

Elektrofyzilogické metody a studium chování a paměti

Eduard Kelemen

Národní ústav duševního zdraví, Klecany



Elektrofyzilogické metody studia chování a paměti

EEG a potenciál blízkého pole (LFP)

- LFP a EEG u zvířat
- EEG u lidí,
- spánkové EEG (příští přednáška)

Nahrávání jednotkové aktivity

- tetrody
- silikonové próby
- vápníkové zobrazování aktivity
- terčíkový zámek

Metody vyhodnocování

- LFP/EEG - Fourierova transformace
- jednotky - autokorelace, vzájemné korelace, korelační matice

Elektroencefalogram (EEG) a potenciály blízkého pole

Zaznamenávají se sumární změny elektrického potenciálu, které vznikají v důsledku synchronizované synaptické aktivity velkého množství neuronů.

EEG – elektroencefalogram – měří se z povrchu lebky u lidí nebo zvířat.

LFP – local field potentials – potenciály blízkého pole, měří se u zvířat (zřídka u lidí v případě klinické potřeby) z elektrod uvnitř mozku.

Na EEG/LFP záznamu se často studují rytmické vzorce aktivity – ‚mozkové vlny‘

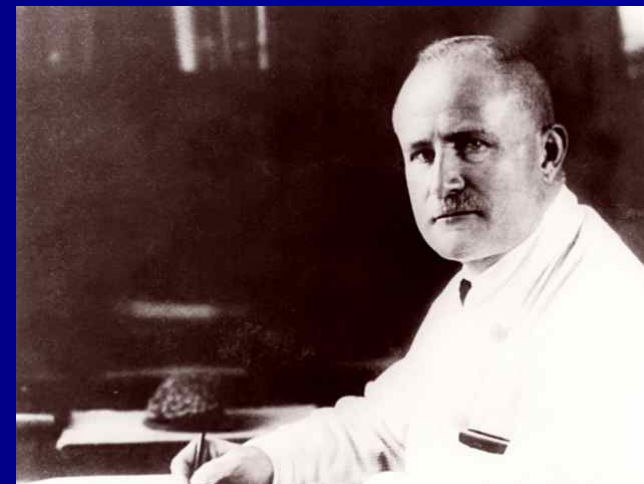
- théta rytmus
- gama rytmus
- pomalé oscilace
- spánková vřetena

Hans Berger – lékař na univerzitě v německé Jeně

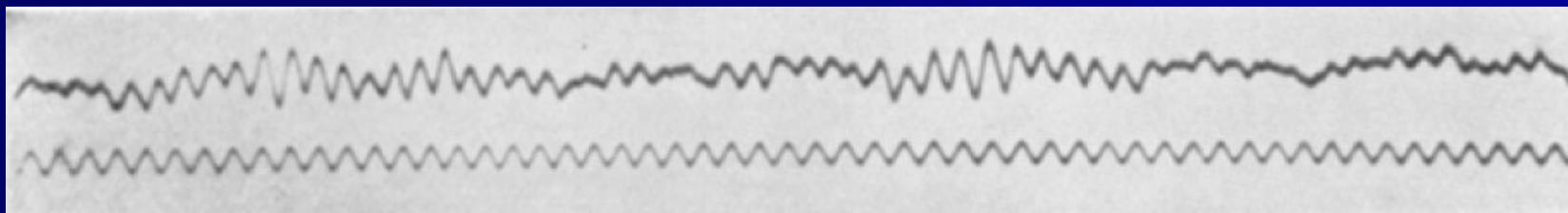
První nahrávání EEG u lidí (1924)

Objev alfa vln

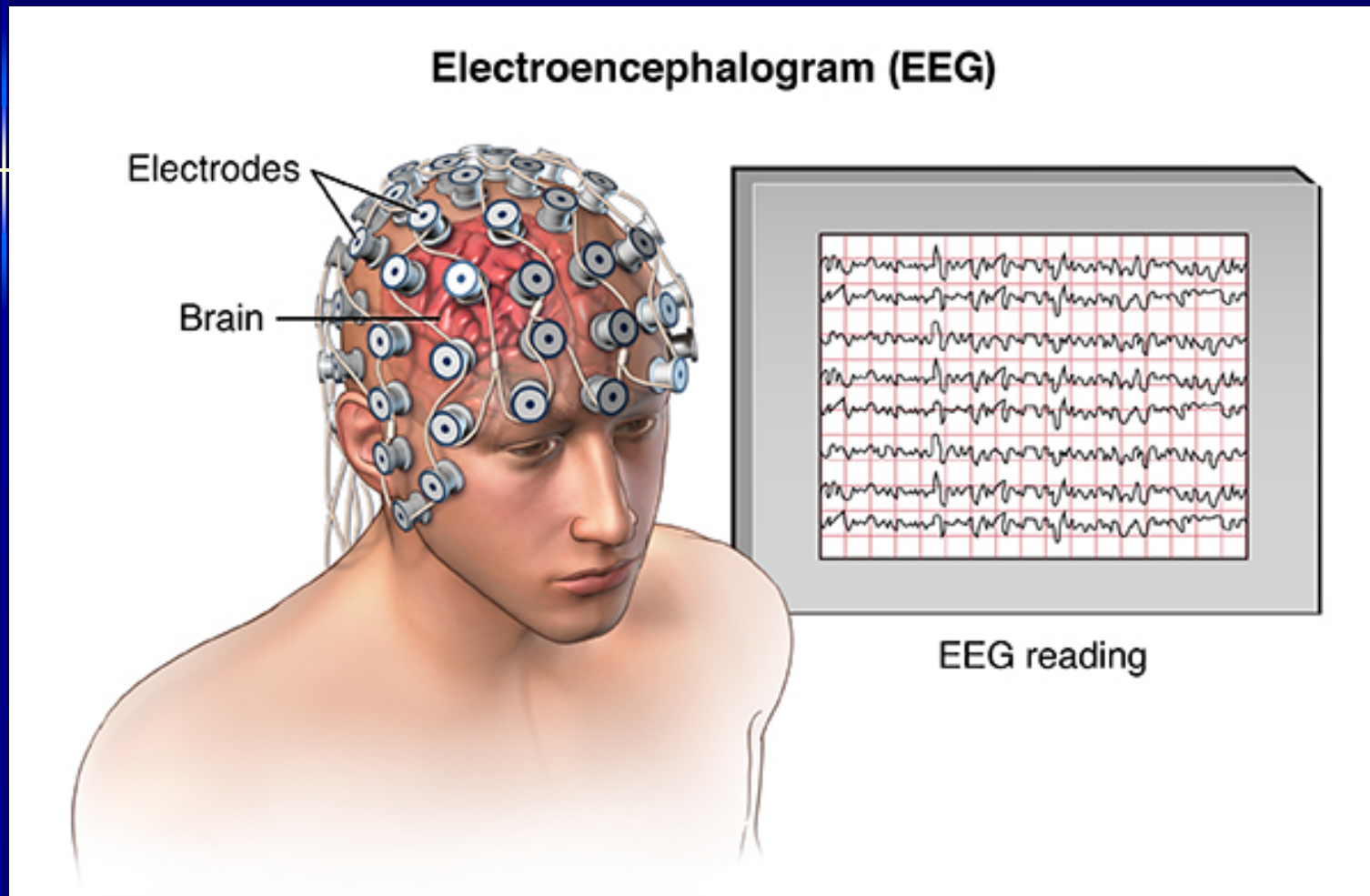
-obrázek dole ukazuje jednu z prvních nahrávek. Horní záznam je nahrávka EEG, spodní záznam umělý signál s frekvencí 10Hz.



Alfa vlny se u lidí objevují v bdělosti, když je člověk v klidu a má zavřené oči.

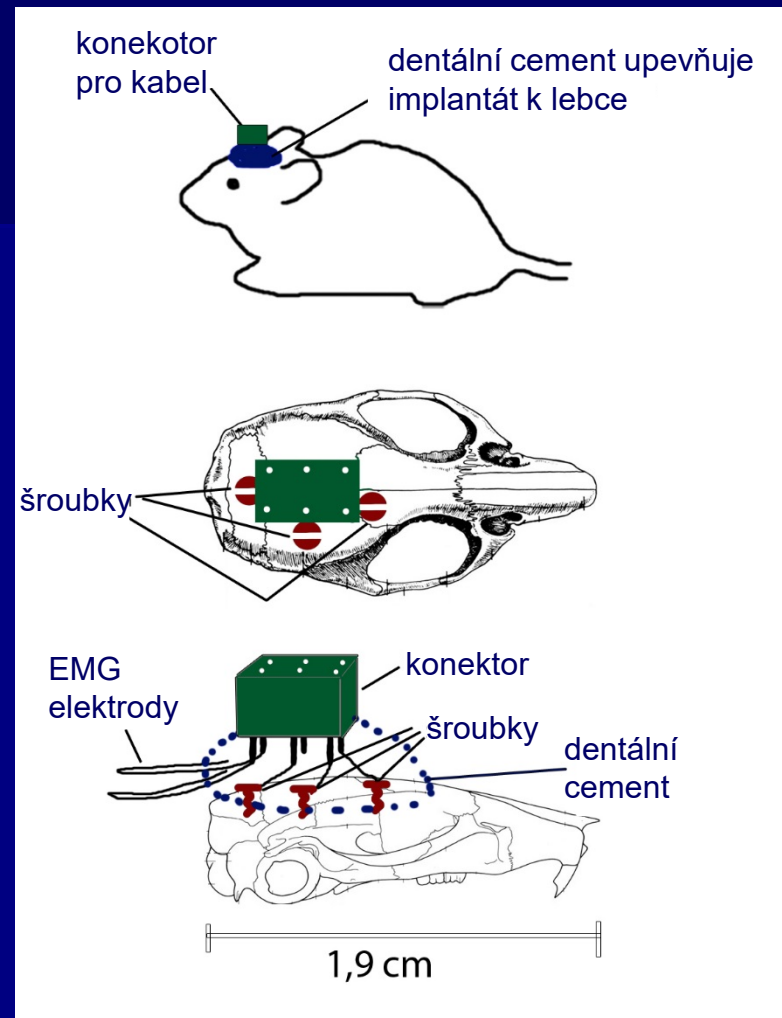
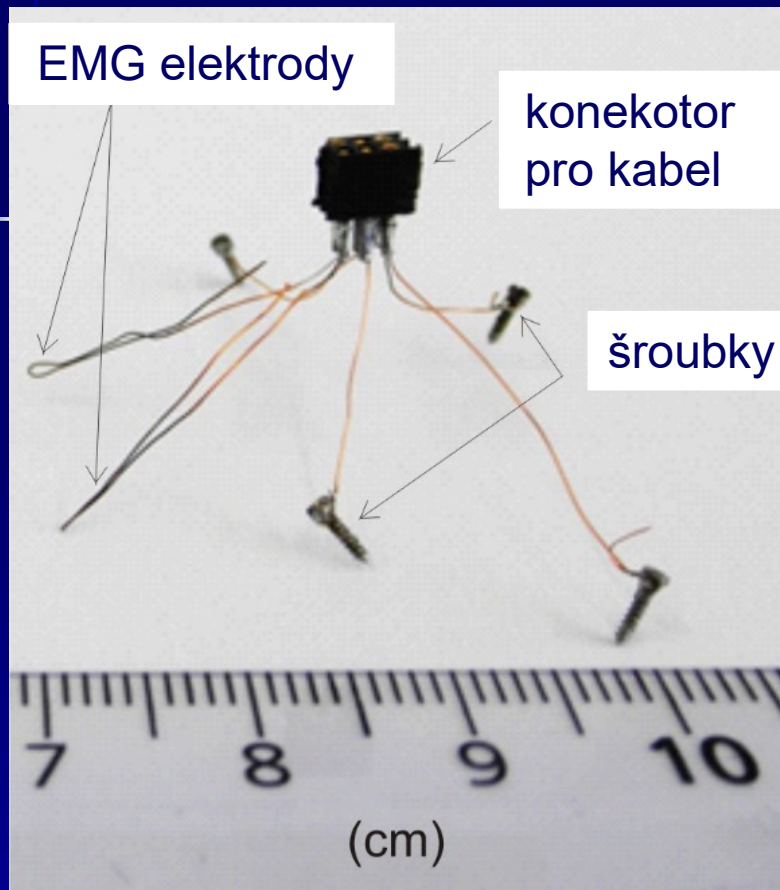


Elektroencefalogram



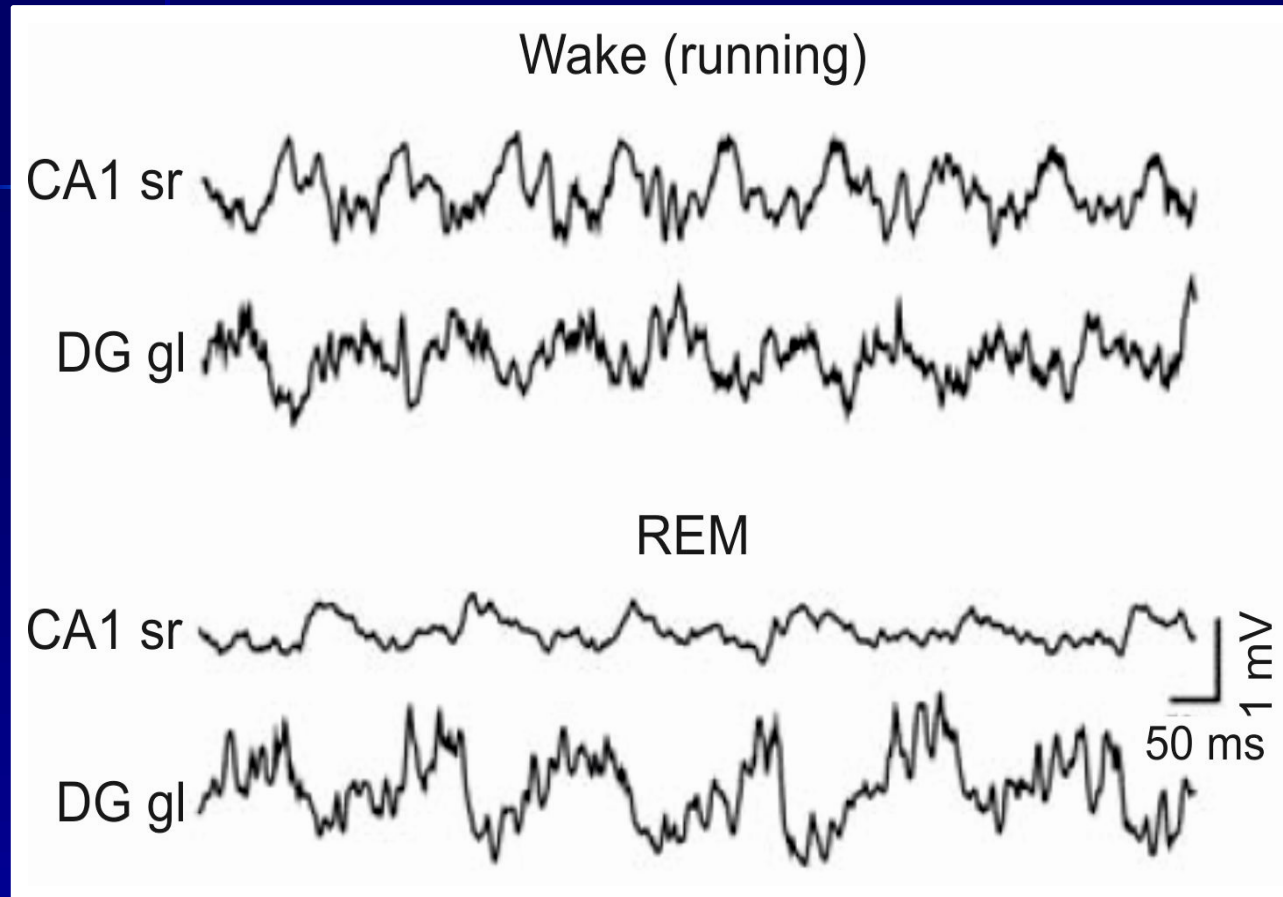
Schema nahrávání EEG. Často se používá větší množství elektrod rozmístěných po povrchu hlavy.

Elektroencefalogram u hlodavců



U laboratorních zvířat, třeba u myši, se EEG elektrody (v tomto případě šroubky) upevňují k lebce permanentně. Šroubky jsou připevněny ke konektoru, který je taky implantován na hlavě a k němu se během nahrávání připojuje kabel k zesilovačům.

Théta rytmus



4-12 Hz

doprovází aktivní pohyb

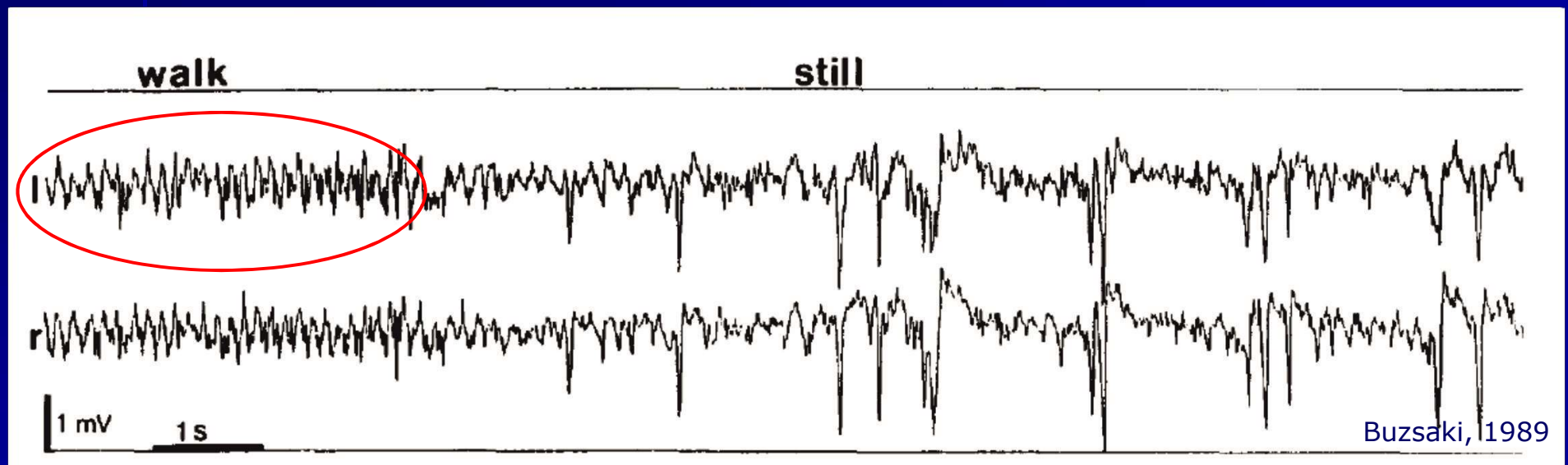
vyskytuje se i během REM spánku

Organizuje aktivitu hipokampálních neuronů

Hraje roli v utváření paměti (LTP)

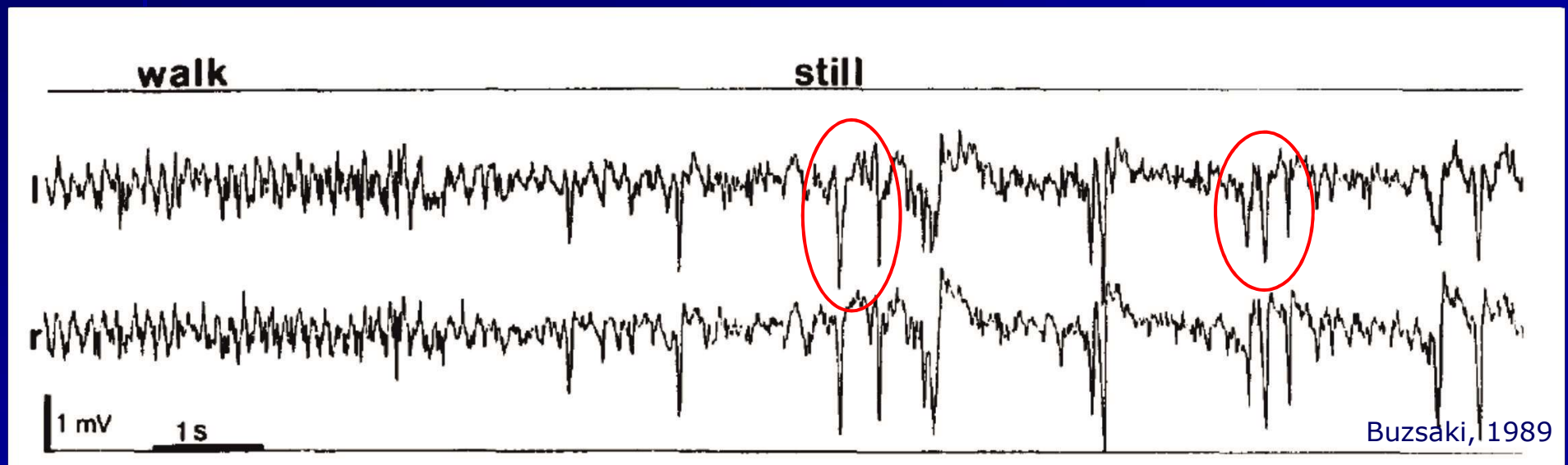
Na následujících několika obrázcích si představíme několik charakteristických typů (vzorců) EEG aktivity, které lze pozorovat v EEG záznamech. Jako první je tzv. théta aktivita pozorována v hipokampu u zvířat.

Théta rytmus – během aktivního pohybu



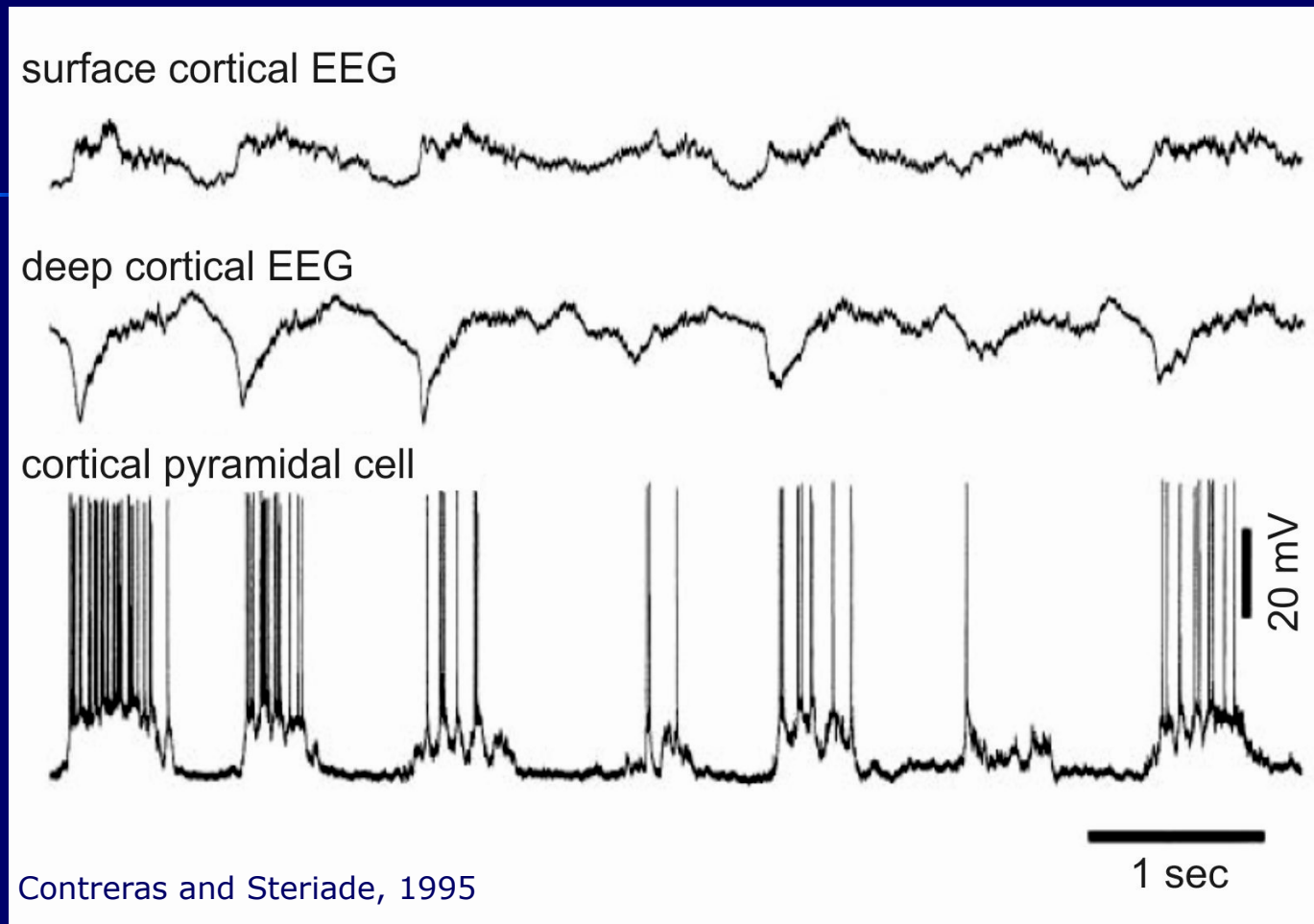
Červenou je označena pravidelná théta aktivita v nahrávce LFP z hipokampu potkana, která je pozorována během aktivního pohybu (walk).

Sharp waves – ostré vlny



Během lokomoční inaktivity (still) se vzorec hipokampového LFP u hlodavců mění. V nepravidelných intervalech se objevují tzv. ostré vlny – sharp waves, označeny červeně.

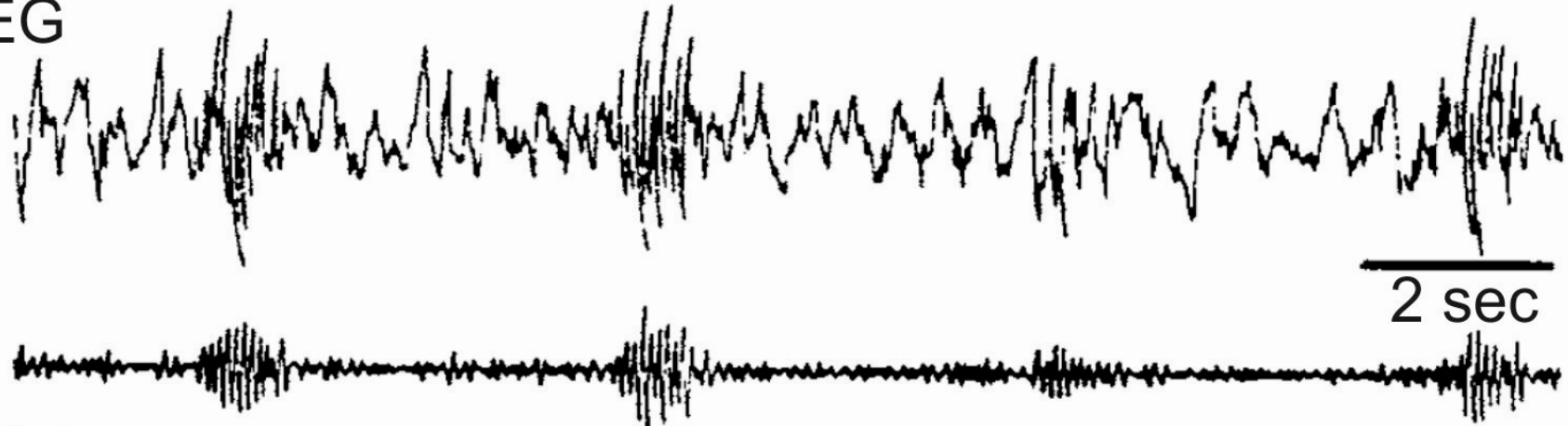
Pomalé spánkové vlny



Dalším typickým vzorcem v EEG aktivitě jsou pomalé vlny, které se objevují během hlubokého spánku. Jsou to rytmicky se opakující změny v EEG s frekvencí 0,5 -4 Hz. Tyto vlny jsou odrazem střídajících se stavů aktivity (up states) a inaktivity (down states) v neuronech mozkové kůry.

Spánková vřetena

EEG

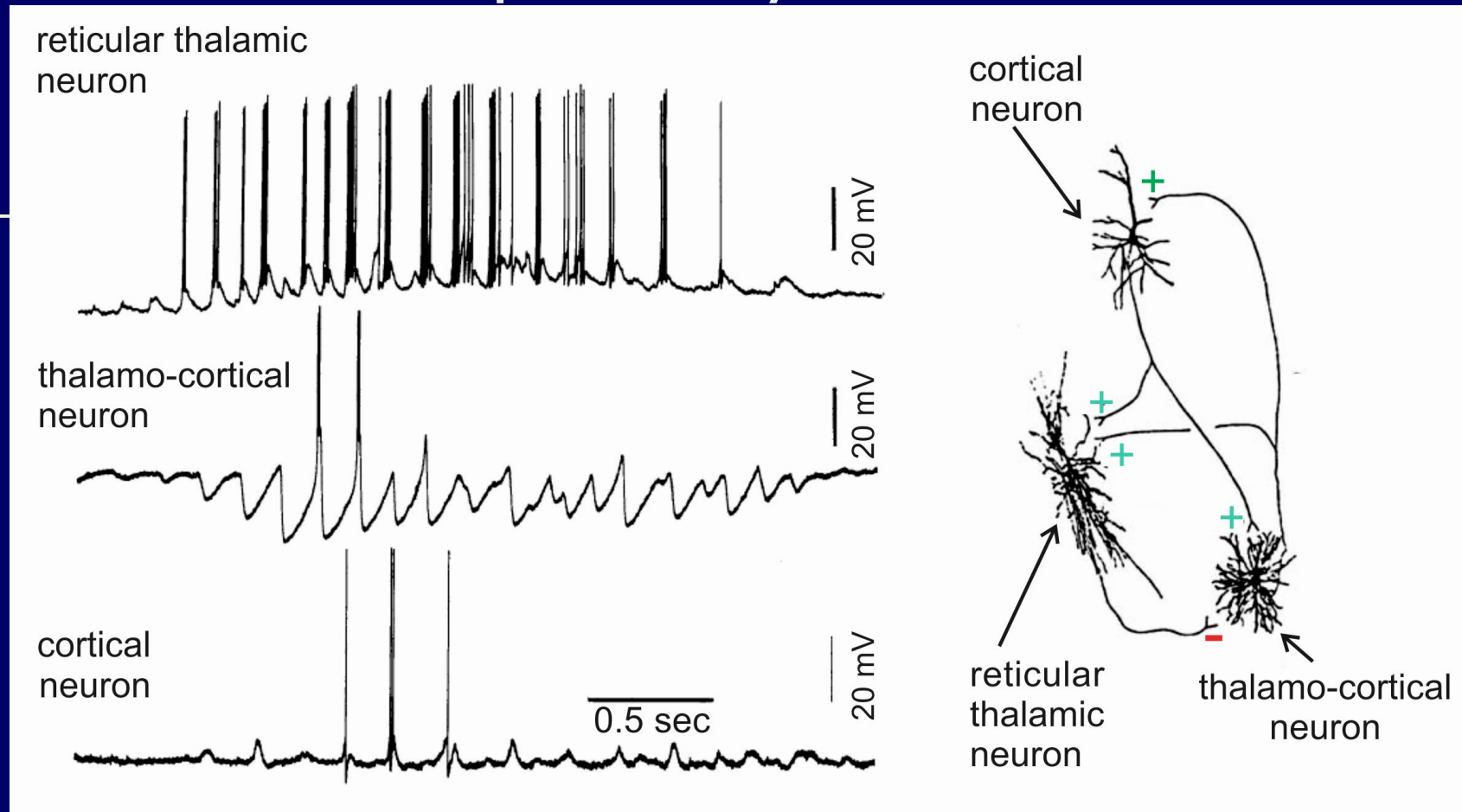


spindles filtered (7-14Hz)

Amzica and Steriade, 2000

Během mělkých stadií spánku se objevují spánková vřetena (sleep spindles). Jsou to krátce trvající (cca 1 sekundu) oscilace o frekvenci kolem 10 Hz. V rámci vřeténka amplituda nejdříve vzrůstá a pak klesá – to vytváří charakteristický vřeténkovitý tvar v záznamu EEG.

Vznik spánkových vřeten



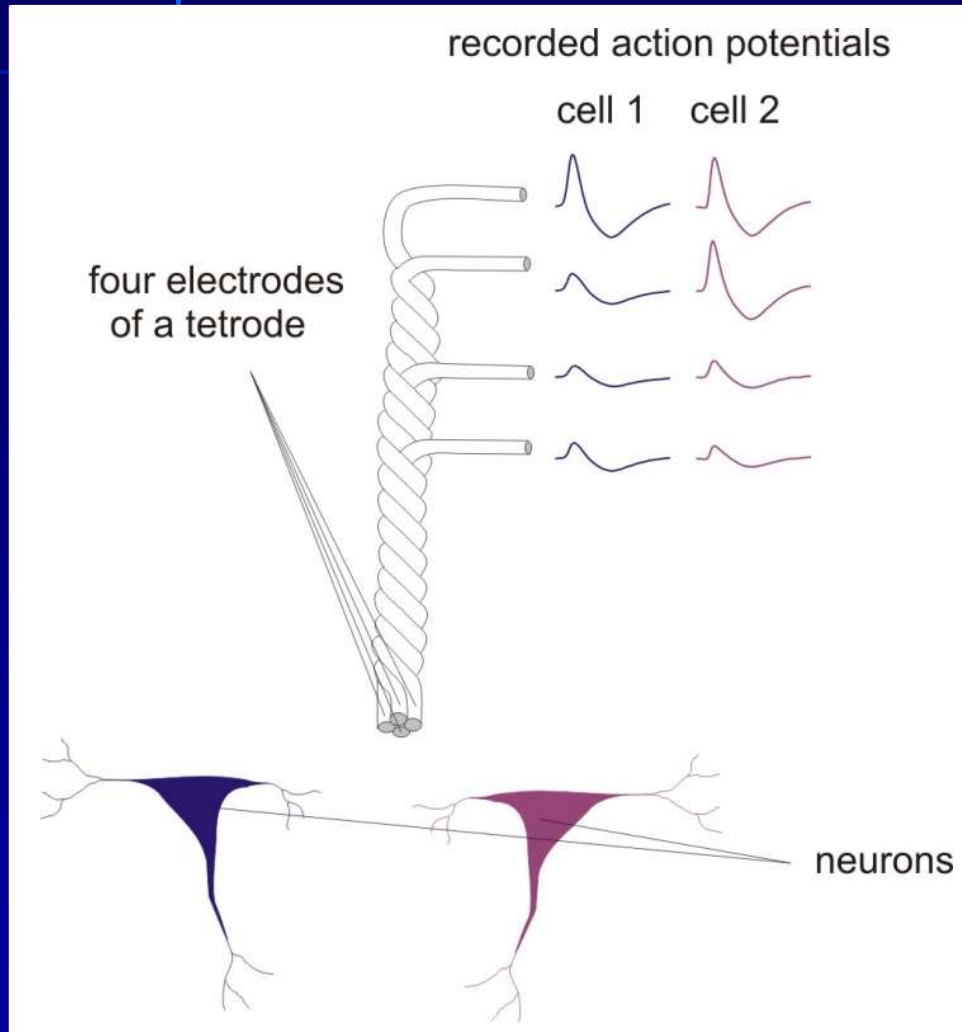
Tento obrázek vysvětluje jak vznikají spánková vřetena interkcí mezi aktivitou v talamu a mozkové kůře. Roli hrají tři typy neuronů: 1) inhibiční neurony v retikulárním jádru talamu mají rytmicky organizovanou aktivitu a takto inhibují 2) excitační thalamo-kortikální neurony. Rytmická aktivita thalamo-kortikálních neuronů se přenáší na 3) kortikální neurony, které projikují zpátky do talamu, a kruh se tak uzavírá.

Nahrávání jednotkové aktivity

Dále se budeme zabývat zaznamenáváním aktivity *jednotlivých* neuronů. Postupně představíme čtyři metody:

- tetrody
- silikonové próby
- vápníkové zobrazování aktivity
- terčíkový zámeček

Tetrodové nahrávání – princip

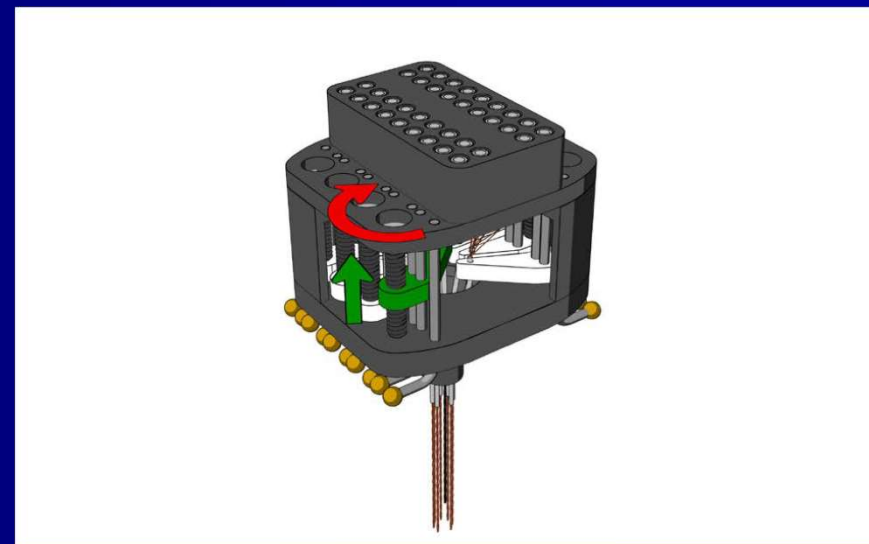
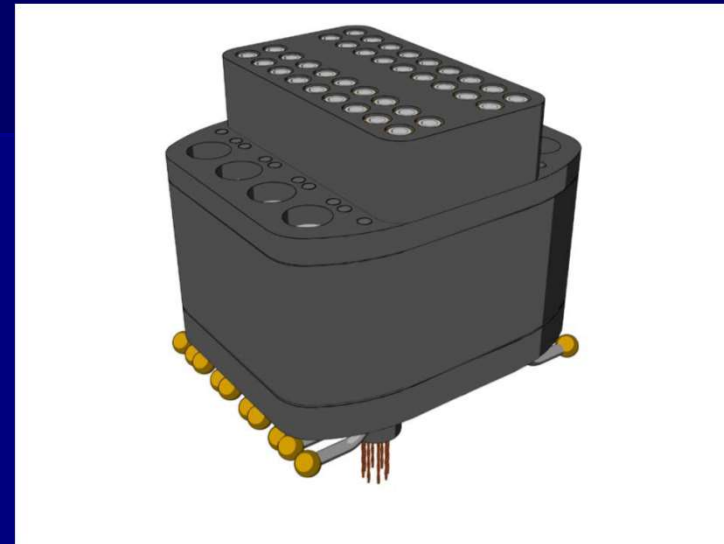
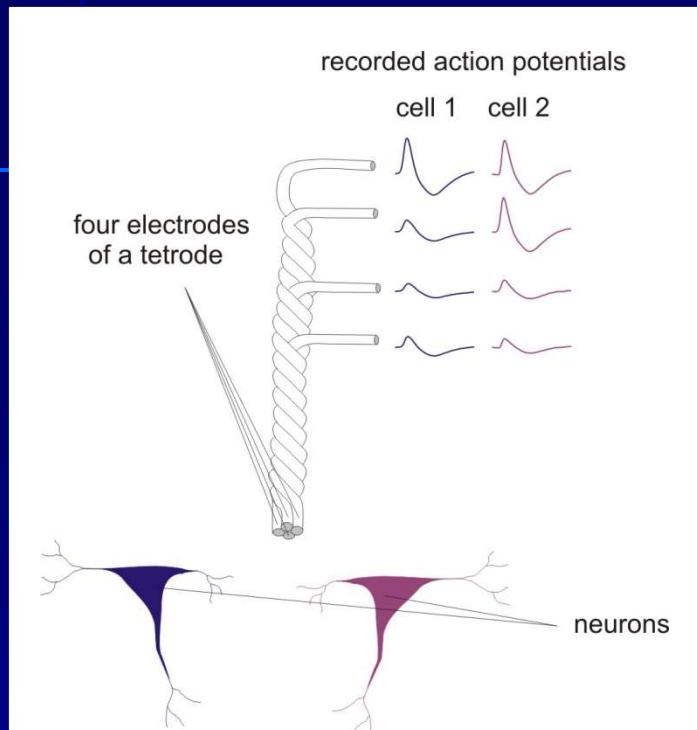


Elektrická aktivita neuronů se často sleduje pomocí elektrod vyrobených z jemných vodivých drátků s izolací na povrchu (kromě zakončení). Typicky se používají drátky s průměrem 12 nebo 25 mikrometrů. Často se čtyři drátky zapletou dohromady (jako cop) čímž vznikne tzv. tetroda.

Konce tetrody se pak zavedou do cílové oblasti mozku, kde se pak extracelulárně snímá aktivita ze skupiny blízkých neuronů. Konce čtyř drátků tetrody jsou dostatečně blízko sebe, aby zaznamenali akční potenciály ze stejné skupiny neuronů. Každá elektroda snímá aktivitu stejného neuronu z jiné pozice – a tak má zaznamenaný akční potenciál na různých elektrodách jiný tvar. To umožňuje rozpoznat a odlišit akční potenciály generované různými neurony.

(Tento princip je znázorněn na obrázku Akčních potenciály modré a červené buňky mají různý tvar a mohou být odlišeny.)

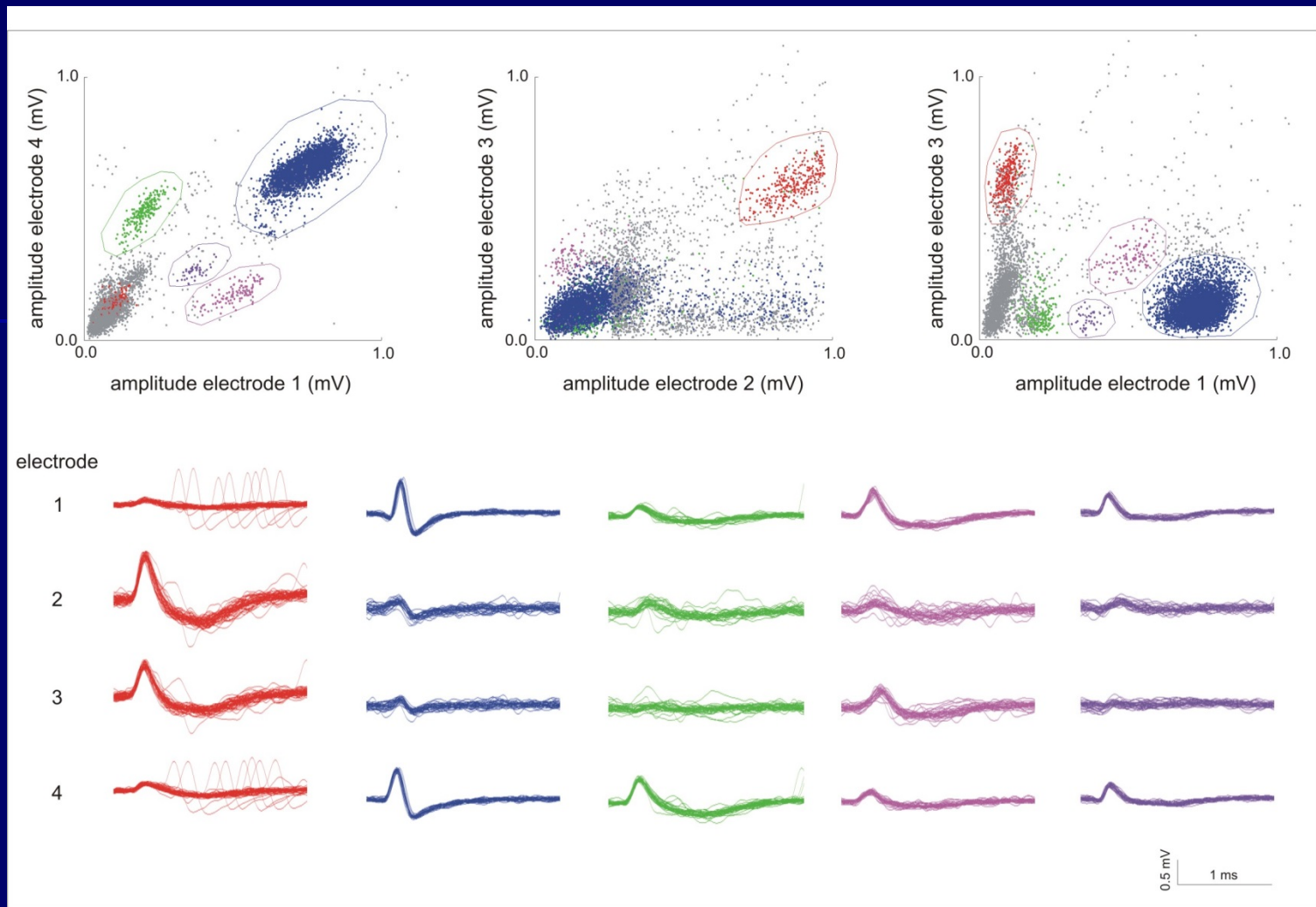
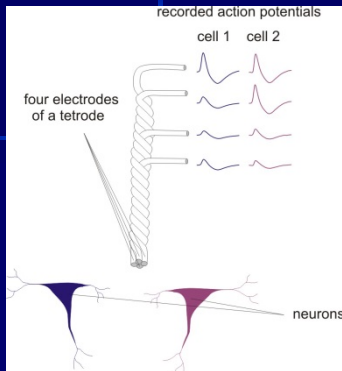
Tetrodové nahrávání



Několik tetrod se vestaví do jednoho implantátu. Implantát na obrázku vpravo obsahuje 8 tetrod a má rozměry asi 1x1x1 cm.

Implantát slouží 1) k propojení elektrod s konektorem a nahrávací technikou, a taky 2) umožňuje vertikální pohyb elektrod (zelená šipka) otáčením šroubků (červená šipka).

Tetrodové nahrávání

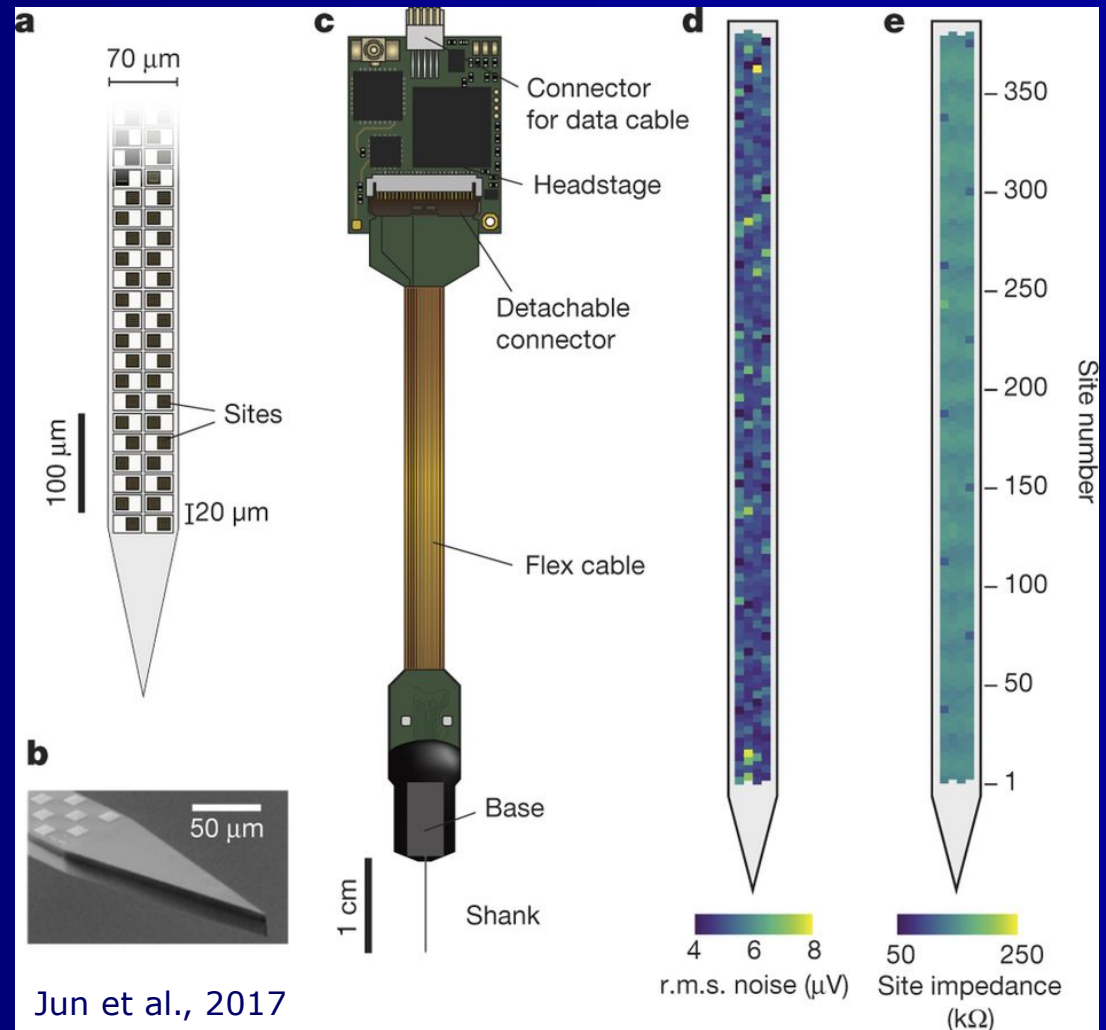


Příklad skutečných neuronových dat nahraných tetrodou. Pro každý z pěti neuronů (jsou barevně odlišeny) je ukázána nahrávka akčních potenciálů (AP) z každé ze čtyř elektrod. Obrázky nahoře reprezentují každý nahraný AP jako tečku. Jednotlivé AP jsou zobrazeny podle amplitudy na jednotlivých tetrodách. Všimněte si, že se nahrané AP zhlukují – poznají se tak AP emitované stejnou buňkou.

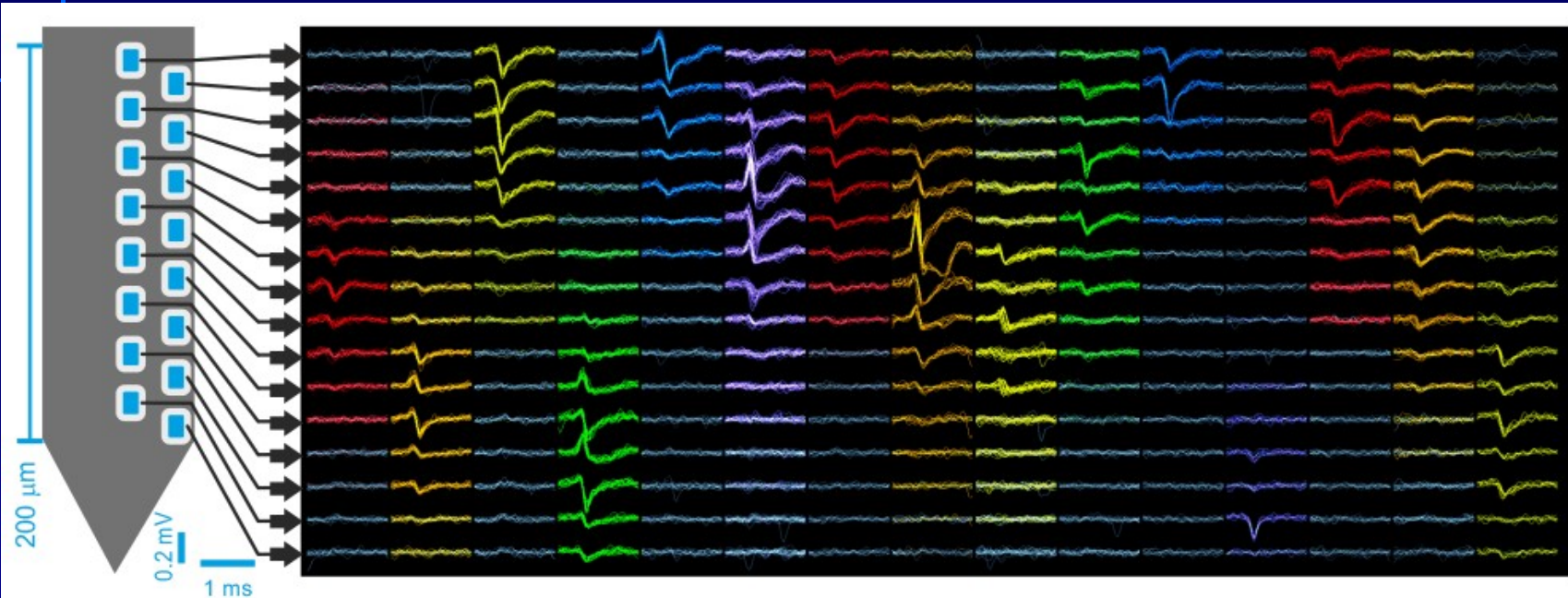
Silikonové próby

Jako modernější alternativa k elektrodám z drátků se dnes často používají takzvané silikonové próby. V tomto případě jsou elektricky vodivá zakončení rozmístěna v pevně daných pravidelných intervalech na jemné jehlici, která se implantuje do mozku. Obrázek znázorňuje takové čidlo se stovkami vodivých zakončení – elektrod na próbě o šířce 75 mikrometrů.

- V naší laboratoři používáme tetrody a postupně implementujeme nahrávání pomocí silikonových prób.



Silikonové próby

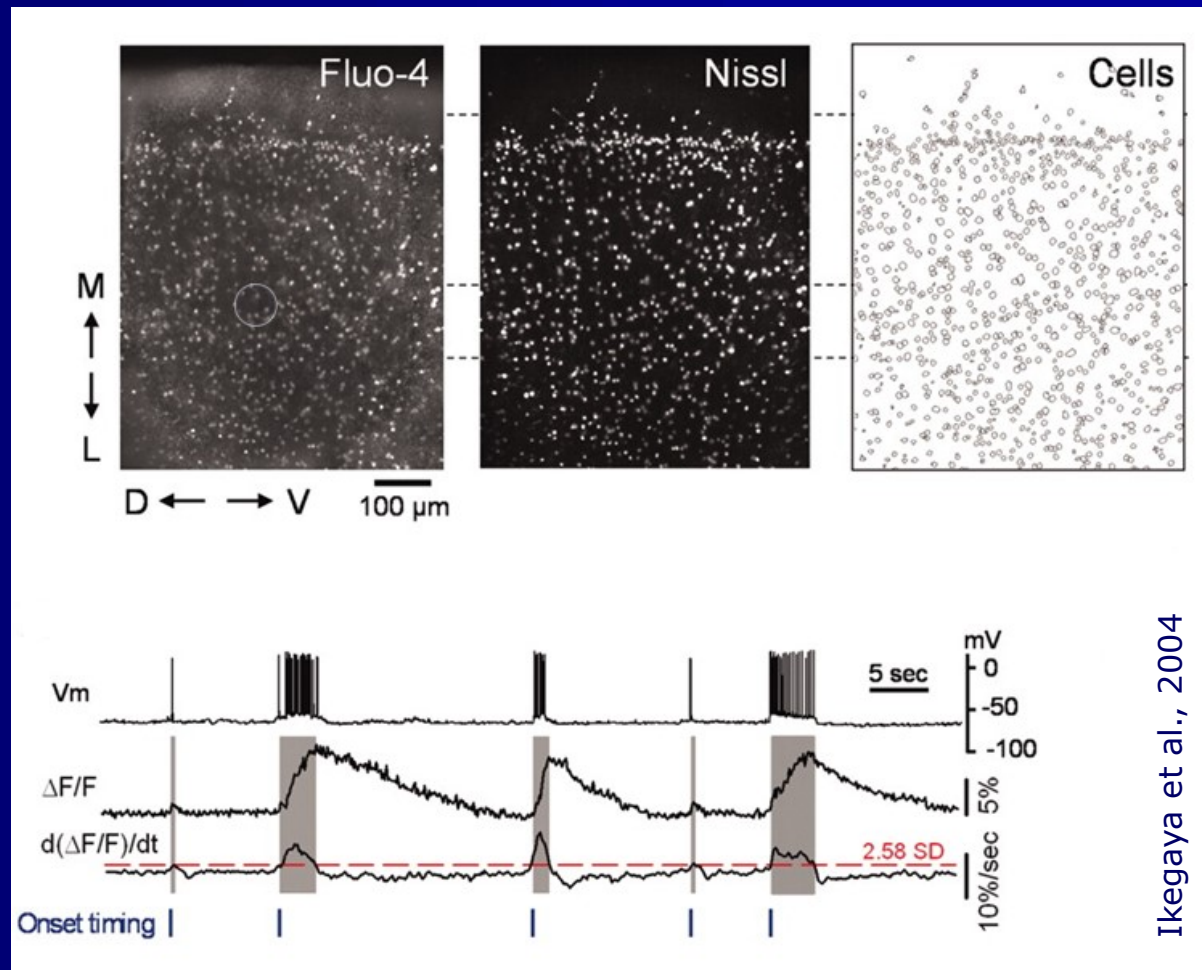


Spike-sorted single unit data from freely behaving rat medial prefrontal cortex - recorded 60 days post-implant and after 30 days in the same location. Each colour-coded column shows spikes from a discrete single unit. [Data courtesy Tahl Holtzman, Nick Donnelly, Jeff Dalley – University of Cambridge, UK.]

Příklad nahrávky několika neuronů z 16 nahrávacích míst na silikonové próbě. Jednotlivé neurony jsou v sloupcích a jsou barevně odlišeny.

Vápníkové zobrazování aktivity

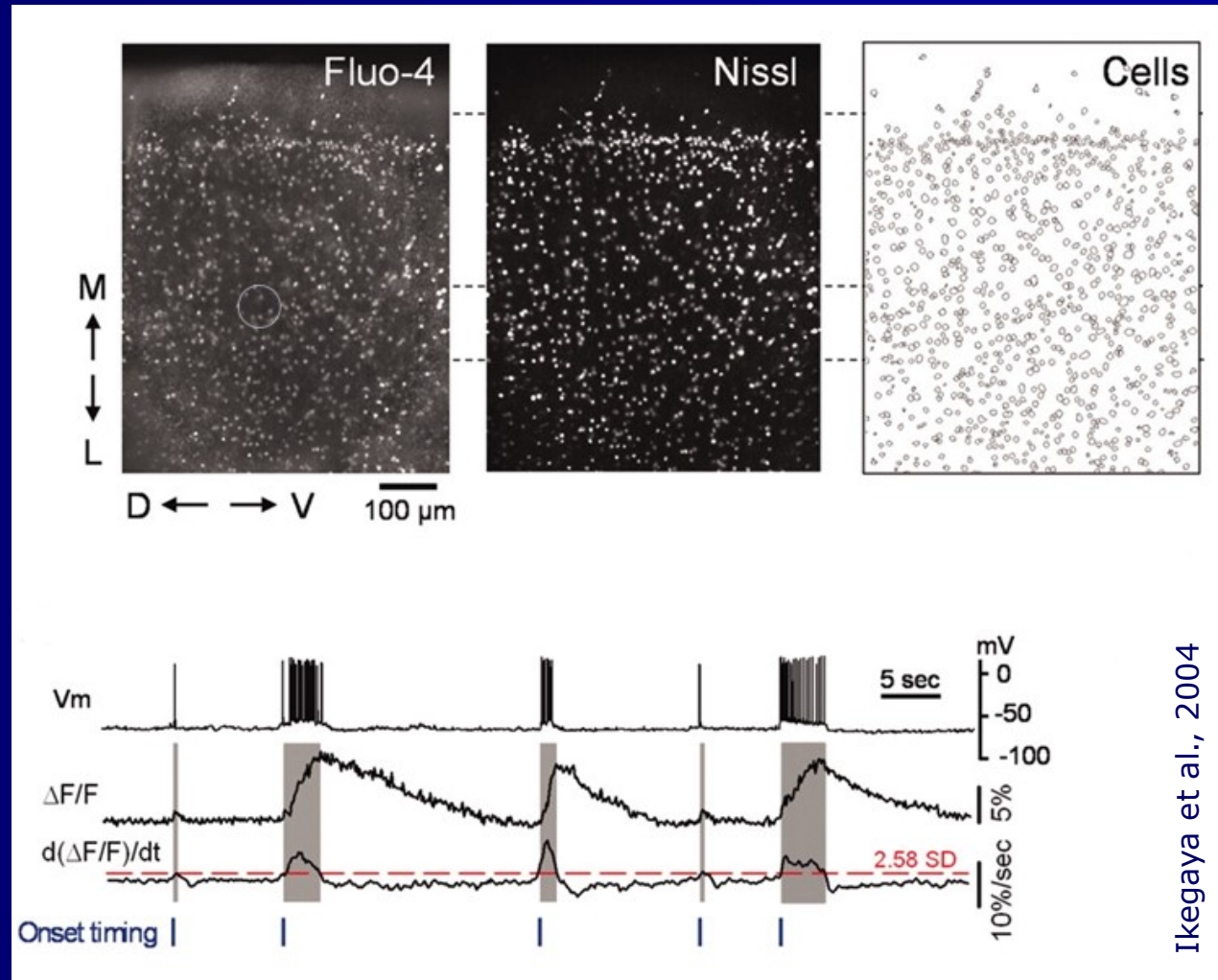
Další metodou sledování neuronové aktivity je zobrazování pomocí vápníkových indikátorů. Toto není elektrofyziologická, ale optická metoda. Je potřeba mikroskop, ne elektrody. Používá se např. látka Fluo-4, která významně zvýší fluorescence, pokud se na molekulu naváže vápník. Protože vstup vápníku do buňky nastává během neuronální aktivity, zvýšená fluorescence signalizuje zvýšenou neuronovou aktivitu.



Vápníkové zobrazování aktivity

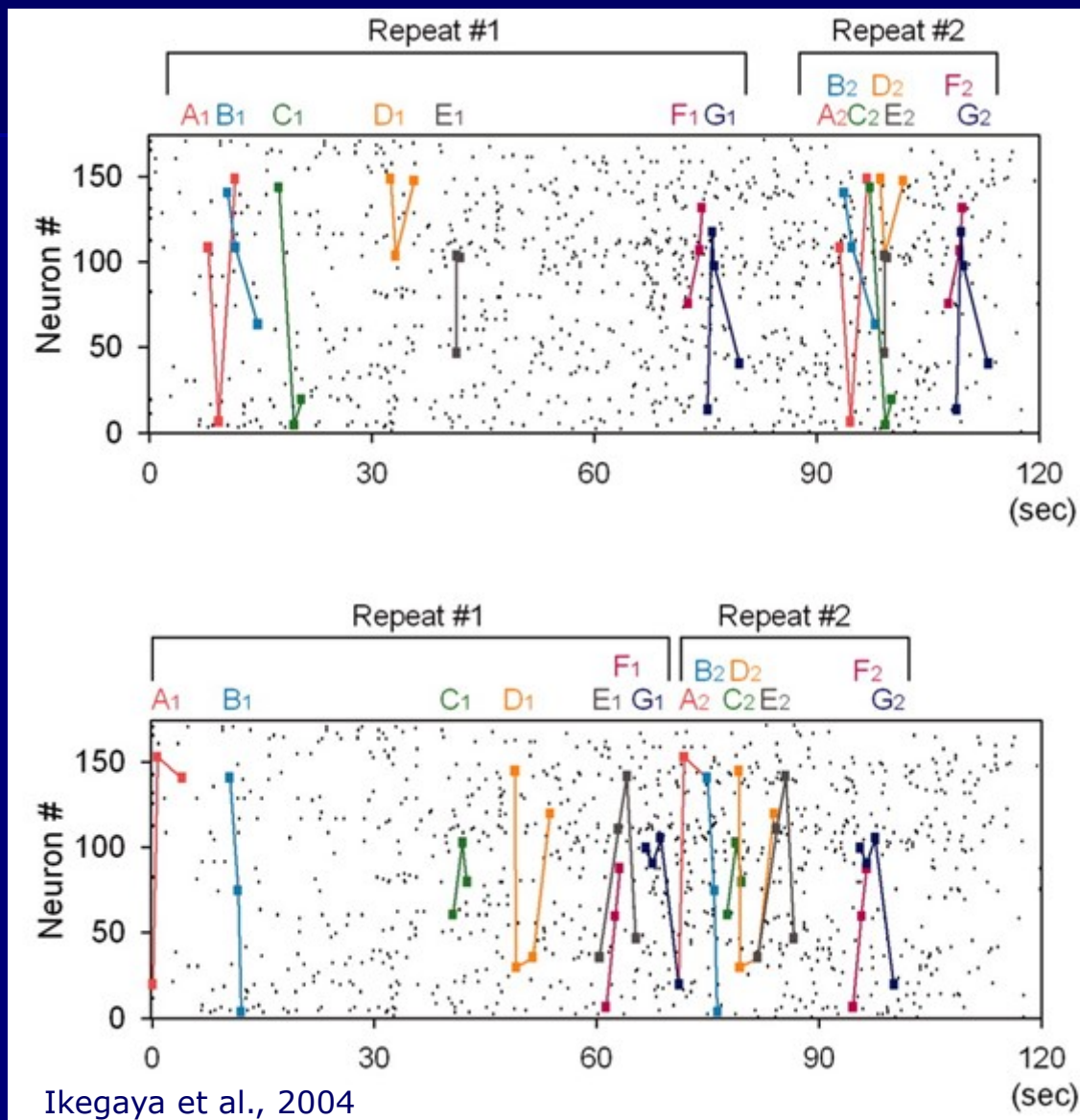
Obrázky nahoře znázorňují mozkovou kůru, ve které lze identifikovat jednotlivé neurony.

Spodní část ukazuje nahoře změny v napětí jednoho neuronu (V_m) s akčními potenciály (vertikální linky). Uprostřed jsou změny ve fluorescence (dF/F), téhož neuronu. Spodní křivka ukazuje derivaci změn fluorescence, která opovídá aktivaci neuronu.



Vápníkové zobrazování aktivity

Příklad záznamu aktivity >150 kortikálních neuronů. Takovéto záznamy umožňují sledovat organizaci aktivity v neuronových sítích. V tomto konkrétním experimentu byly identifikovány opakující se vzorce aktivace skupin neuronů (označeny písmeny A,B,...G). Společně tyto vzorce vytvářely opakující se sekvence (označeny jako Repeat 1, Repeat 2).

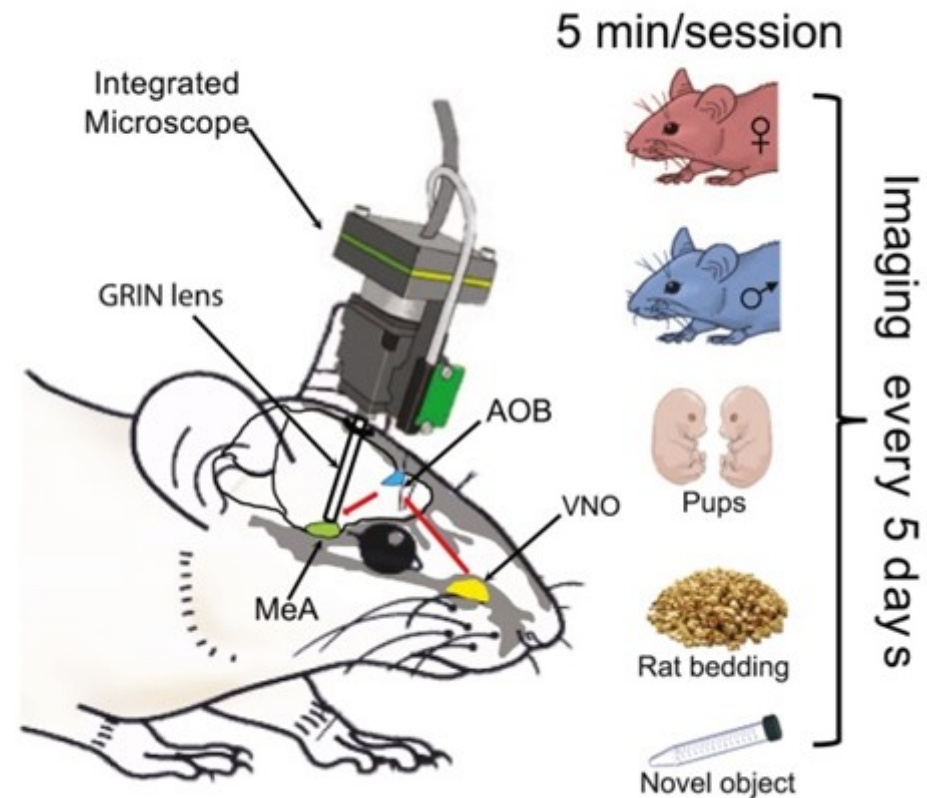


Vápníkové zobrazování aktivity u volně se pohybujících zvířat

Velmi nedávno se povedlo miniaturizovat vápníkové zobrazování natolik, že ho lze použít u volně se pohybujících zvířat.

Tady uvádím příklad experimentu, ve kterém nahrávali neuronové odpovědi u zvířat během interakce s příslušníky stejného druhu...

Experimental design

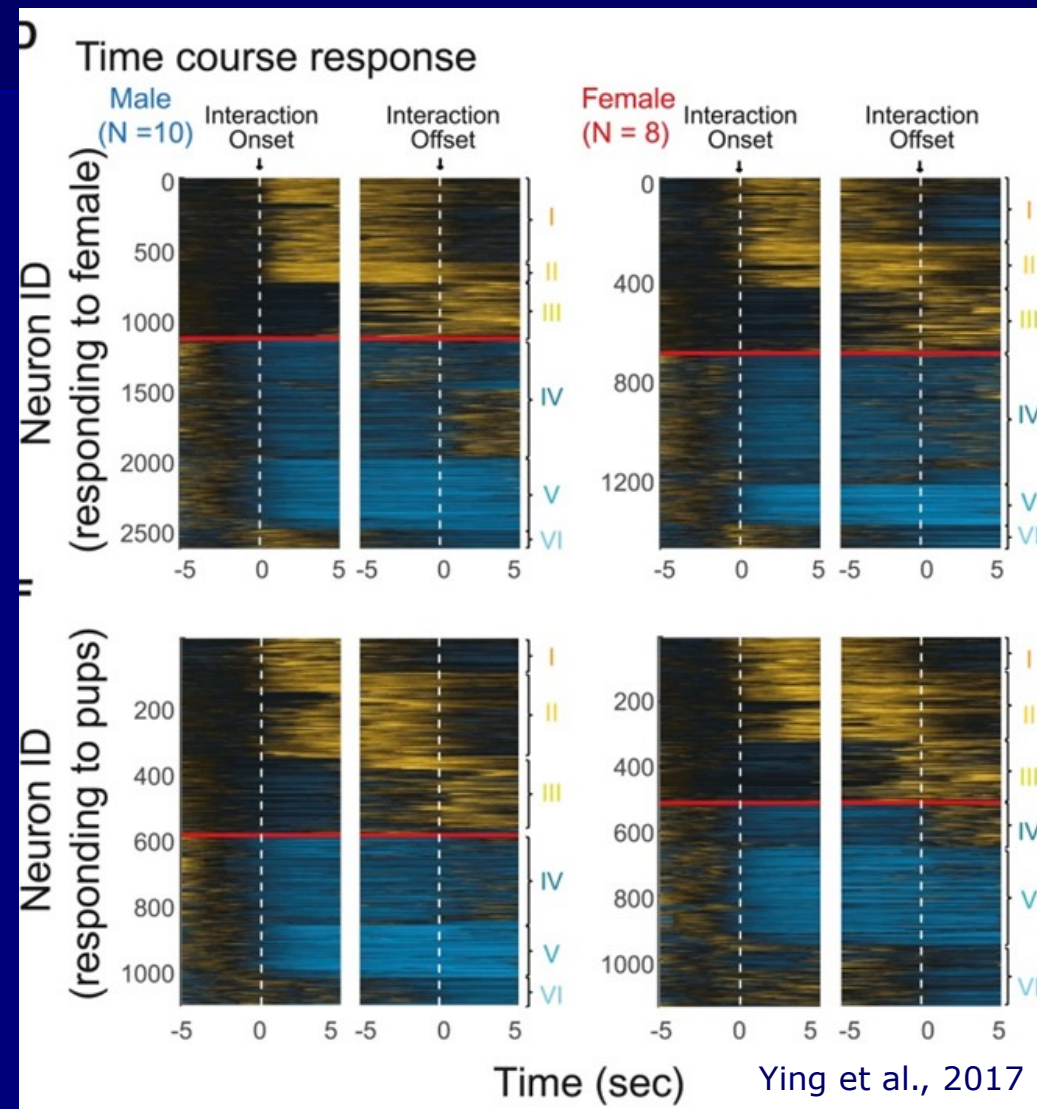


Ying et al., 2017

Vápníkové zobrazování aktivity u volně se pohybujících zvířat

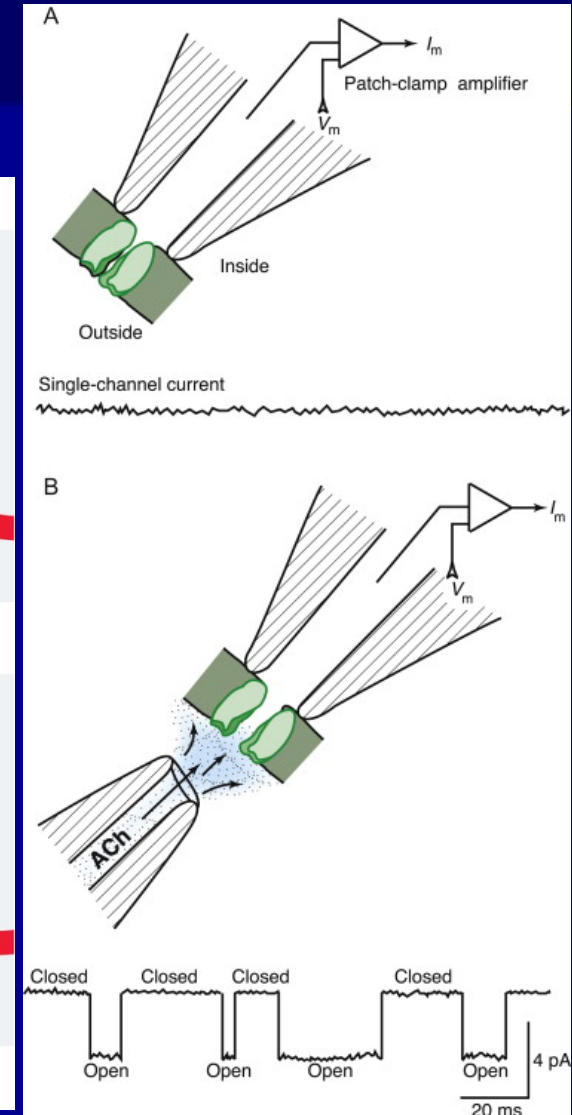
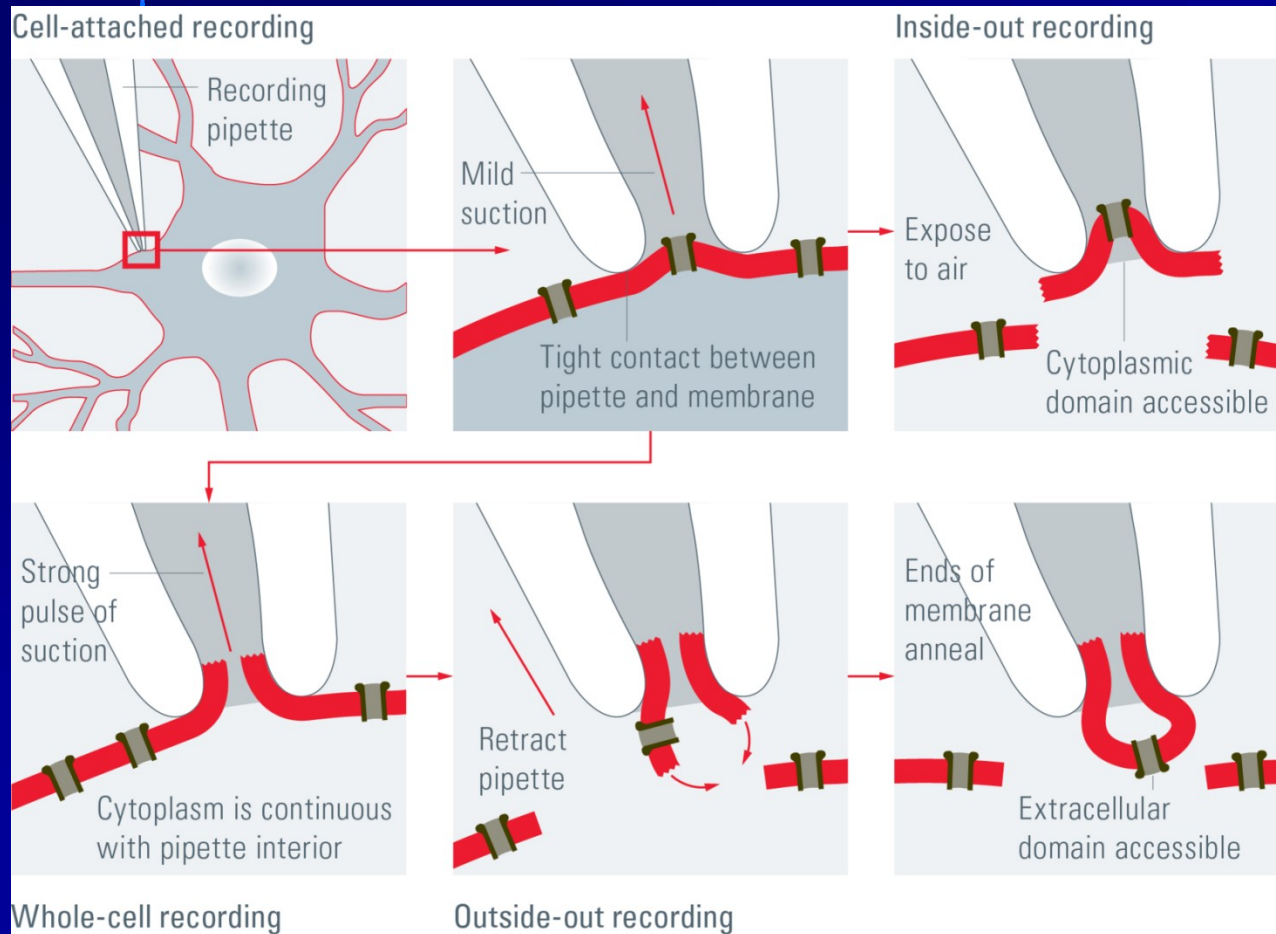
V této studii objevili neurony, které reagují změnou aktivity na přítomnost druhého zvířete.

Na obrázku je aktivita jednotlivých neuronů zobrazena v řádcích. Změna aktivity je kódována barevně – zvýšená aktivita je znázorněna žlutou barvou, snížení aktivity je znázorněno modře.



Terčkový zámeček (patch clamp)

Poslední metodou, kterou tady chci představit, je metoda terčkového zámečku.



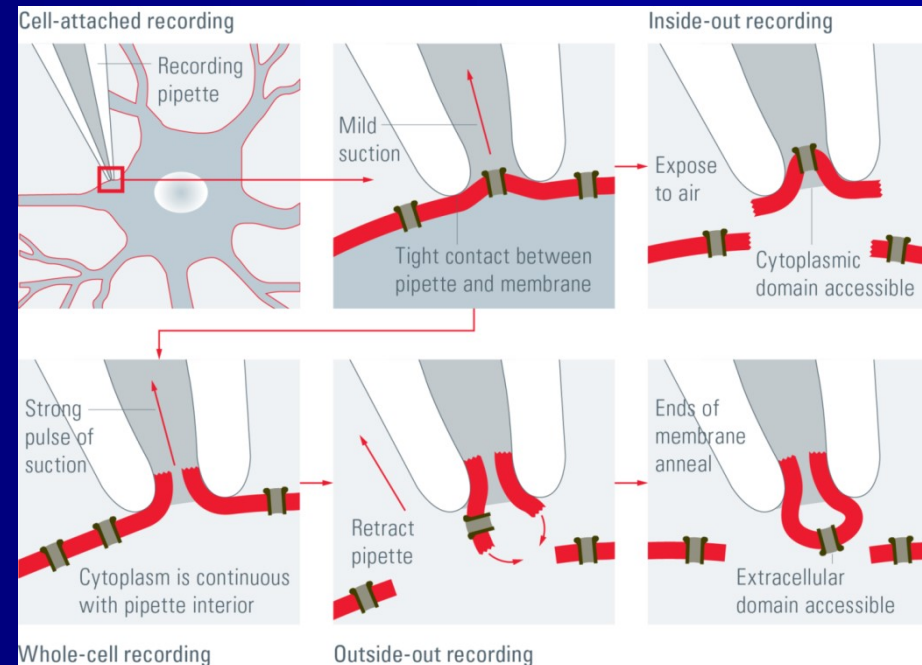
Terčíkový zámek (patch clamp)

Metoda terčíkového zámku se používá pro elektrofyziologické nahrávání aktivity z jednoho neuronu, z části buněčné membrány, nebo dokonce z jednoho membránového kanálu.

Technika je založena na tom, že se k buňčné membráně neuronu přisaje velmi malinkatá skleněná pipeta, sloužící jako elektroda.

Po přisátí mikropipety k membráně lze postupovat několika alternativními postupy:

- 1) Je možné vytrhnout kousek membrány s několika málo proteiny a kanály a ten studovat jako preparát (inside-out, nebo outside-out varianty).
- 2) Nebo je možnost protrhnout membránu v terčíku pipety a mít celou buňku jako preparát (whole-cell konfigurace).



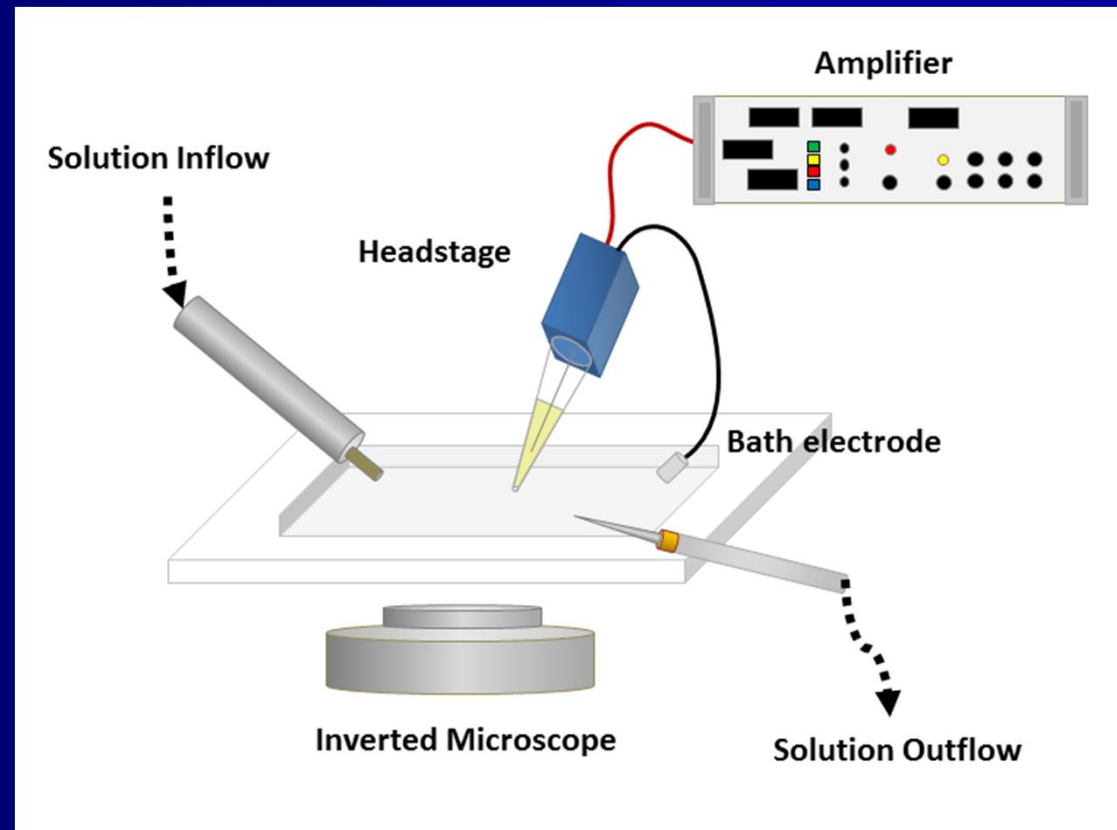
Terčkový zámek (patch clamp)

Schematické znázornění experimentálního uspořádání pro pokus terčkového zámku.

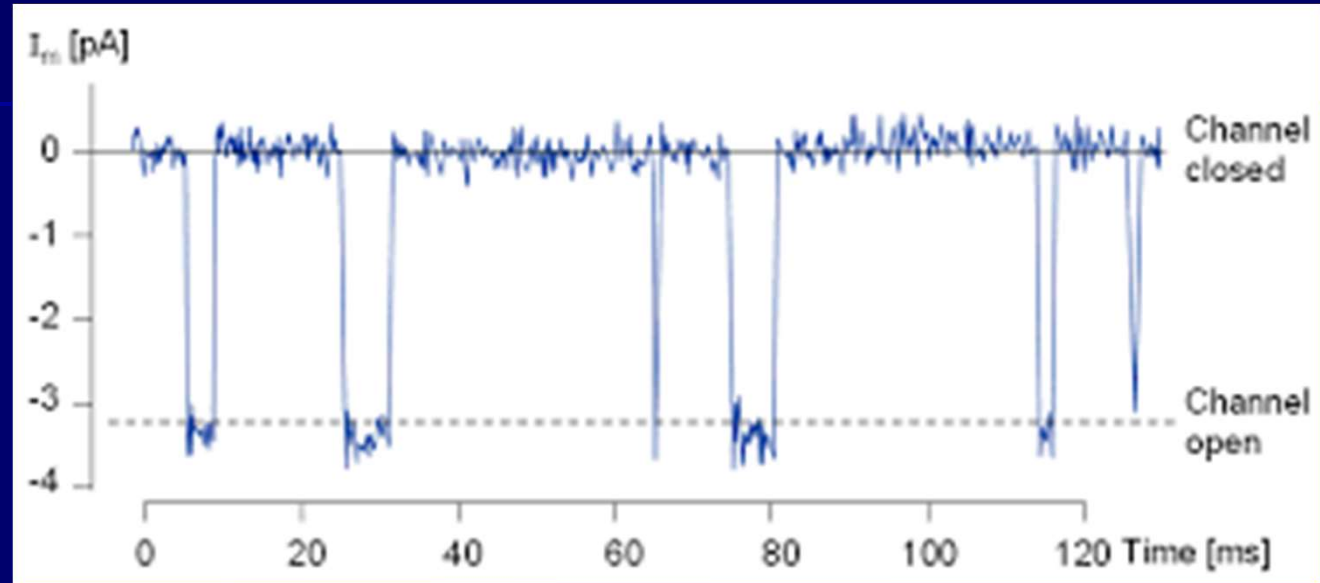
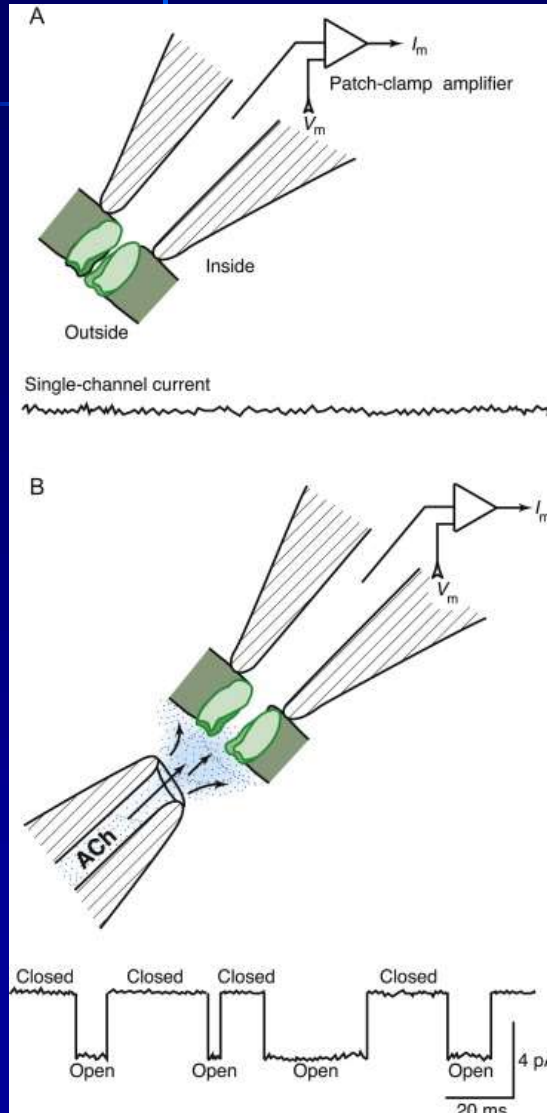
Preparát s neurony je v nádobce ve fyziologickém roztoku, který je možné promývat a vyměňovat.

Mikropipeta, která slouží jako elektroda, je napojena na elektronické přístroje k nahrávání.

Pipeou lze pohybovat mikromanipulátoty a celou situaci sledovat mikroskopem.



Terčkový zámek (patch clamp)



Příklad nahráky pomocí terčkového zámku. V tomto případě lze pozorovat miniaturní elektrické proudy spojené s otevíráním a zavíráním jediného kanálu. Zavřeným kanálem proud neprotéká, otevřeným ano.

Metody analýzy neuronálního signálu

Na závěr představím několik metod, používaných k analýze elektrofyziologických dat.

Potenciál blízkého pole (local field potential), EEG
Fourierova transformace

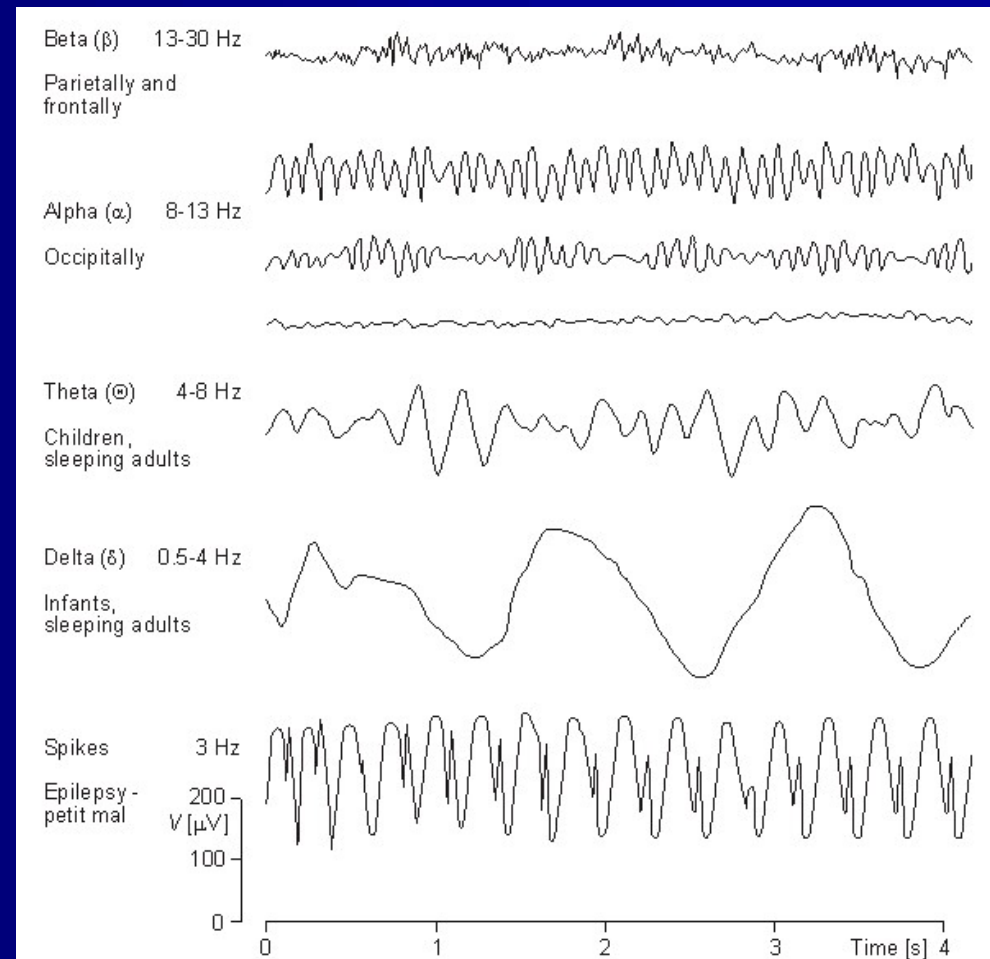
Neuronální aktivita autokorelace
 vzájemná korelace (cross-correlation)
 analýza populačních vektorů

Smyslové a behaviorální koreláty neuronální aktivity

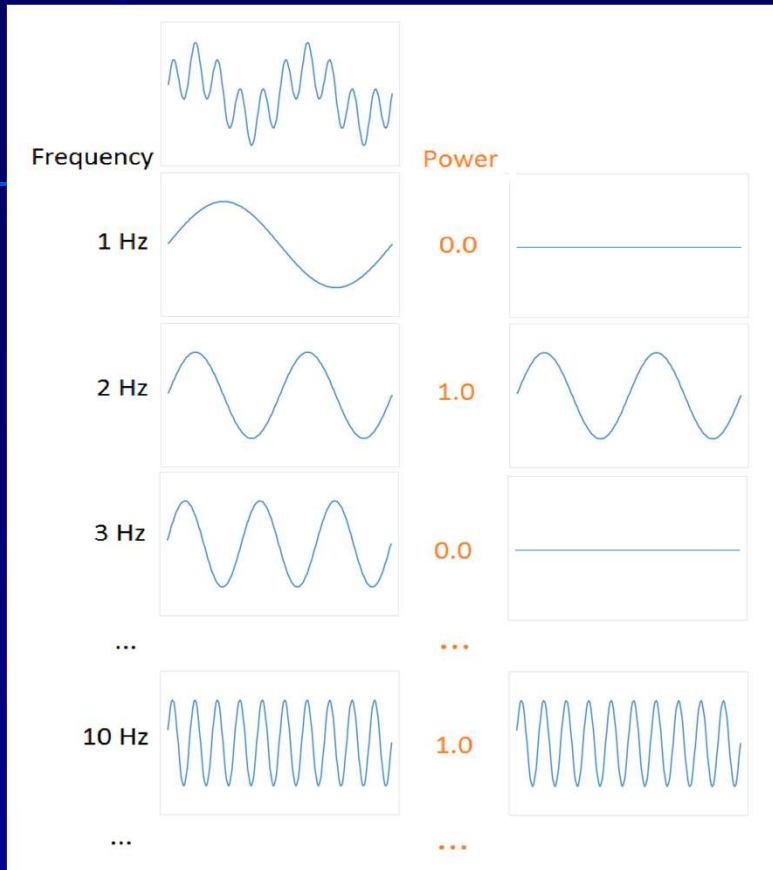
stimulus-response function (funkce
podnětu a odpovědi)
dekódování pozice

Fourierova transformace – analýza periodicky se opakujících vzorců (oscilací) v EEG

Aktivita EEG je často rytmická, periodicky se opakující. Obrázek vpravo ukazuje příklady takové aktivity. Pro kvantitativní analýzu periodických jevů se často používá Fourierova transformace.

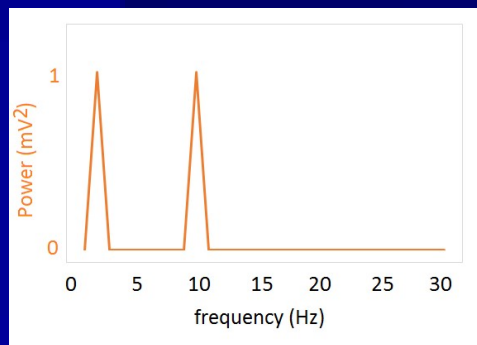


Fourierova transformace - princip



Fourierova transformace rozkládá signál na komponenty o různých frekvencích. Toto lze ukázat na příkladu uměle vytvořeného signálu vlevo nahoře, který se skládá ze dvou sinusoid s frekvencí 1 Hz a 10 Hz.

Tento signál je rozložen na sinusoidy o frekvencích 1Hz, 2Hz, 3Hz... a každé frekvenci je přiřazena hodnota podle zastoupení každé frekvence v původním signálu. V našem případě je tato hodnota 1 pro frekvence 1 Hz a 10 Hz (jen ty jsou zastoupeny v původním signálu) a 0 pro ostatní frekvence.



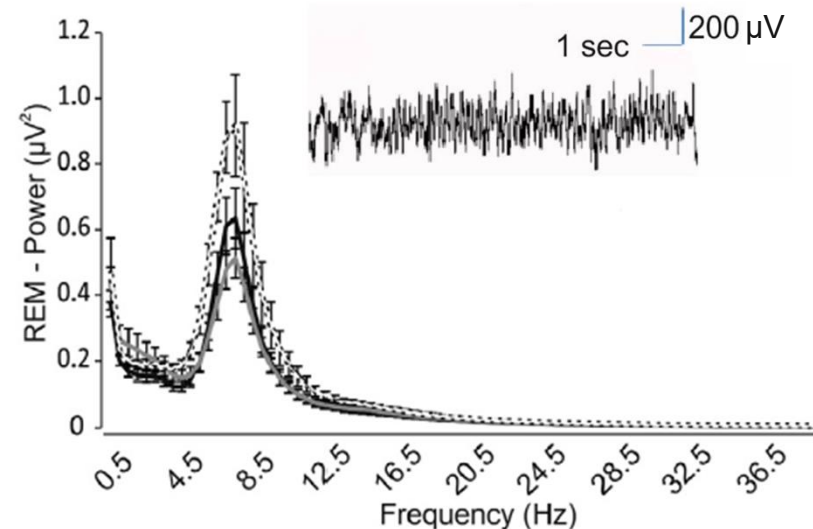
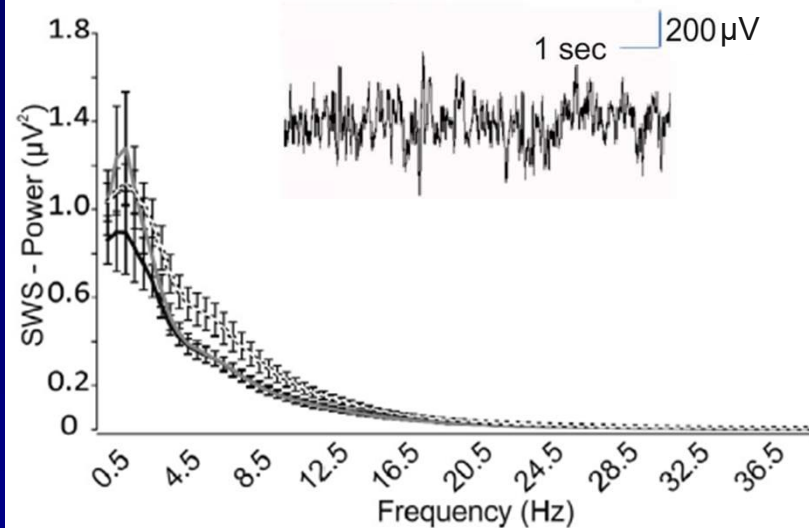
Power spectrum

Zastoupení jednotlivých frekvencí pak lze zobrazit pomocí výkonového spektra (angl. power spectrum) na obrázku vlevo.

Fourierova transformace – příklad reálného použití

nonREM spánek

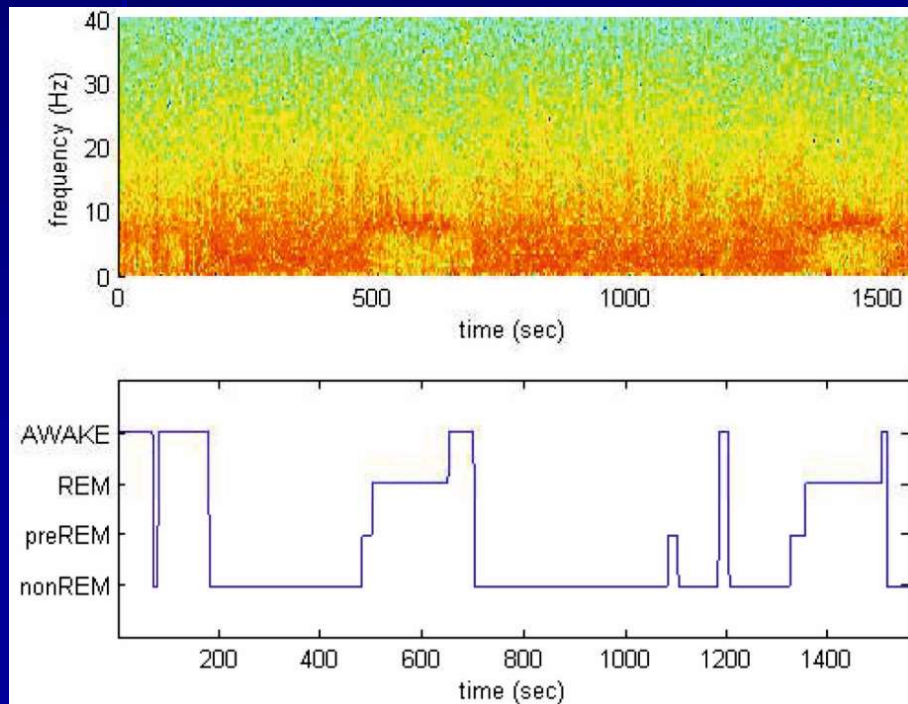
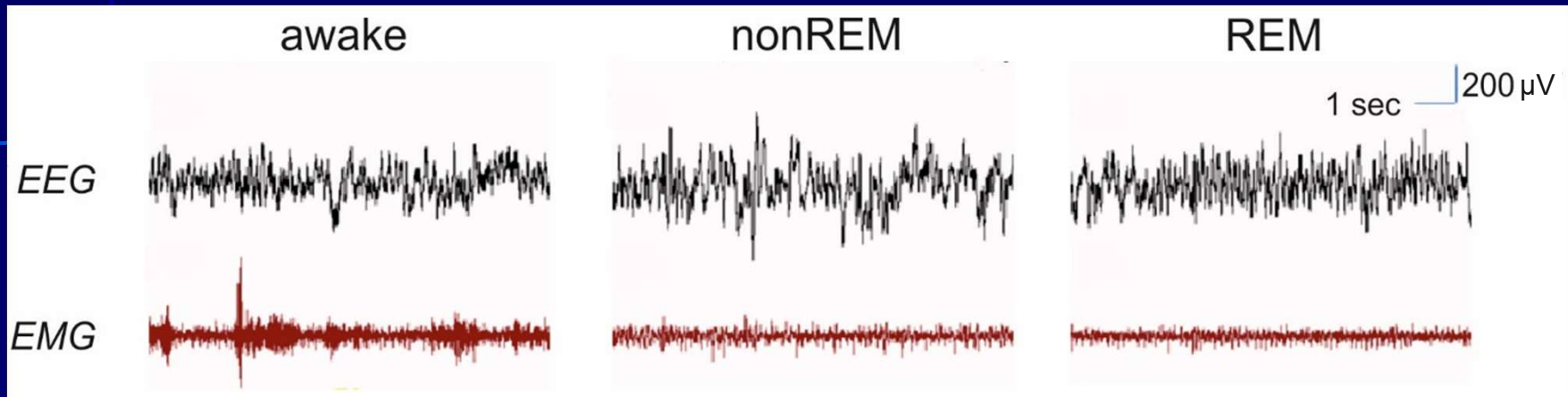
REM spánek



Oyanedel et al., 2015

Příklad výkonových spekter signálů z mozku potkana během nonREM spánku a REM spánku. Během nonREM spánku převládají v EEG frekvence $<4\text{Hz}$, které odpovídají pomalým vlnám. Během REM spánku dominuje theta rytmus s frekvencí kolem 7 Hz.

Fourierova transformace

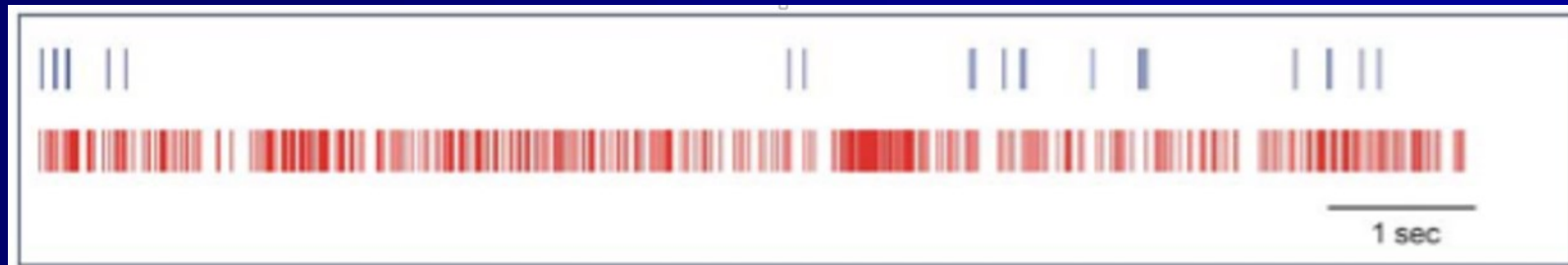


Fourierova transformace vyjadřuje rozložení a zastoupení různých frekvencí v analyzovaném signálu. Na obrázku vlevo je možno sledovat změny výkonového spektra EEG v čase, to může například pomoci identifikovat různé spánkové stavy.

Časová sekvence akčních potenciálů neuronu

buňka 1

buňka 2



buňka 1

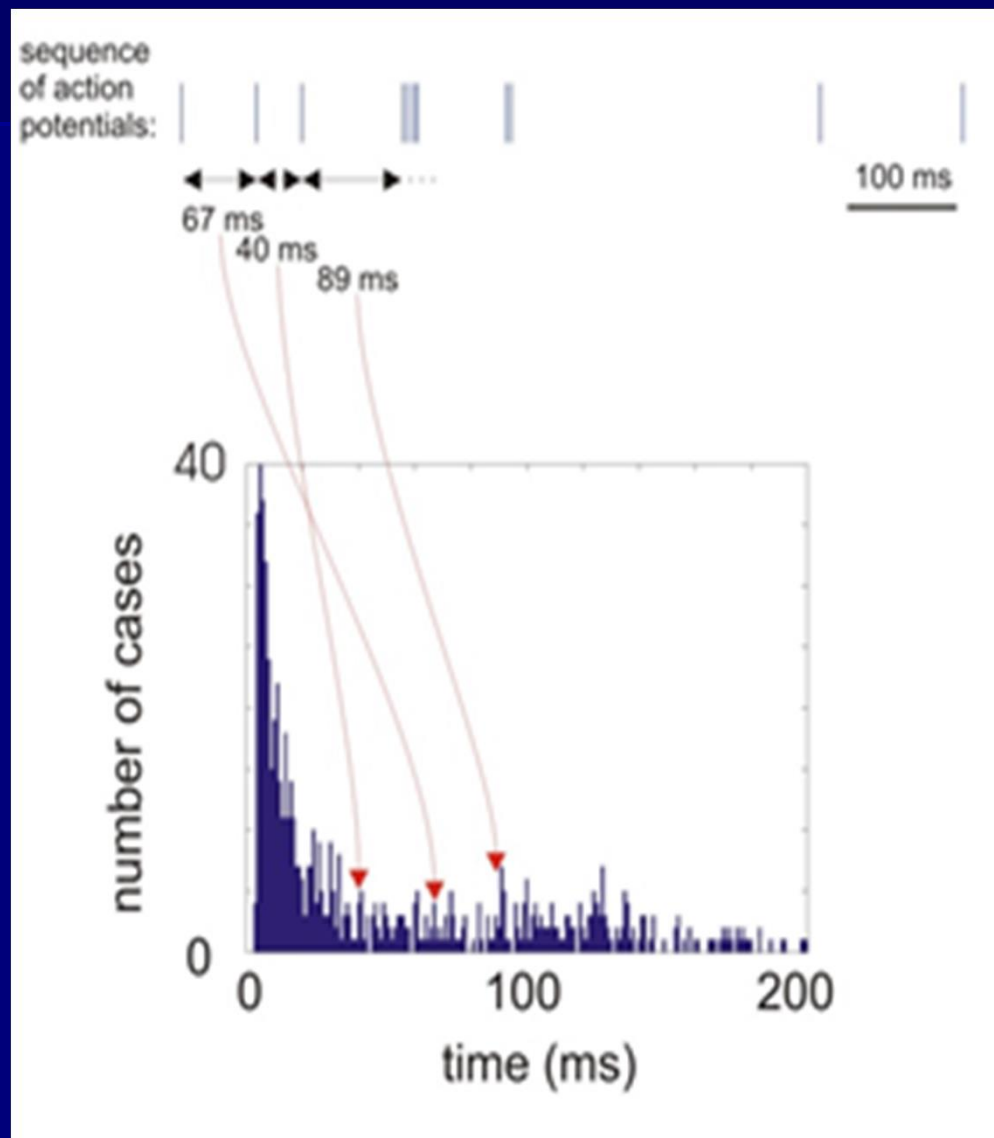
buňka 2



Dále se budeme zabývat tím, jak analyzovat a charakterizovat aktivitu jednotlivých neuronů a vztahy mezi aktivitou různých buněk. Aktivitou neuronu tady rozumíme časovou sekvenci akčních potenciálů.

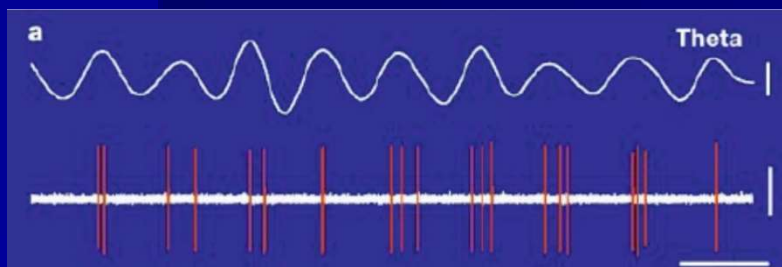
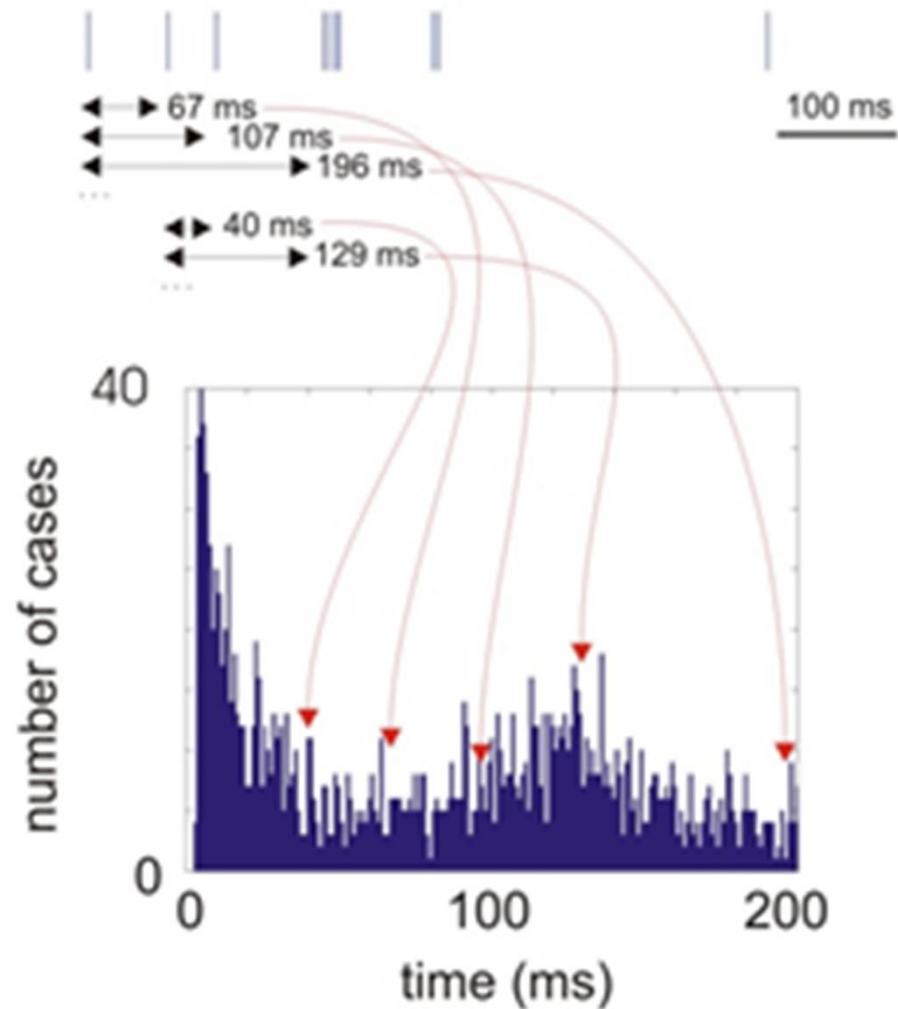
Histogram intervalů mezi akčními potenciály (inter-spike-interval histogram)

Často používaná metoda je tzv. inter-spike interval histogram. Ten charakterizuje délku intervalů mezi následujícími akčními potenciály. Příklad vpravo ukazuje neuron, který často emituje akční potenciály v rozmezí několika málo milisekund.



Autokorelace

Výpočet autokorelace je podobný příkladu na předešlé straně s tím rozdílem, že zde je znázorněné rozložení intervalů mezi všemi AP, nejenom těsně po sobě následujícími. Metoda ukazuje pravděpodobnost, že po akčním potenciálu bude neuron znovu aktivní v různých časových intervalech. Na příkladu vlevo vidíme, že neuron pálí se zvýšenou pravděpodobností v intervalu asi 120 milisekund. Je to proto, že aktivita tohoto neuronu je synchronizována s théta rytmem.

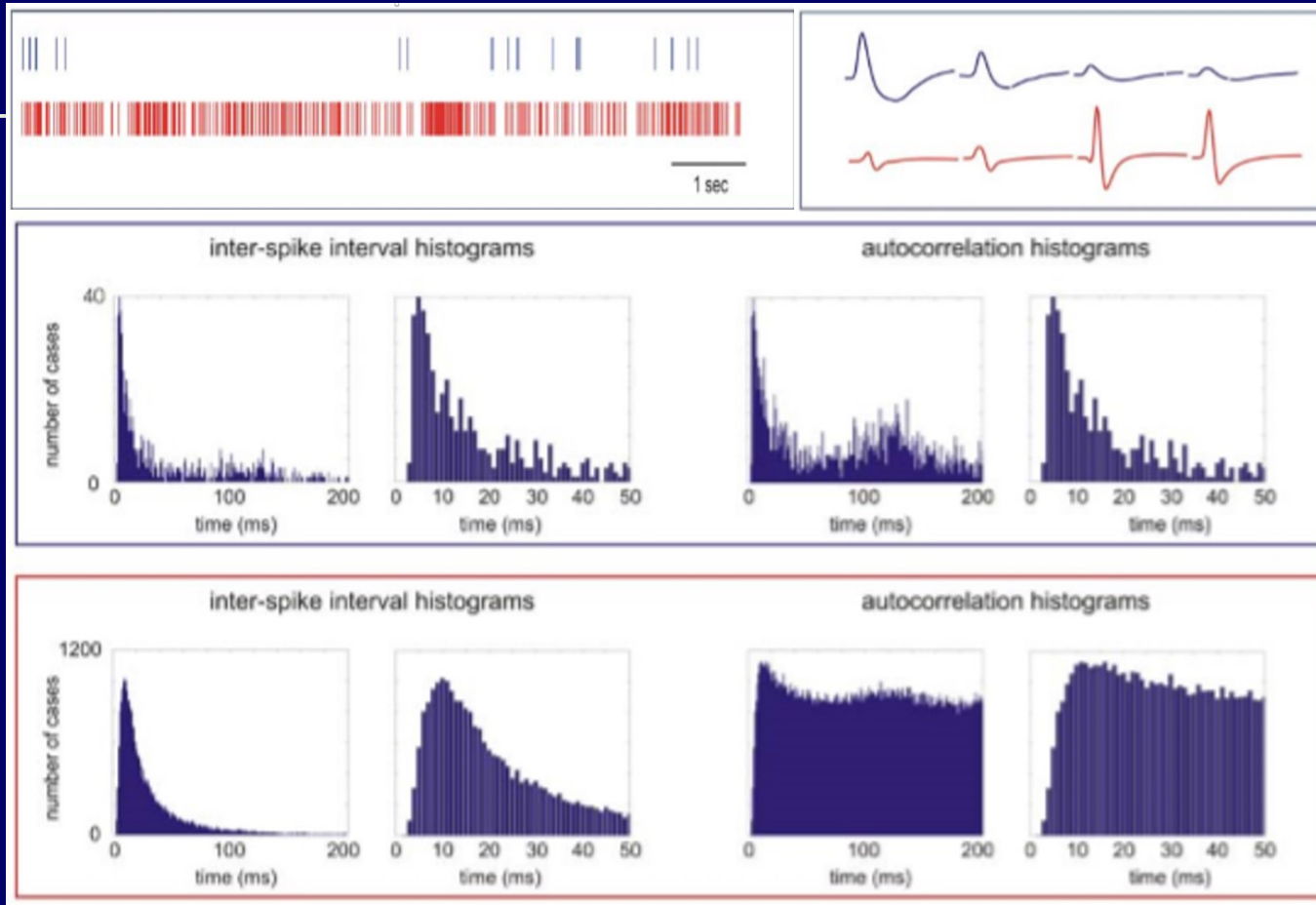


Klausberger et al.,
2003

Inter-spike interval histogram a autokorelace – příklady dvou neuronů

Pyramidální
buňka

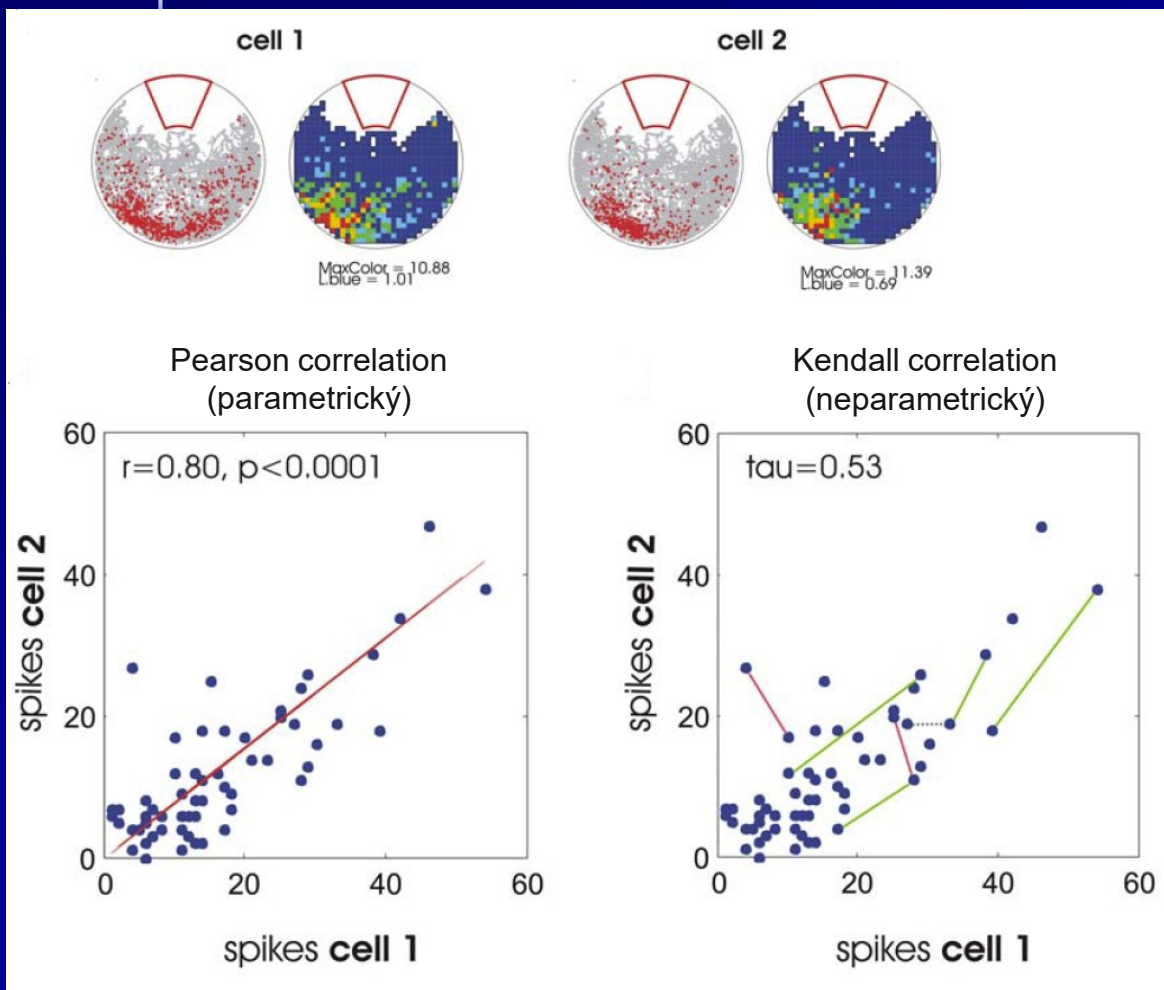
Interneuron



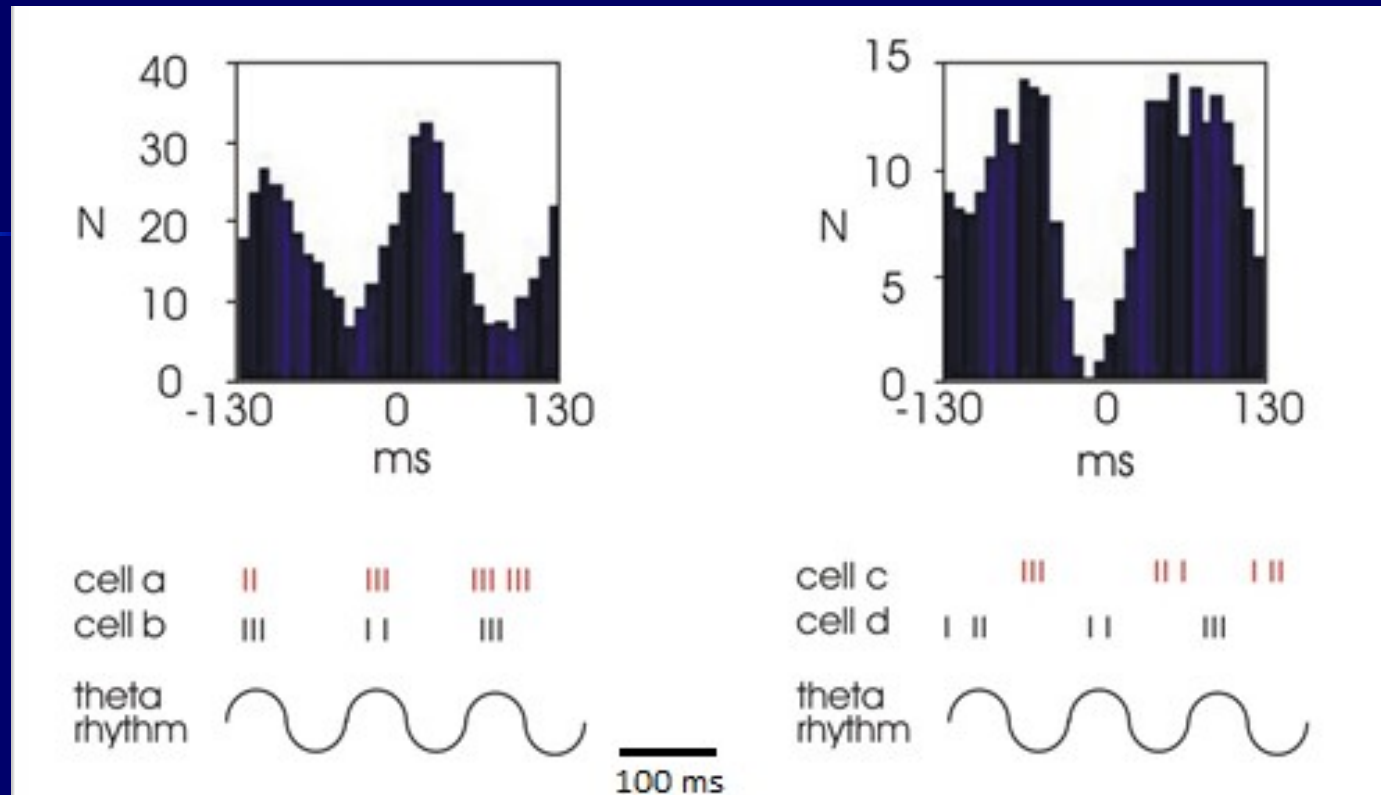
Pyramidální buňka (complex spike cell) charakteristicky vysílá krátké dávky akčních potenciálů s intervaly $< 10\text{ ms}$, interneuron ne. Aktivita obou buňek je modulována theta rytmem.

Vztah mezi aktivitou dvou neuronů

Vztah mezi aktivitou dvou neuronů může být vyjádřen pomocí korelačních koeficientů. Na obrázku je příklad dvou současně nahraných hipokampových neuronů místa s překrývajícími se aktivačními místy. Na grafech ve spodní části je znázorněna aktivita obou neuronů během jednovteřinových intervalů. Je vidět, že aktivita je pozitivně korelována. Kvantifikovat korelaci lze například pomocí Pearsnova nebo Kendallova korelačního koeficientu.



Vzájemná korelace (cross-correlation)

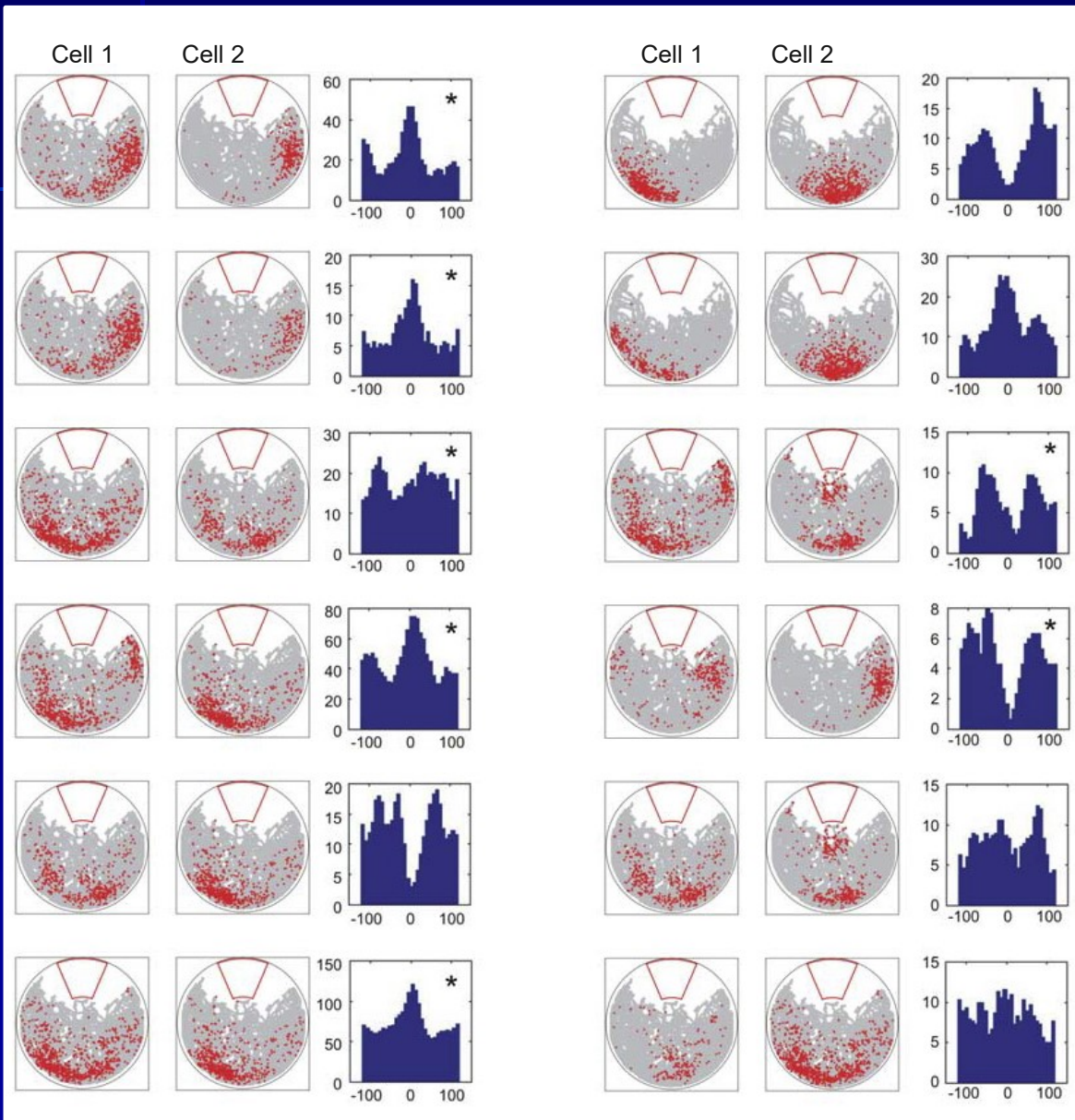


Vzájemná korelace je další používaný parametr, který vyjadřuje, s jako pravděpodobností páří jeden neuron v různých časových intervalech po aktivaci druhého neuronu.

Příklad vlevo ukazuje situaci, kdy jsou dva neurony aktivní skoro současně. Jeden z nich se aktivuje nejvíc asi 20 milisekund po druhém. (Oba neurony jsou aktivní ve stejné fázi théta rytmu.)

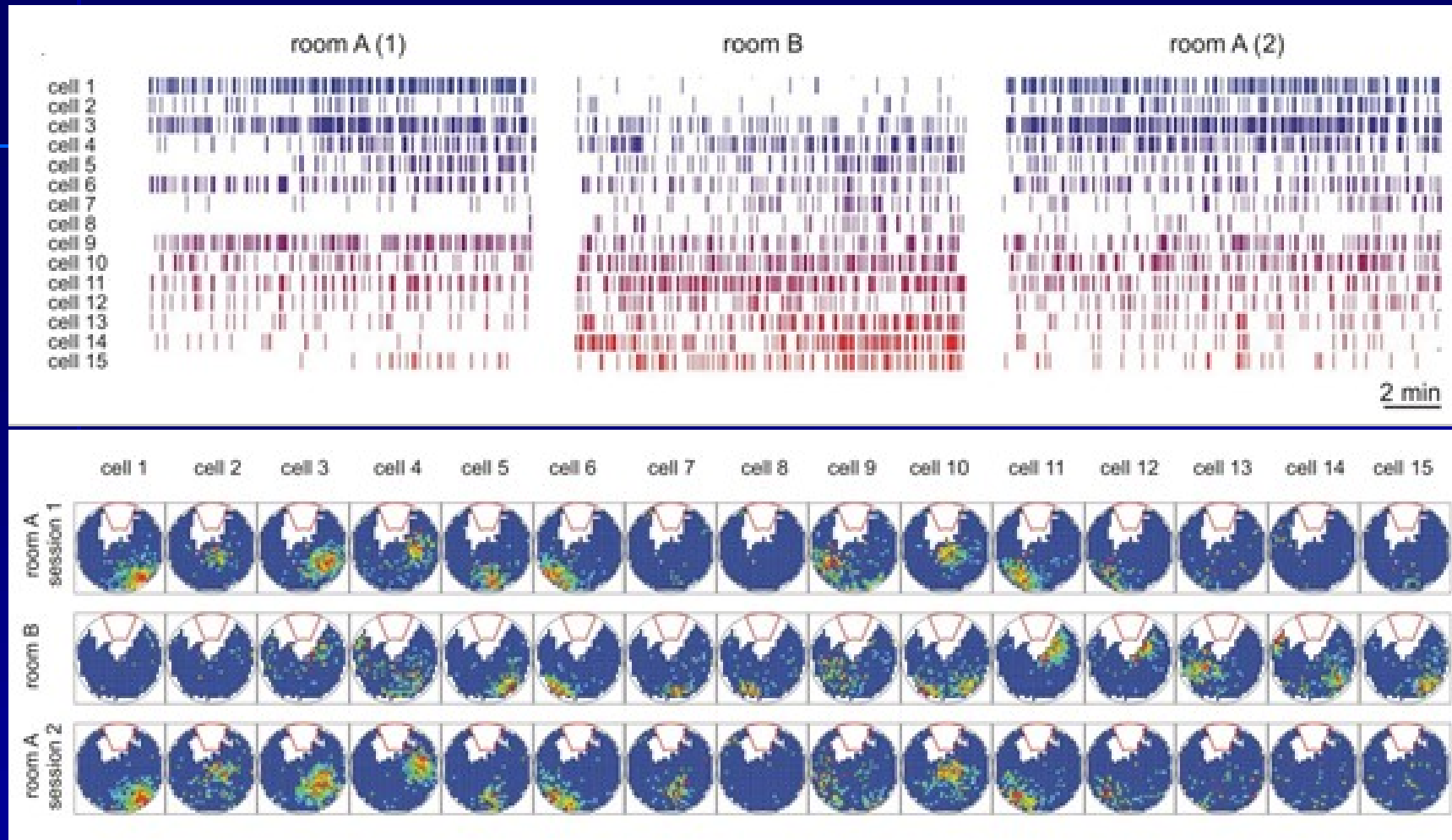
Příklad vpravo ukazuje situaci dvou neuronů, které se velmi zřídka aktivují současně, aktivují se nejvíc s intervalem (pauzou) 70 ms. (Neurony jsou aktivní v opačné fázi théty.)

Vzájemná korelace – reálné příklady



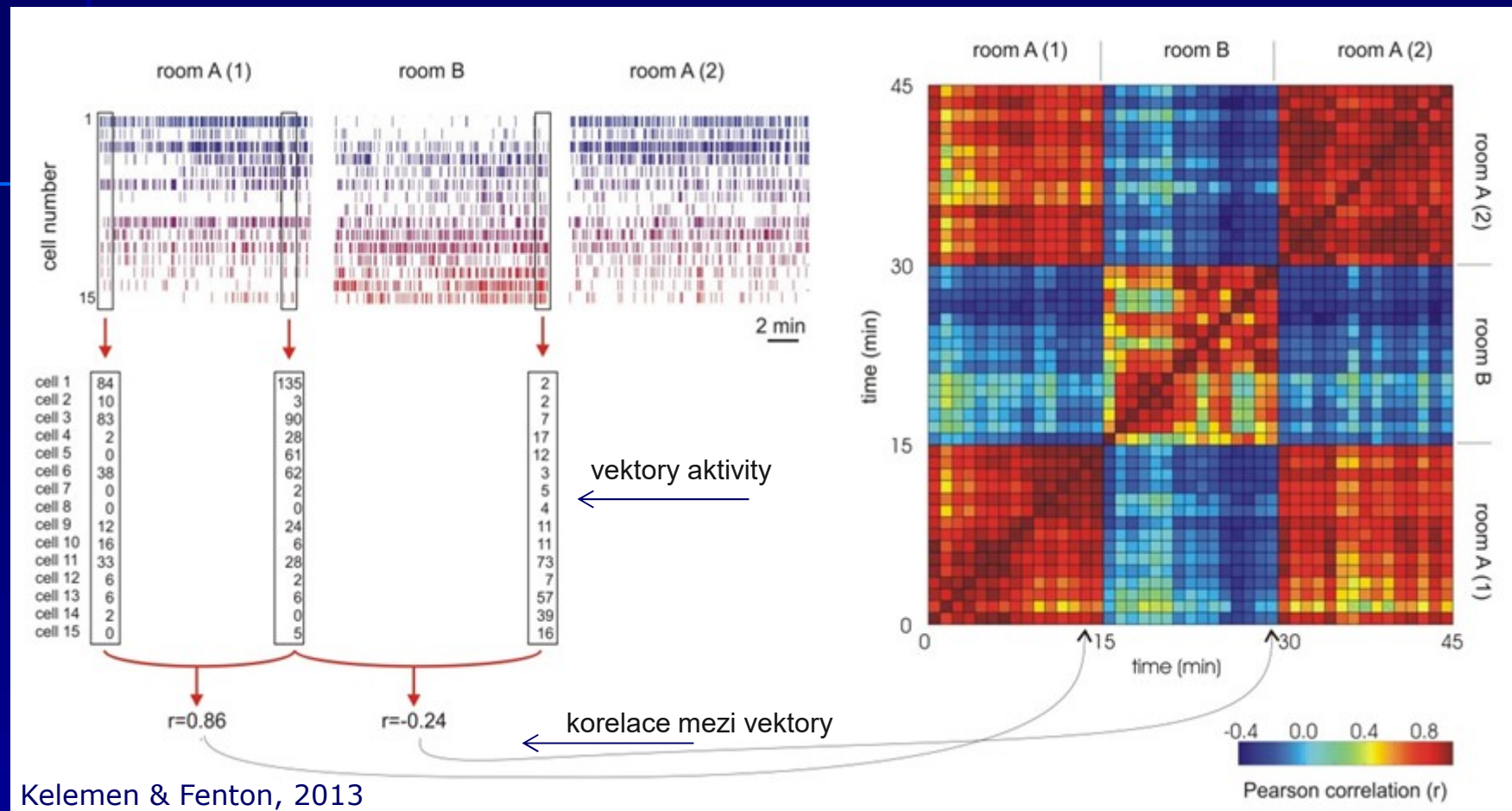
Příklady vzájemné korelace aktivity mezi páry hipokampálních neuronů místa. Některé páry neuronů se aktivují současně, jiné páry nepálí spolu, ale spíš s rozestupem ~ 50 ms.

Analýza aktivity neuronových ansámbliů



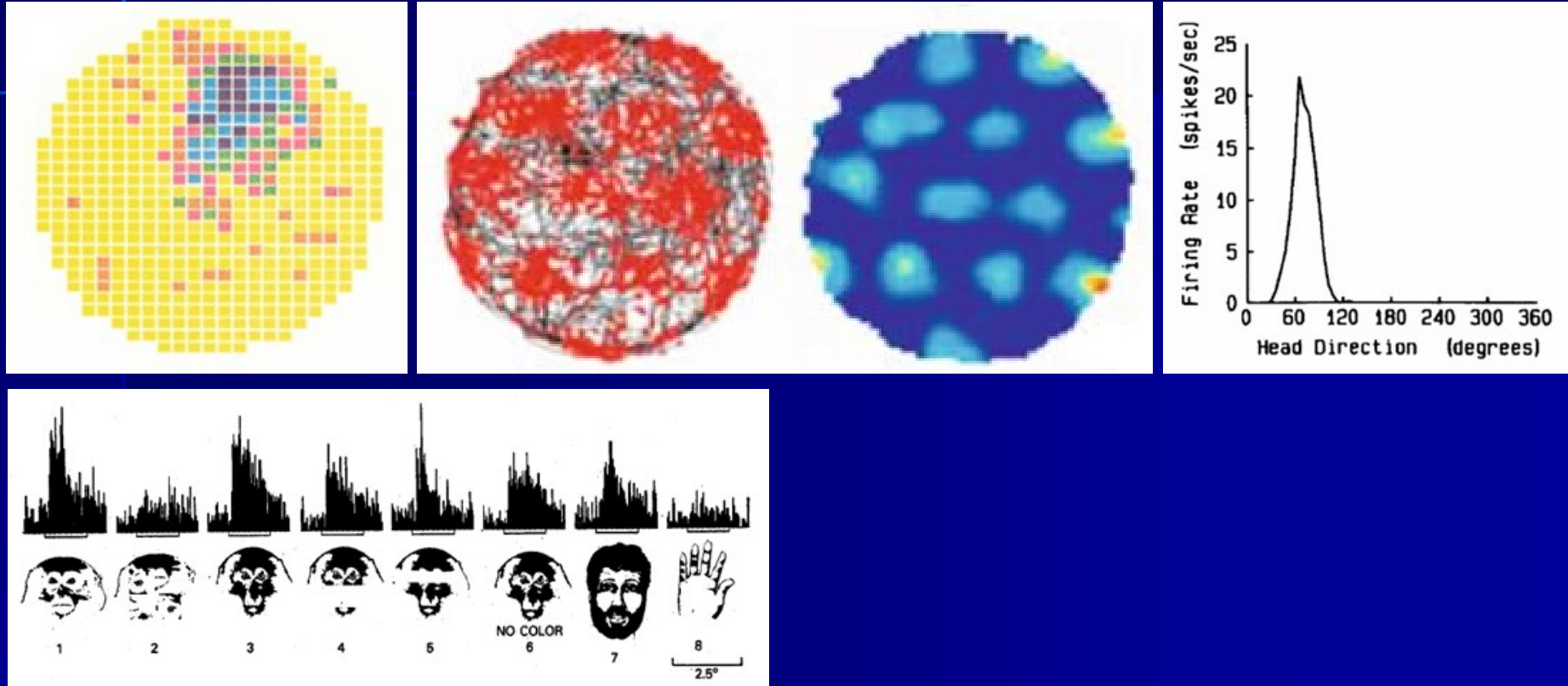
Příklad aktivity 15 současně nahraných hipokampálních neuronů ve dvou různých prostředích – v místnosti A a v místnosti B. Nahrávka v A byla opakována dvakrát.

Korelace vektorů aktivity neuronálního ansámblu, korelační matice



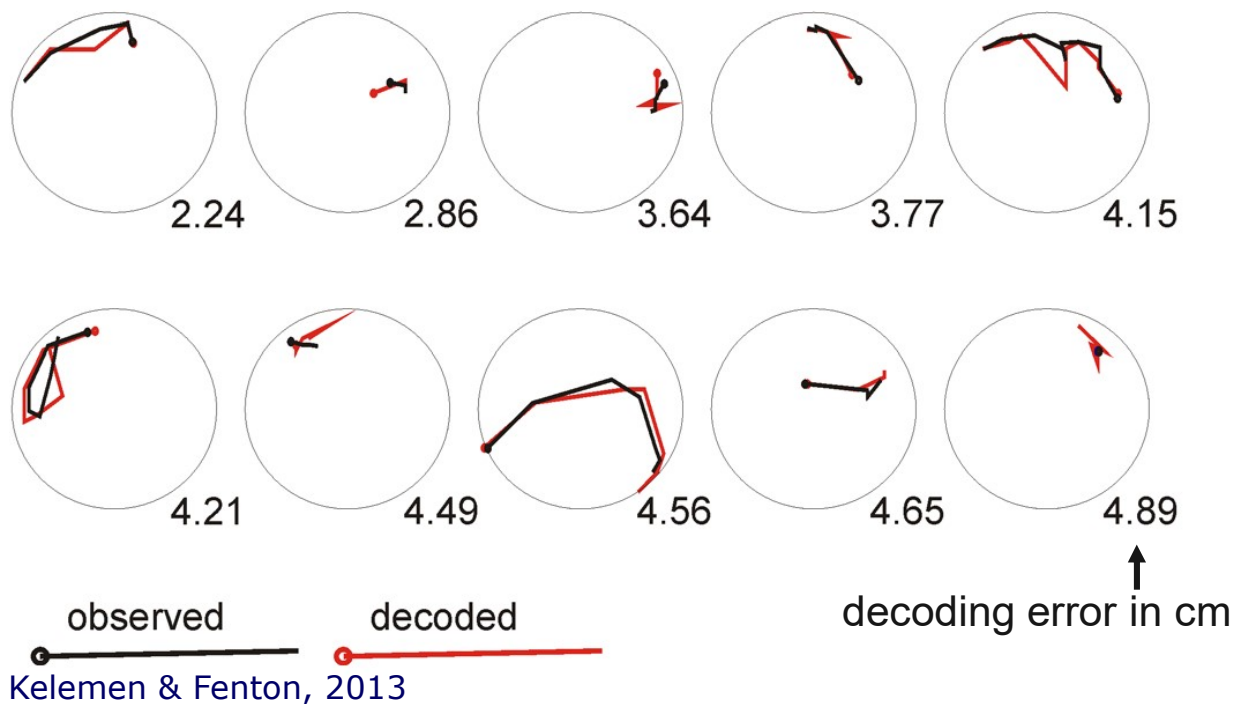
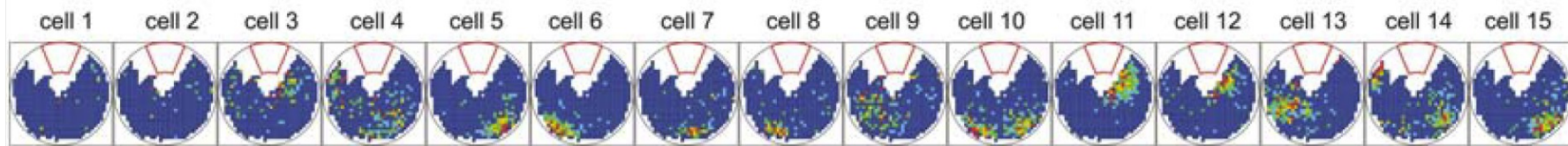
Aktivita celého souboru 15 neuronů v libovolném časovém intervalu může být vyjádřena vektorem aktivity – ten znázorňuje aktivitu každého z 15 neuronů během daného intervalu. Aktivita mezi intervaly pak může být porovnána pomocí korelace. Korelace mezi všemi páry časových intervalů může být znázorněna korelační maticí, kde červené barvy znázorňují vysokou pozitivní korelaci a modré odstíny nízkou nebo negativní korelací.

Stimulus-response function (funkce podnětu a odpovědi)



Aktivita neuronů může být korelována s behaviorálními a senzoryckými parametry. V horní řadě jsou příklady korelace aktivity s pozicí u place cell a grid cell a korelace aktivity head direction cell se směrem hlavy potkana – jsou vysvětleny v mé předchozí přednášce. Ve spodní části je korelace aktivity neuronu opice s různými obrázky – neuron reagoval nejvíc, když zvíře vidělo obličej.

Určování polohy zvířete na základě aktivity hipokampálních neuronů místa.



Korelace aktivity neuronů s nějakým behaviorálně relevantním parametrem (třeba pozicí potkana) může být použita k predikci onoho parametru na základě neuronální aktivity.

Na příkladu vlevo je ukázka dekódování pozice potkana podle aktivity skupiny place cells.

Děkuji