplitude akcionih potencijala uz istovremeno smanjenje frekvencije i trajanja. Dakle, radi se o proporcionalnom uticaju, shodno primenjenom indukciji magnetnog polja, što je slučaj i kod predstavljenih istraživanja u ovom radu. Postoje i slični eksperimentalni dokazi o inhibitornom uticaju magnetnog polja indukcije 10 mT na neurone sisara u kulturi ćelija (McLean i sar. 1995). Slabo konstantno magnetno polje smanjuje prag nadražljivosti nervnih vlakana tokom ekstraćelijskog registrovanja (Novikov i sar. 2008). Promenljivo magnetno polje 50 Hz slabije indukcije u rasponu od 2,83 μT do 207,2 μT takođe pokazuje inhibitorni uticaj na frekvenciju akcionih potencijala u F1 neuronima vinogradskog puža (*Helix aspera*). Konstantno magnetno polje indukcije od 2 do 3 mT moduliše sinaptičku ekscitabilnost hipokampalnih ćelija u slajs preparatima (Wieraszko 2000). Nakon dodavanja dantrolena, unutarćelijskog blokatora Ca^{2+} kanala, uticaj magnetnog polja je bio blokiran. Trabulsi i sar. (1996) su otkrili da magnetno polje indukcije od 2 do 3 mT uzrokuje malu depresiju nakon koje je sledilo pojačanje broja evociranih potencijala snimljenih iz hipokampalnih slajseva. Jače polje indukcije 10 mT inhibiralo je ove potencijale. Autori su pretpostavili da se navedeni fenomen može povezati sa unutarćelijskim promenama u koncentraciji Ca^{2+} jona. Umereno magnetno polje indukcije veće od 125 mT menja kinetiku voltažno zavisnih Na^{+} kanala u GH3 ćelijama zbog promena u orijentaciji diamagnetnih

anizotropnih molekula u membranama (Rosen 2003b), dok magnetno polje indukcije 120 mT inhibira aktivaciju Ca^{2+} kanala (Rosen 1996). Konstantno magnetno polje velike indukcije moduliše ritmičku aktivnost velikog broja interneurona u antenalnom lobusu voćne mušice (*lat. drosophila melanogaster*) (Yang i sar. 2011). Istraživanja uticaja magnetnog polja na aktivnost neurona puža posebno su interesantna ako se uzme u obzir činjenica da je ponašanje pojedinačnih neurona puža (*Helix aspera*) tokom izlaganja konstantnom magnetnom polju od 3 mT do 0,7 T kao i promeljivom magnetnom polju od 1 mT do 15 mT, skoro istovetno ponašanju mozga sisara i ljudi tokom magnetne stimulacije sa pulsirajućim magnetnim poljem indukcije od 0,3 mT do 2.4 T (Azanza i Calvo 2000).

7.4. Uloga uabaina u modulaciji fraktalne kompleksnosti bioelektrične aktivnosti Br neurona

S obzirom na ranije dokaze da je uticaj jačeg magnetnog polja indukcije 10 mT posredovan povećanom aktivnošću Na^+/K^+ pumpe, izražen kao magnituda uticaja uabaina izmerenog preko parametara bioelektrične aktivnosti (Nikolić i sar. 2012), u eksperimentalni dizajn za praćenje promena kompleksnosti AP, ISI I IBI komponenata uveden je uabain pre i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT (Slika 30). Takođe, iz navednih istraživanja, kao i iz studije Nikolić i sar. (2008), vidi se da jače magnetno polje indukcije 10 mT za razliku od polja indukcije 2,7 mT može da promeni kompleksnost signala, kao i sve bioelektrične parametre akcionih potencijala u paketićima i pratećim ISI komponentama. Iz navedenih razloga je za eksperimente sa uabainom, inhibitotom Na^+/K^+ pumpe, primenjeno samo polje indukcije 10 mT.

U radu je istraživanjem uticaja uabaina na spontanu bioelektričnu aktivnost Br neurona pre i nakon delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT, demonstrirana upotreba normalizovanih srednjih vrednosti empirijske raspodele *FD* kao senzitivnog, brzog i pouzdanog metoda za otkrivanje promena u zastupljenosti AP, ISI i IBI komponenata. U cilju isključivanja kasnog uticaja MP na aktivnost Br neurona i pripisivanja promena delovanju uabaina nakon izlaganja magnetnom polju, korišćeni su jednogminutni snimci pre, tokom i nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT.

Kao što se može videti iz priloženih rezultata (Slika 30), uabain dodat u komoricu za registrovanje aktivnosti Br neurona nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT u odnosu na uabain dodat nakon kontrolnog snimanja, uslovljava manji porast učešća AP kao i manji porast učešća IBI komponenata u normalizovanim srednjim vrednostima empirijske raspodele *FD*. Uabain i magnetno polje indukcije 10 mT imaju suprotan uticaj na zastupljenosti AP, ISI i IBI komponenata u normalizovanim srednjim vrednostima empirijske raspodele *FD* (Slika 30), što se moglo očekivati s obzirom da MP povećava aktivnost dok uabain inhibira aktivnost Na^+/K^+ pumpe (Nikolić i sar. 2012). Uabain i uabain posle delovanja magnetnog polja uzrokuju isti trend promena zastupljenosti AP, ISI i IBI komponenata u normalizovanim srednjim vrednostima empirijske raspodele *FD* u odnosu na kontrolne uslove (Slika 30). Promene u kompleksnosti signala tj. zastupljenosti komponenata u PMP periodu su bile u suprotnosti od promena nastalih delovanjem uabaina pre i nakon delovanja magnetnog polja (Slika 30). Stoga, uticaj uabaina na spontanu bioelektričnu aktivnost Br neurona nije posledica prolongiranog delovanja magnetnog polja.

Uabain se jako dugo primenjuje kao lek za različite bolesti srca, kao što je angina pectoris (*lat. angina pectoris*) i srčani udar (Fürstenwerth 2010). S obzirom da je uticaj uabaina na ćelije srca verovatno izmenjen pod dejstvom magnetnog polja određene indukcije, kao što naša istraživanja pokazuju da je to slučaj sa neuronima, ljudi koji koriste uabain kao lek trebalo bi da pripaze na izvore magnetnog zagađenja u životnoj sredini, jer pored promena u funkcionisanju nervnog sistema sve je više dokaza o uticaju magnetnog polja na kardiovaskularni sistem. Konstantno magnetno polje indukcije 5,5 mT i 12 mT mogu da utiču na farmakološku modulaciju krvnog pritiska kod zečeva i pacova (Okano i Ohkubo 2005, 2007). Sugestija mnogih studija jeste da konstantno i promenljivo magnetno polje mogu povoljno uticati na određena klinička stanja (Sandor i sar. 2007, Wang i sar. 2010a), međutim, nisu nam sasvim jasni mehanizmi kojima se ostvaruje to delovanje. Tako npr. konstantno magnetno polje može da reprodukuje efekat potencijalnog leka za Parkinsonovu bolest pod nazivom ZM241385 (Wang i sar. 2010a).

Smanjena aktivnost Na^+/K^+ pumpe dovodi do pojave različitih patologija u kardiocitama kao što je ishemija, hipertrofija, reperfuzija (Fuller 2013). Smanjena

aktivnost Na^+/K^+ pumpe u proksimalnim tubularnim ćeljama bubrega čoveka dovodi do pojave hipertenzije (*Holthouser i sar. 2010*). Specifične mutacije gradivnih subjedinica Na^+/K^+ pumpe dovode do pojave niza neuroloških poremećaja kao što su migrena, distonija i Parkinsonova bolest (*Benarroch 2011*).

S obzirom da su mnoge bolesti povezane sa smanjenom aktivnošću Na^+/K^+ pumpe, na osnovu naših istraživanja možemo samo da pretpostavimo medicinsku korist od povećane aktivnosti pumpe nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT. U literaturi se mogu pronaći dokazi da povećana aktivnost pumpe može da povećava memorijski učinak i da služi kao neuroprotektivni modulator protiv pojave Alchajmerove bolesti (*Zhang i sar. 2013*) kao i da spreči smanjenu aktivnost pumpe u prirodnom procesu starenja (*Maurya i Prakash 2013*). U ovom trenutku je teško reći da li je izmenjena spontana bioelektrična aktivnost neurona nakon dodavanja uabaina, a posle izlaganja magnetnom polju, štetna ili korisna, ali svakakao pacijenati koji koriste uabain morali bi pripaziti na eventualno prisustvo umereno jakog konstantnog magnetnog polja.

7.5 . Zajednička upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije i analize nezavisnih komponenata u otkrivanju efekta magnetnog polja indukcije 2,7 mT, 10 mT i uabaina

Higučijeva fraktalna dimenzija je primenjena u prvim koracima analize, pre primene algoritma za izračunavanje ICA komponenata. Zajednička upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije i ICA metode u elektrofiziologiji je višestruko demonstrirana u više studija (*Yeo i Lee 2001, Naik i sar. 2011, Spasić i sar. 2011c, Khoa i sar. 2012, Samavati i sar. 2012*). ICA analiza uticaja konstantnog magnetnog polja indukcije 2,7 mT je već prethodno publikovana u *Spasić i sar. (2011c)*. U ovim istraživanjima u cilju daljeg testiranja upotrebe ICA metode u analizi spontane bioelektrične aktivnosti neurona, proširena je kontrolna grupa za testiranje 2,7 mT (Slika 31) i analizirani su novi podaci dobijeni eksperimentima sa magnetnim poljem indukcije 10 mT (Slika 32), uabainom i uabainom PMP (Slika 33). Takođe, za svaki eksperimentalni uslov uvedena je podela na AP, ISI i IBI segmente (Slike 31, 32, 33). Proširena kontrolna grupa je potvrdila prethodne

rezultate (*Spasić i sar. 2011c*), a testiranjem ICA metode na novim setovima podataka potvrdilo je njenu primenljivost u analizi pojedinačne neuronske aktivnosti. Rezultati ICA metode su sa druge strane komplementarni rezultatima dobijenih upotrebom normalizovanih srednjih vrednosti empirijske raspodele *FD* što je dokazano u navedenim istraživanjima. ICA metoda je komplementarno fraktalnoj dimenziji pokazala uticaj magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT na AP, ISI i IBI komponente. Iz rezultata ICA metode se može videti da slabije polje indukcije 2,7 mT (Slika 31) uslovljava promene pre svega u ISI segmentu u prvoj i drugoj ICA komponenti, dok jače polje od 10 mT (Slika 32), sem promena u ISI segmentu dovodi i do promena u AP segmentu druge ICA komponente. Ono što je novi doprinos ICA metode, nasuprot empirijskoj raspodeli *FD* jesu vidljive promene ICA komponentata u IBI segmentu tokom i posle delovanja slabijeg i jačeg magnetnog polja (Slike 31, 32). Sa druge strane, upotreba normalizovanih srednjih vrednosti empirijske raspodele *FD* je omogućila precizno razdvajanje i kvantifikaciju komponentata spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona *per se*, a i za potrebe ICA analize. Dakle, tek jednom zajedničkom upotrebom obe metode bilo je moguće diskriminisati celokupan uticaj ispitivanog magnetnog polja. Takođe, ono što se tek moglo naslutiti iz rezultata o promenama kompleksnosti AP, ISI i IBI komponentata kao i iz ranije studije urađene od strane *Nikolić i sar. (2008)* o promenama bioelektričnih parametara aktivnosti Br neurona jeste reverzibilnost/ireverzibilnost promena pod delovanjem oba magnetna polja. ICA metoda je definitivno dokazala različit efekat 2,7 mT i 10 mT na aktivnost Br neurona u smislu trajanja efekta u okviru ispitivanog vremenskog okvira. U prethodnoj studiji koju su uradili *Spasić i sar. (2011c)*, kao i u ovoj studiji, nakon dopune kontrolne grupe i podele segmenata, identifikovane su dve nezavisne ICA komponente koje sugerišu dva moguća izvora fraktalne kompleksnosti koja odgovaraju postojanju dva suprostavljena ćelijska odgovora na prisustvo magnetnog polja indukcije 2,7 mT (Slika 31). Prva ICA komponenta je identifikovana kao komponenta plastičnosti, a druga kao komponenta elastičnosti. To znači da postoje dva suprostavljena mehanizma tj. odgovora na delovanje magnetnog polja indukcije 2,7 mT: jedan mehanizam (vidljiv preko prve komponente) (Slika 31A) potencira delovanje magnetnog polja indukcije 2,7 mT, dok je drugi mehanizam (komponenta elastičnosti) (Slika 31B) odgovoran za zaustavljanje

delovanja magnetnog polja i uspostavljanja normalne bioelektrične aktivnosti. Nakon razdvajanja dve nezavisne ICA komponente tokom i posle delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT, videlo se da ne postoji komponenta elastičnosti (fizički postoje dve komponente dobijene ICA analizom, ali se ponašaju na istovetan način kao komponenta elastičnosti), koja vraća aktivnost neurona na prethodno neizmenjeno stanje, već da postoji samo komponenta plastičnosti (Slika 32). Dakle, postoji samo jedan ireverzibilan mehanizam koji potencira delovanje magnetnog polja indukcije 10 mT i trajnu izmenu ćelijske fiziologije. Efekat magnetnog polja indukcije 2,7 mT je prolazan i ćelijski protektivni mehanizmi uspeavaju da nadvladaju delovanje magnetnog polja. Suprotno tome, jače polje izaziva trajne promene u neuronskoj fiziologiji verovatno preko metaboličkih procesa koji menjaju aktivnost Na^+/K^+ pumpe. Svakako, nema sumnje da su obe komponente identifikovane, tokom i posle delovanja ispitivanog magnetnog polja, jedino je pitanje koja će komponenta prevagnuti u zavisnosti od indukcije ispitivanog polja. Sa druge strane, nakon dodavanja uabaina pre i nakon delovanja magnetnog polja nakon primene ICA metode razdvojene su dve komponente (Slika 33). Prva ICA komponenta potvrđuje rezultate prethodnih eksperimenata o izmenjenoj spontanoj aktivnosti nakon delovanja jačeg magnetnog polja indukcije 10 mT u AP, ISI i IBI segmentima signala (Slika 33B). Druga ICA komponenta potvrđuje nalaze normalizovanih srednjih vrednosti empirijskih distribucija *FD*, jer ukazuje na izmenjenu modulaciju spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona od strane uabaina nakon delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT u AP, ISI i IBI segmentima (Slika 33D).

ICA je veoma značajna složena statistička tehnika koja se sve više koristi za analizu bioloških signala, posebno za analizu podataka dobijenih tehnikom fMRI (*Biswal i Ulmer 1999, Kiviniemi i sar. 2003, Eichele i sar. 2009*), EEG poligrafskim registrovanjem i MRI oslikavanjem (*Makeig i sar. 1996, James 2003, Eichele i sar. 2009, Huong i Linh 2013*). Takođe, ICA metoda nalazi sve više primena u genomici, posebno kada postoji veliki broj podataka nastalih sekvenciranjem velikog broja gena (*Lee and Batzoglou 2003*). Skoro da ne postoje studije koje koriste ICA metodu za analizu pojedinačne neuronske aktivnosti. Ova istraživanja demonstriraju uspešnu i korisnu upotrebu ICA tehnike za potrebe analize podataka dobijenih intraćelijskim registrovanjem neurona.

8. ZNAČAJ RADA

U ovim istraživanjima, uz pomoć Higučijeve fraktalne dimenzije kao nelinearne tehnike u analizi signala, su po prvi put razdvojene AP, ISI i IBI komponente spontane bioelektrične aktivnosti neurona. Takođe, po prvi put su korišćene normalizovane srednje vrednosti empirijskih raspodela FD za praćenje promena spontane bioelektrične aktivnosti neurona nastale uticajem umereno jakog magnetnog polja indukcije (2,7 mT i 10 mT) kao i uabaina inhibitora Na^+/K^+ pumpe. Istraživanja su jedinstvena jer se po prvi put zajedno koriste normalizovane srednje vrednosti empirijskih raspodela FD i ICA metoda uopšte, a posebno u ispitivanju uticaja magnetnog polja na spontanu bioelektričnu aktivnost neurona. Po prvi put su praćene promene ICA komponentata po izdvojenim AP, ISI i IBI komponentama spontane bioelektrične aktivnosti.

S obzirom na funkcionalni značaj koji ima spontana bioelektrična aktivnost neurona u nervnom sistemu kičmenjaka i beskičmenjaka i s obzirom na veliki broj istraživanja koja se bave spontano aktivnim neuronima iz ugla bazične i primenjene nauke, svaki nov, efikasan, brz i precizan metod za razdvajanje AP, ISI i IBI komponentata čini značajan doprinos. Rezultati ovih istraživanja sugerišu upotrebu Higučijeve fraktalne dimenzije ili, preciznije rečeno, normalizovane empirijske raspodele FD u daljim studijama spontano aktivnih neurona kod kičmenjaka kao što je slučaj sa neuronima talamičkog retikularnog jedra, neuronima cerebelarnog jedra i neurona kore velikog mozga kako *in vitro* tako i *in vivo*. Pokazano je da nelinearan pristup u analizi elektrofizioloških signala veoma često ima prednost nad klasičnim lineranim kada se radi o tačnosti i brzini dobijanja rezultata.

Magnetno polje, kako konstantno tako i promenljivo, predstavlja poseban izazov za novu granu biologije koja se naziva magnetobiologija. Razvojom tehnologije, izvori elektromagnetnog zagađenja u životnoj sredini rastu iz dana u dan u čitavom svetu. Svakodnevno smo izloženi delovanju umerenog konstantnog magnetnog polja indukcije nekoliko mT. Stoga u svetu su aktuelizovana istraživanja uticaja konstantnog magnetnog polja na biološke organizme. Naša istraživanja predstavljaju mali doprinos razumevanju delovanja umereno jakog konstantnog magnetnog polja na nervni sistem vinogradskog

puža. Međutim, s obzirom na visoku konzerviranost spontane bioelektrične aktivnosti kroz životinjsko carstvo i skoro istovetnih puteva delovanja konstantnog magnetnog polja na neurone (*Azanza i Calvo 2000*) razumno je očekivati da će različite vrednosti indukcije magnetnog polja ispitivane na neuronima puža, na sličan način uticati na spontano aktivne neurone sisara i čoveka. Umereno jako konstantno magnetno polje indukcije od nekoliko do nekoliko desetina mT, pokazuju terapijsko dejstvo, stoga se za vidljive promene u aktivnosti Br neurona nakon izlaganja konstantnom magnetnom polju ne može tvrditi da li su krajnje dobre ili loše. Mehanizmi štetnog i terapijskog dejstva magnetnog polja tek treba da se razjasne.

Uabain se poslednjih nekoliko vekova koristi kao lek za niz srčanih oboljenja. Takođe, neke ćelije sisara luče endogeni uabain. Ova istraživanja ukazuju na neke aspekte delovanja uabaina na modulisanje spontane bioelektrične aktivnosti neurona. Istraživanja pokazuju da je uticaj uabaina na promene AP, ISI i IBI komponenata spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona puža izmenjen u prisustvu umereno jakog magnetnog polja iz čega sledi oprez kod pacijenata koji koriste uabain kao lek. Mnoge bolesti su povezane sa smanjenom aktivnošću Na^+/K^+ pumpe, ali iz literature znamo da magnetno polje pojačava aktivnost ovog transmembranskog enzima, tako da se možda i ovde nazire mogući terapijski potencijal magnetnog polja. Neka buduća istraživanja možda mogu da odgovore na to pitanje.

Upotreba ICA metode u analizi spontane bioelektrične aktivnosti može da pomogne u pronalaženju izvora fraktalne kompleksnosti kao i u praćenju pretpostavljenih mehanizama odgovora ćelija na prisustvo nekih spoljašnjih stimulusa kao što je slučaj sa magnetnim poljem. U istraživanjima smo predstavili snagu zajedničke upotrebe Higučijeve fraktalne dimenzije i ICA metode u rasvetljavanju uticaja magnetnog polja i uabaina na spontanu bioelektričnu aktivnost Br neurona, što znači da se ove dve metode mogu koristiti u budućnosti za potrebe rasvetljavanja uticaja magnetnog polja velikih indukcija, ali i drugih hemijskih jedinjenja koji modulišu spontanu bioelektričnu aktivnost neurona. Zajednička upotreba ove dve metode, ali i kombinovanje sa drugim matematičkim i statističkim metodama u analizi signala, može pružiti nove informacije kada se radi o fiziološkoj, ali i patofiziološkoj neuronskoj aktivnosti u nizu neuroloških

bolesti (*Huong i Linh 2013*). Svakakao može se reći da je u modernoj nauci više nego ikad neophodno istu problematiku posmatrati iz više uglova, kao i da se upotrebom novih tehnika analize signala, iznova otkrivaju delići slagalice koji su ostali sakriveni u složenim signalima biološkog porekla tokom nekih ranijih, ne manje vrednih, pristupa. Stoga, najbolji i najpotpuniji rezultati nastaju kada se zajedno primene klasična analiza neuronske aktivnosti, nelinearne i razvijene statističke metode. Buduća istraživanja nervnog sistema temeljiće se na klasičnim pristupima neuronauke koji se mogu označiti kao redukcionistički, ali i uz pomoć najnovijih saznanja nelinearnih nauka (*Korn i Faure 2003*).

9. ZAKLJUČCI

Zaključci o upotrebi Higučijeve fraktalne dimenzije kao nove metode u razlaganju komponenata spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona:

1. Higučijeva fraktalna dimenzija je brz i efikasan nelinearan metod za razdvajanje AP, ISI i IBI komponenata složene bioelektrične aktivnosti Br neurona vinogradskog puža.
2. Po prvi put u analizi signala dobijenih intraćelijskim registrovanjem su uspešno razdvojene komponente složene bioelektrične aktivnosti neurona upotrebom Higučijeve fraktalne dimenzije.
3. Za potrebe razdvajanja AP, ISI i IBI komponenata po prvi put smo koristili normalizovane srednje vrednosti empirijskih raspodela *FD*.
4. Aproksimacija normalizovanih srednjih vrednosti empirijskih raspodela *FD* uz pomoć Gausove funkcije je omogućila razdvajanje AP, ISI i IBI komponenata.
5. Higučijeva fraktalna dimenzija se može koristiti za razdvajanje komponenata bioelektrične aktivnosti neurona kičmenjaka i beskičmenjaka u istraživanjima fizioloških i patoloških stanja.

Zaključci o uticaju umereno jakog magnetnog polja indukcije 2,7 mT i 10 mT na promene kompleksnosti spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona:

1. Magnetno polje indukcije 2,7 mT i 10 mT utiče na značajne promene zastupljenosti AP i ISI komponenata u normalizovanim srednjim vrednostima empirijskih raspodela *FD*.
2. Slabije magnetno polje indukcije 2,7 mT značajno povećava zastupljenost ISI komponente, dok 10 mT smanjuje zastupljenost AP uz povećanje zastupljenost ISI komponente u normalizovanim srednjim empirijskim raspodelama *FD*.
3. Nijedno od istraživanih indukcija magnetnog polja ne menja značajno učešće IBI komponente.

Zaključci o uticaju uabaina na promene kompleksnosti spontane bioelektrične aktivnosti

Br neurona pre i nakon delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT:

1. Uabain nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT, u odnosu na uabain dodat nakon kontrolnog snimanja, uslovljava manji porast učešća AP i IBI komponenata u normalizovanim srednjim empirijskim raspodelama *FD*.
2. Uabain i magnetno polje indukcije 10 mT imaju suprotan uticaj na promene kompleksnosti signala tj. na zastupljenost AP, ISI i IBI komponenata.
3. Uabain i uabain posle delovanja magnetnog polja indukcije 10 mT uzrokuju isti trend promena u učešću AP, ISI i IBI komponenata u odnosu na kontrolu.
4. Promene u zastupljenosti komponenata u periodu nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT su u suprotnosti od promena nastalih delovanjem uabaina pre i nakon delovanja magnetnog polja. Stoga, uticaj uabaina na spontanu bioelektričnu aktivnost Br neurona nije posledica prolongiranog delovanja magnetnog polja.

Zaključci o upotrebi ICA metode u praćenju promena spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona pre, tokom i nakon delovanja magnetnog polja indukcije (2,7 mT i 10 mT) i uabaina:

1. Upotrebom ICA metode razdvojene su dve ICA komponente pre, tokom i nakon delovanja magnetnog polja indukcije (2,7 mT, 10 mT) i uabaina.
2. ICA metoda pokazuje da je tokom i nakon delovanja magnetnog polja indukcije 2,7 mT moguće identifikovati komponentu plastičnosti i komponentu elastičnosti. Komponenta plastičnosti sugerise postojanje unutarćelijskog mehanizma koji potencira delovanje polja, a komponenta elastičnosti ukazuje na suprotan, protektivan ćelijski mehanizam koji zaustavlja delovanje magnetnog polja.
3. Tokom i nakon delovanja jačeg magnetnog polja indukcije 10 mT, bilo je moguće razdvojiti dve ICA komponente, međutim obe komponente se mogu

proglasiti da predstavljaju komponentu plastičnosti koja sugerira da jače magnetno polje trajno menja fiziologiju ćelije.

4. Primenom ICA metode nasuprot normalizovanoj empirijskoj raspodeli *FD* otkrivene su i promene u IBI segmentu tokom i posle delovanja oba magnetna polja.
5. Druga ICA komponenta u uslovu uabaina nakon izlaganja magnetnom polju indukcije 10 mT ukazuje na izmenjenu uabain zavisnu modulaciju spontane bioelektrične aktivnosti nakon delovanja magnetnog polja.

Zaključci o zajedničkoj upotrebi Higučijeve fraktalne dimenzije i ICA metode u analizi uticaja magnetnog polja i uabaina:

1. Zajednička upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije i ICA metode omogućava brzo, efikasno i precizno praćenje uticaja magnetnog polja i uabaina na spontanu bioelektričnu aktivnost neurona.
2. Metode su uzajamno komplementarne jer se rezultati njihove primene podudaraju i dopunjavaju.
3. Razdvajanje elemenata bioelektrične aktivnosti Br neurona uz pomoć Higučijeve fraktalne dimenzije omogućilo je praćenje ponašanja ICA komponenata po AP, ISI i IBI segmentima. Ovo je prvi ovakav doprinos Higučijeve fraktalne dimenzije ICA metodi kada se radi o analizi spontane bioelektrične aktivnosti neurona.
4. Predlaže se upotreba Higučijeve fraktalne dimenzije i ICA metode za analizu aktivnosti pojedinačnih neurona u fiziološkim i patološkim stanjima.

10. LITERATURA

Abarbanel H, Huerta R, Rabinovich M, Rulkov N, Rowat P, Selverston A (1996). Synchronized action of synaptically coupled chaotic model neurons. *Neural Comput.* 8(8):1567-1602.

Abdi H, Williams L (2010). Principal component analysis. *Wiley Interdiscipl. Rev.* 2(4):433-459.

Accardo A, Affinito, M, Carrozzi M, Bouquet F (1997). Use of the fractal dimension for the analysis of electroencephalographic time series. *Biol. Cybern.* 77:339-350.

Aizenman C, Linden D (1999). Regulation of the rebound depolarization and spontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum. *J. Neurophysiol.* 82:1697-1709.

Alevizo A, Weiss R, Koester J (1991). Synaptic actions of identified peptidergic neuron R15 in Aplysia. III. Activation of the large hermaphroditic duct. *J. Neurosci.* 11:1282-1290.

Alving B (1968). Spontaneous activity in isolated somata of Aplysia pacemaker neurons, *J. Gen. Physiol.* 51:29-45.

Amara S, Douki T, Garrel C, Favier A, Rhouma K, Sakly M, Abdelmelek H (2010). Effects of static magnetic field and cadmium on oxidative stress and DNA damage in rat cortex brain and hippocampus. *Toxicol. Ind. Health* 27(2):99-106.

Anier A (2004). Higuchi fractal dimension and spectral entropy as measures of depth of sedation in intensive care unit, *Engineering in Medicine and Biology Society, 2004.IEMBS'04.26th Annual International Conference of the IEEE.* Vol. 1.IEEE.

Azanza, M, Calvo C (2000). Snail neuron bioelectric activity induced under static or sinusoidal magnetic fields reproduces mammal neuron responses under transcranial magnetic stimulation. *Electromagn. Biol. Med.* 19:303-319.

Bal T, McCormik D (1993). Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. *J. Physiol.* 468:669–691.

Bennarroch E (2011). Na^+/K^+ - ATPase. Functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76(3):287-293.

Bingham E, Hyvarinen A (2000). A fast fixed-point algorithm for independent component analysis of complex valued signals. *Int. J. Neur. Syst.* 10(1):1-8.

Biswal B, Ulmer J (1999). Blind source separation of multiple signal sources of fMRI data sets using independent component analysis. *J. Comput. Assist. Tomo.* 23:265-271.

Blank M (1995). Biological effects of environmental electromagnetic fields: molecular mechanisms. *BioSystems* 35:175-178.

Blank M (2005). Do electromagnetic fields interact with electrons in the Na,K-ATPase? *Bioelectromagnetics* 26:677-683.

Brown D, Yamada S, Sejnowski J (2001). Independent component analysis at the neural cocktail party. *TRENDS Neurosci* 24:54-63.

Bugli C, Lambert P (2006). Comparison between Principal Component Analysis and Independent Component Analysis in electroencephalograms modeling. *Biometrical J* 48:1–16.

Byrne J, Roberts J (2004). From molecules to networks: an introduction to cellular and molecular neuroscience. Academic Press, San Diego, California.

Canavier C, Clark J, Byrne J (1990). Routes to chaos in a model of a bursting neuron. *Biophys. J.* 57:1245–1251.

Carpenter D, Alving B (1968). A contribution of an electrogenic Na^+/K^+ pump to membrane potential in *Aplysia* neurons. *J. Gen. Physiol.* 52:1–21.

Celone K, Calhoun V, Dickerson B, Atri A, Chua E, Miller S, DePeau K, Rentz D, Selkoe D, Blacker D, Albert M, Sperling R (2006). Alterations in memory networks in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an independent component analysis. *J. Neurosci.* 26(40):10222-10231.

Chen J, Contreras R, Wang R, Fernandez S, Shoshani L, Russo I, Cereijido M, Russo J (2006). Sodium/potassium ATPase (Na,K-ATPase) and uabain/related cardiac glycosides: a new paradigm for development of anti-breast cancer drugs? *Breast Cancer Res. Treat.* 96(1):1-15.

Chouvarda I, Rosso V, Mendez M, Bianchi A, Parrino L, Grassi A, Terzano M, Cerutti S (2011). Assessment of the EEG complexity during activations from sleep. *Comp. Meth. Prog. Bio.* 104: 16-28.

Ciszewski J, Klonowski W, Stepien R, Jernajczyk W, Karlinski A, Niedzielska K (1999). Application of chaos theory for EEG-signal analysis in patients with seasonal affective disorder. *Med. Biol. Eng. Comput.* 37:359-360.

Comon P (1994). Independent component analysis, a new concept? *Signal Process.* 36(3):287–314.

Corn H, Faure P (2003). Is there chaos in the brain? II. Experimental evidence and related models. *C. R. Biologies* 326:787-840.

Dehaene S, Changeux P (2005). Ongoing spontaneous activity controls access to consciousness: A neuronal model for inattentional blindness. *PLoS Biol.* 3(5):e141.

Dini L, Abbro L (2005). Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron* 36:195-217.

Dini L, Panzarini E (2010). The influence of a 6 mT static magnetic field on apoptotic cell phagocytosis depends on monocyte/macrophage differentiation. *Exper. Biol. Med.* 235:1432-1441.

Dobson J, St Pierre G, Schultheiss-Grassi P, Wieser G, Kuster N (2000). Analysis of EEG data from weak-field magnetic stimulation of mesial temporal lobe epilepsy patients. *Brain. Res.* 868(2):386-391.

Eichele T, Calhoun V, Debener S (2009). Mining EEG-fMRI using independent component analysis. *Int. J. Psychophysiol.* 73:53-61.

Eke A, Herman P, Kocsis L, Kozak L (2002). Fractal characterization of complexity in temporal physiological signals. *Physiol. Meas.* 23:1-38.

Esteller R, Vachtsevanos G, Echauz J, Litt B (2001). A comparison of waveform fractal dimension algorithms. *IEEE T Circuits Syst.* 48 (2):177-183.

Ferentes R, Vanluchene A, Lipping T, Byorn H, Michel S (2007). Behavior of entropy/complexity measures of the electroencephalogram during propofol-induced sedation. *Anesthesiology* 106:696-706.

Feychting M (2005). Health effects of static magnetic fields-a review of the epidemiological evidence. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 87(2-3):241-246.

Forrest M, Wall M, Press D, Feng J (2012). The sodium - potassium pump controls the intrinsic firing of the cerebellar purkinje neuron. *PLoS One* 7(12):e51169.

Fuentealba P, Steriade M (2005). The reticular nucleus revisited: intrinsic and network properties of a thalamic pacemaker. *Prog. Neurobiol.* 75:125-141.

Fuller M, Dobson J, Wieser H, Moser S (1995). On the sensitivity of the human brain to magnetic fields: Evocation of epileptiform activity. *Brain. Res. Bull.* 36:155-159.

Fuller W, Tulloch L, Shattock M, Calaghan S, Howie J, Wypijewski K (2013). Regulation of the cardiac sodium pump. *Cell.Mol. Life Sci.* 70:1357-1380.

Fürstenwerth H (2010). Uabain – the insulin of the heart. *Int. J. Clin.Pract.* 64:1591-1594.

Gadsby D, Cranefield P (1979). Electrogenic sodium extrusion in cardiac Purkinje fibers. *J. Gen. Physiol.* 73:819–837.

Gadsby D, Bezanilla F, Rakowski R, DeWeer P, Holmgren M (2012). The dynamic relationship between the three events that release individual Na^+ ions from the Na, K-ATPase. *Nat. Commun.* 3:669.

Gao J, Wymore S, Wang Y, Gaudette R, Krukenkamp B, Cohen S, Mathias T (2002). Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *J. Gen. Physiol.* 119:297–312.

Gardiner J, Overall R, Marc J (2010). The fractal nature of the brain: EEG data suggest that the brain functions as a “quantum computer” in 5-8 dimensions. *NeuroQuantology* 8(2):137-141.

Georgiev S, Minchev Z (2009). EEG fractal dimension measurement before and after human auditory stimulation. *Bioautomation* 12:70-81.

Giambattista A, Richardson B, Richardson R (2004). *College Physics*. ISBN: 0-07-052407-6, McGraw-Hill Education, New York, USA.

Glanzman D (2010). Ion pumps get more glamorous. *Nat. Neurosci.* 13(1):4-5.

Glaser R (2001). *Biophysics*. ISBN: 81- 8128-126-8, Springer - Verlag, Germany

Glass L (2001). Synchronization and rhythmic processes in physiology. *Nature* 410:277-284.

Gloor M (2007). Relevance of Na,K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett.* 412:1-4.

Goldberger A (2001). Heartbeats, hormones, and health. Is variability the spice of life? *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 163:1289–1290.

Goldberger A, Amaral L, Jeffrey M, Hausdorff J, Ivanov P, Peng C, Stanley E (2002). Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99:2466-2472.

Gómez C, Mediavilla A, Hornero R, Abasolo D, Fernandez A (2009). Use of the Higuchi's fractal dimension for the analysis of MEG recordings from Alzheimer's disease patients. *Med. Eng. Phys.* 31(3):306 – 313.

Gómez C, Hornero R (2010). Entropy and complexity analyses in Alzheimer's disease: An MEG study. *Open. Biomed. Eng. J.* 4:223-235.

Gyires K, Zadori Z, Racz B, Laszlo J (2008). Pharmacological analysis of inhomogeneous static magnetic field-induced antinociceptive action in the mouse, *Bioelectromagnetics* 29:456-462.

Hashish A, El-Missiry M, Abdelkader H, Abou-Saleh R (2008). Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71(3):895-902.

Hausser M, Clark B (1997). Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19:665-678.

Hausser M, Raman I, Otis T, Smith S, Nelson A, Lac S, Loewenstein Y, Mahon S, Pennartz C, Cohen I, Yarom Y (2004). The beat goes on: spontaneous firing in mammalian neuronal microcircuits. *J. Neurosci.* 24(42):9215-9219.

Herz A, Gollisch T, Machens C, Jaeger D (2006). Modeling single-neuron dynamics and computations: a balance of detail and abstraction. *Science* 314(5796):80-85.

Higuchi T (1988). Approach to an irregular time series on the basis of the fractal theory. *Physica D* 31:277–283.

Hinrikus H, Bachmann M, Karai D, Klonowski W, Lass J, Stepien P, Stepien R, Tuulik V (2011). Higuchi's fractal dimension for analysis of the effect of external periodic stressor on the brain electrical oscillations. *Med. Biol. Eng. Comput.* 49(5):585-91.

Holthouser K, Mandal A, Merchant M, Schelling J, Delamere N, Valdes R, Tyagi S, Lederer E, Khundmiri S (2010). Uabain stimulates Na-K-ATPase through a sodium/hydrogen exchanger-1 (NHE-1)-dependent mechanism in human kidney proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 299:77-90.

Huang Y, Chueh S, Teng C, Guh J (2004). Investigation of uabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Biochem. Pharmacol.* 67(4):727-733.

Huong N, Linh H (2013). Analyzing electroencephalogram by integrated methods to diagnose neurological disease. *Int. J. Appl. Phys. Math.* 3(4):305-311.

Hyvarinen A, Oja E (2000). Independent component analysis: algorithms and applications. *Neur. Networks* 13:411-430.

Hyvarinen A, Karhunen J, Oja E (2001). Independent component analysis. In: Haykin S (Ed) *Wiley Series on Adaptive and Learning Systems for Signal Processing, Communication and Control*. John Wiley & Sons, New York

Jahan-Parwar B, Smith M, Baumgarten R (1969). Activation of neurosecretory cells in *Aplysia* by osphradial stimulation. *J. Physiol-London* 21:1246–1257.

James CJ, Gibson OJ (2003). Temporally constrained ICA: an application to artifact rejection in electromagnetic brain signal analysis. *IEEE T Bio-med Eng* 50:1108-1116.

James J, Hesse C (2005). Independent component analysis for biomedical signals. *Physiol Meas* 26: 15–39.

Juutilainen J, Lang S (1997). Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. *Mutat. Res.* 387(3):165-171.

Katz M (1988). Fractals and the analysis of waveforms. *Comput. Biol. Med.* 18(3):145 - 156.

Keković G, Culić M, MartaćLj, Stojadinović G, Čapo I, Lalošević D, Sekulić S (2010). Fractal dimension values of cerebral and cerebellar activity in rats loaded with aluminium. *Med. Biol. Eng. Comp.* 48:671-679.

Kelleher M, Al-Abri K, Lenihan D, Glasby M (2006). Use of a static magnetic field to promote recovery after peripheral nerve injury. *J. Neurosurg.* 105:610-615.

Kerkut A, Lambert J, Gayton J, Loker J (1975) Mapping of nerve cells in subesophageal ganglia of *Helix aspera*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 50:1-25.

Khoa T, Ha V, Toi V (2012). Higuchi fractal properties of onset epilepsy electroencephalogram. *Comput. Math. Methods. Med.* 2012:461-426.

Kiviniemi V, Kantola J, Jauhiainen J, Hyvarinen A, Tervonen O (2003). Independent component analysis of nondeterministic fMRI signal sources. *Neuroimage* 19:253-260.

Klonowski W, Ciszewski J, Jemajczyk W, Niedzielska K (1999). Application of Chaos Theory and Fractal Analysis for EEG-signal Processing in Patients with Seasonal Affective Disorder, in Proceedings of 1999 International Symposium on Nonlinear Theory and its Applications (NOLTA'99), Waikoloa, Hawaii, U. S. A., pp. 339-342.

Klonowski W, Olejarczyk E, Stepien R (2000). Nonlinear dynamics of EEG-signal reveals influence of magnetic field on the brain. *IEEE* 4:2955–2958.

Klonowski W, Olejarczyk ER, Stepien P, Jalowiecki R (2006). Monitoring the Depth of anaesthesia using Fractal Complexity Method. In: *Complexus Mundi, Emergent Patterns in Nature* (Eds. M.M. Novak), 333-342. World Scientific, New Jersey.

Klonowski W (2009). Everything you wanted to ask about EEG but were afraid to get the right answer. *Nonlinear Biomed. Phys.* 3:2.

Klonowski W, Stepien P, Stepien R (2010). Complexity measures of brain electrophysiological activity in consciousness, under anesthesia, during epileptic seizure, and in physiological sleep. *J. Psychophysiol.* 24(2):131-135.

Klonowski W (2011). Personalized Neurological Diagnostics from Biomedical Physicist's Point of View and Application of New Non-Linear Dynamics Methods in Biosignal Analysis. *Int. J. Biol. Biomed. Eng.* 5(4):190-200.

Koch C, Laurent G (1999). Complexity and the nervous system. *Science* 284(5411):96-98.

Koch-Weser J, Blinks R (1962). Analysis of the relation of the positive inotropic action of cardiac glycosides to the frequency of contraction of heart muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 136:305-317.

Kononenko I (2000). Role of the axodendritic tree in the functioning of Helix bursting neurons: generation of pacemaker activity and propagation of action potentials along the axon. *Neuroscience.* 96:399–406.

Kumar S, Kumar A (2012). Higuchi fractal dimension as a measure of analgesia. *Int. J. Med. Eng. Inform.* 4(1):66-72.

Laubach M, Shuler M, Nicolelis A (1999). Independent component analyses for quantifying neuronal ensemble interactions. *J. Neurosci. Meth.* 94:141-154.

Le Bon-Jego M, Yuste R (2007). Persistently active, pacemaker-like neurons in neocortex. *Front. Neurosci.* 1:123-129.

Legendy C, Salzman M (1985). Bursts and recurrences of bursts in the spike trains of spontaneously active striate cortex neurons. *J. Neurophysiol.* 53(4):926-939.

Lee S, Batzoglou S (2003). Application of independent component analysis to microarrays. *Genome Biol* 4:R76.

Leszczynski D (2005). Cellular, animal and epidemiological studies of the effects of static magnetic fields relevant to human health. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 87:247-253.

Levy N, Martin P, Stuesse S (1981). Neural regulation of the heartbeat. *Annu. Rev. Physiol.* 43: 443-453.

Lewicki M (1998). A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network* 9(4): 53-78.

Lewis D, Huguenard R, Anderson W, Wilson W (1986). Membrane currents underlying bursting pacemaker activity and spike frequency adaptation in invertebrates. *Adv. Neurol.* 44:235-261.

Liebovitch L, Todorov A (1996). Using fractals and nonlinear dynamics to determine the physical properties of ion channel protein. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10(2):169-187.

Liebovitch L, Scheurle D, Rusek M, Zochowski M (2001). Fractal methods to analyze ion channel kinetics. *Methods* 24(4):359-375.

Lingrel J (2010). The physiological significance of the cardiotonic steroid/uabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* 72:395-412.

Lisman J (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci.* 20:38–43.

Llinas R (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insight into central nervous system function. *Science* 242:1654-1664.

Llinas R, Alonso A (1992). Electrophysiology of the mammillary complex in vitro. Tuberomammillary and lateral mammillary neurons. *J. Neurophysiol.* 68(4):1307-1320.

Lu U, Song D, Berger T (2011). Nonlinear dynamic modeling of synaptically driven hippocampal neuron intracellular activity. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 58(5):1303-1313.

Makeig S, Bell A, Jung T, Sejnowski T (1996). Independent component analysis of electroencephalographic data. In: *Advances in neural information processing systems 8* (Eds. Touretzky D, Mozer M, Hasselmo M) 145-151, MIT Press, Cambridge MA.

Marsat G, Pollack G (2012). Bursting neurons and ultrasound avoidance in crickets. *Front. Neurosci.* 6:95.

Maurya K, Prakash S (2013). Decreased activity of Ca⁺⁺-ATPase and Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase during aging in humans. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170(1):131-137.

Mazzoni A, Broccard F, Garcia-Perez E, Bonifazi P, Ruaro M, Torre V (2007). On the dynamics of the spontaneous activity in neuronal networks. *Plos One* 2(5):e439.

McCormick D (2002). Cortical and subcortical generators of normal and abnormal rhythmicity. *Int. Rev. Neurobiol.* 49:99-114.

McLean M, Holcomb R, Wamil A, Pickett J, Cavopoli A (1995). Blockade of sensory neuron action potentials by a static magnetic field in the 10 mT range. *Bioelectromagnetics* 16: 20–32.

Melissant C, Ypma A, Frietman E, Stam J (2005). A method for detection of Alzheimer's disease using ICA-enhanced EEG measurements. *Artif. Intell. Med.* 33(3):209-222.

Mendoza-Angeles K, Cabrera A, Hernandez-Falcon J, Ramon F (2007). Slow waves during sleep in crayfish: A time–frequency analysis. *J. Neurosci. Meth.* 162:264–271.

Miyakoshi J (2005). Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Prog. Biophys Mol. Bio.* 87(2-3):213-223.

Moghadam M, Firoozabadi M, Janahmadi M (2011). Effects of weak environmental magnetic fields on the spontaneous bioelectrical activity of snail neurons. *J. Membrane Biol.* 240:63-71.

Morren G, Wolf M, Lemmerling P, Wolf U, Choi J, Gratton E, De Lathauwer L, Van Huffel S (2004). Detection of fast neuronal signals in the motor cortex from functional near infrared spectroscopy measurements using independent component analysis. *Med. Biol. Eng. Comput.* 42, 92-99.

Morris E, Skalak C (2008). Acute exposure to a moderate strength static magnetic field reduces edema formation in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294(1):50-57.

Mpitsos G, Burton R, Creech H, Seppo O (1988). Evidence for chaos in spike trains of neurons that generate rhythmic motor patterns, *Brain Res. Bull.* 21:529–538.

Munakata M, Fujimoto M, Jin H, Akaike N (1998). Characterizations of electrogenic Na/K pump in rat neostriatal neurons. *Brain Res.* 800:282–293.

Naik G, Arjunan S, Kumar D (2011). Application of ICA and fractal dimension in sEMG signal processing for subtle movement analysis: a review. *Australas. Phys. Eng. Sci. Med.* 34:179-193.

Nikolić L, Kartelija G, Nedeljković M (2008). Effect of static magnetic fields on bioelectric properties of the Br and N-1 neurons of snail *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Phys. A* 151:657–663.

Nikolić Lj, Todorović N, Zakrzewska J, Stanić M, Rauš S, Kalauzi A, Janać B (2012). Involvement of Na⁺/K⁺ pump in fine modulation of bursting activity of the snail Br neuron by 10 mT static magnetic field. *J. Comp. Physiol. A* 198:525-540.

Novikov M, Maksimov V, Volkov V, Shalygin N (2008). Effect of weak static magnetic fields on the excitability of a neuron. *Biofizika* 53(3):519-523.

Okano H, Ohkubo C (2005). Effects of neck exposure to 5.5 mT static magnetic field on pharmacologically modulated blood pressure in conscious rabbits. *Bioelectromagnetics* 26:469-480.

Okano H, Ohkubo C (2007). Effects of 12 mT static magnetic field on sympathetic agonist-induced hypertension in wistar rats. *Bioelectromagnetics* 28:369-378.

Onton J, Westerfield M, Townsend J, Makeig S (2006). Imaging human EEG dynamics using independent component analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30(6):808-822.

Paivinen N, Lammi S, Pitkanen A, Nissinen J, Penttonen M, Gronfors T (2005). Epileptic seizure detection: A nonlinear viewpoint. *Comp. Meth. Prog. Bio.* 79:151-159.

Peiris M, Jones R, Davidson P, Bones P, Myall D (2005). Fractal dimension of the EEG for detection of behavioural microsleep, in proceedings of the 2005 IEEE engineering in medicine and biology 27th annual conference Shanghai, China, September 1-4.

Pena F (2008). Contribution of pacemaker neurons to respiratory rhythms generation in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.* 605:114-118.

Petrosian A (1995). Kolmogorov complexity of finite sequences and recognition of different preictal EEG patterns. *Proc. IEEE Symp. Computer-Based Medical Syst.* 212 - 217.

Prassas I, Diamandis P (2008). Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Rev. Drug Discov.* 7:926-935.

Pulver S, Griffith L (2010). Spike integration and cellular memory in a rhythmic network from Na^+/K^+ pump current dynamics. *Nat. Neurosci.* 13:53-59.

Rabinovich M, Abarbanel H (1998). The role of chaos in neural systems. *Neuroscience* 87:5-14.

Rabinovich M (2006). Dynamical principles in neuroscience. *Rev. Mod. Phys.* 78(4):1213-1265.

Raghavendra B, Narayana – Dutt D (2009). A note on fractal dimensions of biomedical waveforms. *Comp. Biol. Med.* 39:1006-1012.

Raghavendra B, Narayana Dutt D, Halahalli H, John J (2009). Complexity analysis of EEG in patients with schizophrenia using fractal dimension. *Physiol. Meas.* 30(8):795-808.

Raghavendra B, Narayana – Dutt D (2010). Signal characterization using fractal dimension. *Fractals* 18:287-292.

Raman I, Gustafson, A, Padgett D (2000). Ionic currents and spontaneous firing in neurons isolated from the cerebellar nuclei. *J. Neurosci.* 20:9004-9016.

Ramnani N, Behrens T, Penny W, Matthews P (2004). New approaches for exploring anatomical and functional connectivity in the human brain. *Biol. Psychiatry* 56(9):613-619.

Remme M, Lengyel M, Gutkin B (2009). The role of ongoing dendritic oscillations in single-neuron dynamics. *PLoS Comput. Biol.* 5(9):e1000493.

Rittenhouse A, Price C (1985). Peripheral axons of the parabolic burster neuron R15. *Brain Res.* 333:330–335.

Rose M, Valdes R (1994). Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clinical Chemistry* 40:1674-1685.

Rosen D (2003a). Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell. Biochem. Biophys.* 39:163-173.

Rossier B, Geering K, Kraehenbuhl J (1987). Regulation of the sodium pump: how and why? *Trends Biochem. Sci.* 12:483-487.

Sabeti M, Katebi S, Boostani R (2009). Entropy and complexity measures for EEG signal classification of schizophrenic and control participants. *Artif. Intell. Med.* 47(3):263-274.

Samavati M, Nasrabadi A, Mohammadi M (2012). Automatic minimization of eye blink artifacts using fractal dimension of independent components of multichannel EEG, in proceedings of Iranian conference on electrical Engineering, 15-17 may.

Sandor S, Helyes Z, Gyires K, Szolcsanyi J, Laszlo J (2007). Static magnetic field induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism. *Life Sci.* 81:97-102.

Saunders R (2005) Static magnetic fields: animal studies. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 87:225-239.

Schulze-Bonhage A, Ulrich A, Speckmann E, Wittkowski W (1993). Structure and bioelectricity of single neurons of *Helix pomatia* in the intract nervous tissue during epileptic activity: simultaneous evaluations by confocal microscopy and intracellular recordings of membrane potential changes. *Comp. Biochem. Physiol. - Part A: Physiol.* 106:537-545.

Schütt A, Ross, A, Figliola A (2002). A discovery of new features of gastropod local field potentials by application of wavelet tools. *J. Neurosci. Meth.* 119:89-104.

Schwartz L (2003). Static magnetic field therapy for symptomatic diabetic neuropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 84:736-746.

Spasić S, Kalauzi A, Culić M, Grbić G, Martać Lj (2005). Fractal analysis of rat brain activity after injury. *Med. Biol. Eng. Comput.* 43:345–348.

Spasić S, Čulic M, Grbić G, Martać Lj, Sekulić S, Mutavdžić D (2008). Spectral and fractal analysis of cerebellar activity after single and repeated brain injury. *B. Math. Biol.* 70:1235–1249.

Spasić S (2010). Surrogate data test for nonlinearity of the rat cerebellar electrocorticogram in the model of brain injury. *Signal Process.* 90:3015–3025.

Spasić S, Kalauzi A, Kesić S, Obradović M, Šaponjić J (2011a). Surrogate data modeling the relationship between high frequency amplitudes and Higuchi fractal dimension of EEG signals in anesthetized rats. *J. Theor. Biol.* 289:160-166.

Spasić S, Kesić S, Kalauzi A, Šaponjić J (2011b). Different anesthesia in rat induces distinct inter-structure brain dynamic detected by Higuchi fractal dimension. *Fractals* 19:113–123.

Spasić S, Nikolić Lj, Mutavdžić D, Šaponjić J (2011c). Independent complexity patterns in single neuron activity induced by static magnetic field. *Comp. Meth. Prog. Bio.* 104:212-218.

Spasić S, Nikolić Lj, Mutavdžić D (2011d). Effect of a static magnetic field on the fractal complexity of bursting activity of the Br neuron in the snail detected by factor analysis. *Arch. Biol. Sci.* 63:177-183.

Stam J, Jelles B, Achtereekte H, Rombouts S, Slaets J, Keunen R (1995). Investigation of EEG non-linearity in dementia and Parkinson's disease. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.* 95:309-317

Staudinger T, Polikar R (2011). Analysis of complexity based EEG features for the diagnosis of Alzheimer's disease, in 33rd annual international conference of the IEEE EMBS Boston, Massachusetts USA, August 30- September 3.

Stojilković S (2006). Pituitary cell type-specific electrical activity, calcium signaling and secretion. *Biol. Res.* 39:403–423.

Stone J (2002). Independent component analysis: an introduction. *TRENDS Cogn. Sci.* 6(2):59-64.

Takahashi S, Sakurai Y, Tsukada M, Anzai Y (2002). Classification of neuronal activities from tetrode recordings using independent component analysis. *Neurocomputing* 49:289-298.

Tang C, Pearlmutter A, Malaszenko A, Phung B (2002). Independent components of magnetoencephalography: single-trial response onset times. *Neuroimage* 17(4):1773-1789.

Tenuzzo B, Chiona A, Panzarini E, Lanubile R, Tarantino P, Di Jeso B, Dwikat M, Dini L (2006). Biological effects of 6 mT static magnetic fields. A comparative study in different cell types. *Bioelectromagnetics* 27:560-577.

Todorović, D, Kalauzi A, Prolić Z, Jović M, Mutavdžić D (2007). A method for detecting the effect of magnetic field on activity changes of neuronal populations of *Morimus funereus* (Coleoptera, Cerambycidae). *Bioelectromagnetics* 28:238-241.

Tolosa F, Bouzat C, Cravero R (2011). Effects of Static Magnetic Fields on Nicotinic Cholinergic Receptor Function. *Bioelectromagnetics* 32:434-442.

Trabulsi R, Pawlowski B, Wieraszko A (1996). The influence of steady magnetic fields on the mouse hippocampal evoked potentials in vitro. *Brain. Res.* 728(1):135-139.

Tsodyks M, Kenet T, Grinvald A, Arieli A (1999). Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science* 286(5446):1943-1946.

Vadasz I, Salanki J (1976). Mechanisms of spike and burst generation in the bimodal pacemaker RPal neuron of *Helix pomatia* L. In: *Neurobiology of invertebrates* (Eds. SalankiJ), 371–381. Akademiai Kiado, Budapest.

Vigario R, Sarela J, Jousmaki V, Hamalainen M, Oja E (2000).Independent component approach to the analysis of EEG and MEG recordings. *IEEE T Bio-med Eng* 47:589-593.

Wang Z, Che P, Du J, Ha B, Yarema K (2010a). Static magnetic field exposure reproduces cellular effects of the Parkinson's disease drug candidate ZM241385. *PLoS One* 5(11):e13883

Wang C, Zou J, Zhang J, Wang M, Wang R (2010b). Feature extraction and recognition of epileptiform activity in EEG by combining PCA with ApEn. *Cogn Neurodyn* 4:233–240.

Weintraub I, Wolfe I, Barohn A, Cole P, Parry J, Hayat G, Cohen A, Page C, Bromberg B, (2003). Static magnetic field therapy for symptomatic diabetic neuropathy: A randomized, double - blind, placebo - controlled trial. Arch. Phys. Med. Rehabil. 84(5):736-746.

Wieraszko A (2000). Dantrolene modulates the influence of steady magnetic fields on hippocampal evoked potentials in vitro. Bioelectromagnetics 21:175-182.

Werner G (2010). Fractals in the nervous system: conceptual implication of theoretical neuroscience. Front. Physiol. 1:1-28.

Xie Z, Cai T (2003). Na⁺/K⁺ - ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function. Mol. Interv. 3(3):157-168.

Yeo S, Lee C (2001). On-line independent component analysis of EEG signals for brain-computer interfacing. Artif. Intell. 1(1):117-125.

Yamamoto N, López-Bendito G (2012). Shaping brain connections through spontaneous neural activity. Eur. J. Neurosci. 35:1595-604.

Yang Y, Yan Y, Zou X, Zhang C, Zhang H, Xu Y, Wang X, Janos P, Yang Z, Gu H (2011). Static magnetic field modulates rhythmic activities of a cluster of large local interneurons in *Drosophila* antennal lobe. J. Neurophysiol. 106:2127-2135.

Yassin L, Benedett B, Jouhanneau J, Wen J, Poulet J, Barth A (2010). An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex. Neuron 68:1043-1050.

Ye S, Yang J, Chen C (2004). Effect of static magnetic fields on the amplitude of action potential in the lateral giant neuron of crayfish. Int. J. Radiat. Biol. 80:699-708.

Ye S, Yang J, Lee Y, Tsai L (2008). Static magnetic field expose enhances neurotransmission in crayfish nervous system. *Int. J. Radiat. Biol.* 84:561-567.

Zhang N, Sun J, Pan S, Li X, Ye Q, Li Y, Wang L, Gao B (2013). Na-K-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27(1):96-103.

11. BIOGRAFIJA AUTORA

Srđan Kesić je rođen 23.11.1981. u Kninu, SFRJ Jugoslavija, gde je završio sedam razreda osnovne škole. Osmi razred kao i gimnaziju "Dimitrije Tucović" završio je u Beogradu 2000. god. Studije biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2000/2001. god., a diplomirao 2004/2005. god., odbranom diplomskog rada na Katedri za molekularnu biologiju i biohemiju sa naslovom "Učestalost C282Y i H63D mutacija u opštoj populaciji Srbije i Crne Gore". Za školsku 2004-2005. godinu Srđan Kesić je proglašen najboljim studentom studijske grupe Biologija. Srđan Kesić je takođe diplomirao filozofiju na Filozofskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2010. godine. Školske 2005/2006 godine Srđan Kesić je upisao poslediplomske studije na Biološkom fakultetu na smeru Neurofiziologija na kojima je završio prvu godinu a upisao drugu. Nakon uvođenja doktorskih studija na Biološkom fakultetu, tokom školske 2006/2007 god., prešao je sa magistarskih na prvu godinu doktorskih studija na smeru Neuronauke (modul Neurobiologija sa neuroimunologijom).

Od 2005 god. Srđan Kesić je zaposlen na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković«, Univerziteta u Beogradu. Od marta 2012. godine Srđan Kesić se nalazi na Odeljenju za neurofiziologiju Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković«, Univerziteta u Beogradu. Naučno-istraživački rad Srđana Kesića je do sada bio realizovan na sledećim projektima (1) "Modulacija ekscitabilnosti membrane i ritmovi bioelektrične aktivnosti neurona beskičmenjaka i kičmenjaka. Analiza i modeliranje" (2) "Efekti traumatskih, neurotoksičnih i neuroprotektivnih faktora na električnu aktivnost mozga sisara. Analiza i modeliranje" (3) "Interakcija glijne i neurona u procesu oporavka nakon oštećenja centralnog nervnog sistema" (4) "Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja" i na projektu (5) " Uticaj magnetnog polja i drugih sredinskih stresora na fiziološke odgovore i ponašanje različitih vrsta".

Iz doktorske disertacije Srđan Kesić je objavio sledeće radove u međunarodnim časopisima:

Kesić S, Nikolić Lj, Janać B, Spasić S (2014). Using Higuchi's fractal dimension in fine analysis of 2,7 mT and 10 mT static magnetic fields effects on the complex bursting activity of snail Br neuron. Arch. Biol. Sci. 66 (2), Article in press.

Kesić S, Nikolić Lj, Savić A, Janać B, Spasić S (2014). Ouabain modulation of snail Br neuron bursting activity after the exposure to 10 mT static magnetic field revealed by Higuchi fractal dimension. General Physiology and Biophysics, Accepted for publication.

Iz uže naučne oblasti Srđan Kesić je do sada objavio sledeće radove i saopštenja sa kongresa:

Radovi

Kesić S, Kalauzi A, Radulovački M, Carley D, Šaponjic J (2011). Coupling changes in cortical and pontine sigma and theta frequency oscillations following monoaminergic lesions in rat. Sleep Breath. 15:35-47.

Spasić S, Kalauzi A, Kesić S, Obradović M, Šaponjic J (2011). Surrogate data modeling the relationship between high frequency amplitudes and Higuchi fractal dimension of EEG signals in anesthetized rats. J. Theor. Biol. 289:160-166.

Spasić S, Kesić S, Kalauzi A, Šaponjić J (2011). Different anaesthesia in rat induces distinct inter-structure brain dynamic detected by Higuchi fractal dimension. Fractals 19:1-11.

Kalauzi A, Kesić S, Šaponjić J (2009). Cortico-pontine theta synchronization phase shift following monoaminergic lesion in rat. J. Physiol. Pharmacol. 60:79–84.

Ćulić M, Martać Lj, Grbić G, Kesić S, Spasić S, Sekulić S, Lalošević D, Čapo I (2007). Aluminum toxicity in rat brain: Electrophysiological, histological and behavioral evidence. In: From Basic Motor Control to Functional Recovery V (Eds. Gantchev N), 224-230. Sofia, Bulgaria.

Ćulić M, Grbić G, Martać Lj, Kesić S, Todorović V, Spasić S, Sekulić S (2006). Cerebellar responses to traumatic brain injury in rats. In: "Neurobiology Today" Neurobiological Studies – From Genes to Behaviour, (Eds. Ruzdijić S, Rakić Lj), 167-181. Research Signpost, Kerala, India.

Martać Lj, Kesić S, Ćulić M, Grbić G, Spasić S, Sekulić S, Lalošević D (2006). Effects of aluminum neurotoxicity on the rat brain electrocortical activity. A. Biol. Serb. - serija C: A. Physiol. Pharmacol. Serb. 42:219-225.

Grbić G, Ćulić M, Martać Lj, Kesić S, Soković M, Spasić S, Đoković D (2006). Camphor oil poisoning - spectral analysis of rat brain activity. A. Biol. Serb. - serija C: A. Physiol. Pharmacol. Serb. 42:233-238.

Radovi sa kongresa

Kesić S, Kalauzi A, Spasić S, Petrović J, Ćirić J, Šaponjić J. "Spavanje i EEG ritmovi u poremećaju holinergičke inervacije kore velikog mozga" V Kongres Društva za neuronauke Srbije, 29 septembar - 02 oktobar 2011, Kopaonik, Srbija. Zbornik sažetaka, p. 284

Petrović J, Kesić S, Ćirić J, Spasić S, Kalauzi A, Šaponjić J "Topografska analiza arhitekture spavanja u pacovskom modelu nucleus basalis lezije" V Kongres Društva za neuronauke Srbije, 29 septembar - 02 oktobar 2011, Kopaonik, Srbija. Zbornik sažetaka, p. 273

Spasić S, Kalauzi A, Kesić S, Ćirić J, Petrović J, Šaponjić J "Funkcionalna veza amplituda visokih frekvencija i Higučijeve fraktalne dimenzije EEG a modelirana pomoću surogat podataka u različitim generalnim anestezijama pacova" V Kongres Društva za neuronauke Srbije, 29 septembar - 02 oktobar 2011, Kopaonik, Srbija. Zbornik sažetaka, p. 283

Ćirić J, Spasić S, Kesić S, Petrović J, Kalauzi A, Šaponjić J. "EEG ritmovi budnosti i spavanja u fiziološkom starenju sa holinergičkom neurodegeneracijom" V Kongres

Društva za neuronauke Srbije, 29 septembar - 02 oktobar 2011, Kopaonik, Srbija. Zbornik sažetaka, p. 272

Kesić S, Kalauzi A, Šaponjić J. “Altered EEG frequency amplitudes across sleep/wake states in cortical cholinergic innervations disorder in rat. International symposium“ International symposium One hundred years of Ivan Djaja’s (Jean Giaja) Belgrade School of physiology, septembar 10-14, 2010, Beograd, Srbija, Book of Abstracts, p. 141

Kesić S, Spasić S, Kalauzi A, Radulovački M, Carley D, Šaponjić J. “Anaesthetic regimen determines anatomical distribution of EEG complexity in rats”7th FENS Forum of European Neuroscience, July-3-7, 2010, Amsterdam, Holland, Book of Abstracts, 192.26

Kalauzi A, Kesić S, Šaponjić J, Carley D. “Sleep-wake related cortico-pontine theta carrier frequency phase shift following monoaminergic lesion in rat” 7th FENS Forum of European Neuroscience, July 3-7, 2010, Amsterdam, Holland, Book of Abstracts, 130.35

Šaponjić J, Kesić S, Kalauzi A, Radulovački M, Carley D “Altered sigma/theta frequency coupling across sleep-wake states following systemically-induced monoaminergic axotomy in rat” 7th FENS Forum of European Neuroscience, July 3-7, 2010, Amsterdam, Holland, Book of Abstracts, 143.20

Spasić S, Kalauzi A, Kesić S, Šaponjić J, Radulovački M, Carley D. “Surrogate data modeling of the relationship between Higuchi fractal dimension and EEG high frequency (8-50Hz) activity in anesthetized rats” 7th FENS Forum of European Neuroscience, July 3-7, 2010, Amsterdam, Holland, Book of Abstracts, 192.50

Bjelobaba I, Šaponjić J, Kesić S, Lavrnja I, Peković S, Stojiljković M. “Ibotenic acid lesion of the nucleus basalis: diversity of the local astrocyte response to different volumes of the sham control or excitotoxin microinfusions in rat”. 7th FENS Forum of European Neuroscience, July 3-7, 2010, Amsterdam, Holland, Book of Abstracts, 198.1

Spasić S, Nikolić Lj, Kesić S, Vasić V, Kalauzi A, Šaponjić J “Complexity of neuronal activity in different experimental models detected by Higuchi fractal dimension“

Consciousness and its Measures, Nov 29 – Dec 1, 2009, Limassol, Cyprus, Book of Abstracts, P06.

Spasić S, Kesić S, Kalauzi A, Šaponjić J. “Effect of different anesthesia on the brain structure complexity patterns detected by Higuchi fractal dimension“ Second Congress of Physiological Sciences of Serbia with International participation, sept 17-20, 2009, Kragujevac, Srbija, Book of Abstracts, p.181

Spasić S, Kesić S, Rakić Lj, Kalauzi A, Šaponjić J. “Distinct brain inter-structure complexity patterns induced by two types of anesthesia in rat“ Electrical brain oscillations – linking basic and clinical research, 15-16 May, 2009, Zurich, Switzerland

Kesić S, Šaponjić J, Rakić Lj, Kalauzi A. “Effect of monoaminergic lesion on cortico-ponto-muscular oscillations in rat” 6th FENS Forum of European Neuroscience, July-12-16, 2008, Geneva, Switzerland, Book of Abstracts, 047.17

Kesić S, Kalauzi A, Šaponjić J. “Sigma and theta amplitude oscillations coupling caused by monoaminergic lesion in rat” COST B30 Training School “Neuroimaging and complementary techniques”, NERKA IBRO biophysical school, Faculty of Biology, University of Belgrade, 29 June – 6 July, 2008, Belgrade, Serbia, Abstract book, p. 45-46, Oral presentation.

Kalauzi A, Kesić S, Rakić Lj, Šaponjić J. “Changes in cortical and pontine sigma and theta amplitude oscillations coupling following monoaminergic lesions in rat” Revisita Espanola De Neuropsicologia, 2008, 10 (1), p. 134-135.

Kesić S, Kalauzi A, Rakić Lj, Šaponjić J. “Uticaj lezije monoaminergičkog sistema pacova na spregu promena amplituda kortikalnih i pontinskih sigma i teta oscilacija“ IV Kongres Društva za neuronauke Srbije, 11-14. septembar 2008, Kragujevac, Srbija. Zbornik sažetaka, p. 371- 372.

Grbić G, Martać Lj, Kesić S, Soković M. “Spectral analysis of electrical activity in different layers of rat cerebellar cortex” 1st International Congress on Biology in Serbia, 25-28 October 2007, Palić, Srbija, Zbornik sažetaka, p. 51

Čapo I, Lalošević D, Čulić M, Grbić G, Kesić S, Martać Lj, Spasić S, Sekulić S, Rokvić N. “Morphologic and physiologic aspect of aluminium intoxication on nerve cells” 3rd Serbian Congress for Microscopy, 25-28 September 2007, Beograd, Srbija, Book of Abstracts, p. 209-210.

Martać Lj, Grbić G, Čulić M, Kesić S, Spasić S. “Spectral changes of brain activity in the rat model of aluminum intoxication” Workshop - Current aspect in the field of Alzheimer research, 14-17 May 2007, Bad Honnef, Germany, Book of Abstracts, p. 32-33.

Spasić S, Čulić M, Grbić G, Martać Lj, Kesić S, Jovanović A. “Fractal analysis of rat brain activity in animal model of epilepsy” COST Action B27 Electric Neuronal Oscillations and cognition (ENOC), Neuroscience Today: Neuronal Functional Diversity and Collective Behaviors, 26-28 March, 2007 Florence, Italy, Book of Abstracts, p.16-19.

Čulić M, Martać Lj, Grbić G, Kesić S, Spasić S, Lalošević D, Sekulić S. “Fractal analysis of brain activity in the rat model of cognitive dysfunction” COST Action B27 Electric Neuronal Oscillations and cognition (ENOC), Neuroscience Today: Neuronal Functional Diversity and Collective Behaviors, 26-28 March, 2007, Florence, Italy, Book of Abstracts, p. 10-13.

Čulić M, Grbić G, Martać Lj, Kesić S, Todorović V, Spasić S. “Cerebellar responses to single and repeated brain injury in rats” The Node and the Network: the Fundamental Contribution of Camillo Golgi to Modern Neuroscience, 2-4 October 2006, Pavia, Italy, Book of Abstracts, p.14

Grbić G, Čulić M, Spasić S, Kesić S. Fractal analysis of brain activity in rats treated with aluminium. 5th FENS Forum of European Neuroscience, 8-12 July 2006, Vienna, Austria, Book of Abstracts, 130.21

Kesić S, Martać Lj, Grbić G, Spasić S, Sekulić S, Lalošević D. “Spectral analysis of cerebral electrocortical activity in rats treated with aluminium” International Symposium “Neurobiology today”, 50th Anniversary of Belgrade Neurobiological School, 29-30 May 2006, Belgrade-Serbia, Book of Abstracts, P6.

Ćulić M, Grbić G, Martać Lj, Kesić S, Todorović V, Spasić S, Sekulić S. “Cerebellar responses to traumatic brain injury in rats” International Symposium “Neurobiology today”, 50th Anniversary of Belgrade Neurobiological School, 29-30 May 2006, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, SIV, L3.

Spasić S, Ćulić M, Grbić G, Martać Lj, Kesić S, Soković M. “Fractal analysis of rat brain activity after camphor administration” The 9th International Multidisciplinary Conference - Fractal, 12-15 February, 2006, Vienna, Austria, Book of Abstracts, p. 19-20

Martać Lj, Kesić S, Ćulić M, Grbić G, Spasić S, Sekulić S, Lalošević D. “Effects of aluminum neurotoxicity on the rat brain electrocortical activity” The 2nd Multidisciplinary Scientific Meeting with international participation - Oxidative stress and the mechanisms of protection, 2-3 November 2006, Kragujevac, Srbija, Book of Abstracts, p. 41

Grbić G, Ćulić M, Martać Lj, Kesić S, Soković M, Spasić S, Đoković D. “Camphor oil poisoning - spectral analysis of rat brain activity” The 2nd Multidisciplinary Scientific Meeting with international participation - Oxidative stress and the mechanisms of protection, 2-3 November 2006, Kragujevac, Srbija, Book of Abstracts, p. 42

12. IZJAVE

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: **Srđan Kesić**

Broj indeksa: KA060025

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom

Primena Higučijeve fraktalne dimenzije i metode nezavisnih komponentata u analizi spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona vinogradskog puža pod delovanjem konstantnog magnetnog polja i uabaina

- Rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i,
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 24.02.2014



Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora: **Srđan Kesić**

Broj indeksa: KA 060025

Studijski program: **Neuronauke - Neurobiologija sa neuroimunologijom**

Naslov rada: *Primena Higučijeve fraktalne dimenzije i metode nezavisnih komponenata u analizi spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona vinogradskog puža pod delovanjem konstantnog magnetnog polja i uabaina*

Mentor: **dr Slađana Spasić, prof. dr Pavle Anđus**

Potpisani: **Srđan Kesić**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su moje ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 24.02.2014



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u digitalni repezitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Primena Higučijeve fraktalne dimenzije i metode nezavisnih komponenata u analizi spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona vinogradskog puža pod delovanjem konstantnog magnetnog polja i uabaina

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repezitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno– bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno– deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 24.02.2014

Potpis doktoranda

