

Funkční analýza NS

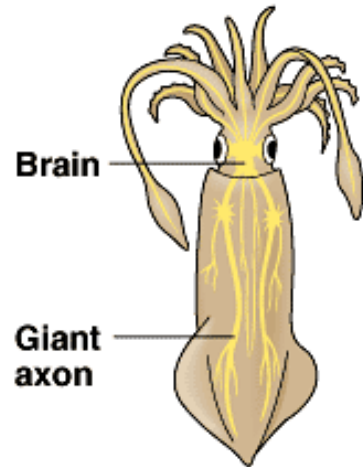
Elektrofyzilogické metody - rychlost

- celá řada metod měření proudu, napětí, potenciálů – využití mikroelektrod

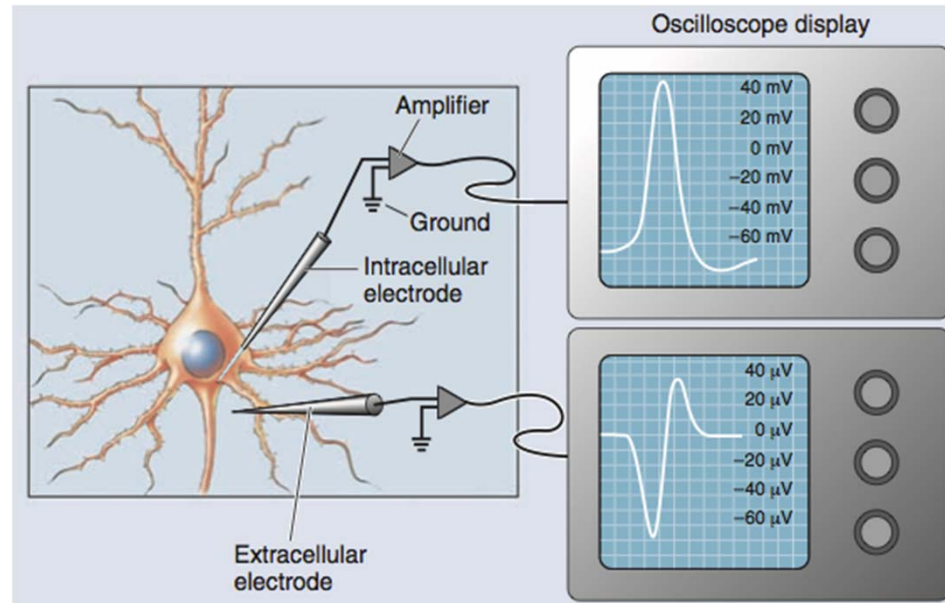
- a) Intracelulární měření – měří se jediná buňka, i malé změny potenciálu

- b) Extracelulární měření – single unit recording (měří se jedna buňka)
 - multi-unit recording (měří se skupina buněk najednou)
 - EEG

Intracelulární měření

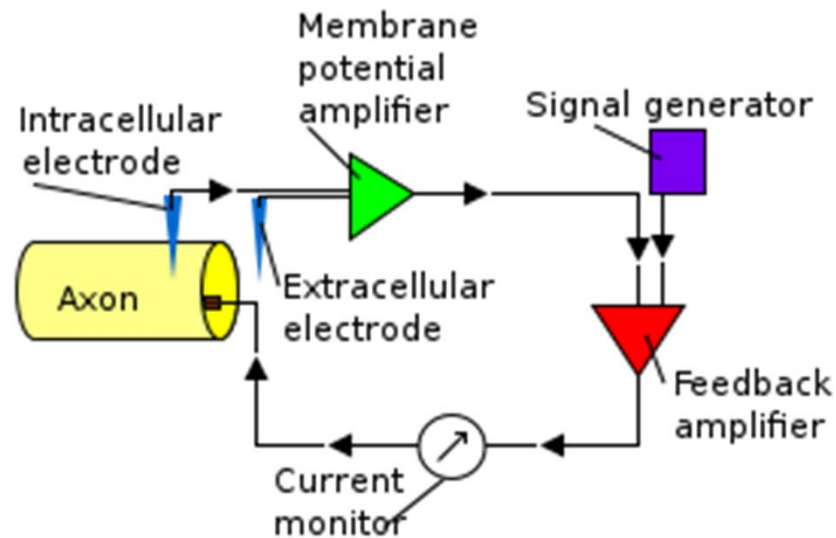


(g) Squid (mollusk)



Intracelulární měření

Metoda vnučeného napětí (voltage clamp technique)



obvykle 2 mikroelektrody – intracelulární snímá membránové napětí proti extracelulární

- buňku vystavíme **konstantnímu** napětí a toto napětí udržujeme
- měříme velikost/četnost proudů v závislosti na nastaveném **konstantním** napětí

Intracelulární měření

Metoda vnučeného proudu (current clamp technique)

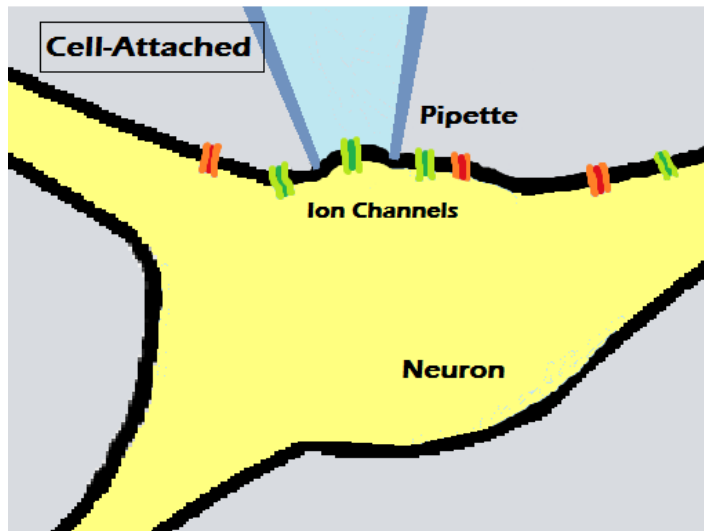
2 mikroelektrody – intracelulární a referenční extracelulární

- buňku stimulujeme různými pulsy proudu – měříme její odpověď
- měříme změny membránového napětí
- měření spontánní a indukované aktivity

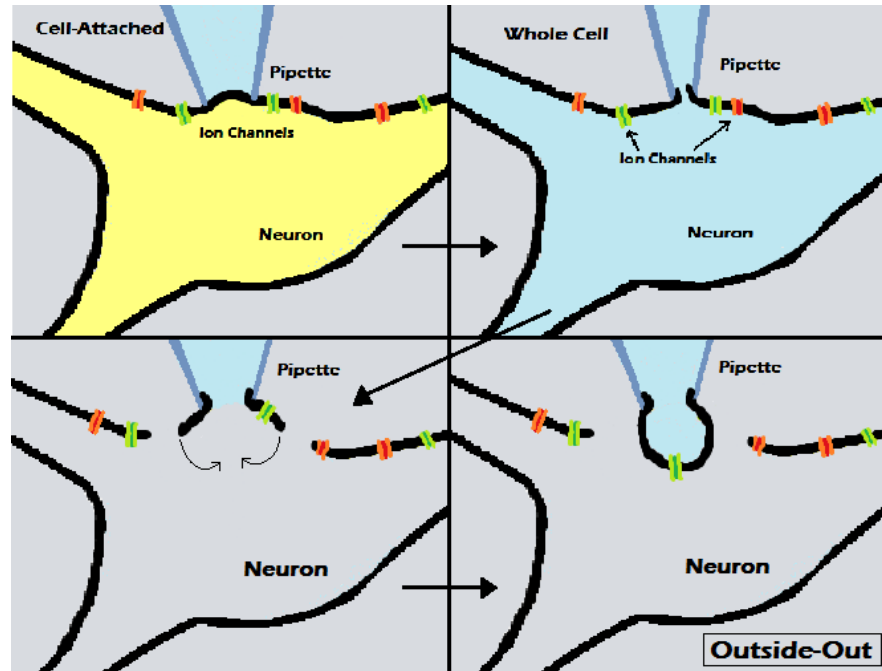
Patch clamp technique

= technika terčikového zámku

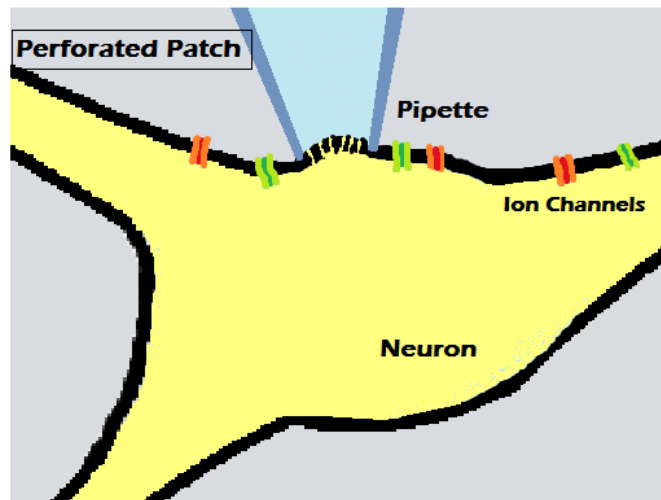
- umožňuje měření proudů vyvolaných aktivací iontových kanálů
- umožňuje snímání celé buňky i jediného iontového kanálu v izolovaném terčíku
- k buněčné membráně je přisáta elektroda (mikropipeta) - pevné spojení s vysokým odporem
- během měření lze měnit složení roztoku v okolí buňky a sledovat kinetiku iontových kanálů.



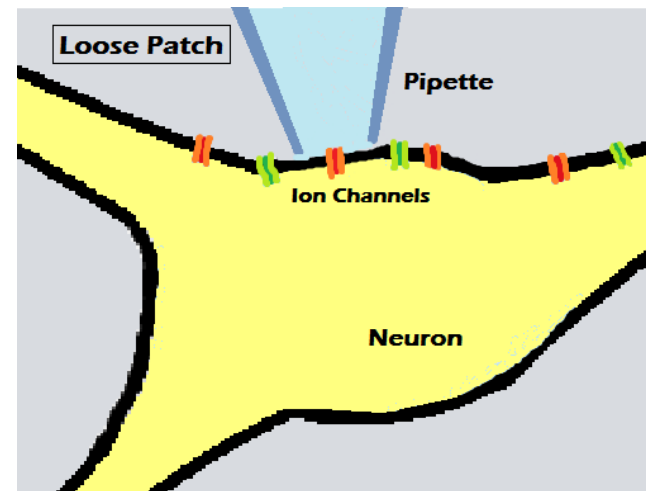
nižší sací síla -



- vyšší sací síla



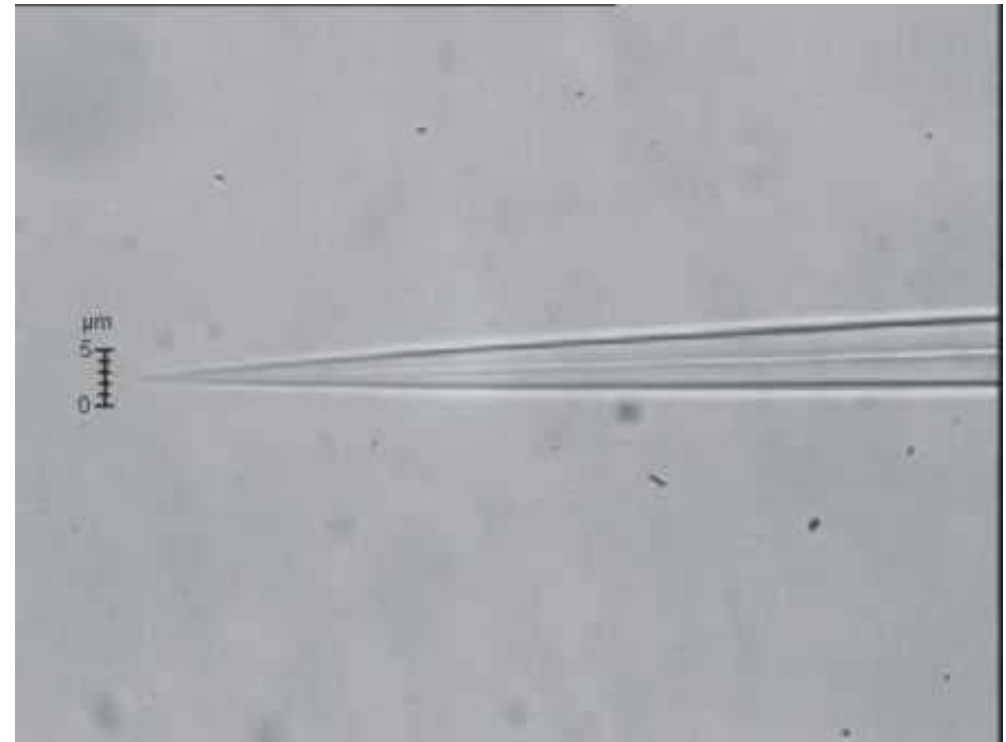
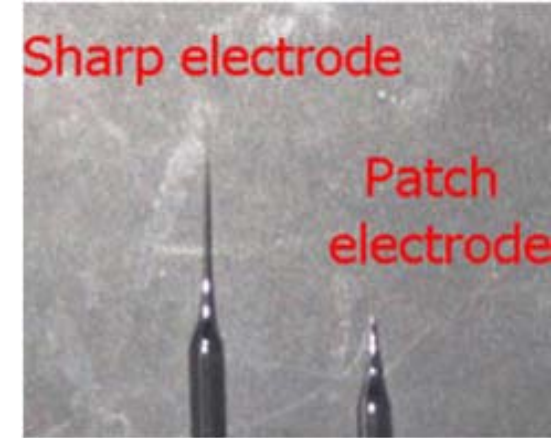
- antibiotiky indukované póry
- projdou pouze malé monovalentní ionty



- posun po membráně a měření více míst

Sharp electrode technique

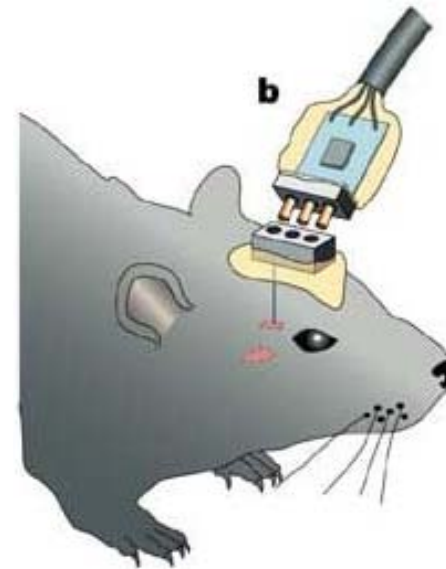
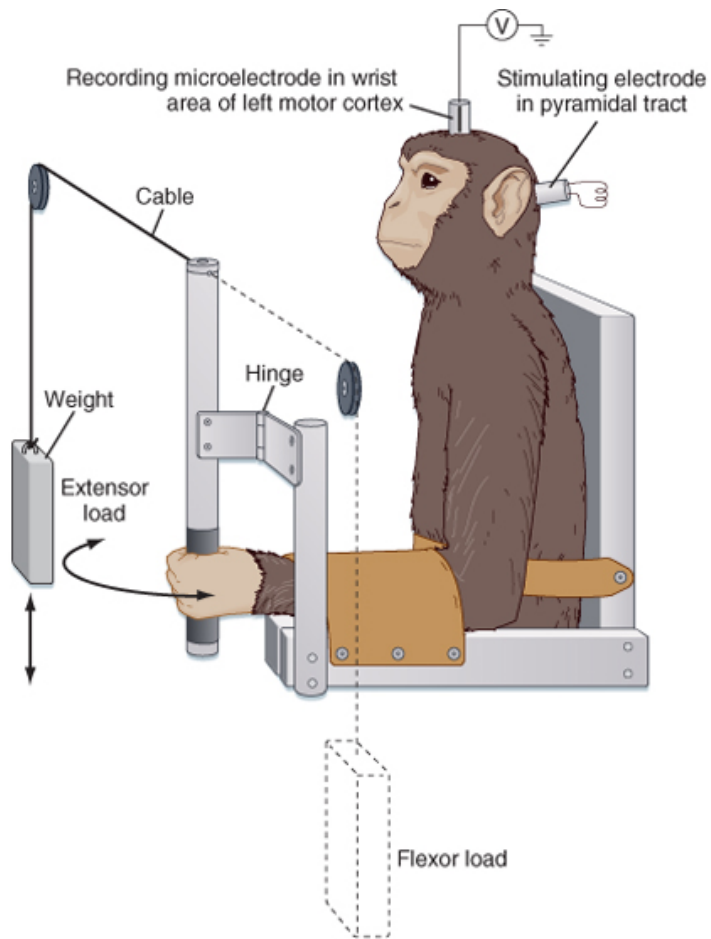
- malý průměr elektrody
- intracelulární měření
- minimální výměna iontů mezi elektrodou a vnitřním prostředím buňky (minimální vliv elektrolytu v elektrodě)



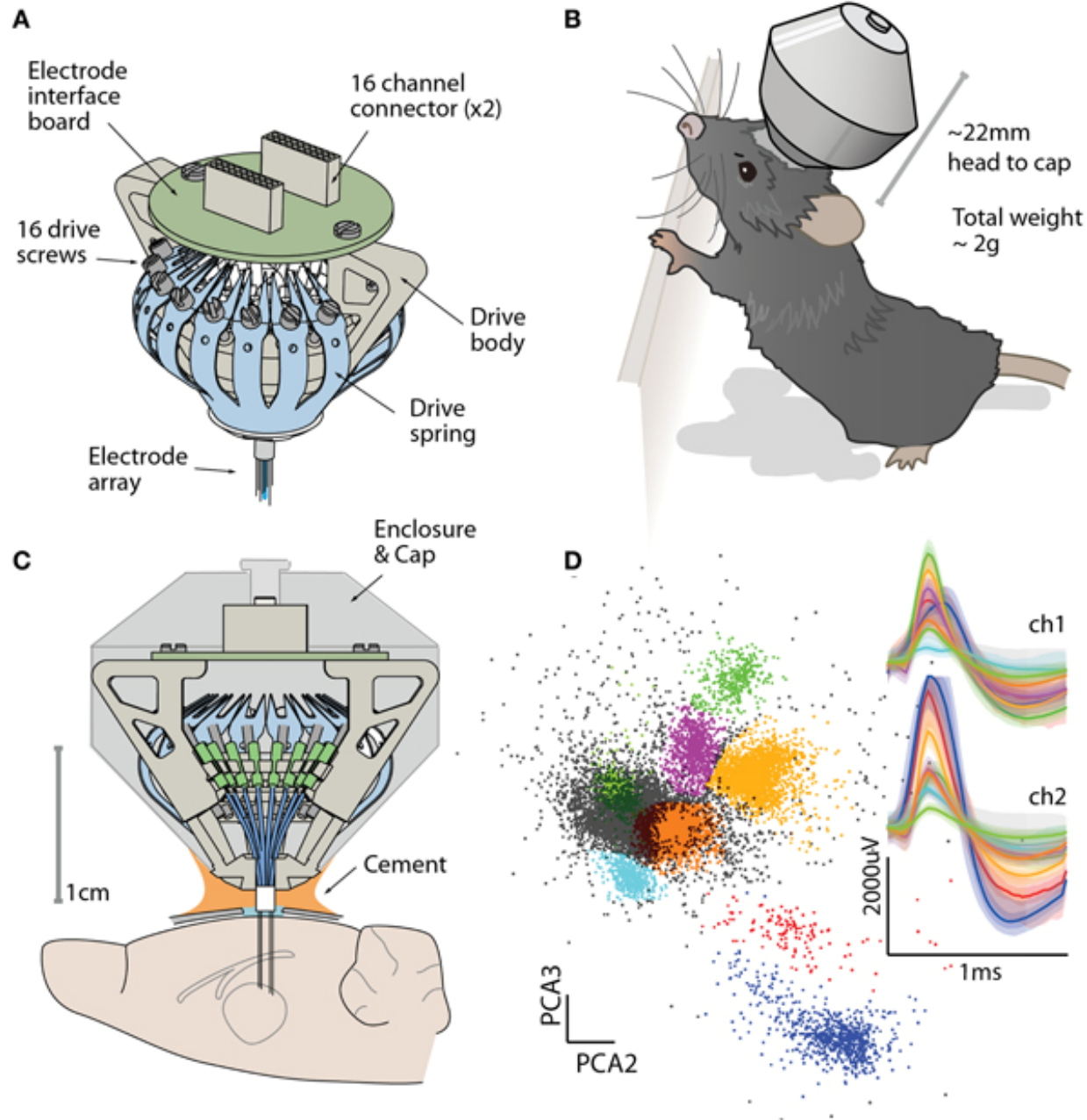
Extracelulární měření

Single unit recording

- mikroelektroda (skleněná, kovová) zavedená do mozku
- rozlišení na 1 neuron – monitorování aktivity 1 neuronu



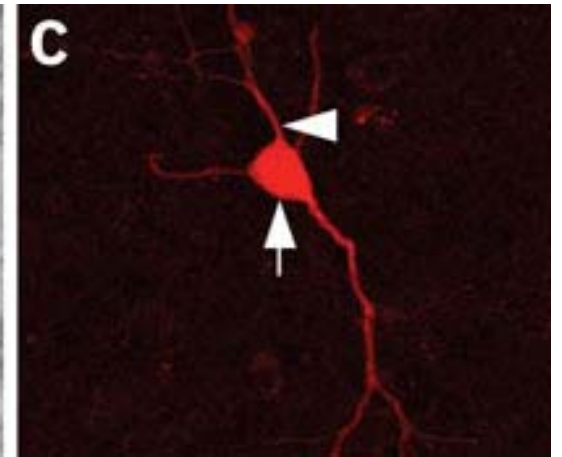
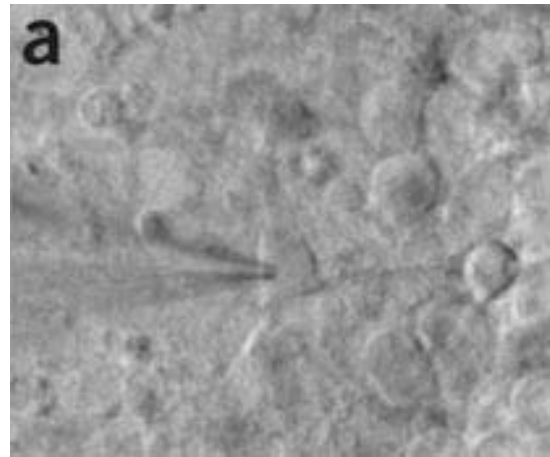
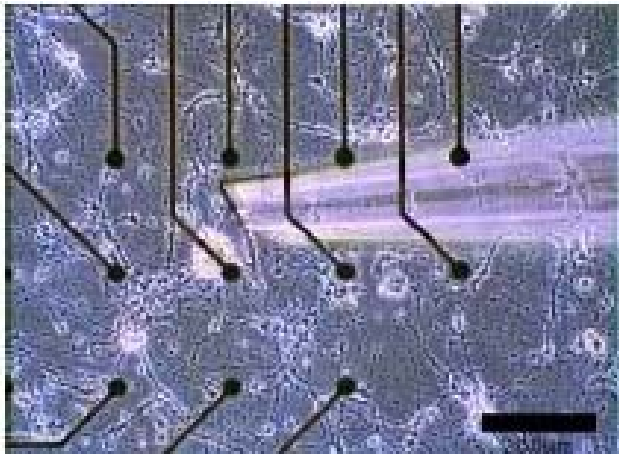
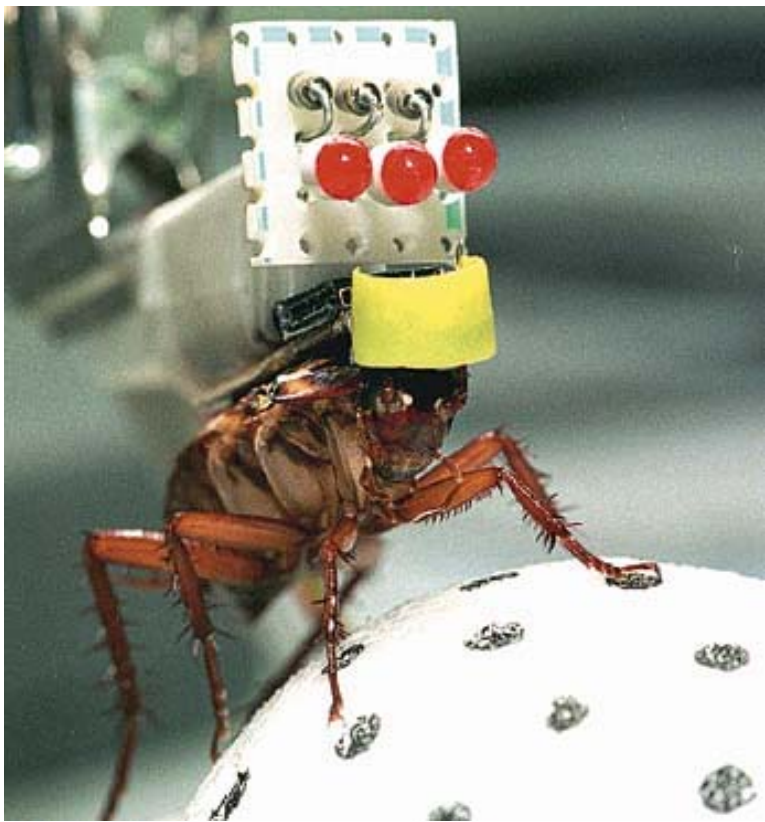
Multi unit recording – větší elektroda nebo systém více elektrod



Funkční analýza NS

- EEG
- záznam časové změny elektrického potenciálu způsobeného mozkovou aktivitou
- tento záznam je pořízen elektroencefalografem
- neinvazivní metoda funkčního vyšetření elektrické aktivity CNS
- Sumační signály z neuronů jsou snímány elektrodami z povrchu skalpu
- EEG signál vzniká jako důsledek sumace aktivity extrémně vysokého množství neuronů





Optogenetika v neurobiologii

- využití světla/laserů pro stimulaci neuronů
- a) exprese iontových kanálů **aktivovaných/inhibovaných** světlem
 - modulace aktivity určité skupiny neuronů (GMO, promotory, inducibilita ...)
 - **channelrhodopsiny** (Na⁺, H⁺)
 - **halorhodopsiny** (Cl⁻)
 - **archaerhodopsin** (inverzně H⁺)
 - bacteriorhodopsin
 - **rychlost, přesnost**



Optogenetika v neurobiologii

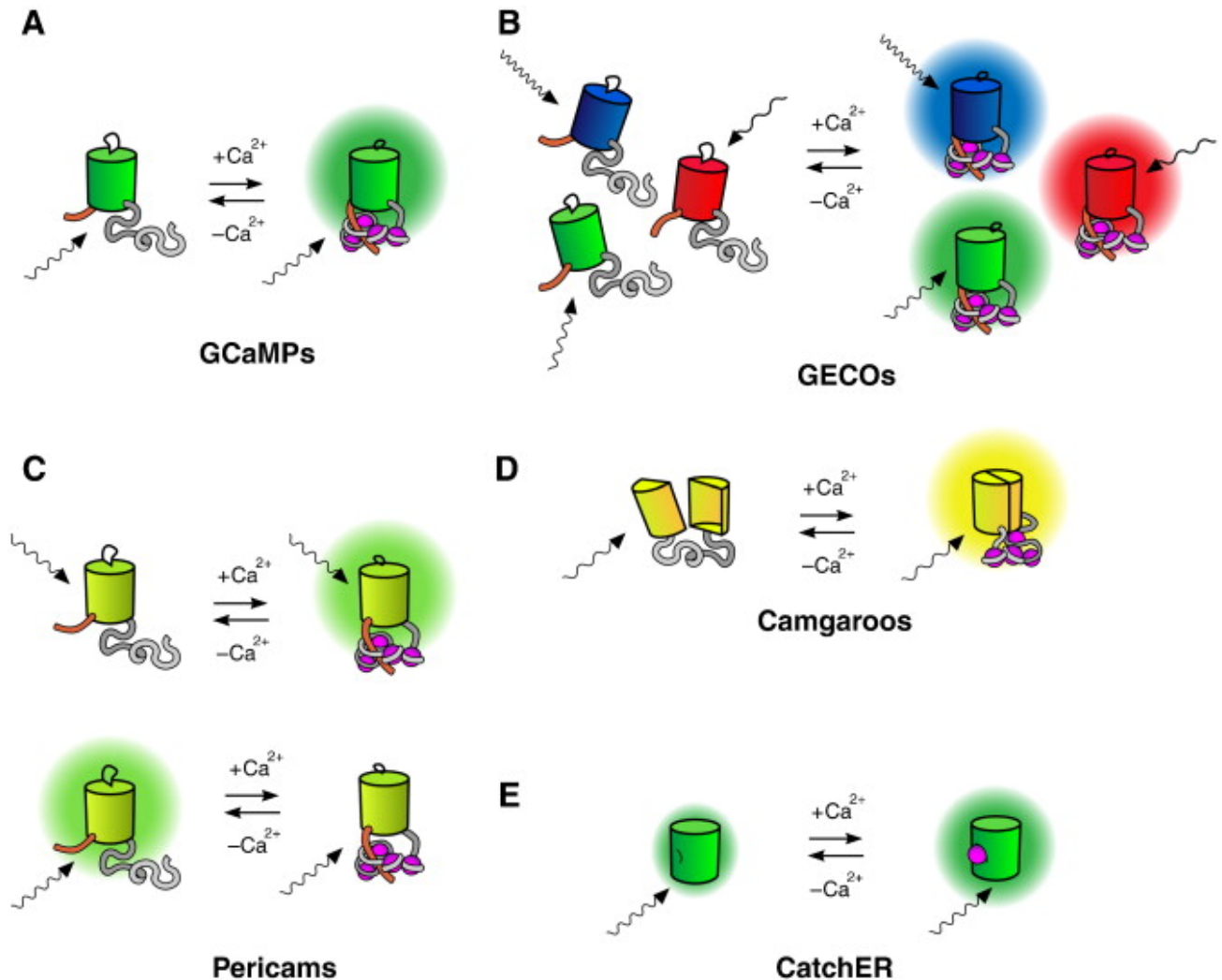
Opsin Type	Variant	Description	Peak Response Spectra (nm)
Channelrhodopsins: cation channels from <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	ChR2	Widely used light-gated cation channel from <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CrChR2)	470
	ChR2/H134	Widely used variant with larger photocurrent compared to CrChR2	450
	ChETA	E123T mutation; creates faster kinetics but reduces photocurrent amplitude	490
	ChR/T159C	T159C mutation; displays increased photocurrents	470
	SFO/SSFO	Step function Opsins and Stabilized Step Function Opsins. Mutations at C128 and D156 of CrChR delay the closing of the channel	470(activ.), 590(inact.)
	ReaChR	Red-activatable variant of CrChR2	590

<https://www.addgene.org/optogenetics/guide/>

Optogenetika v neurobiologii

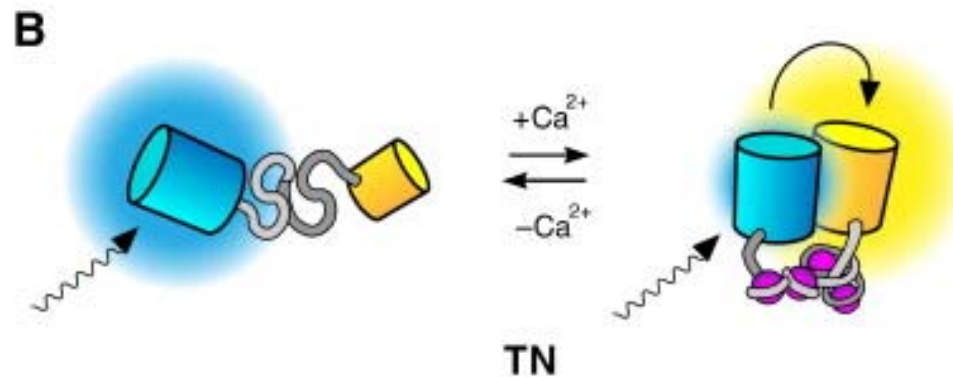
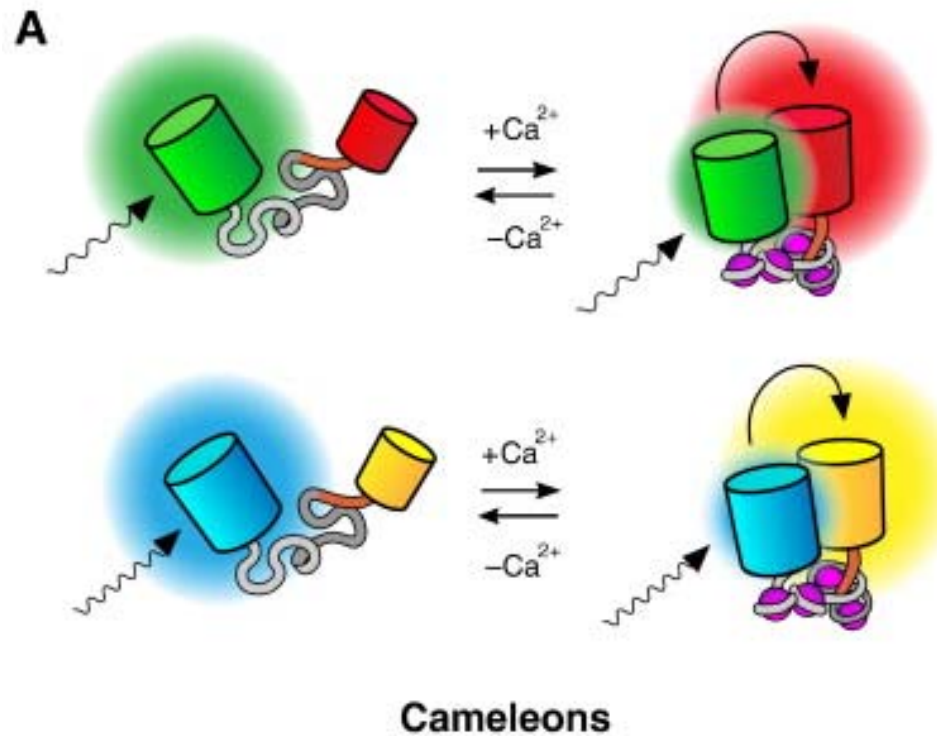
b) exprese optogenetických senzorů pro – neurotransmitery, ionty, membránové napětí ...

Ca²⁺
- single proteiny



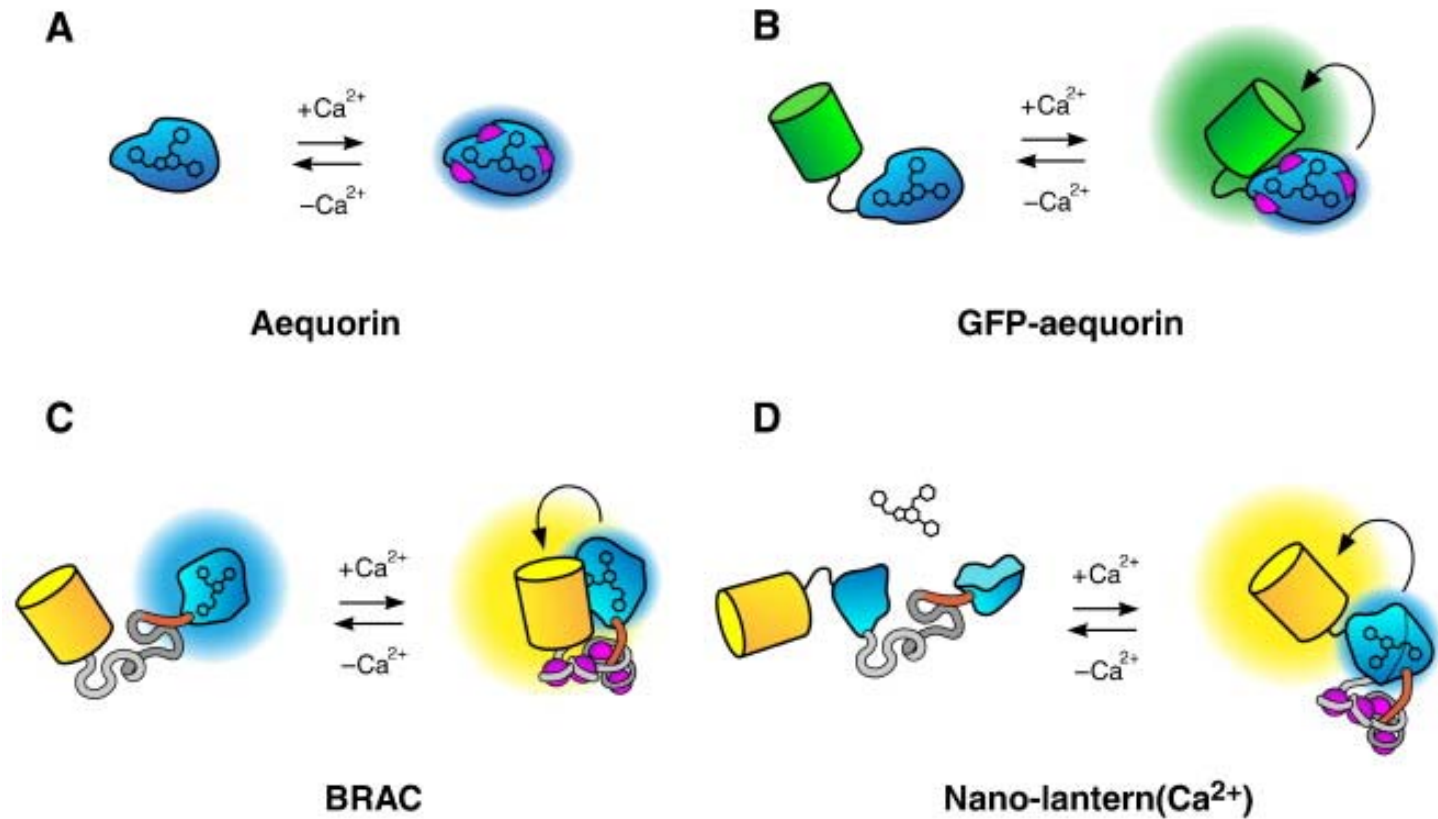
Optogenetika v neurobiologii

Ca²⁺
- dva proteiny (FRET)



Optogenetika v neurobiologii

Ca²⁺
- bioluminescence



Měření aktivity neuronů pomocí fluoroforů (chemických senzorů)

Neinvazivní

- In vitro – tkáňové kultury, řezy mozku, buněčné kultury ...
- In vivo – zvířecí modely



Měření aktivity neuronů pomocí fluoroforů (chemických senzorů)

– fluorofory citlivé na změny napětí, koncentrace iontů...

Aplikace fluoroforu - mikroinjekcí (jsou-li buňky dost velké)
- ve formě esterů (ester loading)

Fluorofory obvykle nepřecházejí přes membránu – hodně nabitě převážně na karboxylových skupinách – jejich esterifikací vzniká nenabitá sloučenina, může se dostat do buňky a tam je aktivována esterázami – trošku problém pak je že indikátor se dostane všude do buňky, v různých částech různě aktivní esterázy a tedy různé množství aktivní latky

- lze dlouhodobé monitorování změn v reálném čase

High Affinity Calcium Indicators

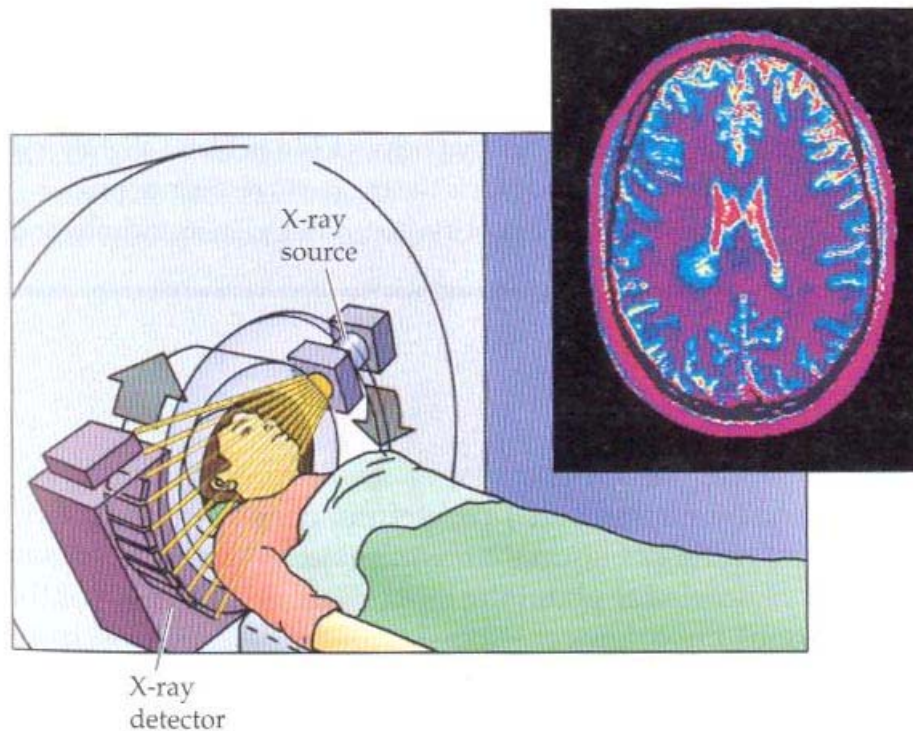
Indicator	Kd for Ca ²⁺ (nM)	Excitation (nm), emission (nm)	Notes
Calcium Green-1	190	490ex 531 em	single wavelength
Fluo-3	325	506 ex 526 em	single wavelength
Fluo-4	345	494 ex 516 em	single wavelength
Fura-2	145	363/335 ex 512 em	dual excitation/ single emission
Indo-1	230	488 ex 405/485 em	single excitation/dual emission
Oregon Green 488 Bapta-1	170	488 ex 520 em	single long wavelength
Fura-4F	0.77	336/366 ex, 511em	Ratiometric Excitation / Single emission
Fura-5F	0.40	336/363 ex, 512em	Ratiometric Excitation / Single emission
Calcium Crimson	185	590ex 615 em	single long wavelength
X-rhod-1	0.7	580 ex,602 em	Single excitation/emission

Funkční analýza NS

Functional brain imaging – neinvazivní, simultánní měření více struktur najednou

CT (počítačová tomografie) – rentgenový paprsek, detektor, rotace, až 3D

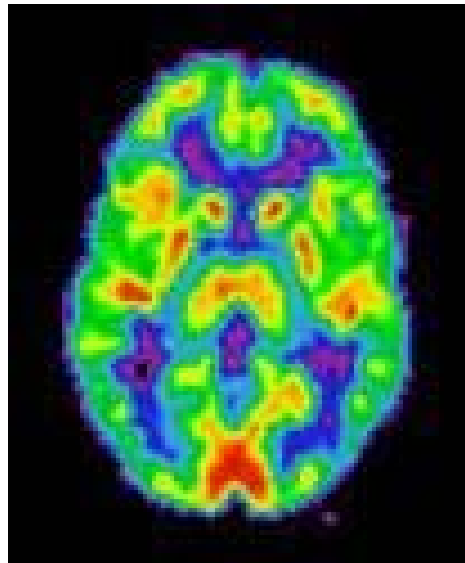
- vysoká rozlišovací schopnost
- rozdíl mezi vstupní a výstupní intenzitou záření



Funkční analýza NS

PET – pozitronová emisní tomografie

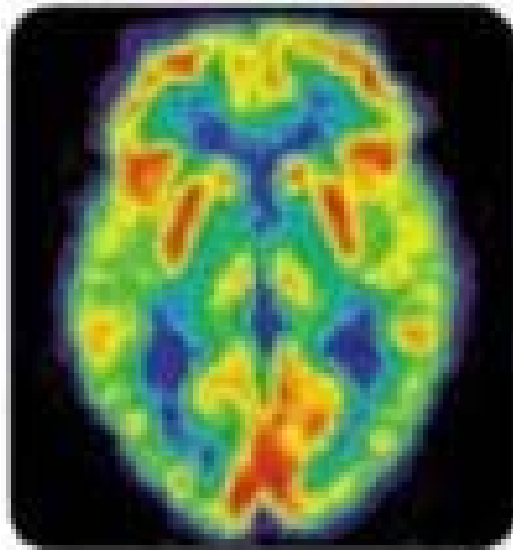
- využívá pozitronových zářičů a detektoru záření
- pozitrony-emitující isotop (např. v glukóze) do krve – akumulace v metabolicky aktivních místech
- hodnocení
 - regionálního metabolismu
 - prokrvení mozku jako ukazatele neuronální aktivity
 - účinek psychofarmak *in vivo*
 - detekce malých funkčních abnormalit mozku u psychických poruch



Funkční analýza NS

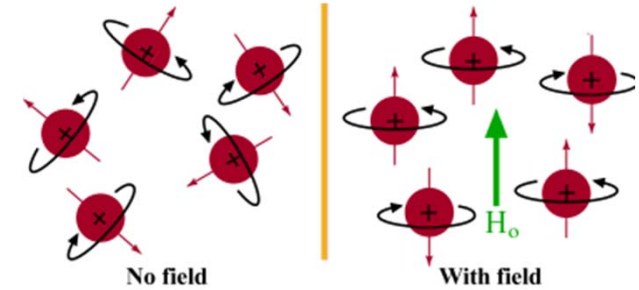
SPECT – single-photon emission computerized tomography

- opět injekce nebo inhalace radioaktivního izotopu a detekce gamma-záření
- izotopem je zde zdroj gamma-záření



Funkční analýza NS

MRI – magnetická rezonance



- působení vysokofrekvenčního magnetického pole na atomová jádra (protony a neutrony)
 - osa otáčení (spin) se podle magnetického pole orientuje – paralelně a antiparalelně
- po odpojení vysokofrekvenčního magnetického pole – jádro se vrací do klidové polohy
- používá se více magnetických polí s různou orientací a frekvencemi
- při určité frekvenci působení určité atomy poskytují rezonanční signál (radiofrekvenční energie) – klasicky pro vodík 42,58 MHz (pro indukci 1 Tesla)
- rozdílná intenzita signálů u různých tkání

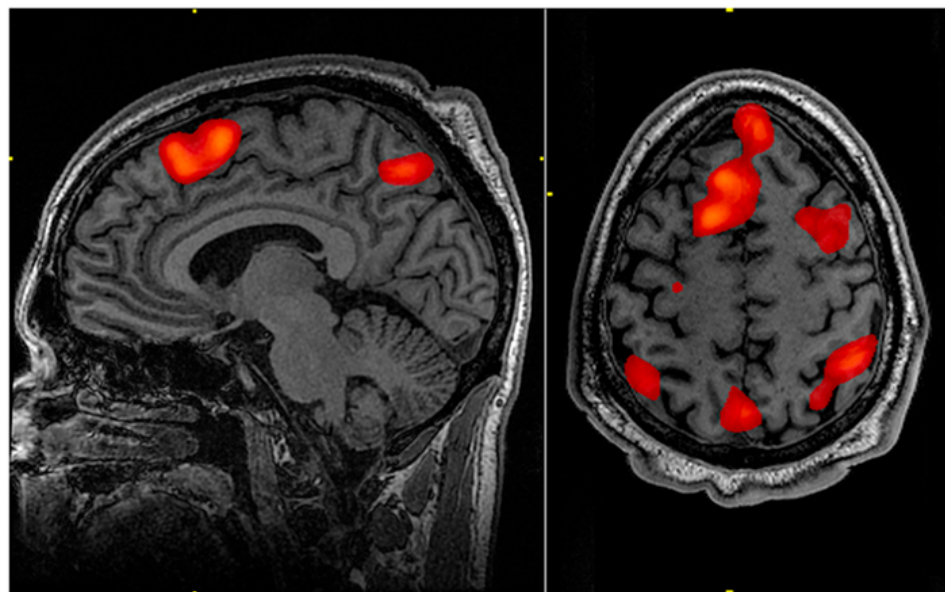


Funkční analýza NS

Funkční MRI (fMRI)

oxyhemoglobin/deoxyhemoglobin

- MRI rozliší zda hemoglobin má navázaný kyslík – podle toho ovlivní rezonanční signál vodíkových jader v blízkosti
- aktivace určité části mozku speciálním úkolem – určitá část mozku potřebuje více kyslíku, zvýší se průtok krve k ní, změna v rezonančním signálu – nepřímé sledování mozkové aktivity



Funkční analýza NS

Magnetoencefalografie

- mapování mozkové aktivity pomocí citlivých magnetometrů
- elektrická aktivita neuronů vede i ke vzniku malého magnetického pole
- pro měření nutné stínění od okolí

