

# Elektrofyzilogické metody a studium chování a paměti

David Levčik

Oddělení Neurofyzilogie paměti

Fyzilogický ústav AV ČR, v.v.i.

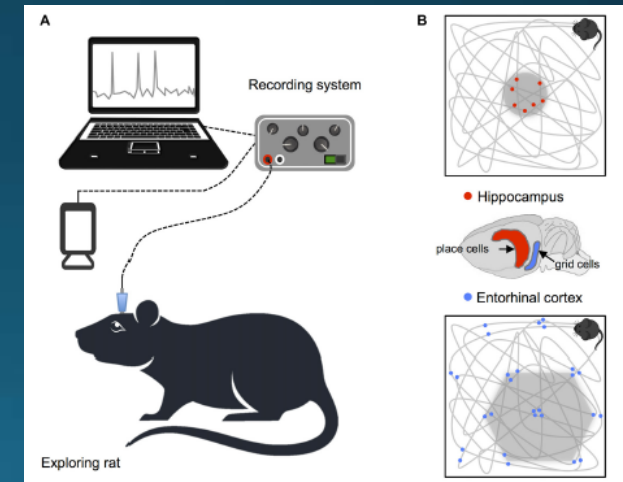
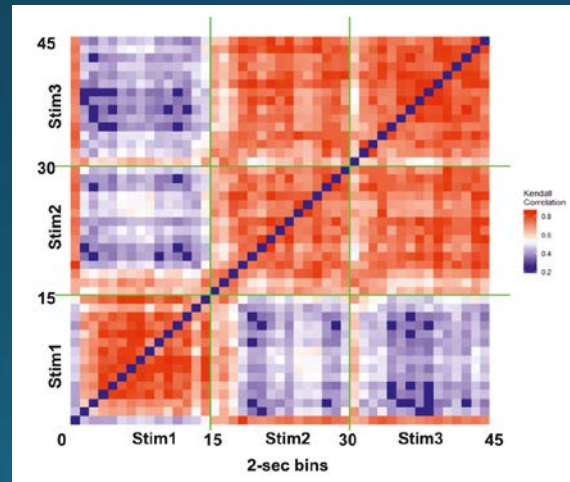
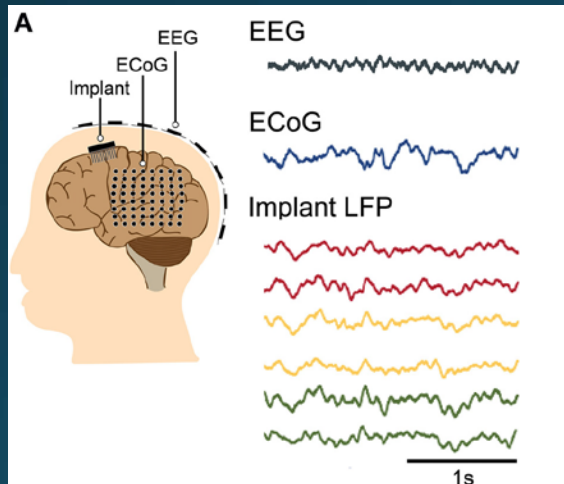
Praha 4



27/04/2022

# Co bude obsahem přednášky?

- Elektrofyzilogické metody
- Analýza a interpretace elektrofyzilogických dat
- Využití elektrofyzilogie ke studiu chování a paměti

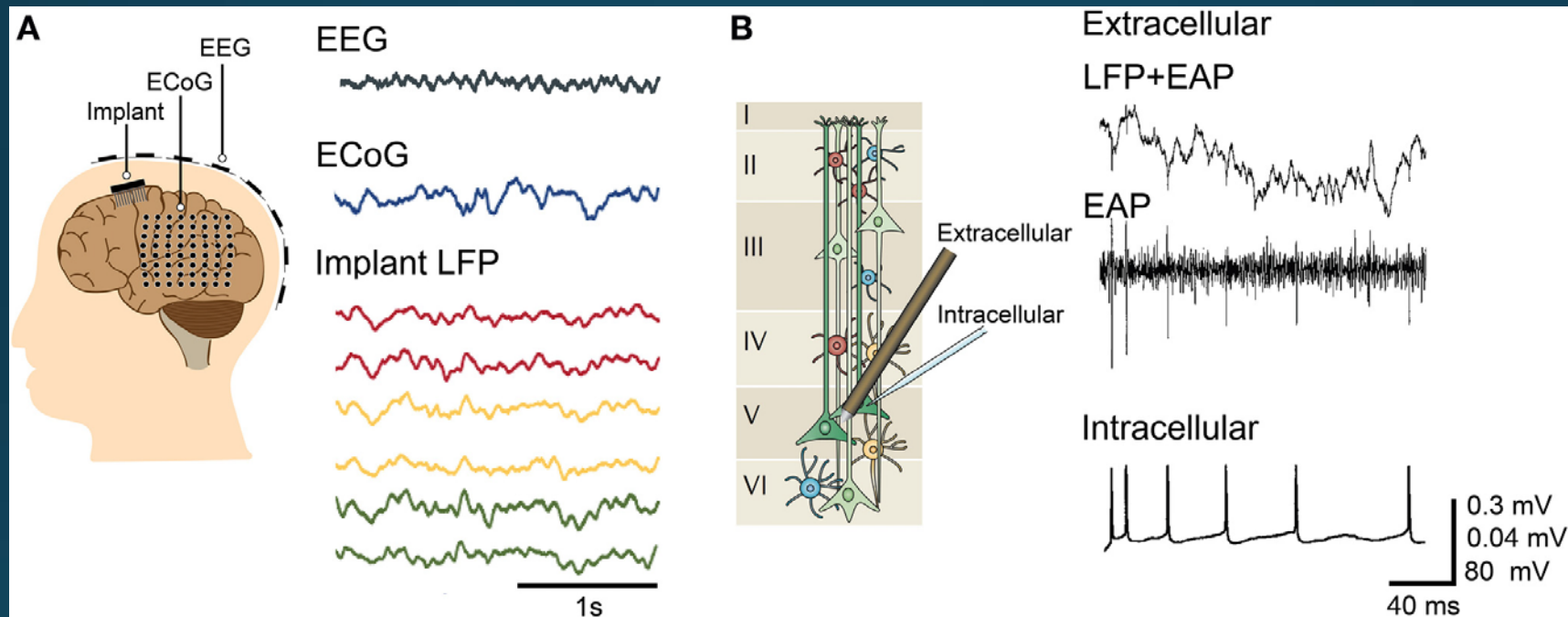


# Co je elektrofyziologie?

- studium elektrických vlastností biologických buněk a tkání
- v neurovědách -> měření elektrické aktivity neuronů (akčních potenciálů)
- elektrická povaha neuronální aktivity umožňuje detekovat signály na elektrodách v určité vzdálenosti od zdroje



# Typické elektrofyziologické metody

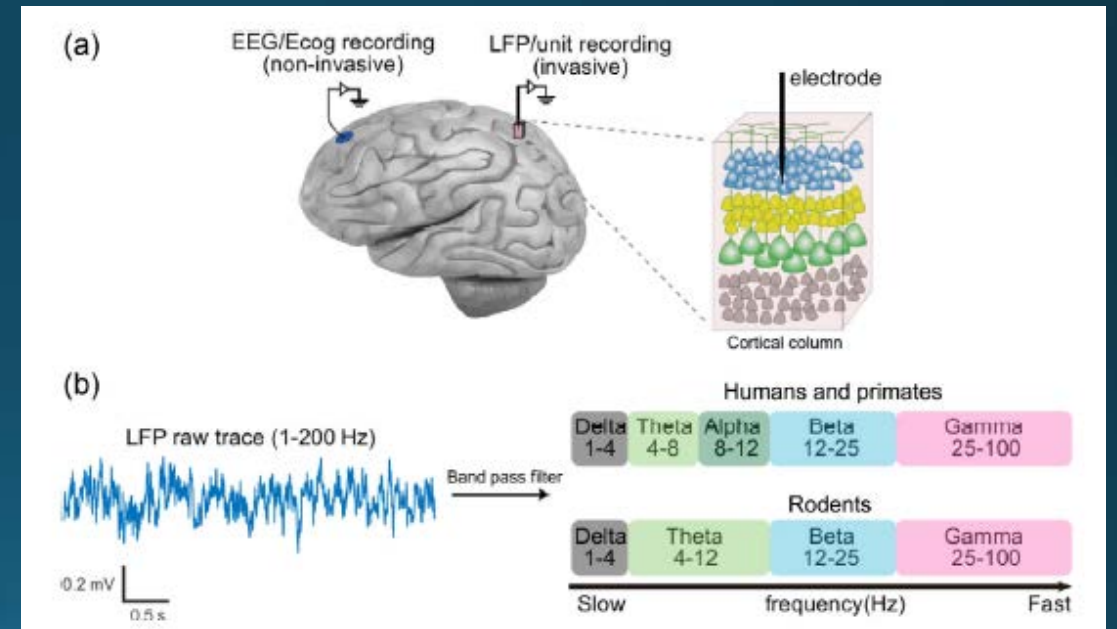


- makroskopické metody: EEG (> 100 ms)
- mezoskopické metody: ECoG, LFP (1-10 ms)
- mikroskopické metody: extracelulární a intracelulární nahrávání AP (< 1 ms)



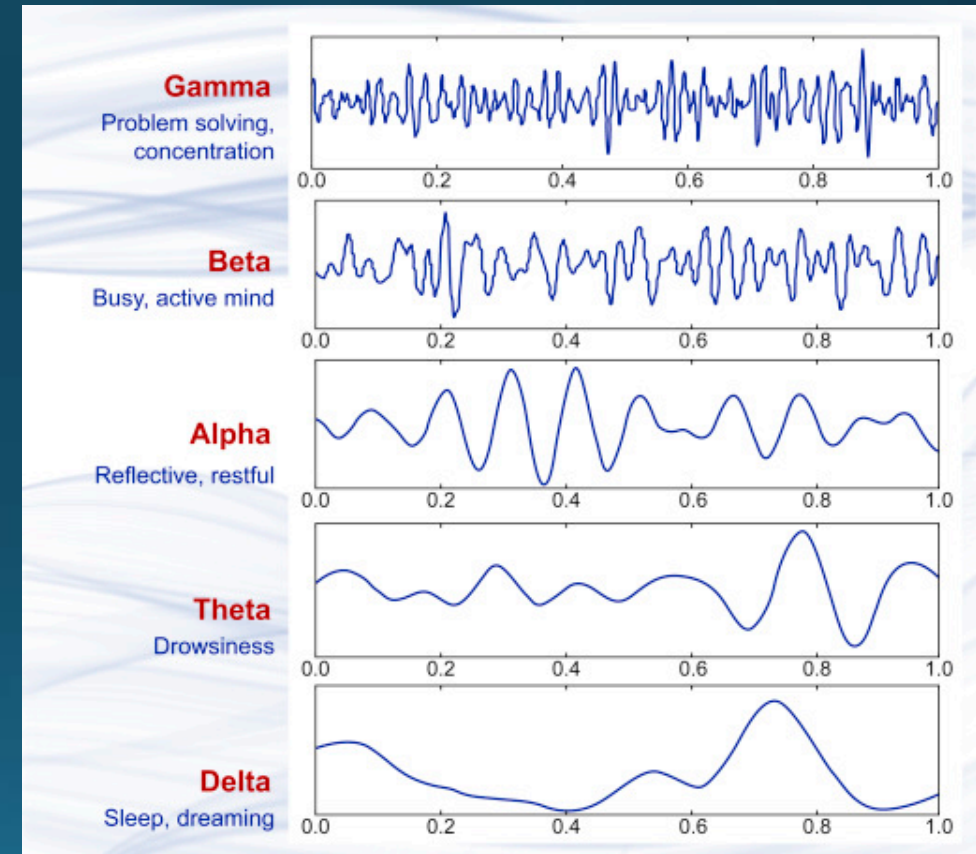
# Elektroencefalogram (EEG) a potenciály blízkého pole (LFP)

- Záznam sumární změny elektrického potenciálu – v důsledku synchronizované synaptické aktivity velkého množství (až tisíců) neuronů.
- EEG – neinvazivní, elektrody na povrchu lebky
- LFP (local field potentials) – invazivní, elektrody uvnitř mozku
- mozkové vlny – rytmické vzorce aktivity s různou frekvencí



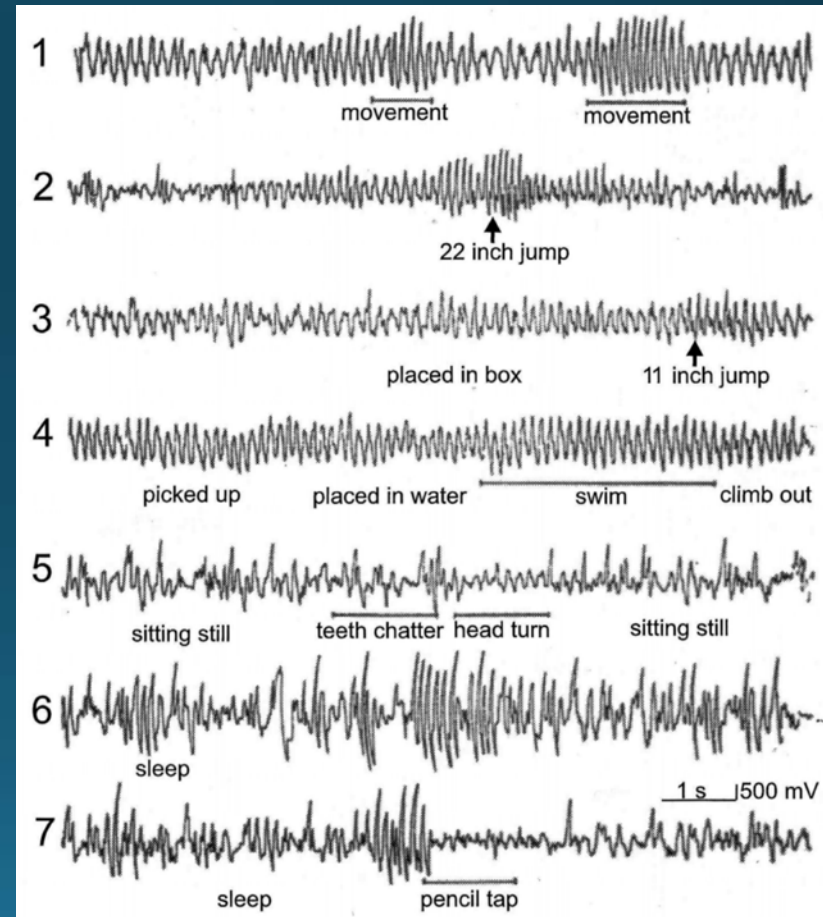
# Typy mozkových vln

- individuální typy mozkových vln odpovídají například různým stavům vědomí či mysli
- rychlejším vlnám (gama) se přisuzuje role v kognitivních procesech (učení, paměť)



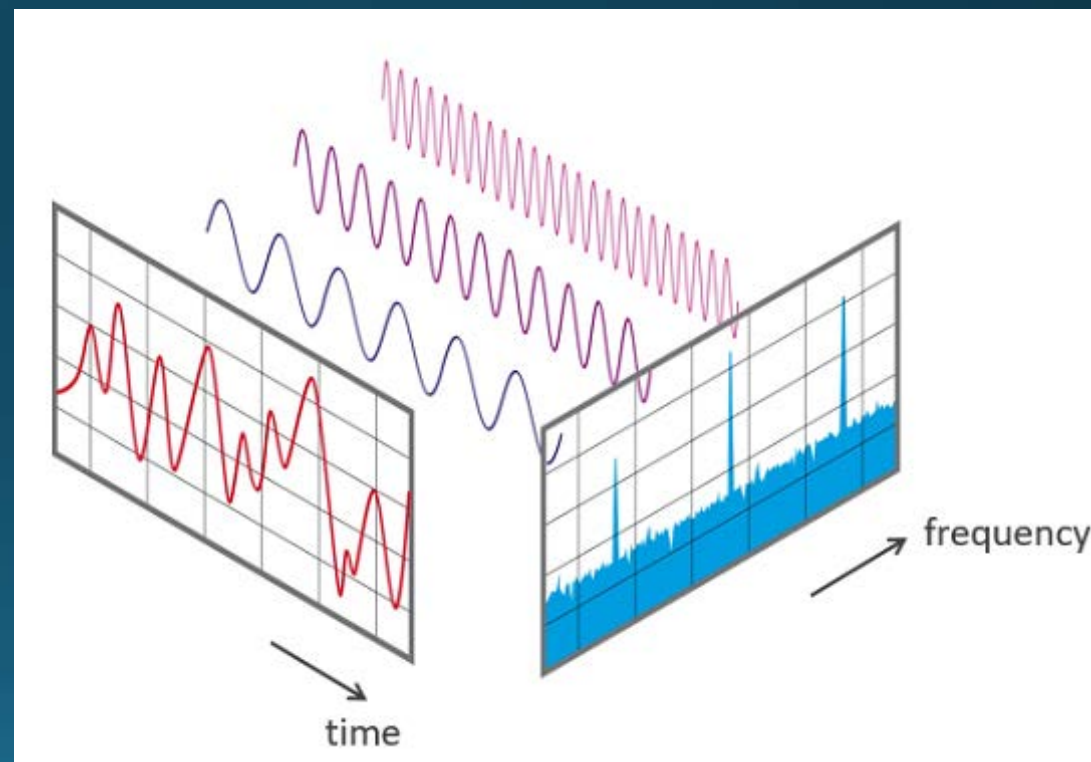
# Hipokampální LFP koreláty pohybu u potkanů

- změny amplitudy a frekvence LFP signálu spojené se spontánními a naučenými pohybovými vzory u potkanů



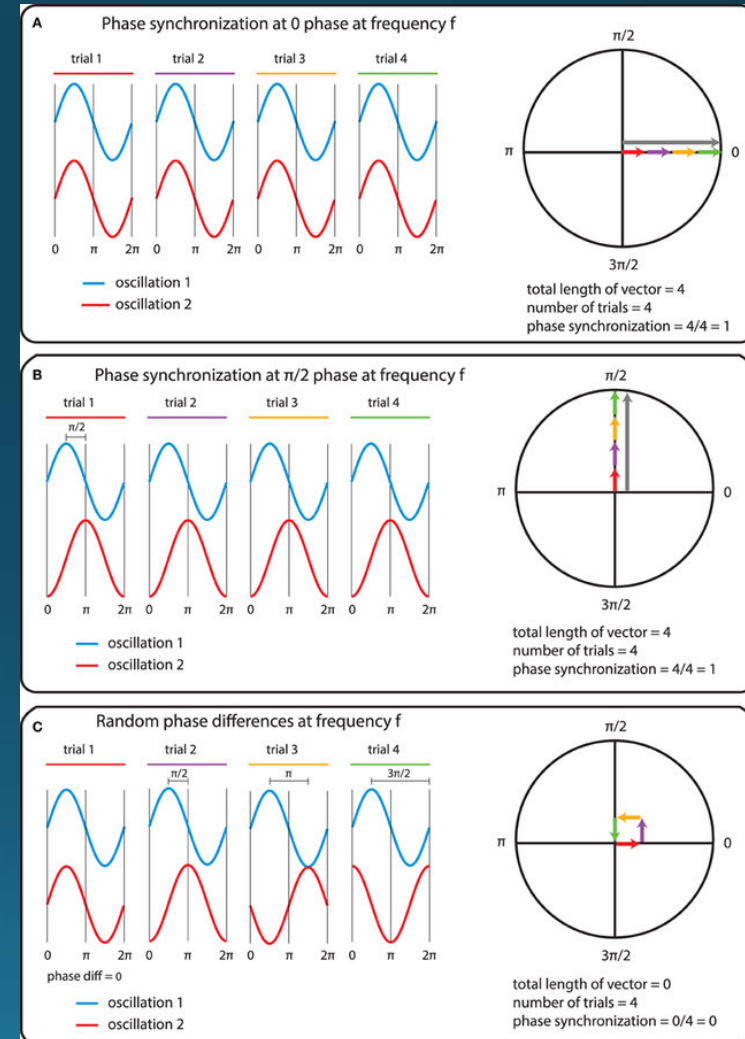
# Fourierova transformace

- Fourierova transformace umožní rozložit nepravidelný signál (červený) na komponenty o různých konkrétních frekvencích (odstíny fialové).
- Vyjadřuje tedy rozložení a zastoupení různých frekvencí v analyzovaném signálu.
- Frekvencím je přiřazena hodnota podle jejich zastoupení v původním signálu.
- Zastoupení jednotlivých frekvencí pak lze zobrazit pomocí výkonového spektra (modrý histogram).
- To umožňuje identifikovat zastoupení individuálních typů mozkových vln v analyzovaném neuronálním signálu.



# Synchronizace a koherence

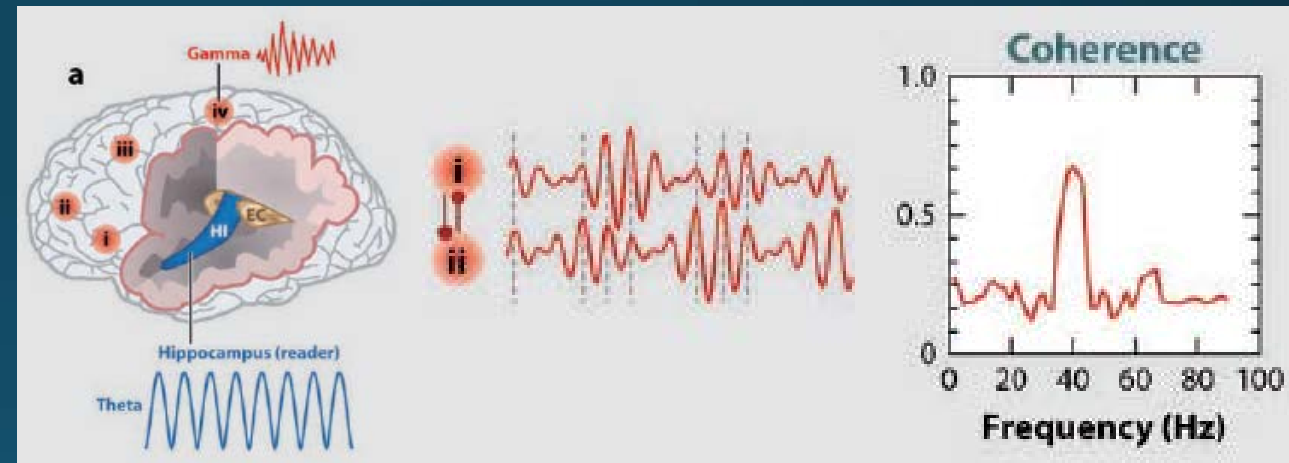
- synchronizace = dva signály oscilují se stejnou frekvencí a identickou fází
- koherence = relativní fáze mezi dvěma signály je konstantní
- Synchronizace je koherence při stejné fázi. Synchronizace je tedy vždy koherentní, ale koherence nemusí být synchronní.





# Komunikace mezi strukturami a hemisférami mozku

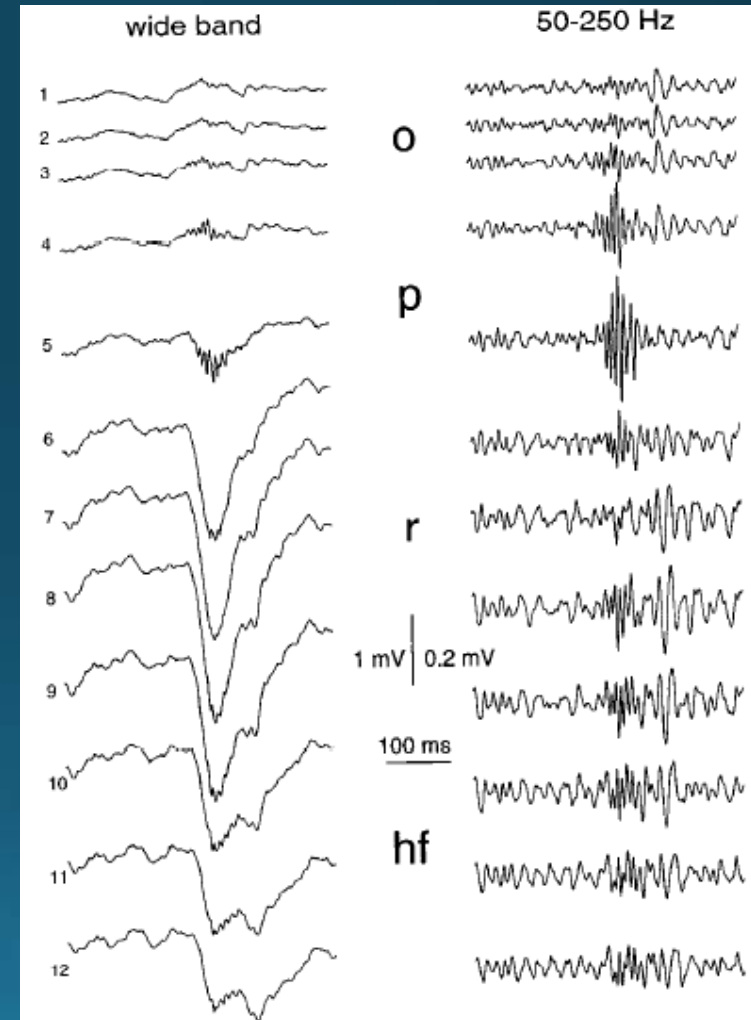
- théta vlny – organizují aktivitu neuronů v hipokampu
- gama vlny – organizují aktivitu kortikálních neuronů
- komunikace přes koherenci = meziregionální komunikace je navázána, když je oscilační aktivita mezi těmito oblastmi koherentní (oscilují na stejné frekvenci se stabilním fázovým rozdílem)
- marker schizofrenie - snížená síla lokalizovaných  $\gamma$  oscilací, ale také narušená  $\gamma$  synchronizace mezi hemisférami nebo jinými velkými anatomickými vzdálenostmi





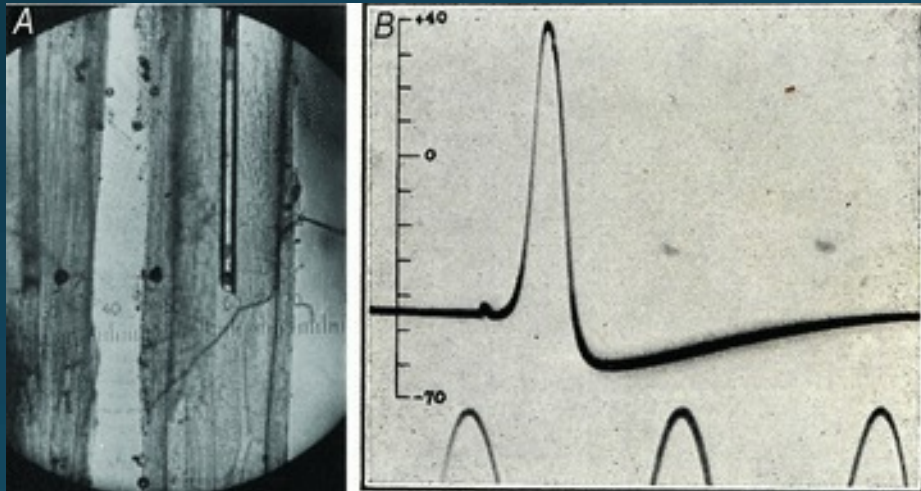
# Ostré vlny a vlnky (SWRs)

- SWRs (sharp wave ripples) = oscilační vzorce (150-250 Hz) v hipokampu savců - během imobility a spánku
- role v konzolidaci paměťových stop
- vysoce organizovaná aktivita neuronů, koordinovaná inhibičními interneurony

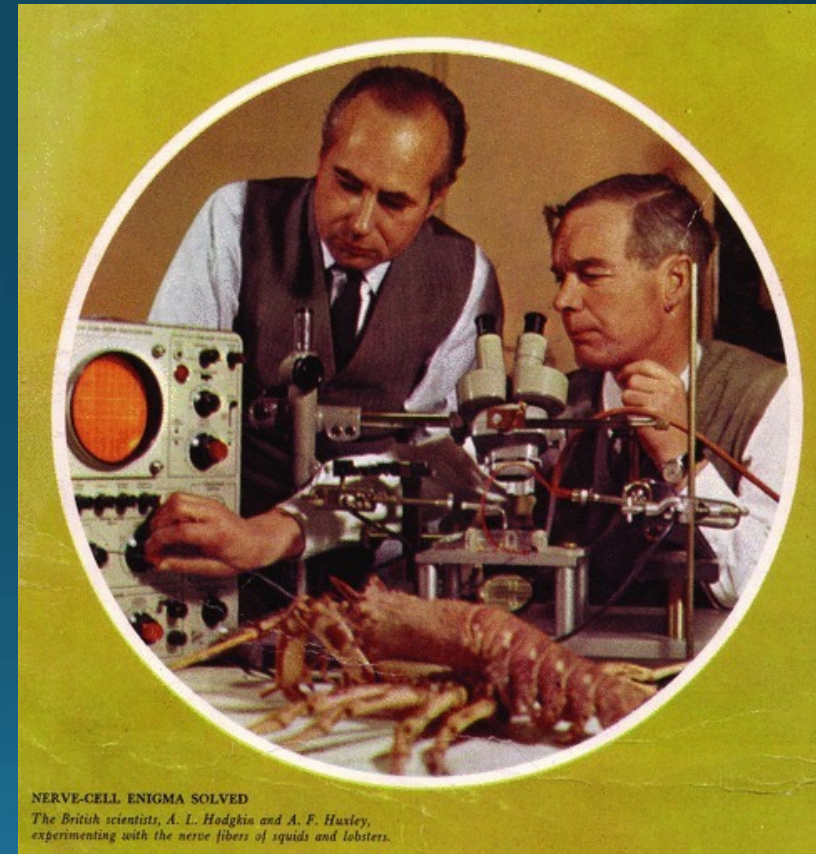


# Aktivita jednotlivých neuronů (akční potenciály)

První zdokumentovaný akční potenciál nahraný (intracelulárně) z obřího axonu (průměr 0.5 mm) sépie.



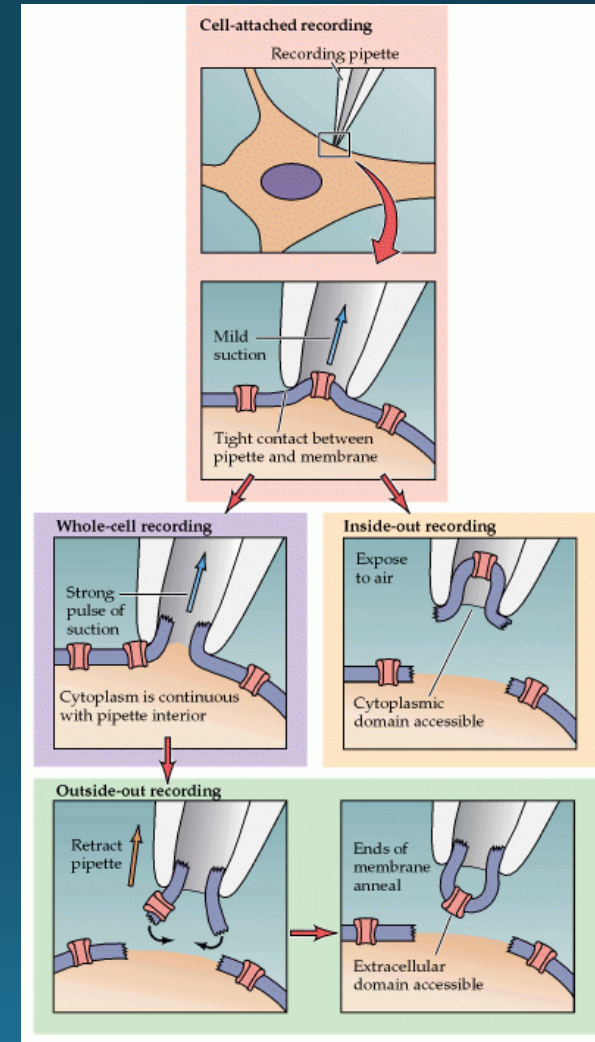
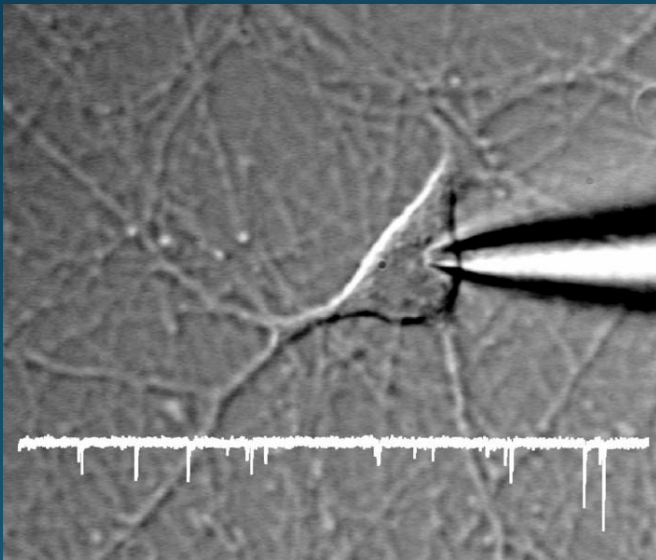
Hodgkin and Huxley 1939, Nature



zdroj: Nobel Prize Programme, 1963

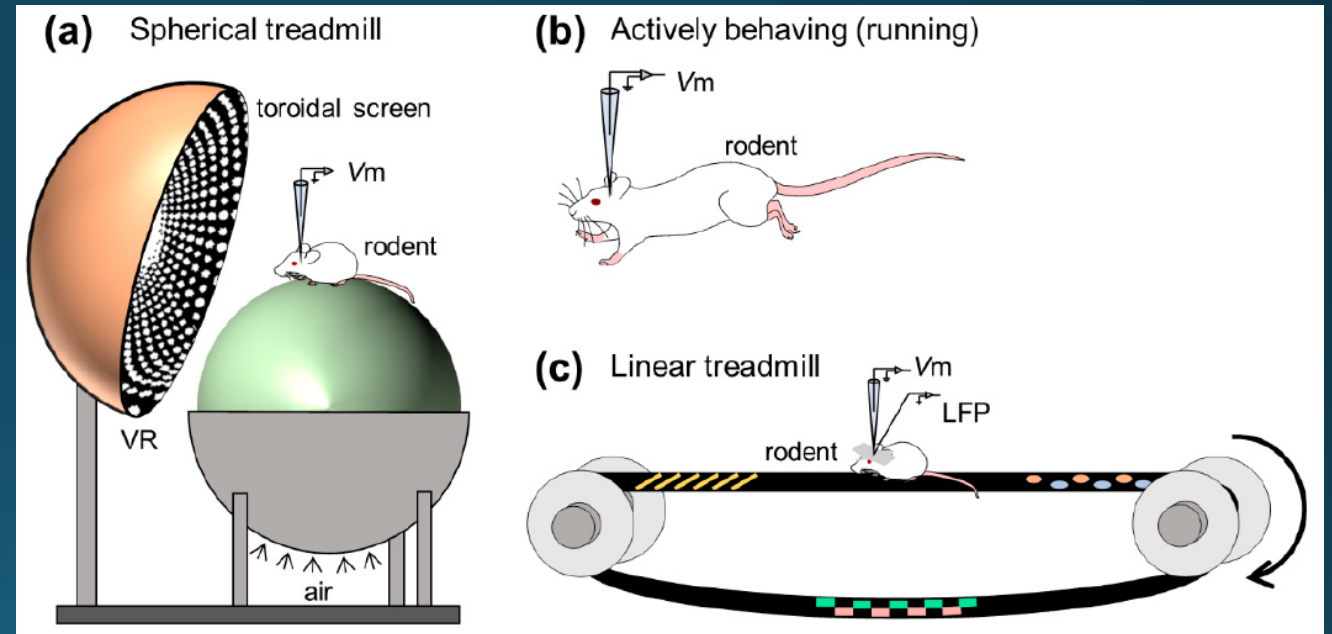
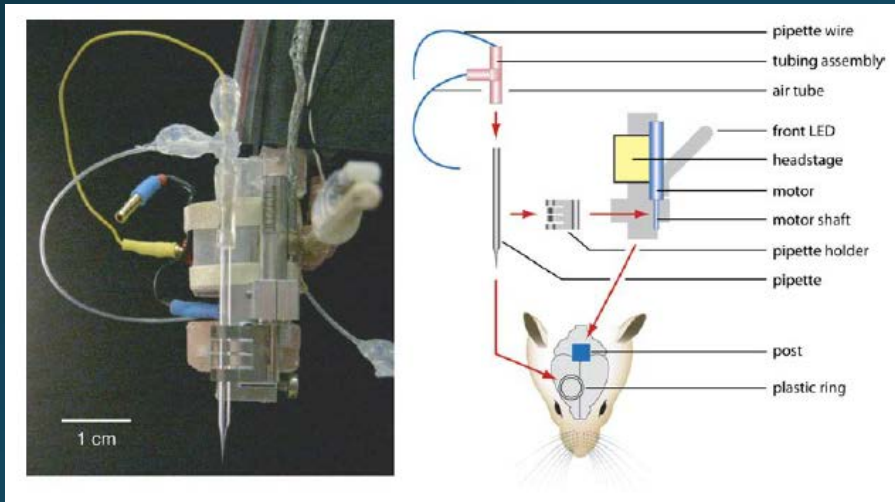
# Intracelulární nahrávání - terčíkový zámek (patch clamp)

- elektrofyziologické snímání aktivity z jednoho neuronu, z části buněčné membrány, nebo dokonce z jednoho membránového kanálu
- pomocí přisání skleněné mikropipety (invazivní metoda)
- nepříliš využívaná metoda u volně pohyblivých zvířat (pohyb může způsobit mechanické narušení kontaktu s buňkou či poškození pipety)



# Intracelulární nahrávání *in vivo*

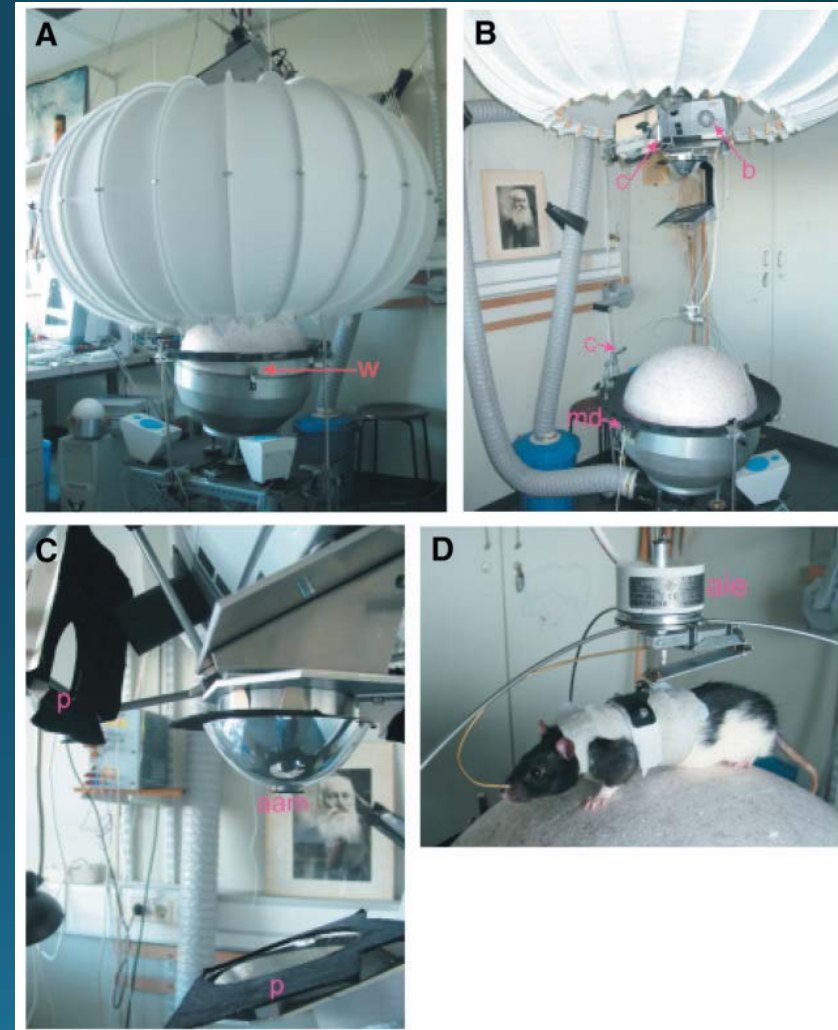
- fixace hlavy zvířete + “šlapací kolo”
- extrémní stabilizace mikropipety





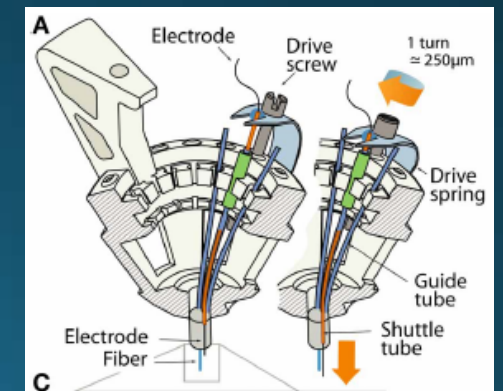
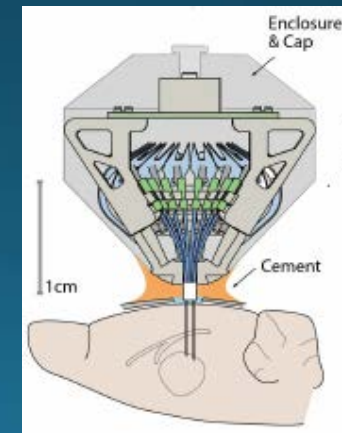
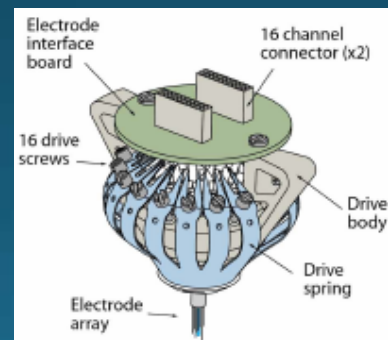
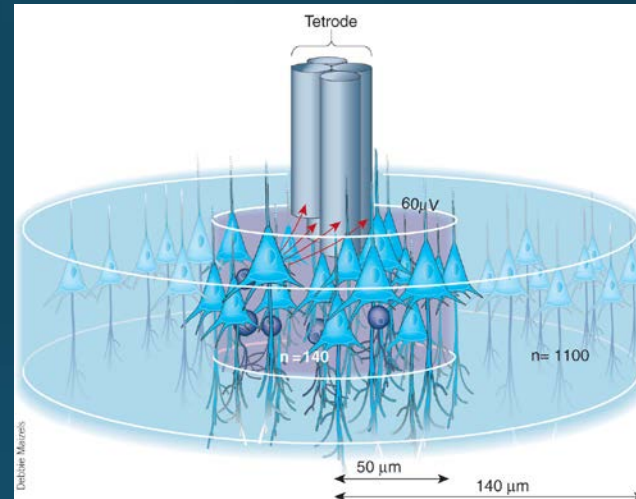
# Virtuální realita pro hlodavce

- hlodavci jsou schopni prostorové navigace ve virtuálním prostředí
- potkan může běhat po polystyrénové kouli, která se v důsledku toho otáčí
- pohyb potkana generuje změny v promítaném prostředí
- kontrola nad promítaným prostředím, variabilita designu, nulová interakce s experimentátorem



# Extracelulární nahrávání - tetrody

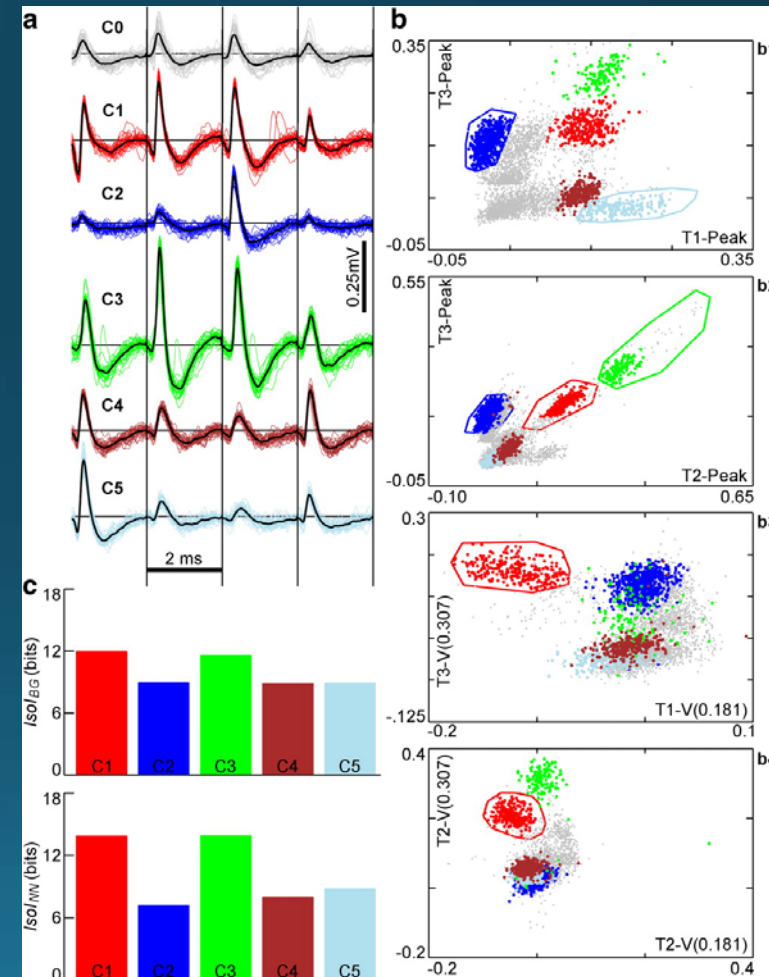
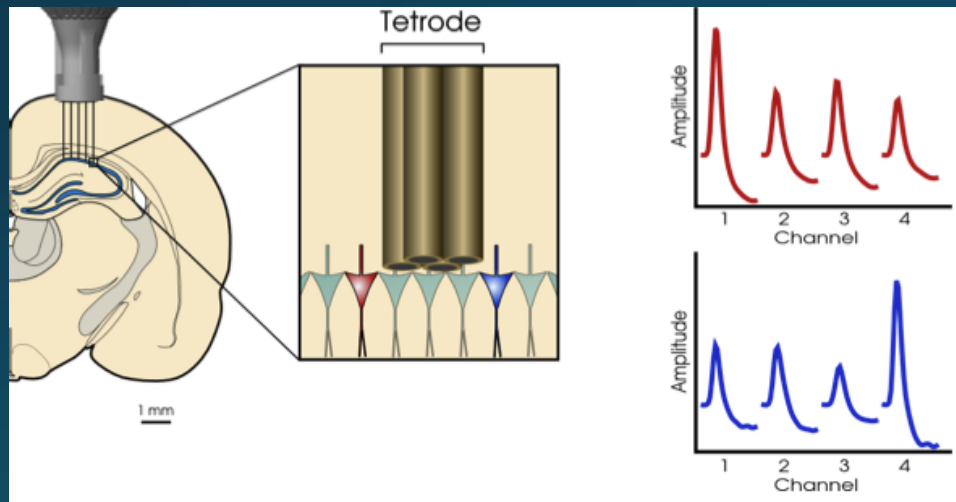
- kovové elektrody 12-25  $\mu\text{m}$  – k izolaci aktivity jednotlivých neuronů
- elektrická aktivita generovaná neurony v blízkosti špičky elektrody
- tetrody – čtveřice elektrod spletených dohromady
- mikromanipulátory – pro přesné zavedení nahrávacích elektrod do cílové oblasti mozku





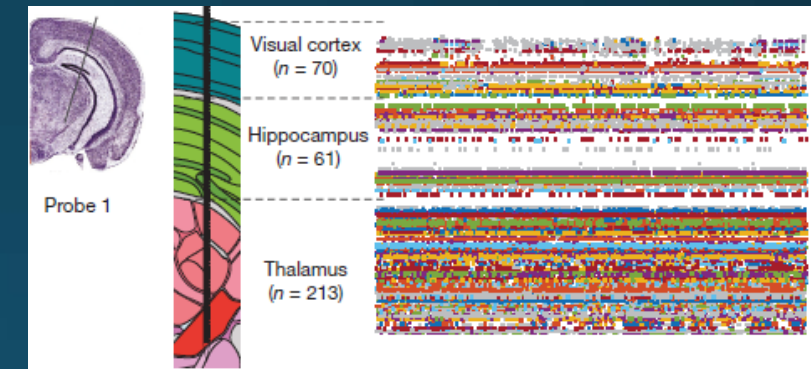
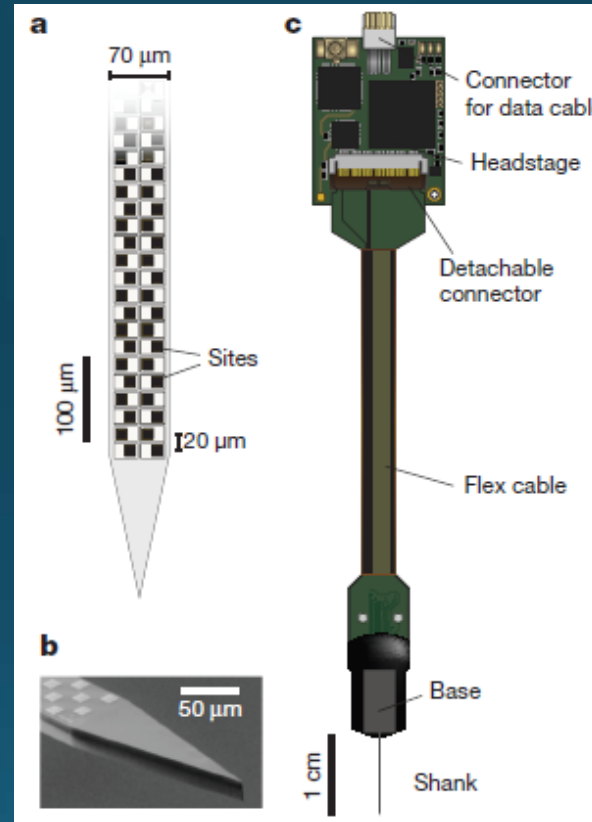
# Tetrody – klastrování akčních potenciálů

- přiřazení jednotlivých akčních potenciálů k jednotlivým neuronům (klastrům)



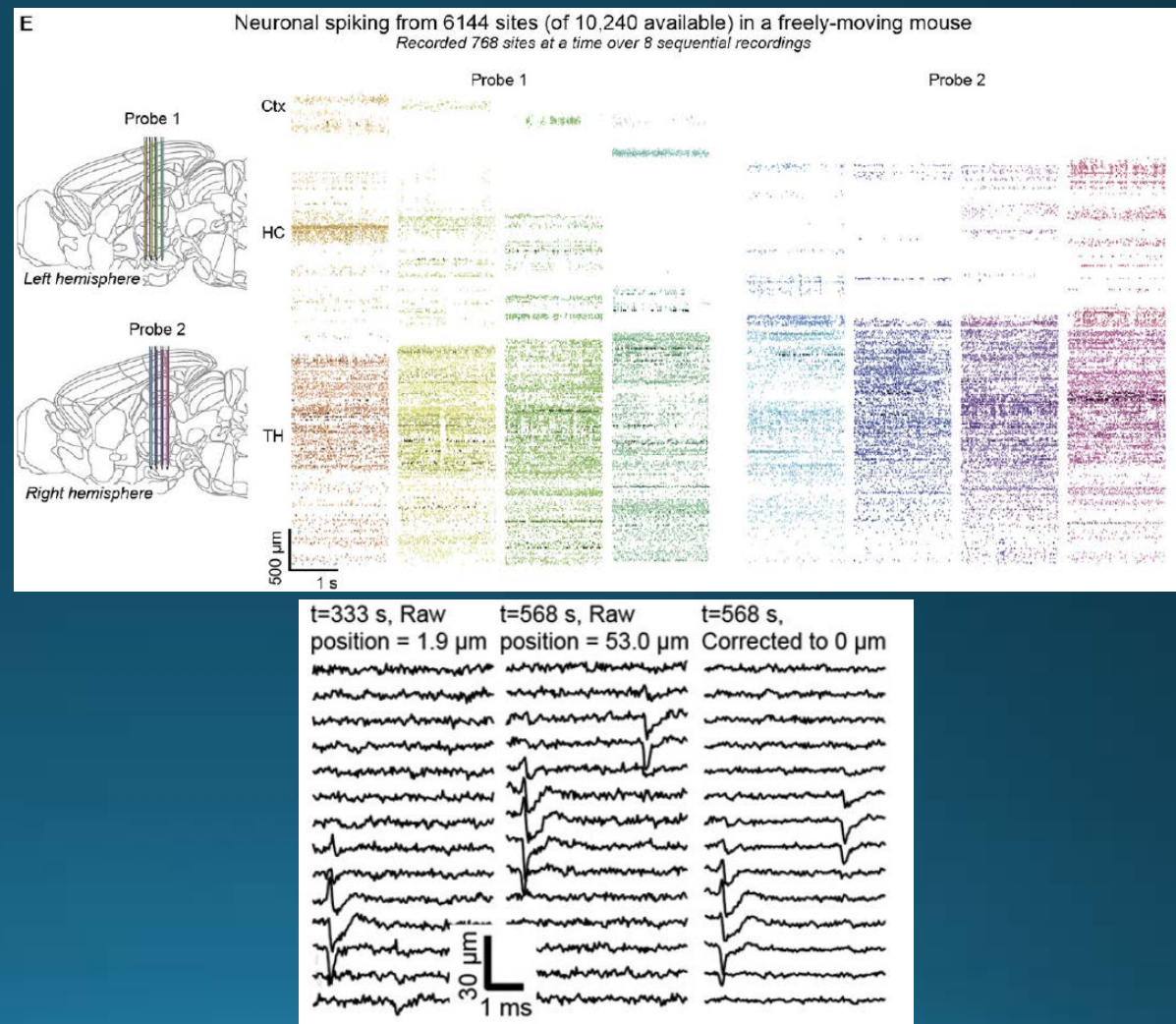
# Silikonové próby

- elektrody rozmístěny v pravidelných intervalech na jemné sondě
- ~1000 elektrod po délce 1 cm
- možnost současně nahrávat až stovky buněk napříč strukturami



# Silikonové próby druhé generace

- 4 sondy na jedné próbě
- možnost nahrávat až tisíce buněk současně
- větší miniaturizace a sloupcové uspořádání elektrod - různé elektrody podél vertikální sondy mohou pokračovat v záznamu ze stejného neuronu (i po několik týdnů)
- kompenzace vertikálního pohybu mozku



# Elektrofyzilogická aparatura

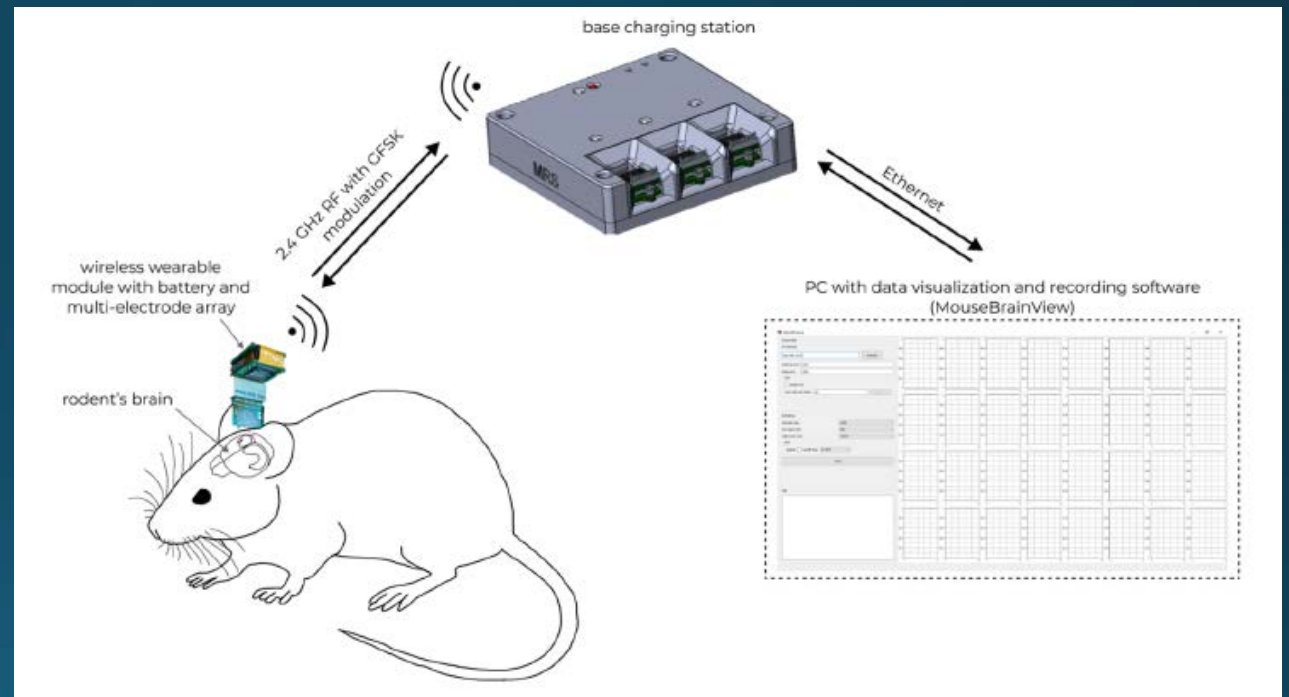
- předzesilovač (headstage)
- komutátor
- A/D převodník
- jednotka pro zpracování dat (možnost synchronizace se vstupy z periferií)
- počítač a SW pro vizualizaci dat



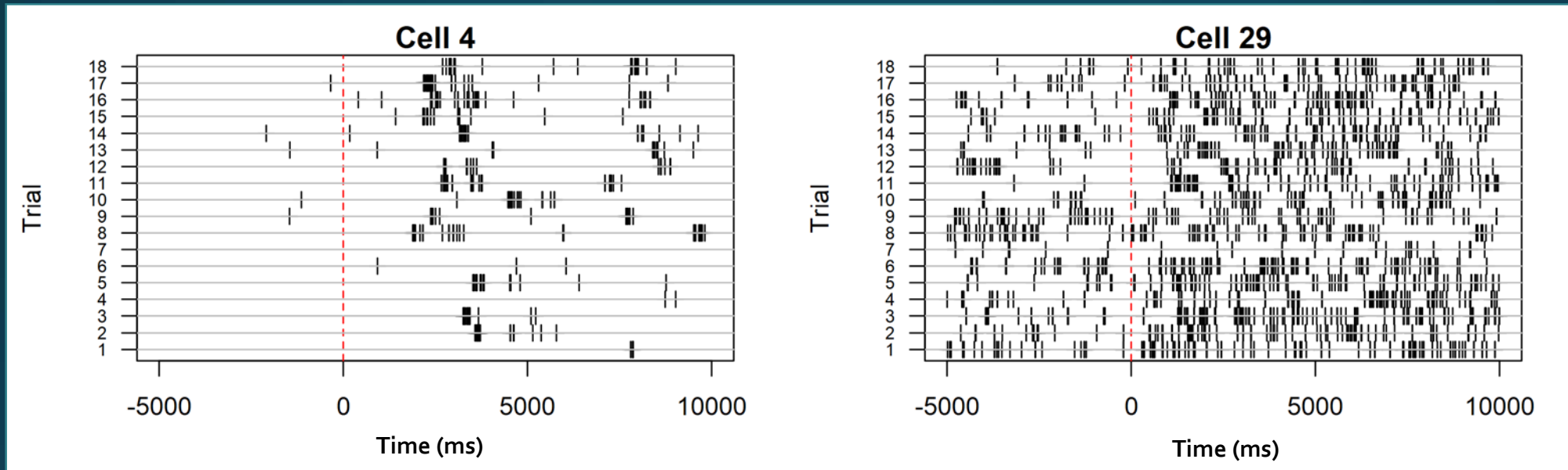


# Bezdrátové nahrávání

- nepřítomnost kabelu výhodou pro některé experimenty (specifická bludiště, sociální experimenty, atd.)
- transfer dat pomocí WiFi (energeticky náročné – délka nahrávání limitována velikostí/hmotností baterie)



# Analýza jednotkové aktivity

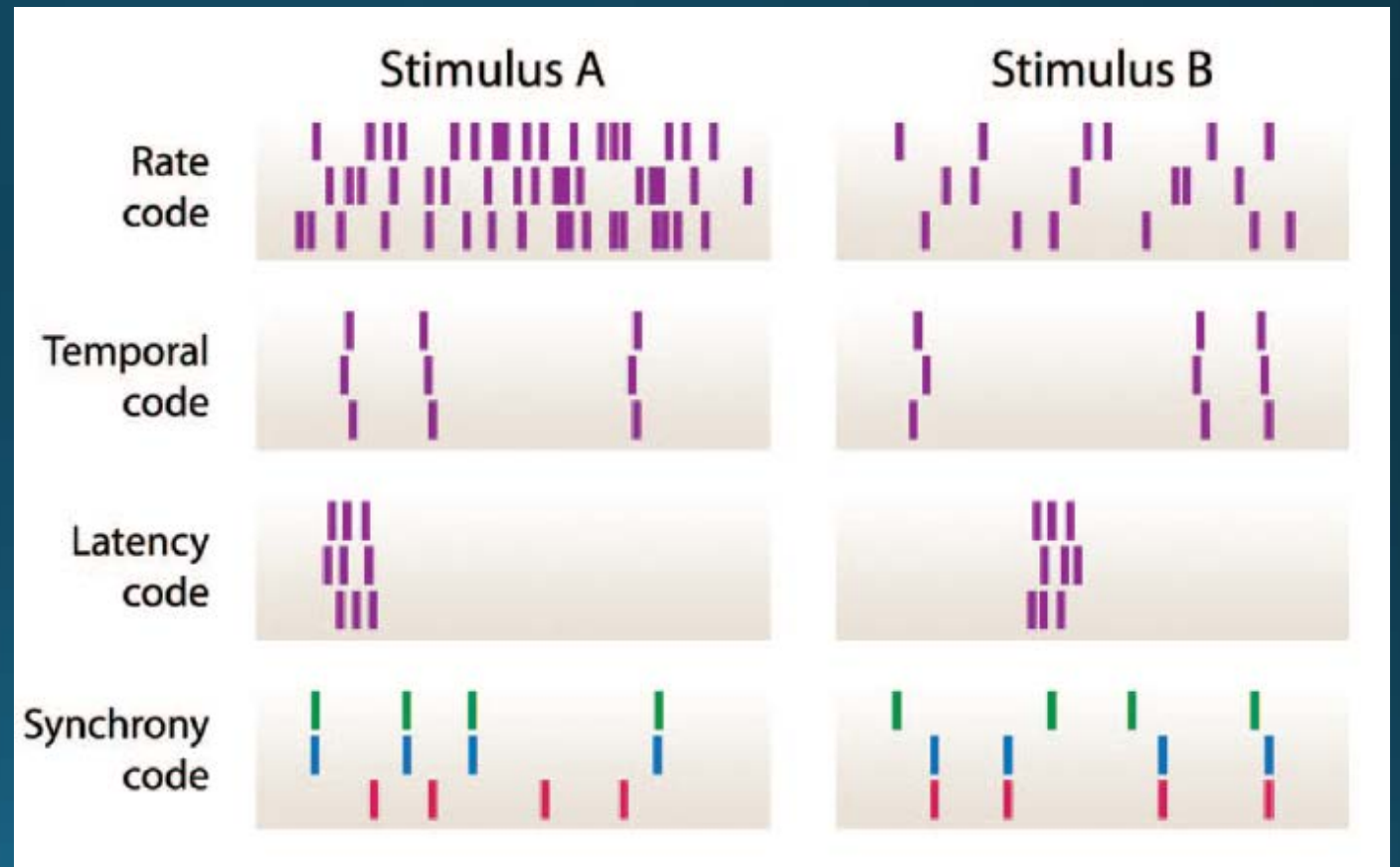


- aktivita neuronu = časová sekvence akčních potenciálů neuronu
- černé vertikální markery odpovídají jednotlivým akčním potenciálům



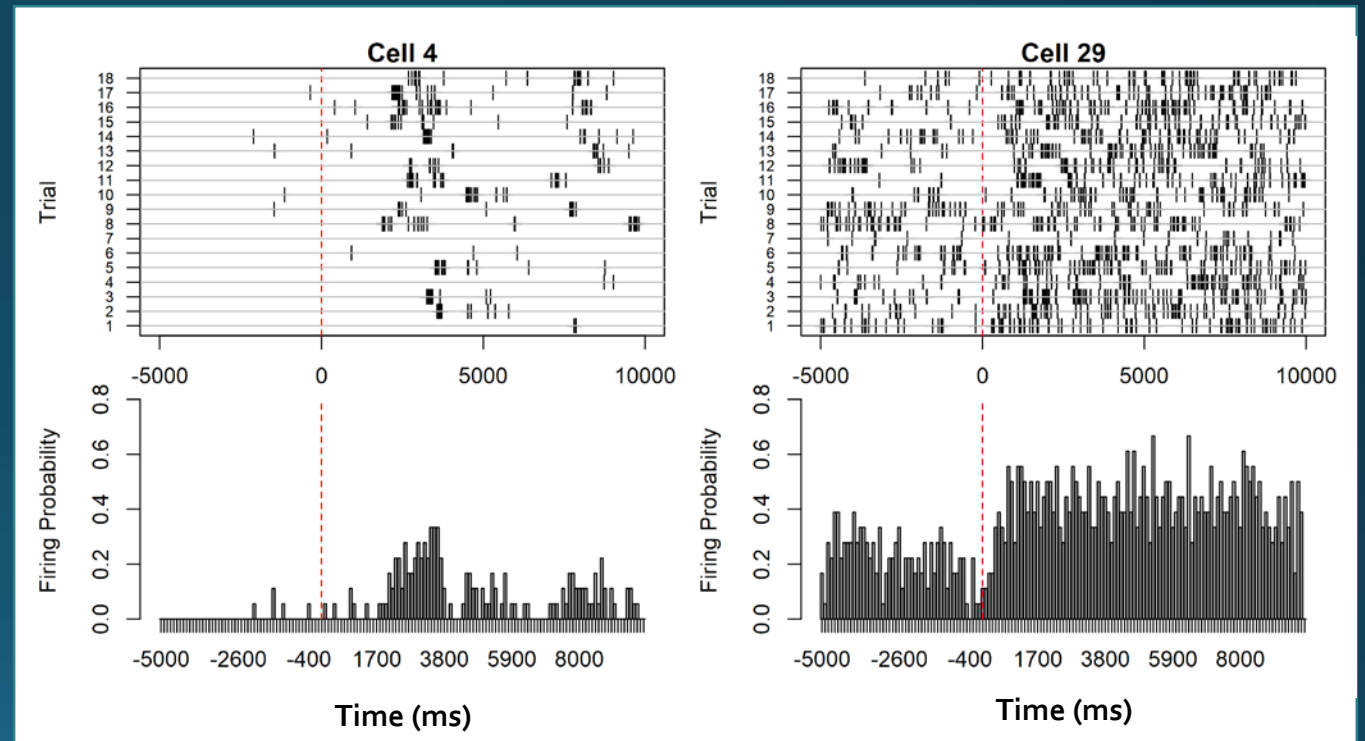
# Neurální kód

- = soubor pravidel a syntaxe, které transformují elektrické impulsy vysílané neurony na vjemy, vzpomínky, znalosti, rozhodnutí a činy
- Frekvenční
- Časový
- Latenční
- Synchronní

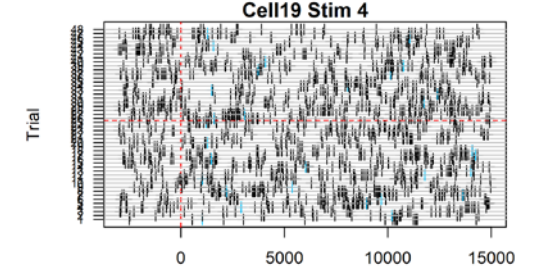
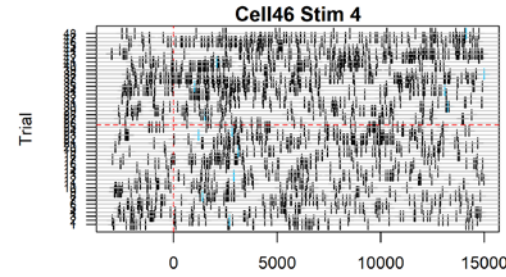
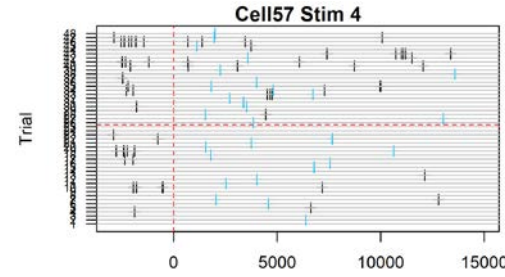
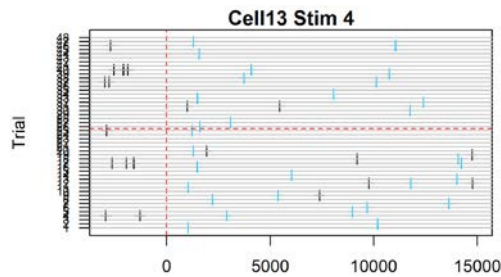
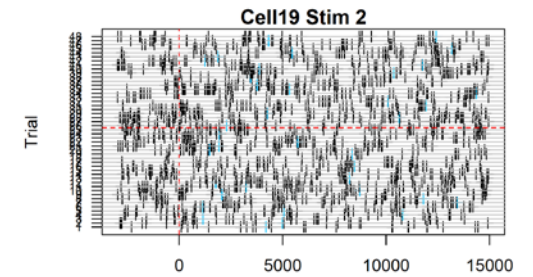
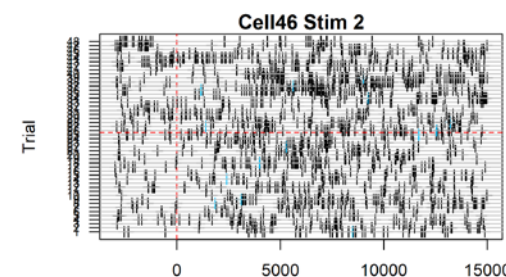
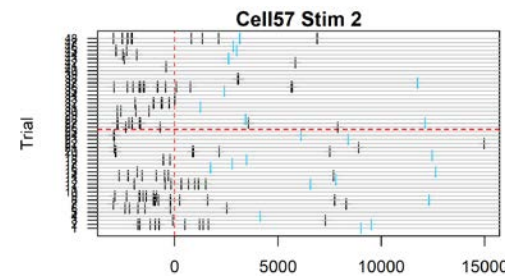
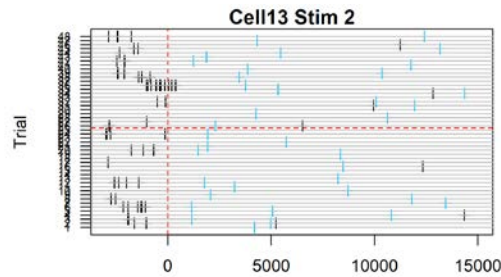
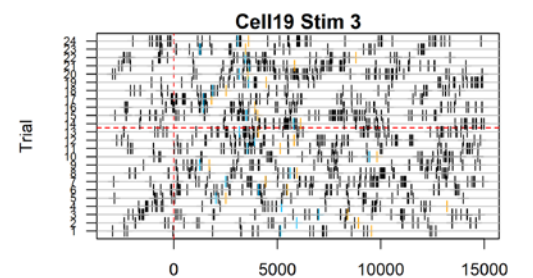
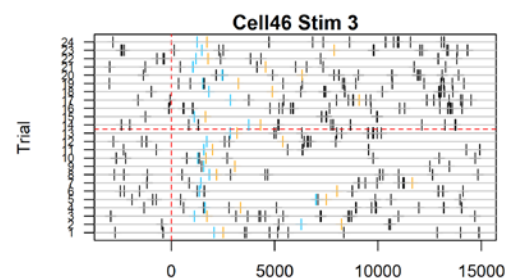
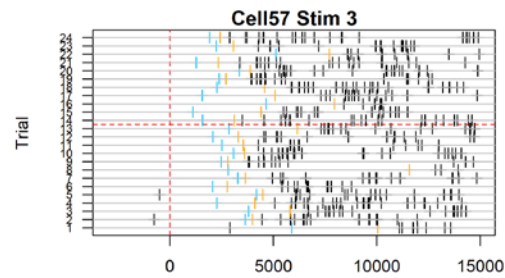
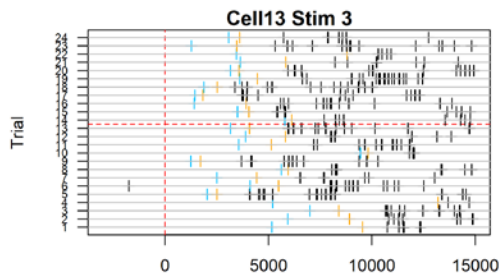
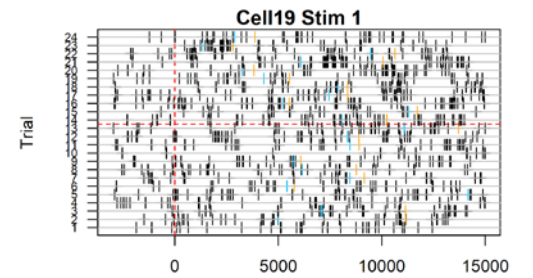
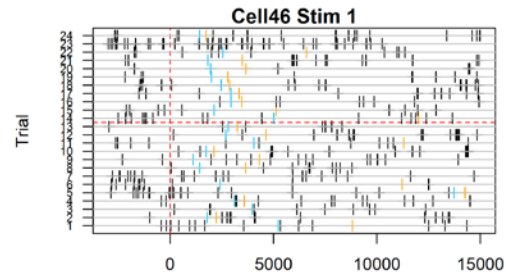
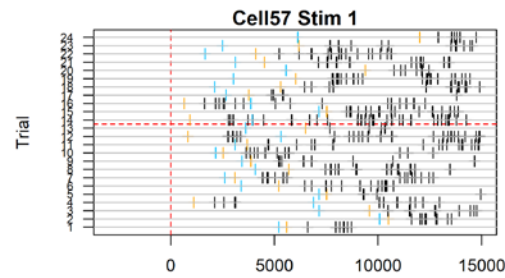
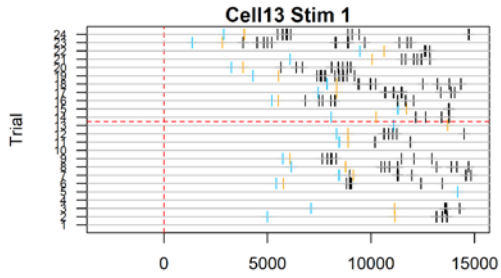
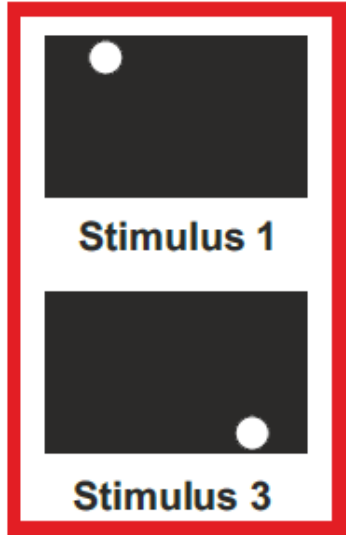


# Raster plot a histogram

- raster plot - umožňuje vizuálně prozkoumat variabilitu odpovědí mezi jednotlivými opakováními
- histogram - umožňuje zjistit jaké vlastnosti mají tyto odpovědi společně pomocí zprůměrování všech odpovědí
- peri-event = vztahující se ke konkrétní události (např. začátek prezentace stimulu)

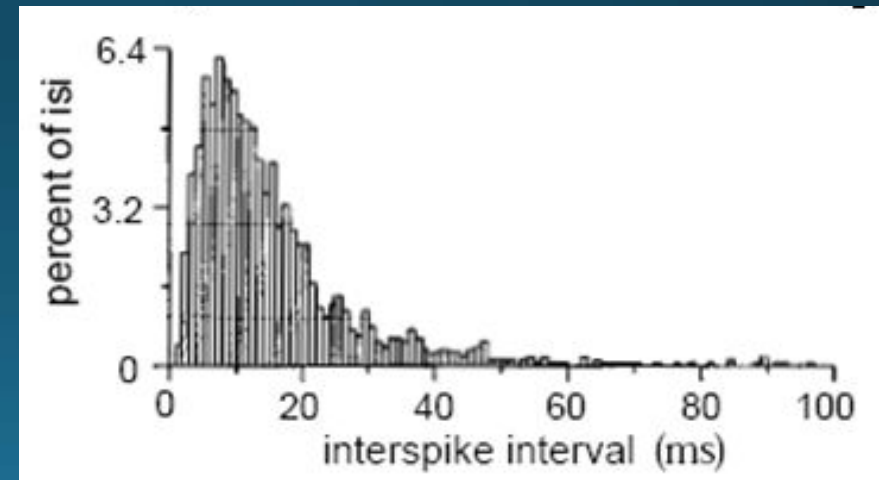
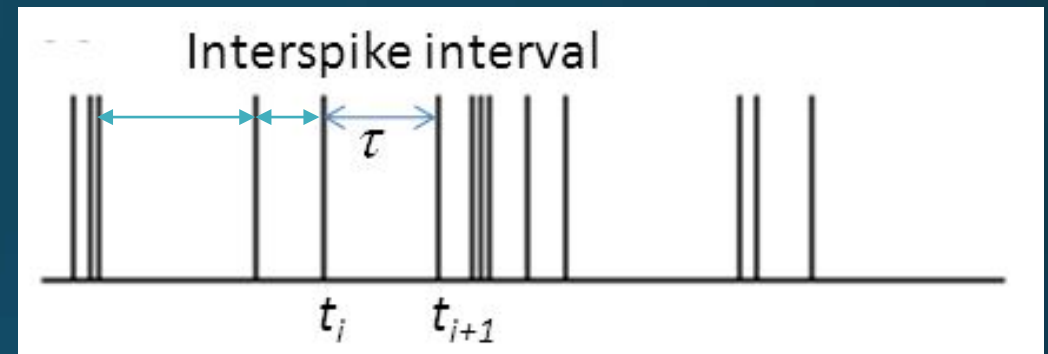


# Raster plots 4 neuronů během prezentace odlišných vizuálních stimulů



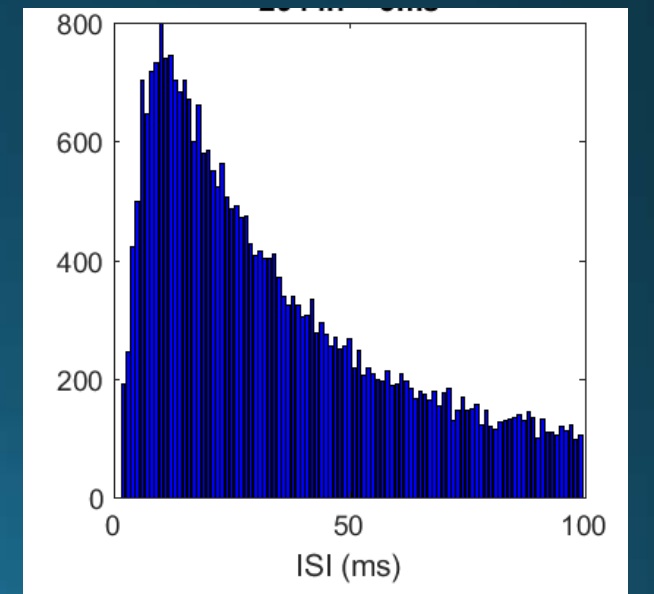
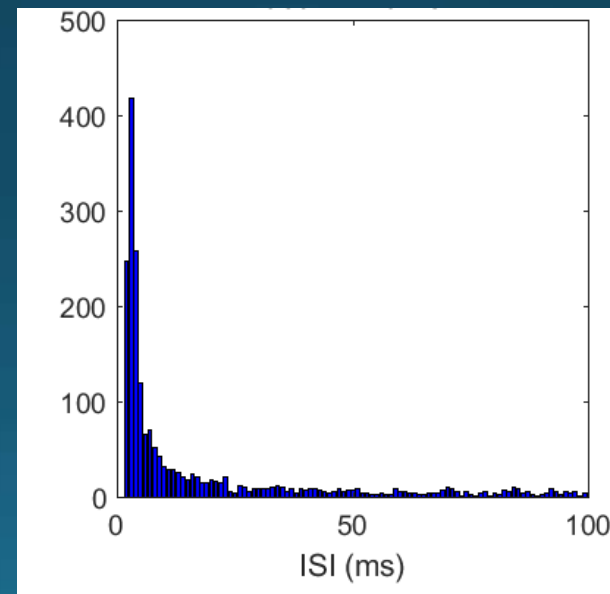
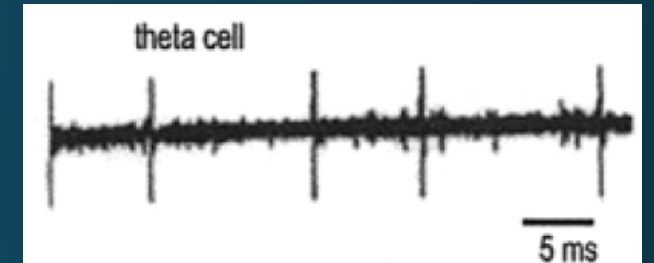
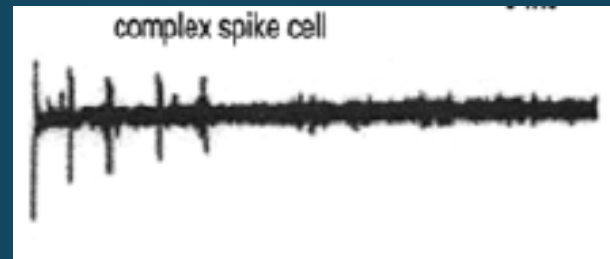
# Histogram intervalů mezi akčními potenciály (ISI)

- ISI (inter-spike interval) histogram = popisuje délku intervalů mezi následujícími akčními potenciály



# Histogram intervalů mezi akčními potenciály (ISI)

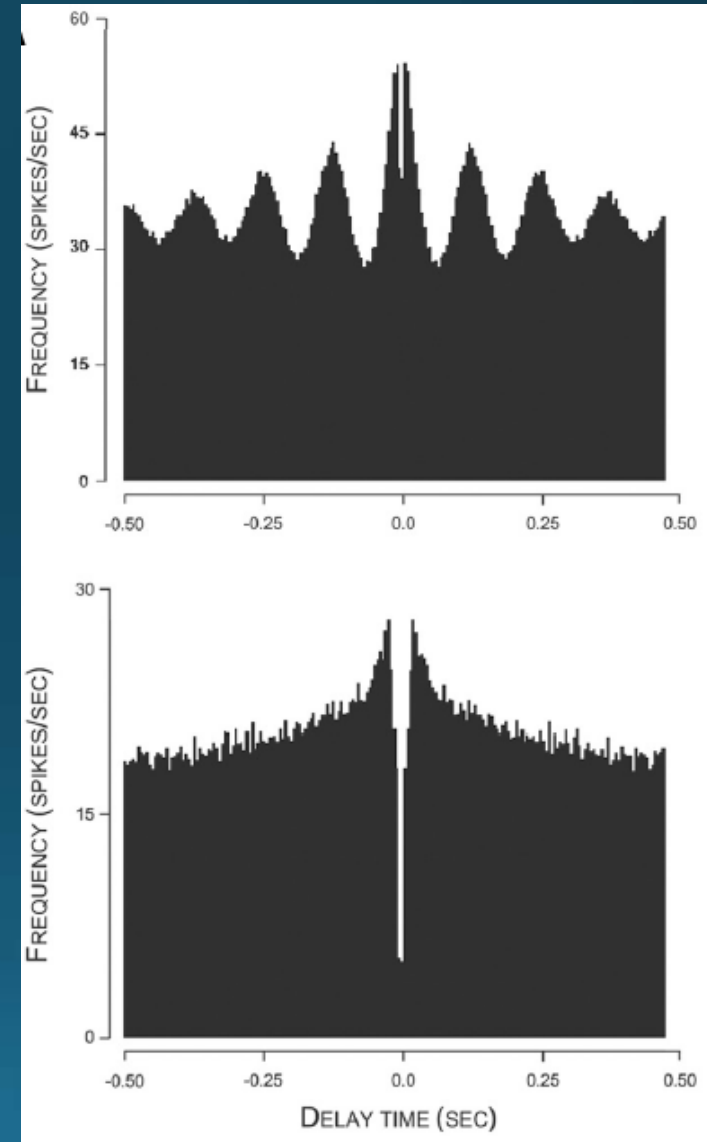
- pyramidové buňky – pálí ve shlucích (komplexní spiky), více akčních potenciálů v rozmezí několika ms
- interneurony – často vykazují rytmickou aktivitu (např. v hipokampu vzhledem k théta rytmu)
- klastrování – kontrola četnosti "akčních potenciálů" v refrakterní periodě





# Autokorelace

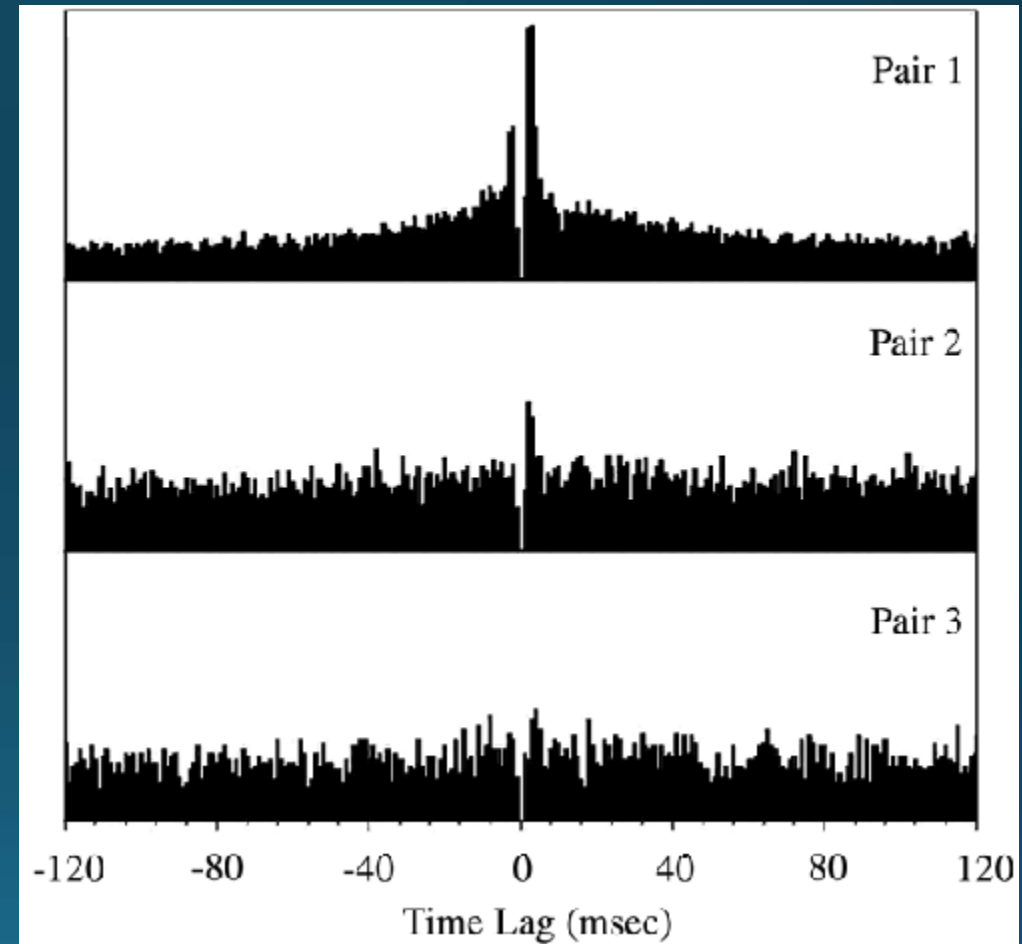
- rozložení intervalů mezi všemi akčními potenciály (nejenom těsně po sobě následujícími)
- ukazuje pravděpodobnost, že po akčním potenciálu bude neuron znovu aktivní v různých časových intervalech
- detekce vzorců v aktivitě neuronů (např. modulace théta rytmem)





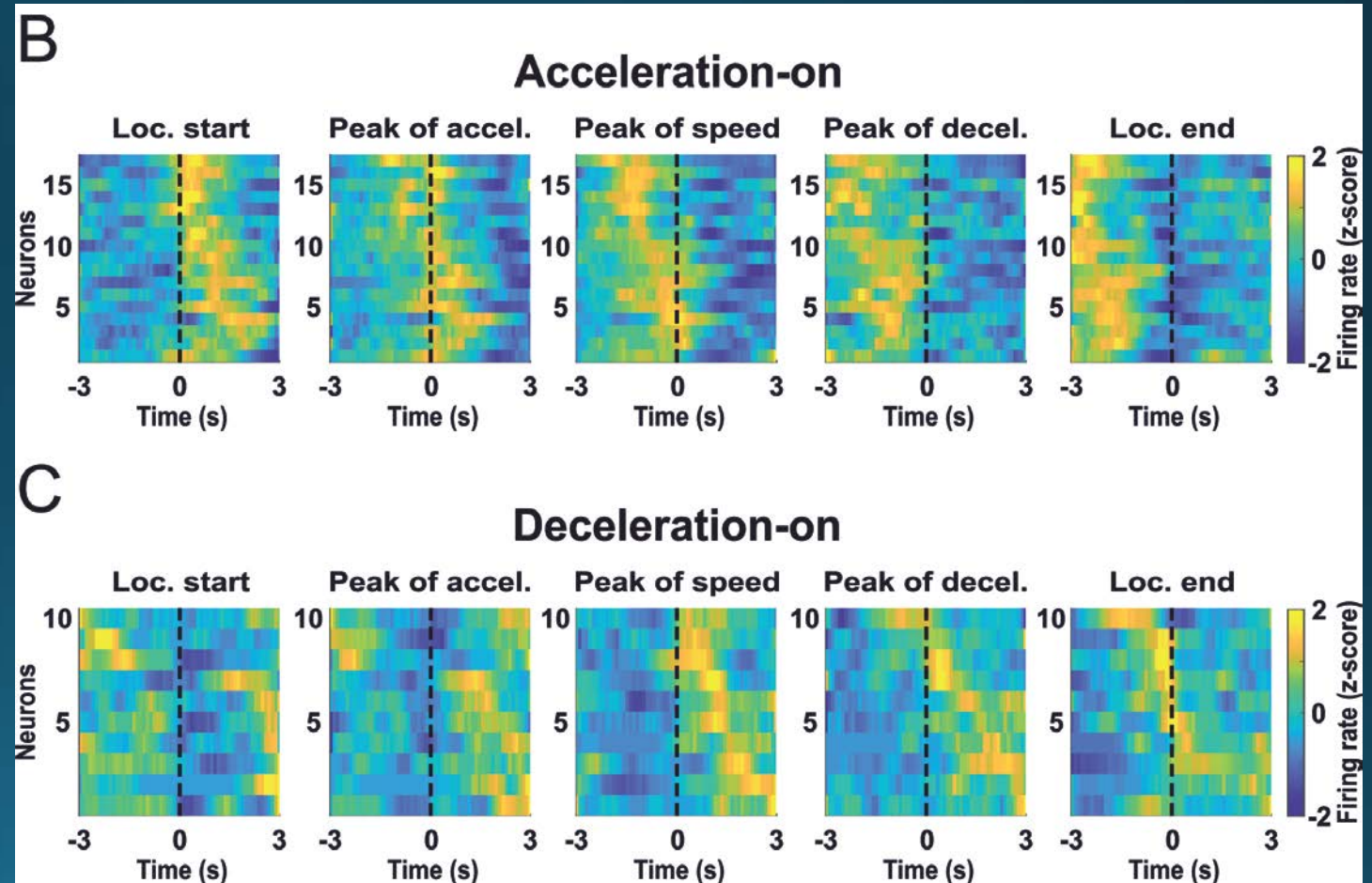
# Vzájemná korelace (cross-correlation)

- znázorňuje časový rozdíl mezi každým akčním potenciálem emitovaným neuronem 1 a každým akčním potenciálem emitovaným neuronem 2
- vyjadřuje, s jakou pravděpodobností pájí jeden neuron v různých časových intervalech po aktivaci druhého neuronu
- peak v čase 0 – synchronní aktivita



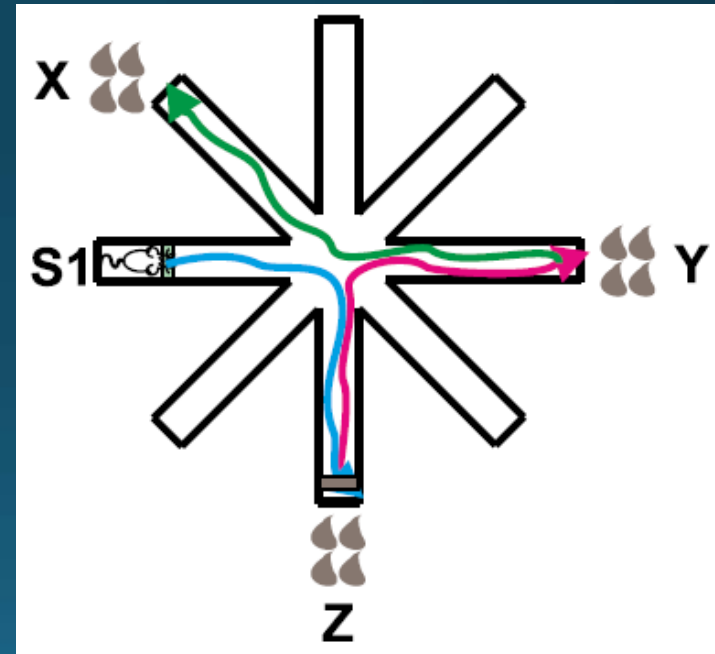
# Teplotní mapy (heatmaps)

- grafické zobrazení dat, ve kterém je každá hodnota reprezentována barvou určitého spojitého barevného spektra
- z-skóre = počet standardních odchylek, o které je hodnota hrubého skóre (tj. pozorovaná hodnota) nad nebo pod střední hodnotou



# Modelování aktivity neuronů

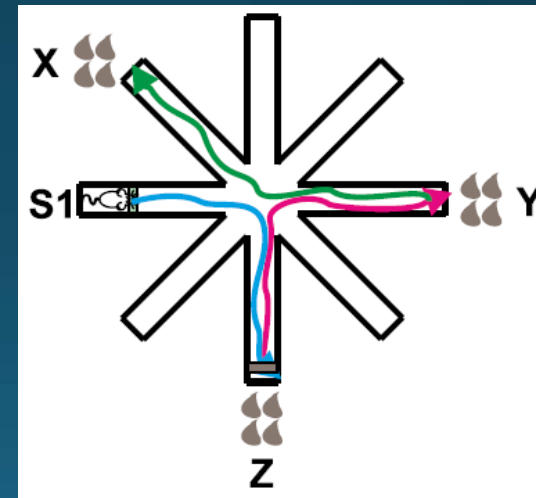
- vhodné zejména při komplexních úlohách – více proměnných, které mohou být reflektovány aktivitou neuronů



# Mnohonásobná lineární regrese

- (1) vysvětlit rozptyl v závisle proměnné Y (aktivita neuronu). K tomu slouží statistika  $R^2$  (vysvětlená variance).
- (2) odhadnout (vypočítat) vliv každé z nezávisle proměnných X na proměnnou závislou. Sílu tohoto vlivu sdělují nestandardizované regresní koeficienty  $\beta$ . Vliv každé nezávisle proměnné je odhadován tak, že je kontrolováno působení ostatních nezávisle proměnných, které vstupují do modelu. Mnohonásobná regrese prostřednictvím standardizovaných regresních koeficientů (beta) také pomáhá určit relativní sílu vlivu jednotlivých proměnných na proměnnou závislou – my tak zjistíme, které proměnné mají na rozptyl závisle proměnné největší vliv a které mají naopak vliv nejmenší.
- (3) s pomocí sestavené regresní rovnice predikovat pro jednotlivé případy hodnoty závisle proměnné.

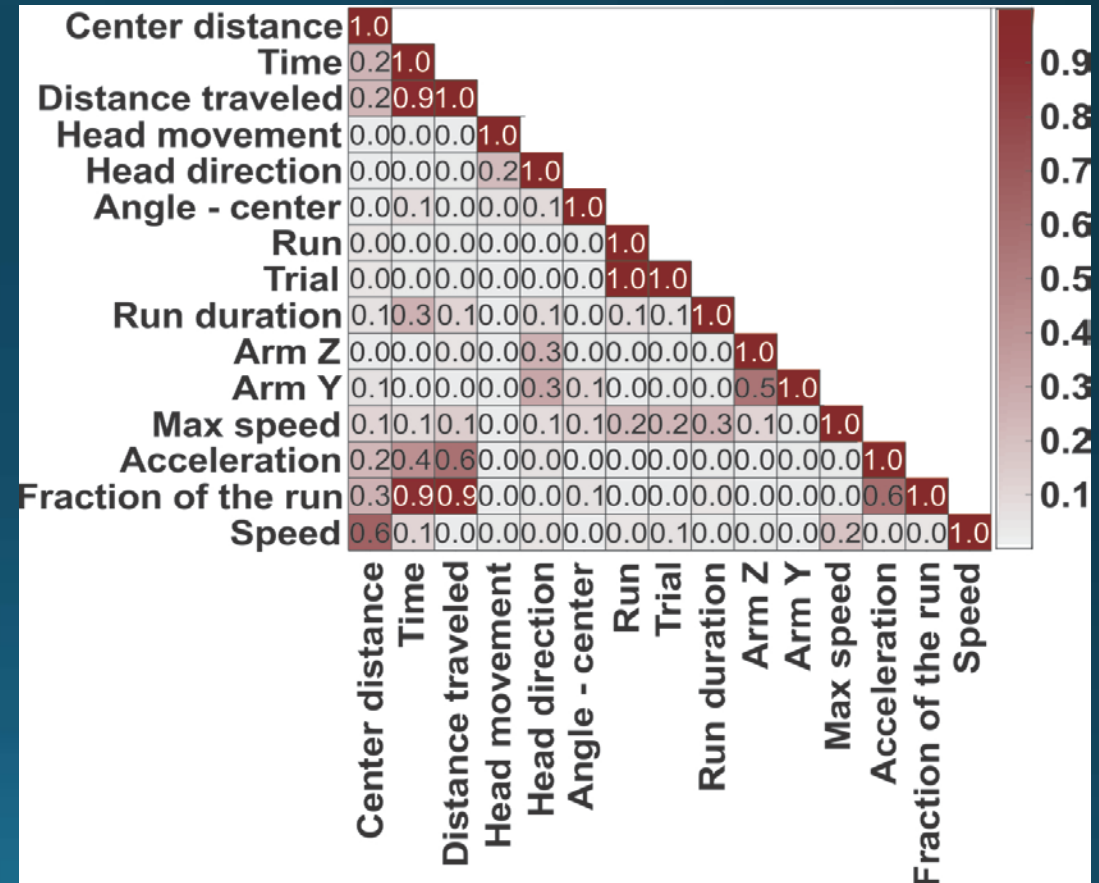
$$Y(t) = \beta_0 + \beta_1 X_1(t) + \beta_2 X_2(t) + \dots + \beta_n X_n(t) + \varepsilon$$



Center distance  
Time  
Distance traveled  
Head movement  
Head direction  
Angle - center  
Run  
Trial  
Run duration  
Arm Z  
Arm Y  
Max speed  
Acceleration  
Fraction of the run  
Speed

# Mnohonásobná lineární regrese

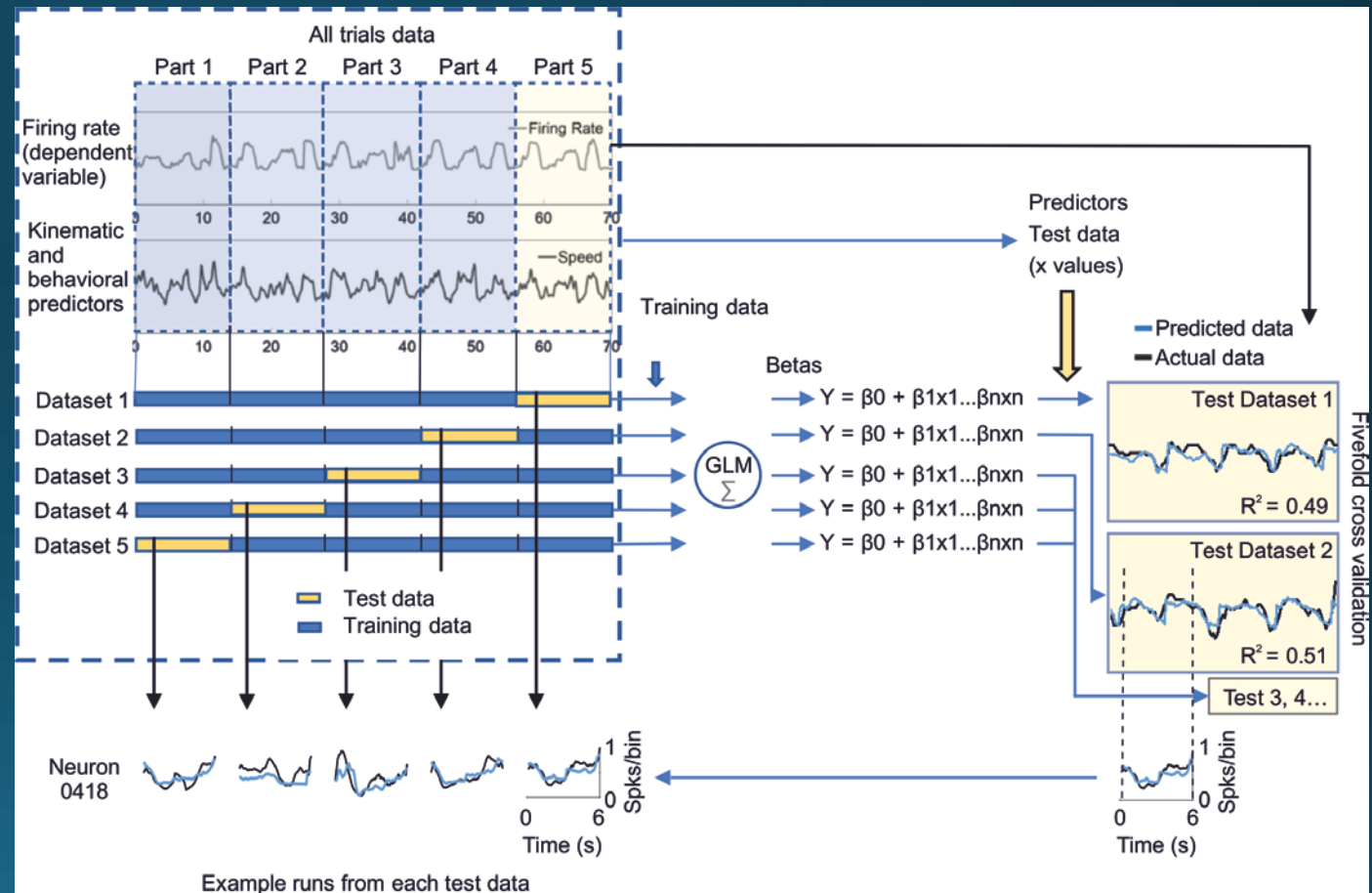
- Pokud mají některé z proměnných vysokou vzájemnou korelaci s jinou proměnnou, jednu z nich z modelu vyloučíme. Případně připravíme více variant modelu, které následně porovnáme.





# Pětinasobné křížové ověření

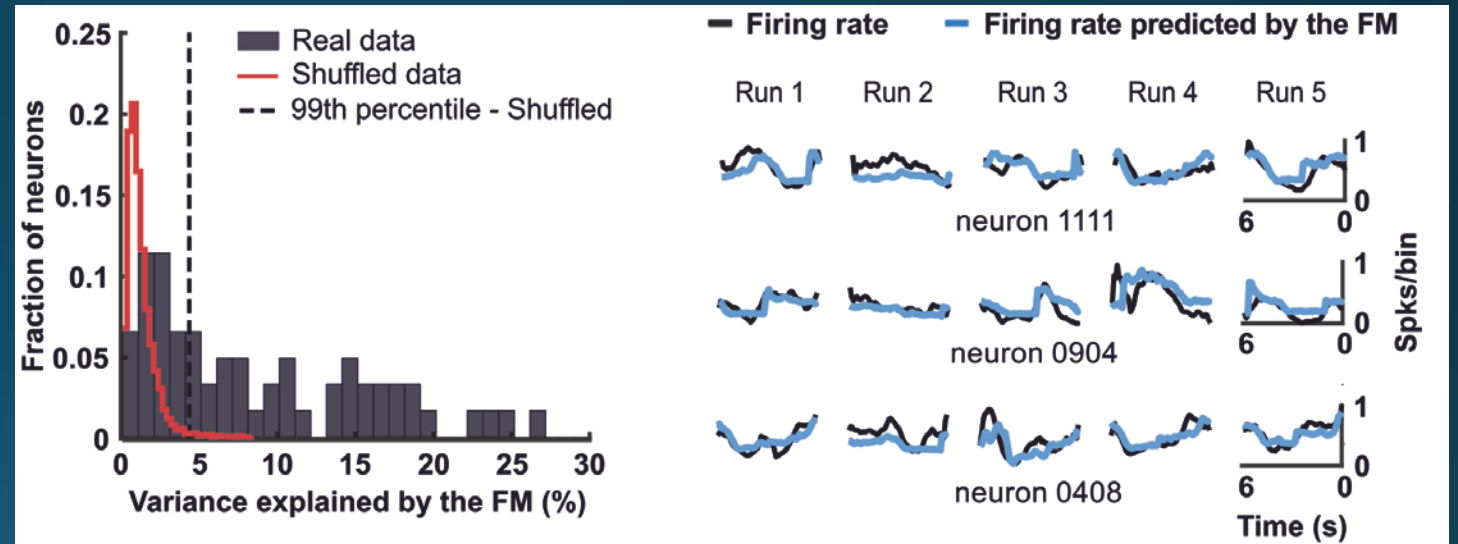
- Model byl trénován a testován pětkrát se 4/5 celkových dat a schopnost modelu předpovídat zbývající 1/5 dat byla hodnocena korelací předpovězených dat se skutečnými daty.
- Průměr hodnot  $R^2$  získaných z pěti korelací ( $R^2$ -průměr) byl považován za průměrný zlomek rozptylu vysvětlený úplným modelem.





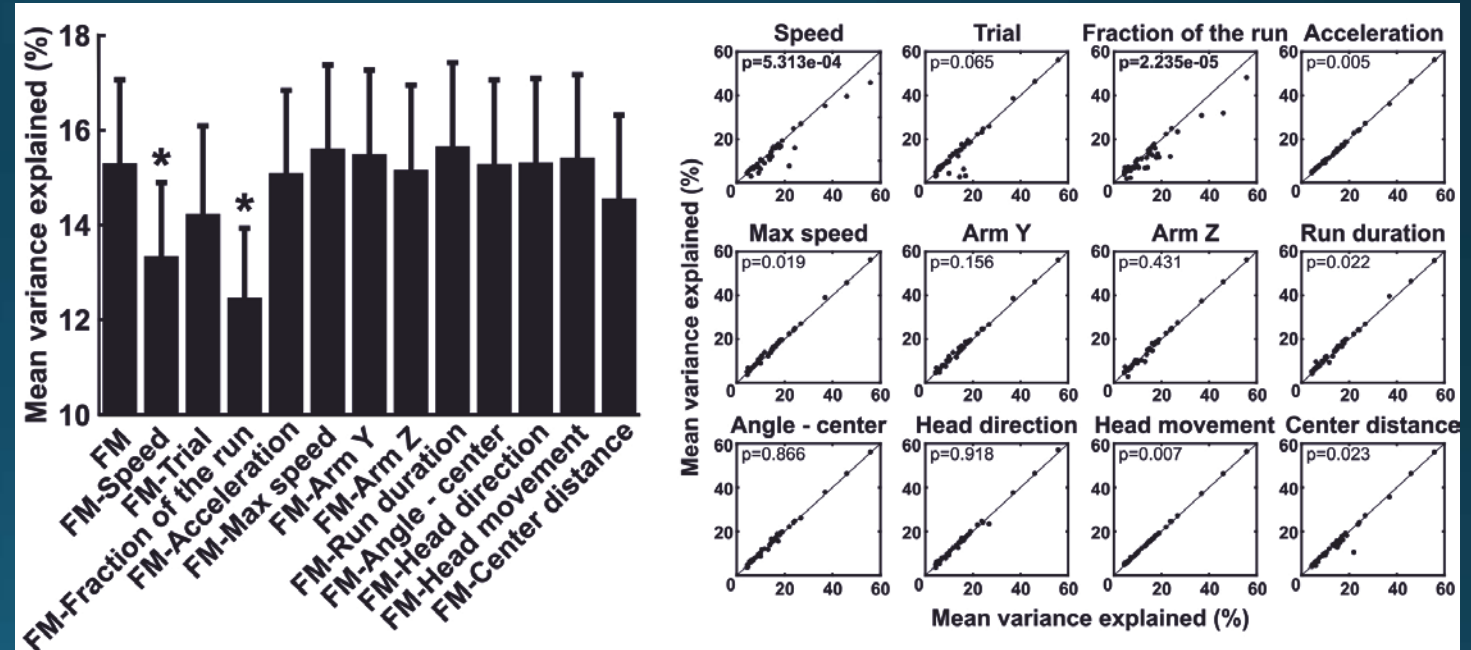
# Porovnání s promíchanými daty

- Signifikance modelu byla vyhodnocena srovnáním získaného  $R^2$ -průměru s distribucí  $R^2$ -průměru hodnot generovaných modely trénovanými s promíchanými neuronovými daty (bootstrapping).
- Neurony, pro které model vysvětlil skutečná data lépe než 99. percentil zamíchaných modelů, byly klasifikovány jako ty, u kterých je jejich aktivita signifikantně vysvětlena modelem.



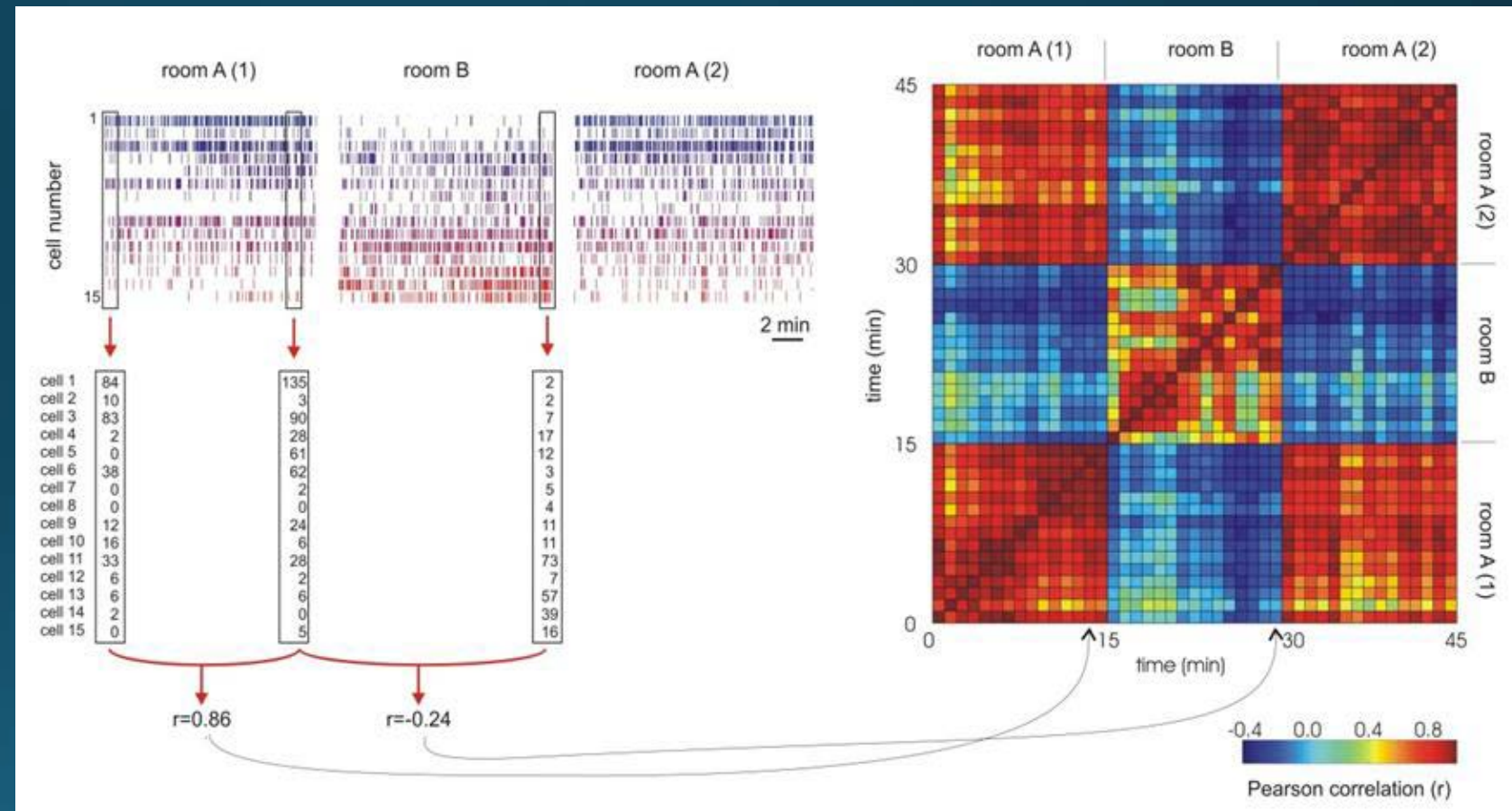
# Efekt jednotlivých proměnných

- Pro výpočet příspěvku každé z proměnných v úplném modelu (full model, FM) byl úplný model porovnán s úplným modelem bez vybrané proměnné (FM – var).

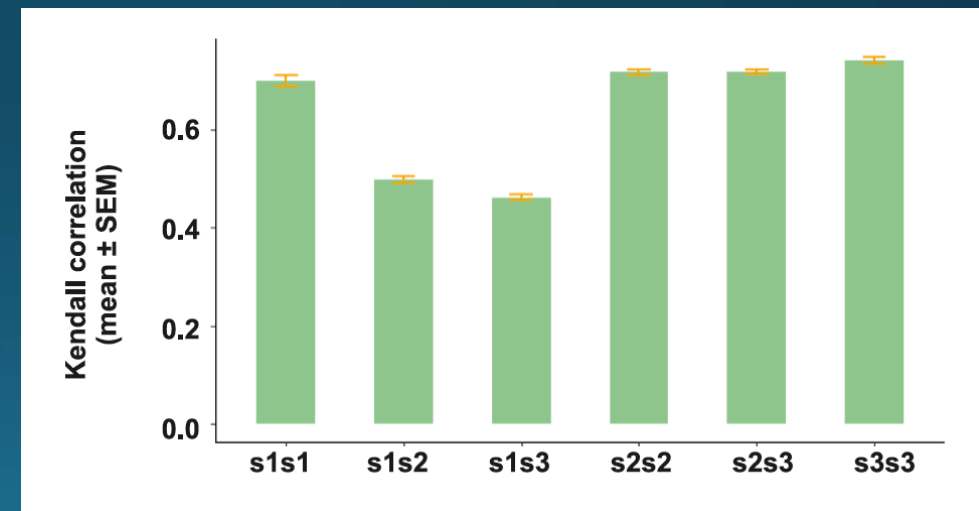
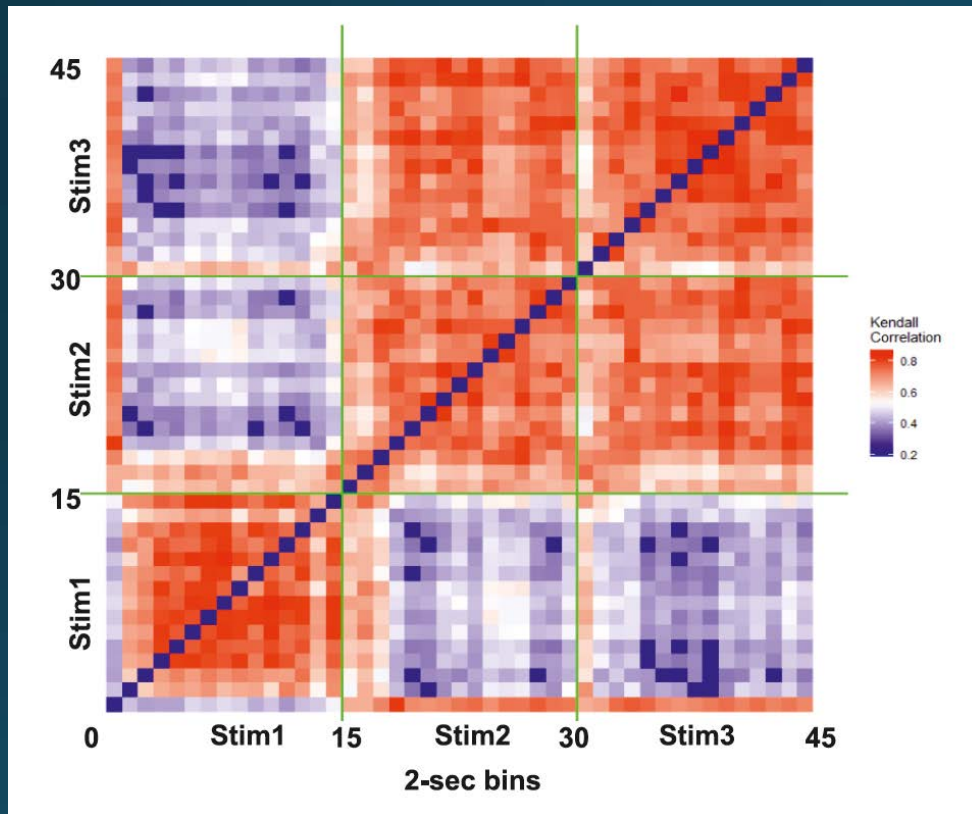


# Populační vektory a korelační matice

- vektor aktivity – znázorňuje aktivitu každého neuronu během daného intervalu
- korelační matice – znázorňuje korelace mezi všemi páry časových intervalů



# Korelační matice zobracující dynamické změny aktivity populace neuronů



# Buňky místa (place cells)

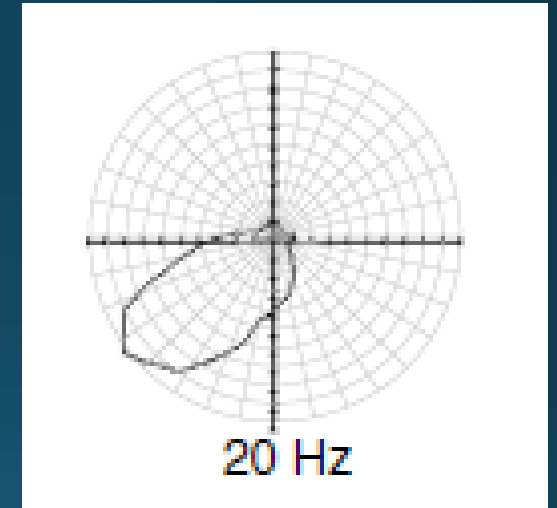
- lokačně-specifická aktivita
- konkrétní buňka místa je intenzivně aktivní pouze tehdy, když je hlava potkana v určité části prostředí, která se nazývá aktivní pole buňky nebo pole místa





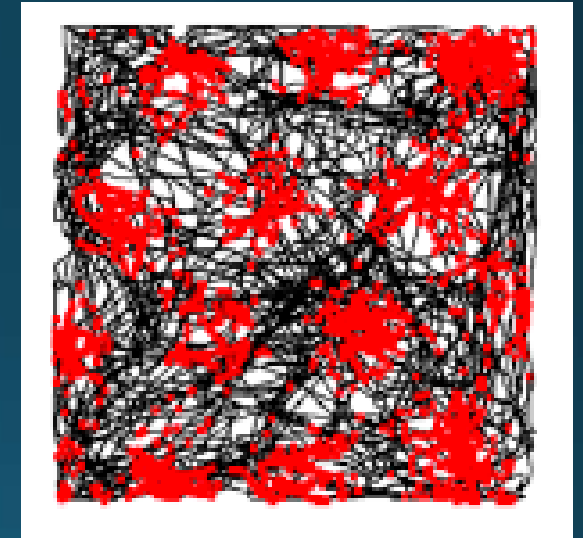
# Buňky směru hlavy

- silně aktivní pouze tehdy, když je hlava potkana namířená určitým směrem
- aktivita buněk směru hlavy není ovlivněna polohou zvířete v prostředí



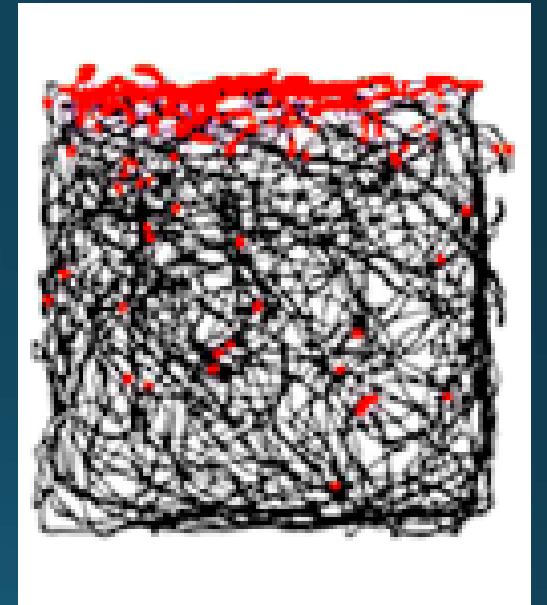
# Buňky mřížky (grid cells)

- buňky mřížky mají několik kruhových aktivních polí, která pokrývají podlahu prostředí v šestiúhelníkovém tvaru mřížky
- jednotlivá palebná pole jsou rozmístěna s konstantními rozestupy
- vnitřní systém měření vzdálenosti -> mohou zprostředkovat metrické informace pro buňky místa a umožnit jim umístit svá aktivní pole přesněji v prostoru

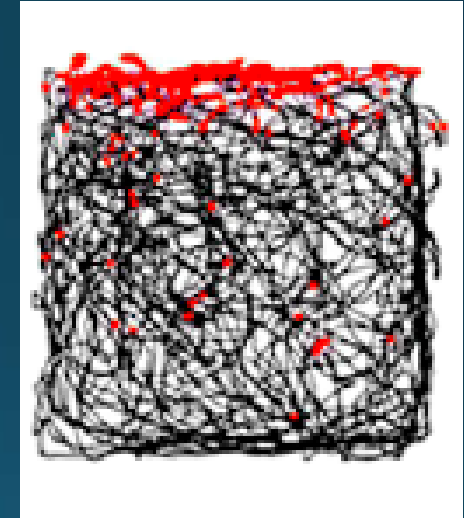
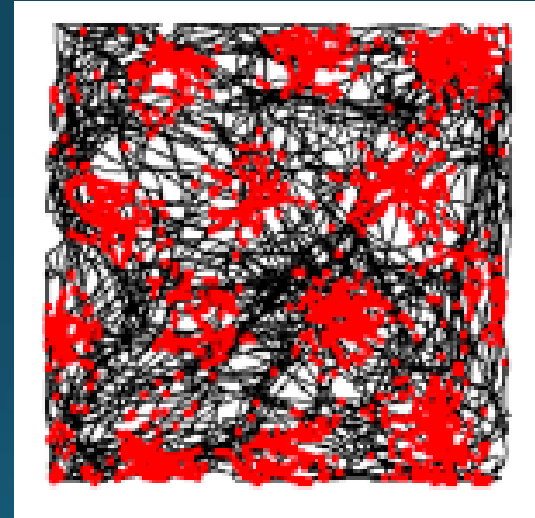
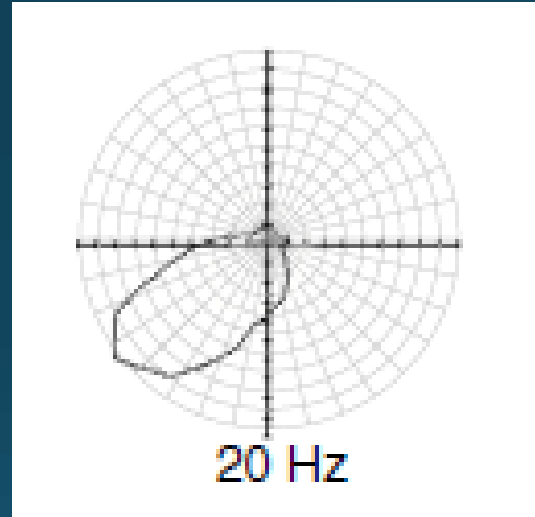
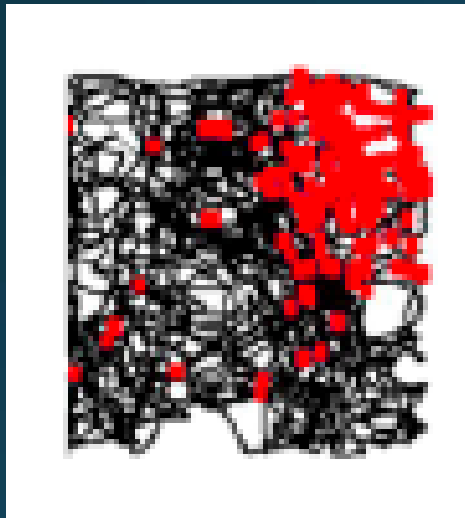


# Buňky hranic (border cells)

- aktivní podél stěn v uzavřeném prostředí



# Vnitřní GPS mozku



# Nobelova cena za fyziologii a lékařství 2014



• John O'Keefe



May-Britt Moser



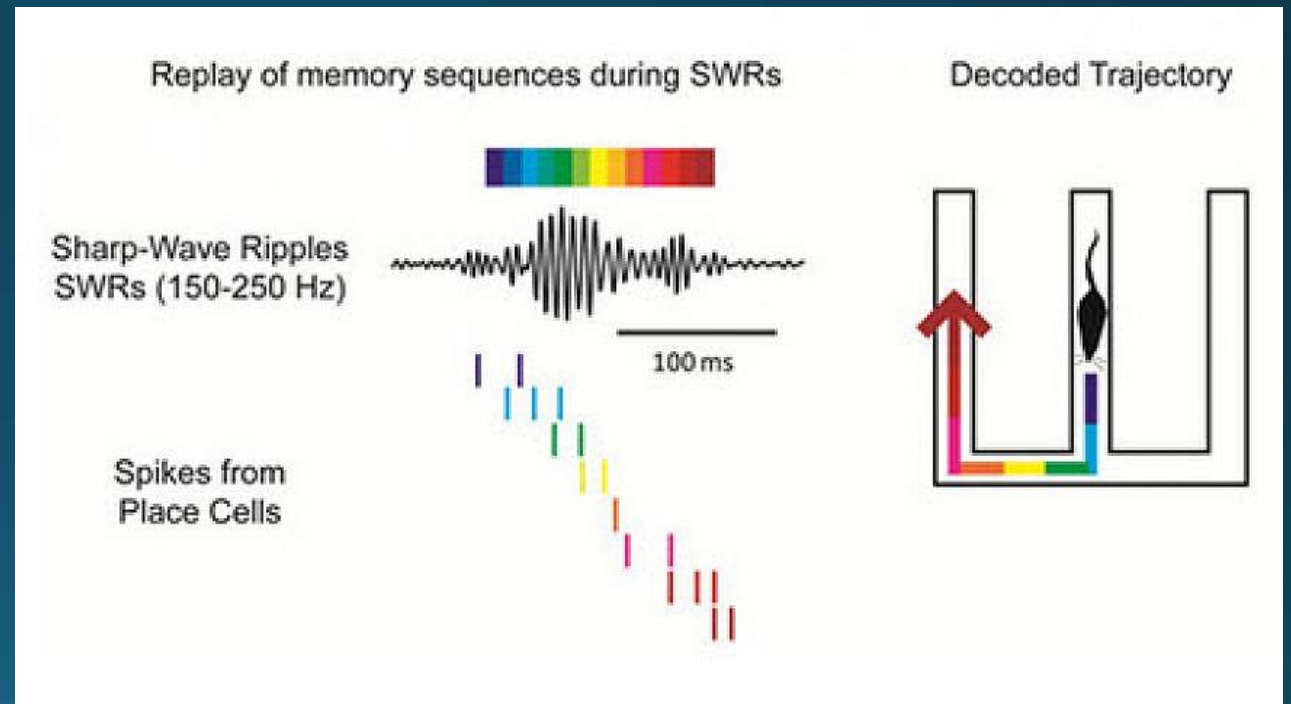
Edvard I. Moser

- *"for their discoveries of cells that constitute a positioning system in the brain"*



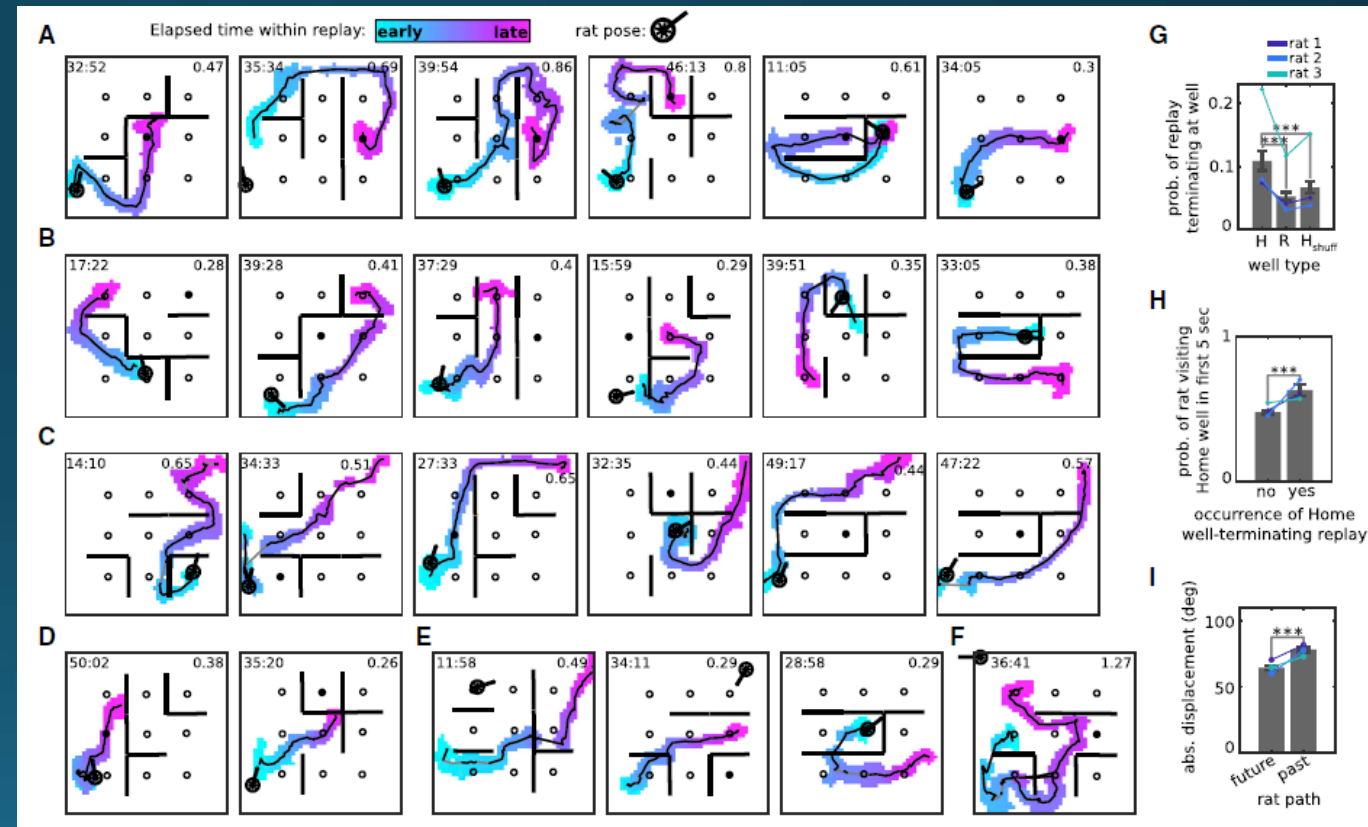
# Přehrání aktivity (replay)

- opakovaný výskyt sekvence aktivací buněk, ke kterým také došlo během aktivity, ale v mnohem rychlejším časovém měřítku
- přehrání trajektorie - buňky místa jsou aktivovány jako v reakci na stejnou prostorovou cestu
- přehrání během SWRs
- během spánku nebo bdělého odpočinku
- role v konzolidaci paměti



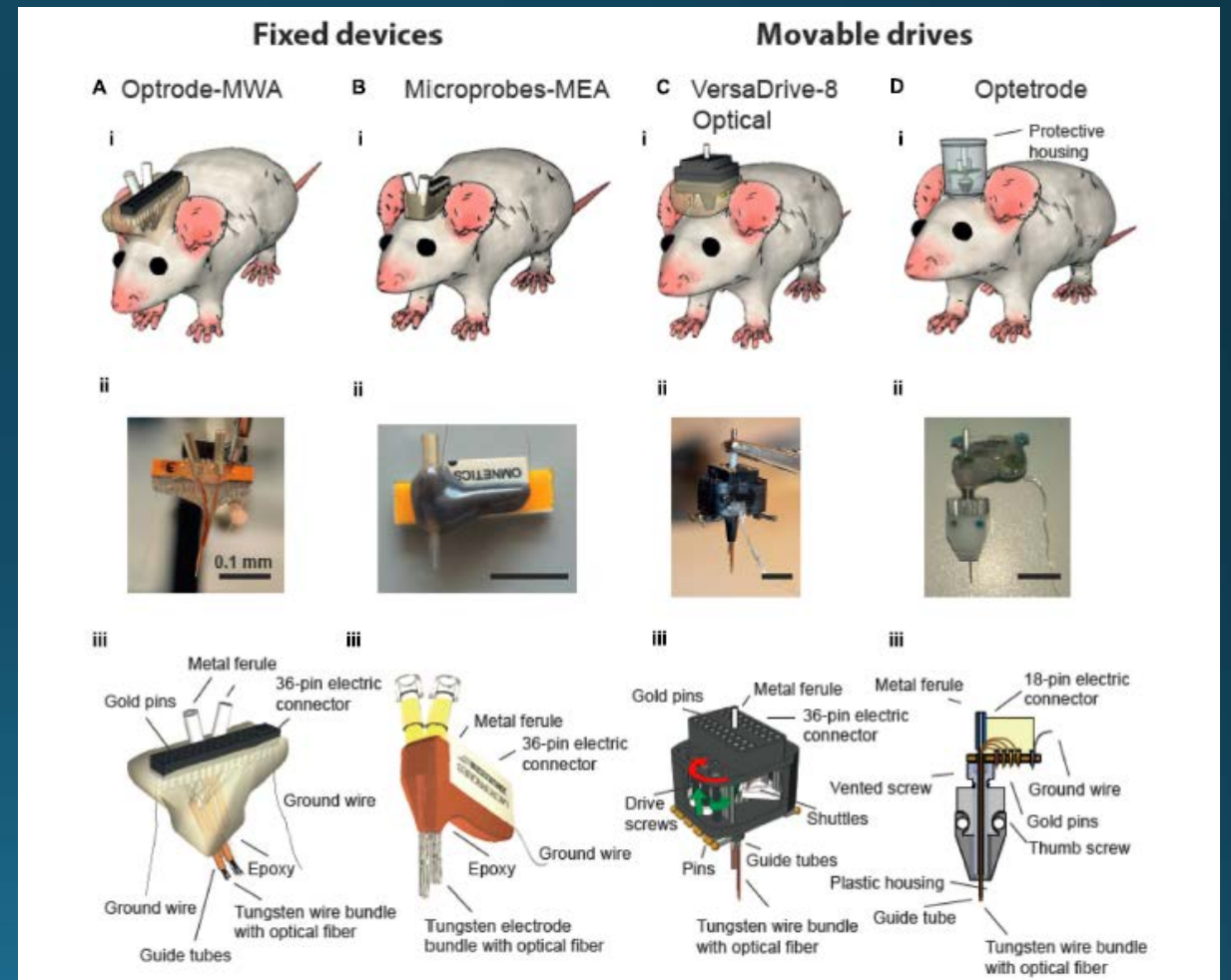
# Přehrání aktivity může predikovat okamžité budoucí chování

- dekódování trajektorie založené na sekvenci buněk místa, které byly aktivní během přehrávání
- pravděpodobnost, že potkan navštíví konkrétní místo, byla vyšší, pokud cestě předcházelo přehrání aktivity končící v tomto místě



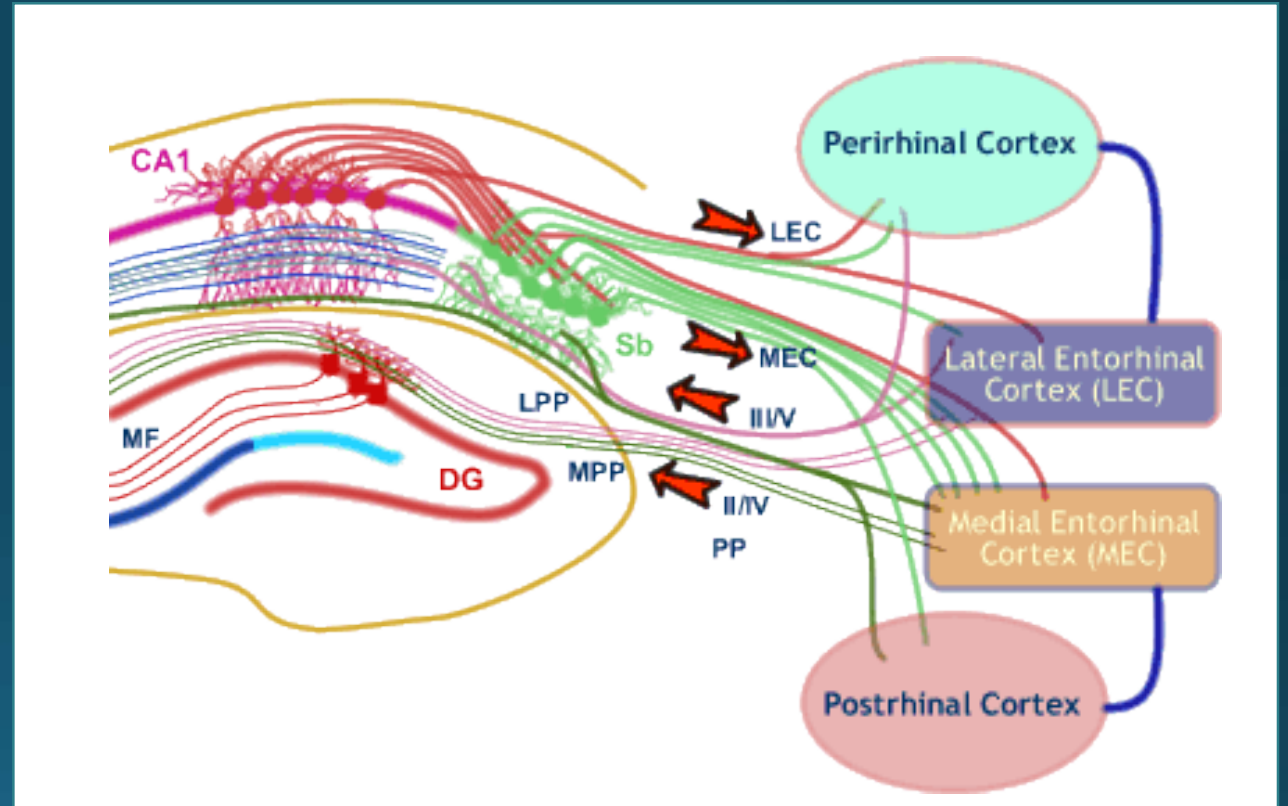
# Elektrofyzologie a optogenetika

- manipulace se specifickými neurony v místě nahrávání (např. inhibice interneuronů a zkoumání tohoto efektu na aktivitu pyramidových buněk či na LFP)



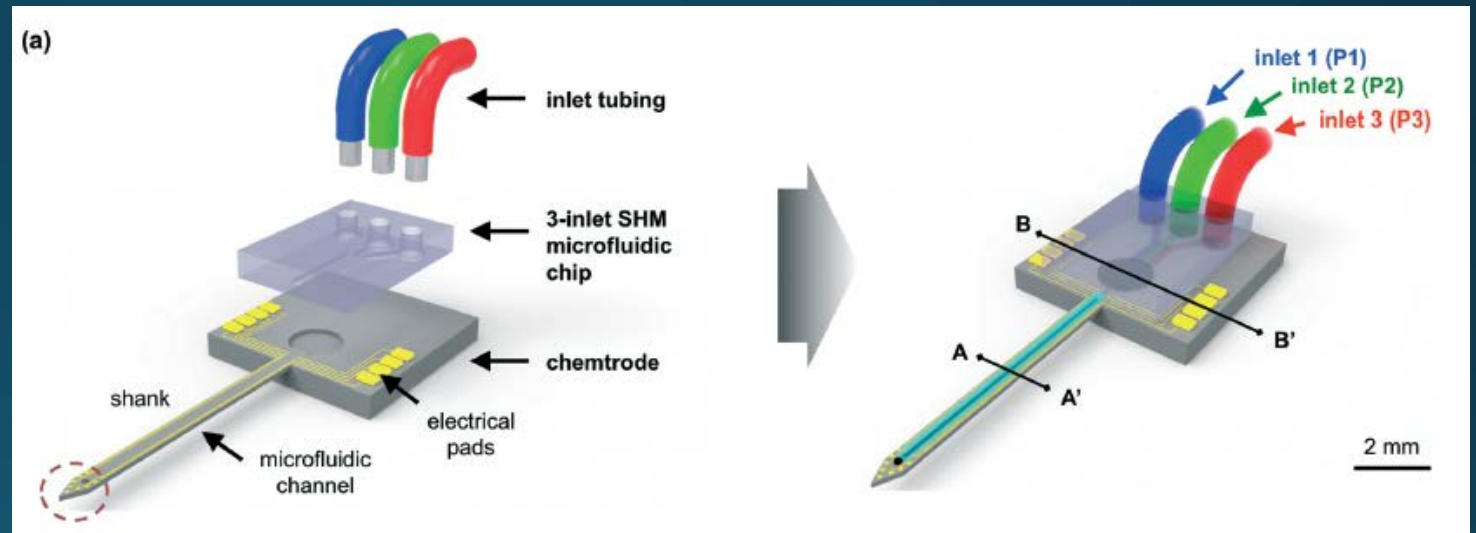
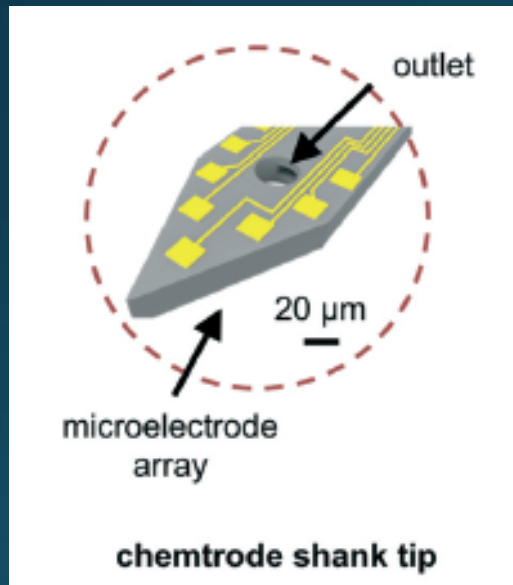
# Elektrofyzologie a optogenetika

- manipulace s neurony v jedné struktuře a nahrávání v jiné struktuře (např. inhibice projekcí z konkrétního vstupu a zkoumání tohoto efektu na aktivitu buněk v cílové struktuře)



# Elektrofyzilogie a lokální farmakologie

- lokální administrace farmaka přímo do místa nahrávání





# Děkuji za pozornost!

