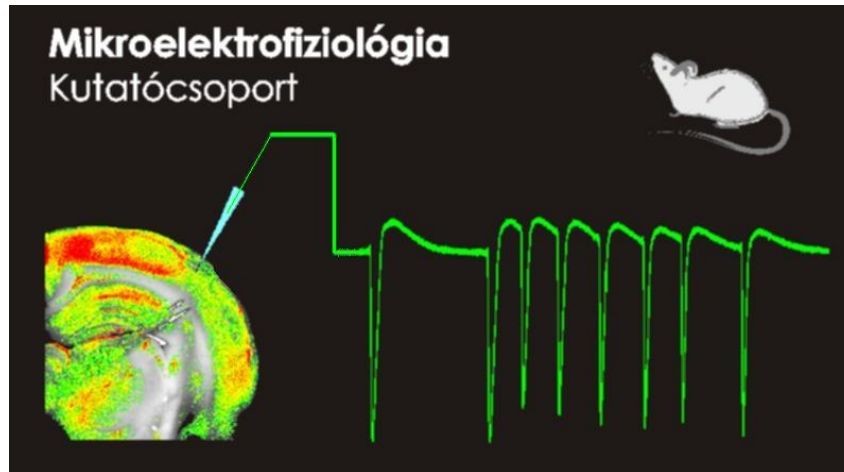


# *Ex vivo* elektrofiziológia

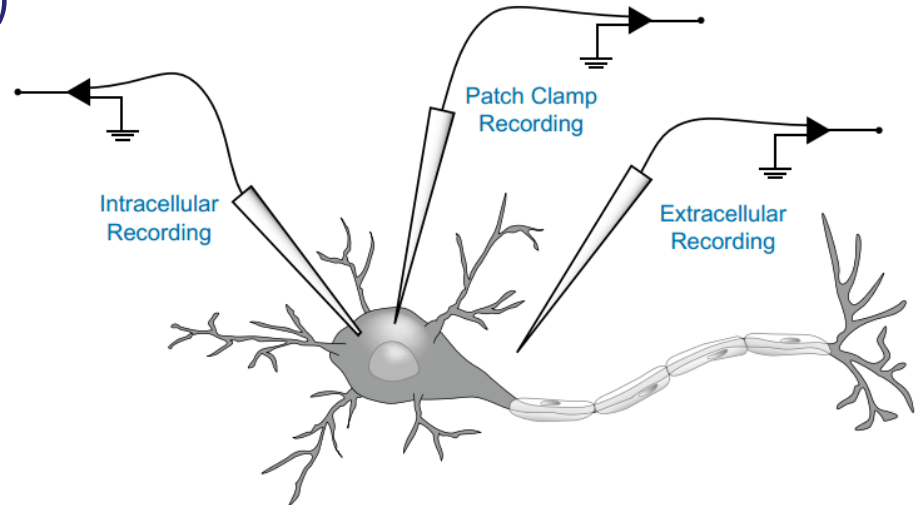


# Bevezetés

Def.: Élő sejtek vagy szövetek elektromos tulajdonságainak vizsgálata kontrollált körülmények között

Módszerei:

- **Klasszikus elektrofiziológia**
  - Intracelluláris technikák (voltage clamp, current clamp, éles elektród)
  - Extracelluláris technikák (single unit, multi unit, mezőpotenciál)
  - Patch clamp
- **Optikai jelek vizsgálata**
  - Feszültségérzékeny festék
  - Belső optikai jelek detektálása (IOS = intrinsic optical signal)




# *In vitro – ex vivo - mérési technika*

## **Előnyei:**

- kontrollálhatóság
- kisebb változatosság a komponensek között
- stabilabb körülmények, pulzálás nincs
- jobb láthatóság

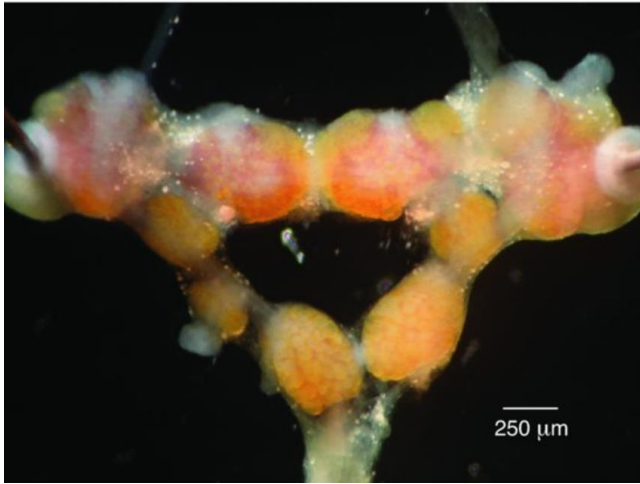
## **Hátrányai:**

- sértési felületek
  - bemeneti kapcsolatok megszűnése
  - nincs szétterjedő spontán aktivitás alapállapotban (görcskeltők)
- 

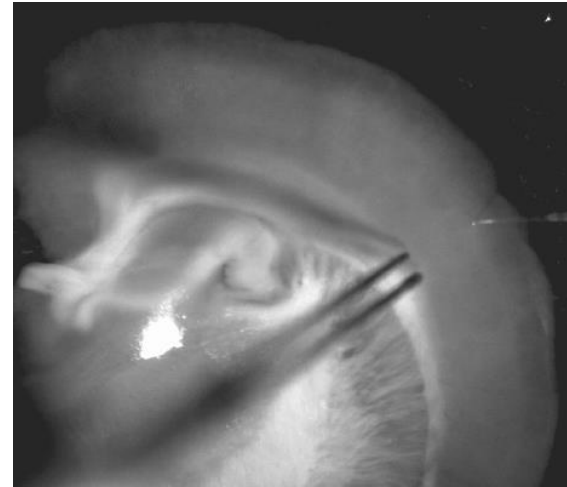
# *Ex vivo és in vitro preparátumok*

- **Izolált szelet**
  - Kimenet és bemenet sérül, de a belső struktúra ép.
- **Kombinált szelet**
  - Megőrzi egy specifikus kapcsolatrendszert (hippokampusz – entorhinális kéreg, talamusz – szomatoszenzoros kéreg)
- **Szelettenyészet**
  - Steril körülmények között hosszú ideig fenntartható
- **Sejttenyészet**
  - Immortalizált sejtvonalak
  - Primer: akut, krónikus
- **Oocyta**
  - Bármely struktúra RNS-e bevihető és expresszáltatható

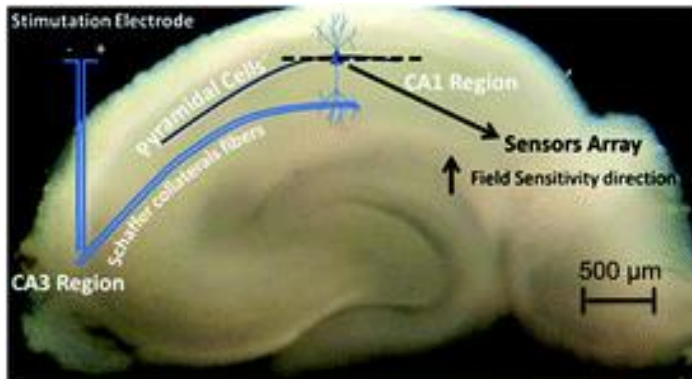
# Túlélő agyi preparátumok



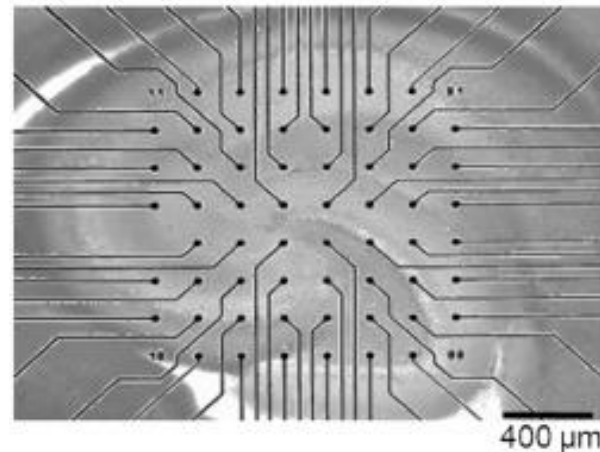
Csiga garatideggyűrű preparátum



Agykérgi koronális szelet



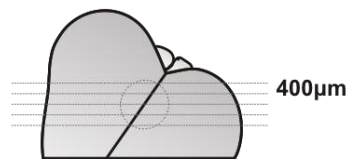
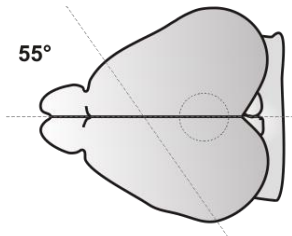
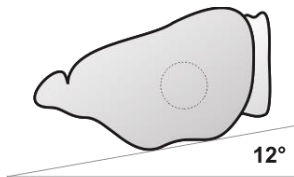
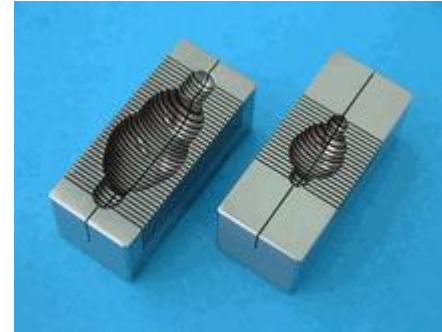
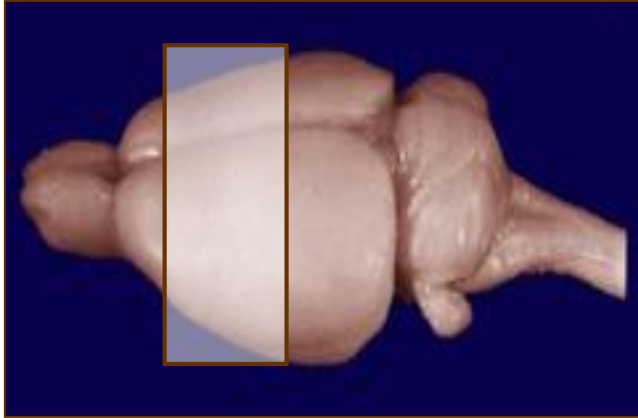
Hippokampális szelet preparátumok: mezőpotenciál elvezetés,



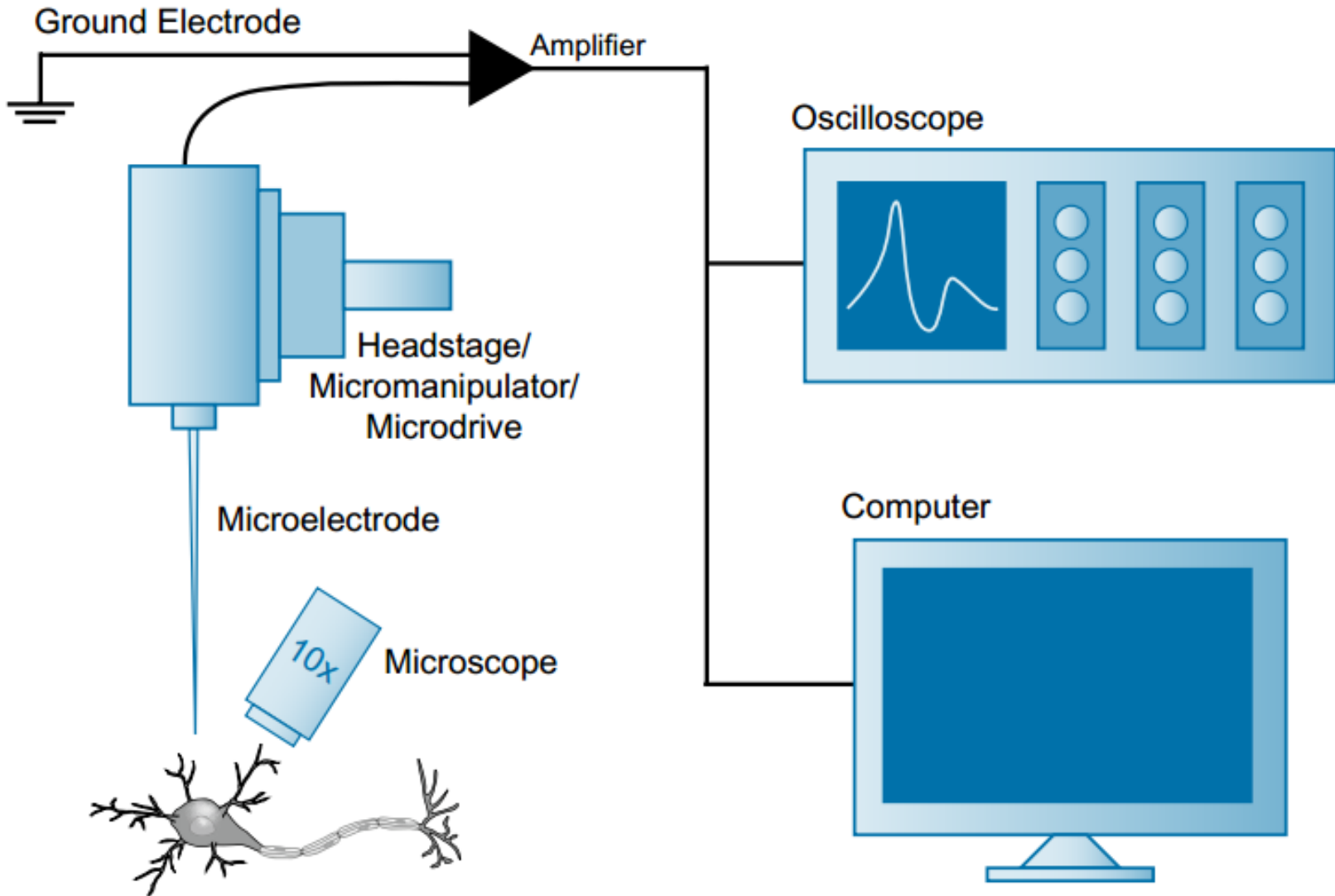
MEA elvezetés

# A preparátum elkészítése

Agykérgi koronális szelet készítésének lépései



# A mérőberendezés vázlatja



# Mérőberendezések



Rezgésmentes asztal, manipulátorok, perfúziós kamra,

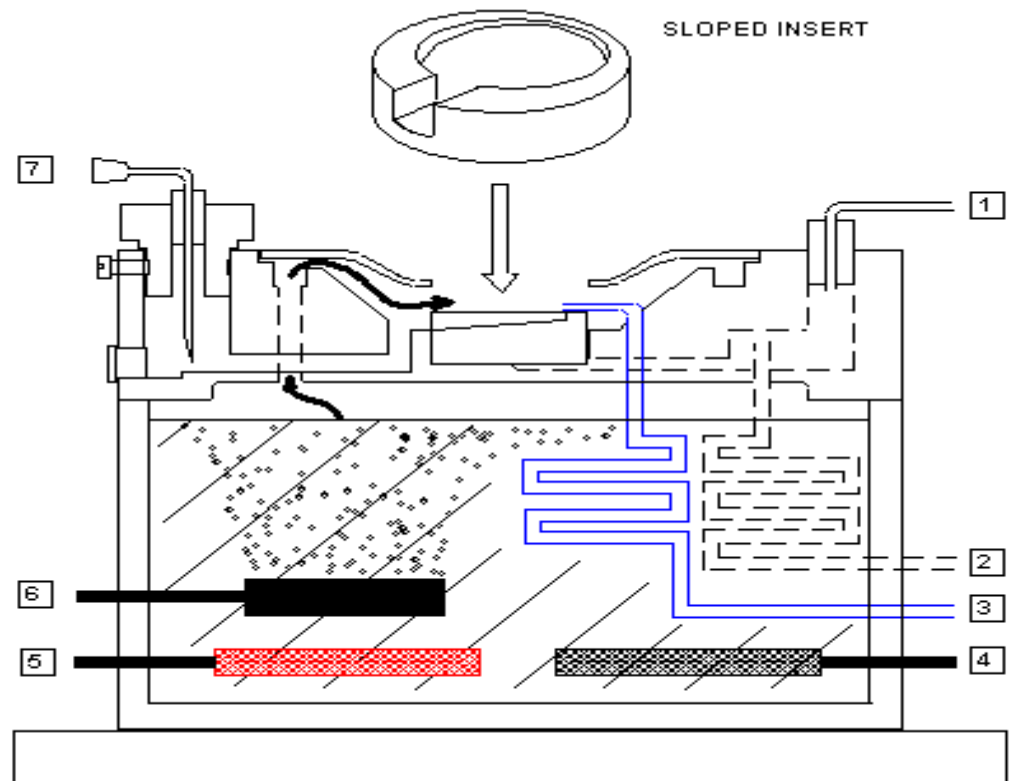
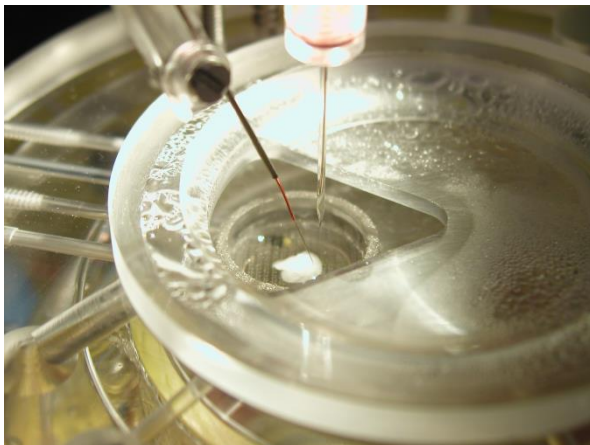


Erősítő és adatrögzítő berendezések,



# Regisztrálás

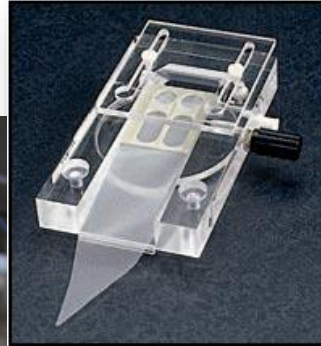
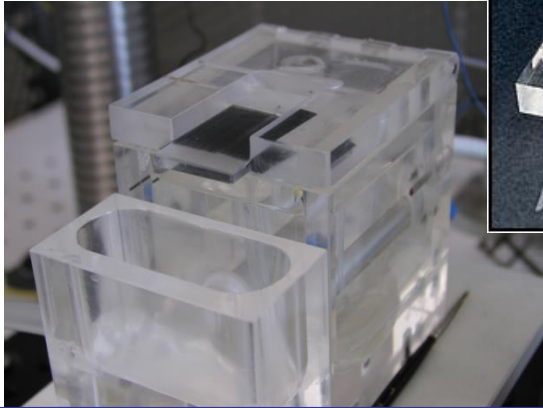
- **Inkubálókamra**
  - A fiziológias körülmények biztosítása a cél (hőmérséklet,  $O_2$  ellátás, szerves ionok, glükóz, pH)
- **Inkubáló oldatok (perfúziós oldat)**
  - összetétel, pH, karbogén buborékoltatás
- **Anyagadási lehetőségek:**
  - perfúzió
  - iontoforézis



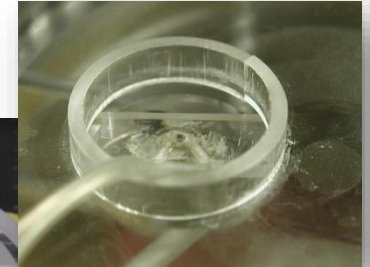
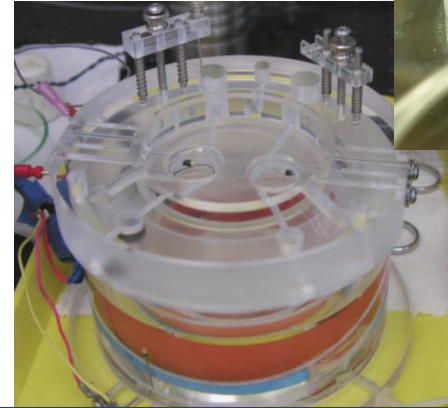
# Mérőkamrák

## Interface kamrák

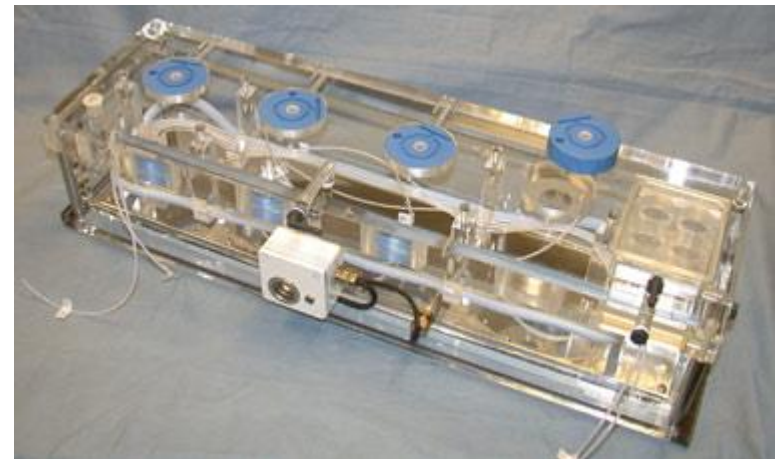
Haas-típus



Oslo típus



## Submerged kamrák



# ***Elektródok***

## **Üveg mérőelektród**

- Másodfajú elektród (Ag/AgCl elektród merül  $\text{Cl}^-$  tartalmú oldatba)
- Típusai:
  - Éles elektród (intracell.: KCl, extracell.: NaCl)
  - Patch elektród (hőpolírozás)

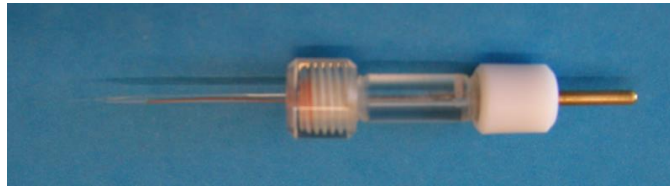
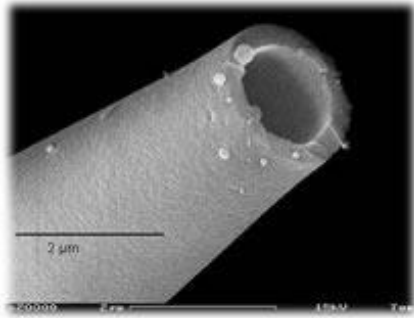
## **Fém mérőelektród**

- Változatos felépítés és anyag
- Típusai:
  - Többcsatornás multielektród (8, 16, vagy 24 csatorna)
  - Mátrixelektród (36-100 elektród /  $\text{mm}^2$ )

## **Ingerlőelektródok**

- Bipoláris elektród
- Koncentrikus elektród

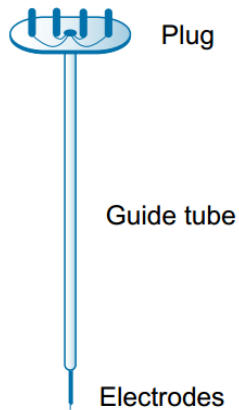
# Mérő mikroelektródok



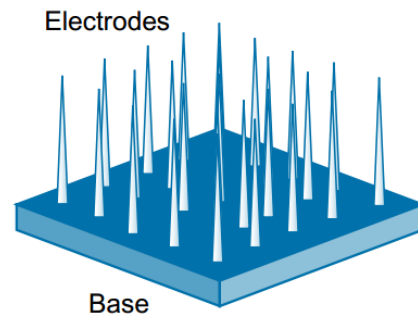
Üvegelektrod és a tarója, csatlakozóval



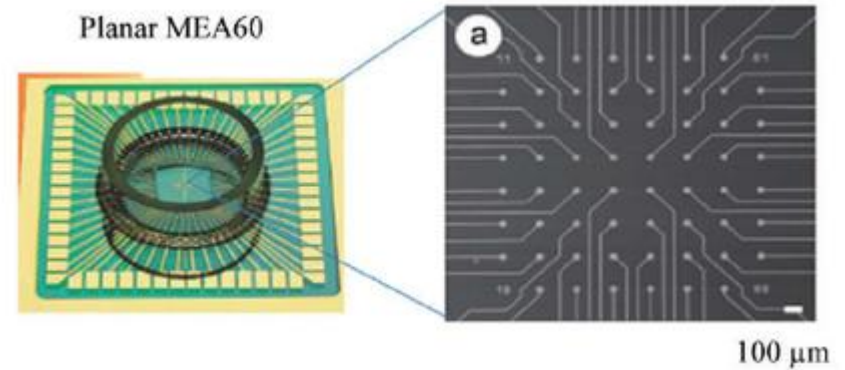
A Tetrode



B Multielectrode Array



Többcsatornás mérőelektródok



# Üveg mikroelektród húzók



vertikális húzó

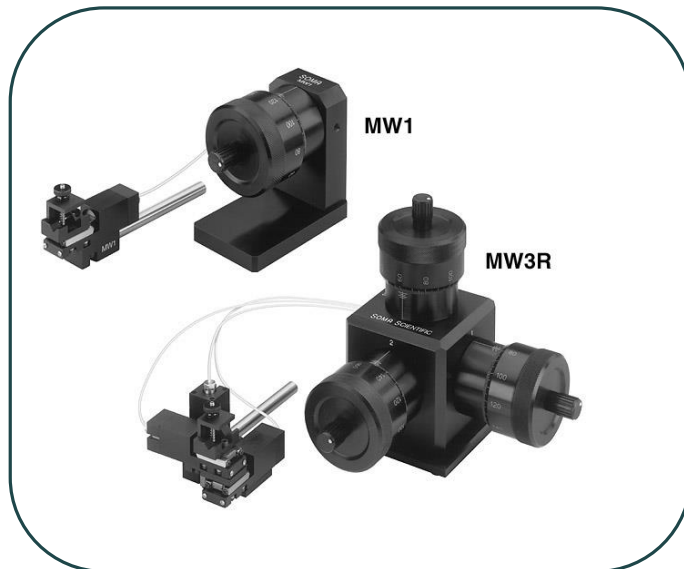
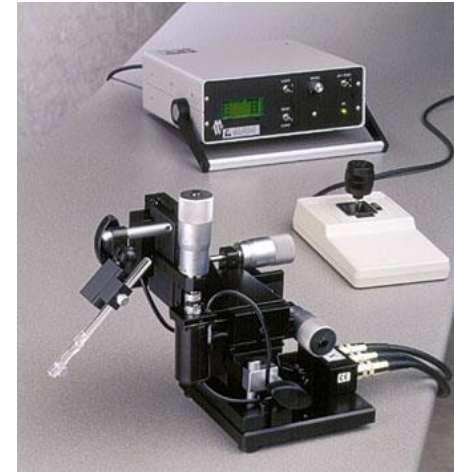


horizontális húzó

# Manipulátorok

A mérő- és ingerlőelektródok finom pozicionálására szolgálnak

- Manuális
- Motoros
- Hidraulikus
- Piezoelektromos



# Előerősítő, erősítő



MEA erősítő rendszer



Előerősítők



Extracelluláris erősítők



Intracelluláris erősítő

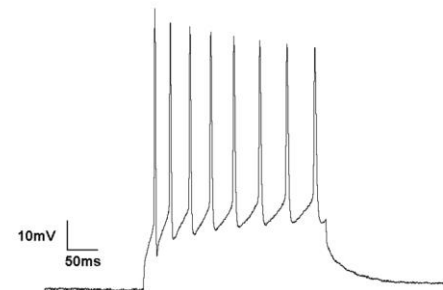
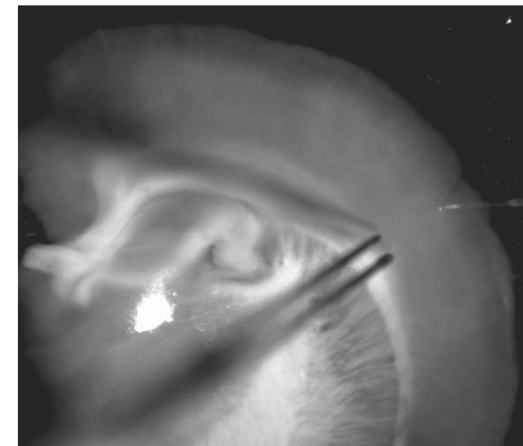
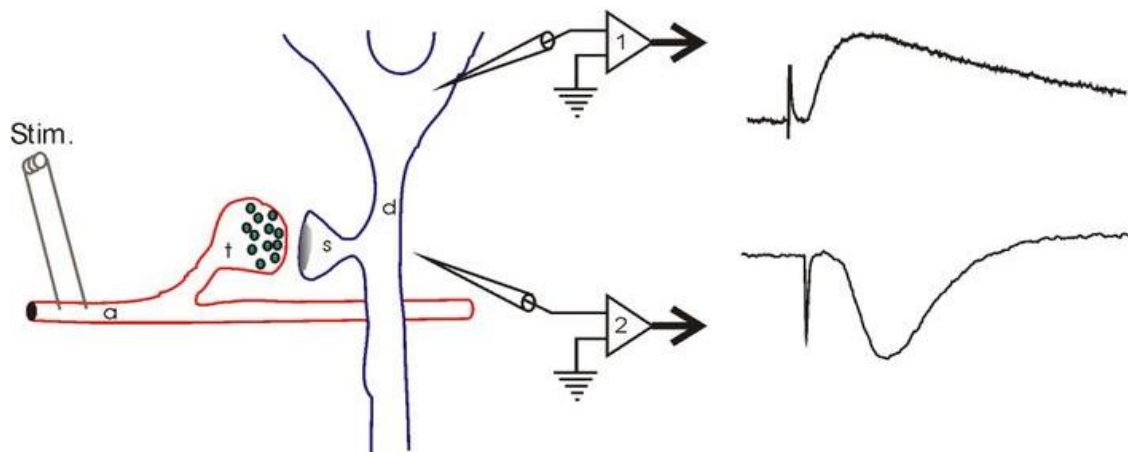
# Regisztrált jelek

## Mezőpotenciál (field potential)

- Az elektród környezetében lévő sejtek összegzett elektromos aktivációját detektáljuk (szinaptikus átvitel, spontán kisülések)
- Az elektród ellenállása 3-15 M $\Omega$  , átmérője 1-10  $\mu\text{m}$
- Egysejt- vagy többsejtaktivitás mérés is lehetséges

## Intracelluláris potenciál

- Egy sejt belsejéből elvezetés



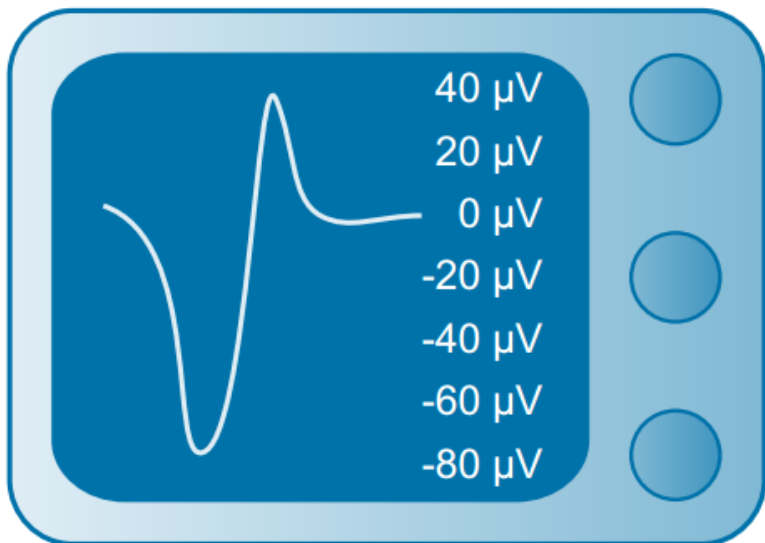


# Extracelluláris módszerek, single- és multi-unit

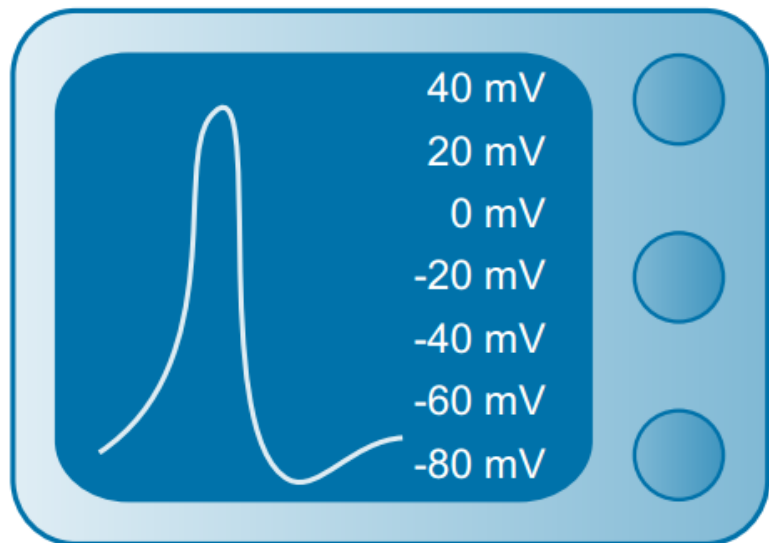
## Single unit (egysejt-aktivitás mérés):

- Az extracelluláris térbe helyezett kis átmérőjű (<math><1\mu\text{m}</math>) elektróddal egyetlen neuron aktivációja mérhető
- Kis amplitúdójú jelek detektálhatók

Extracellular Electrode

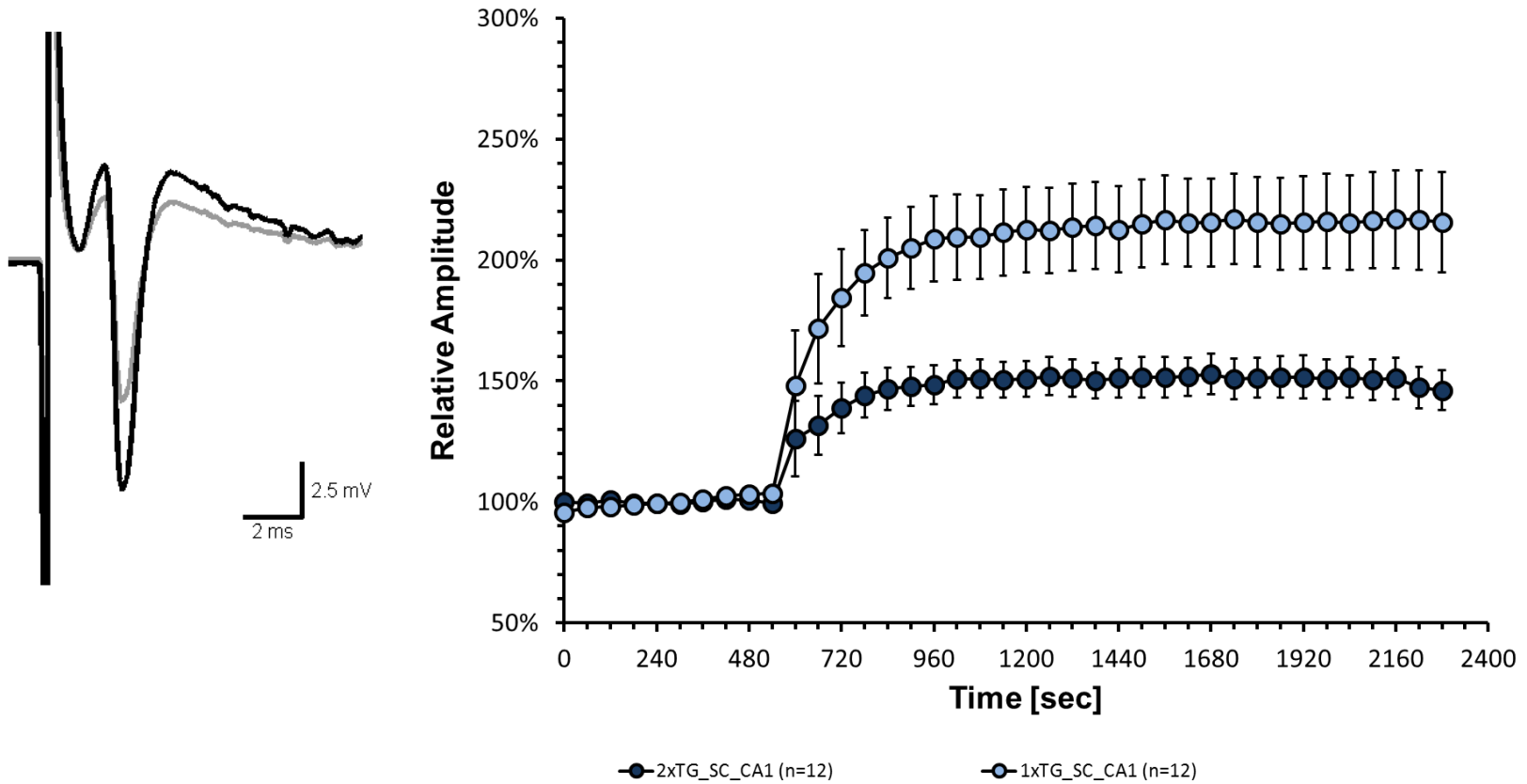


Intracellular Electrode



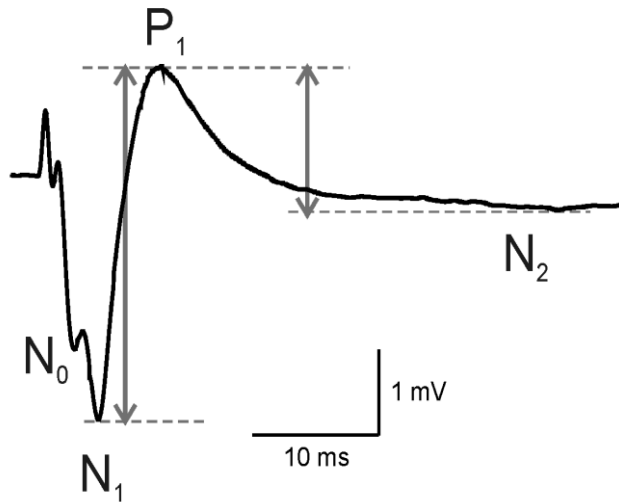
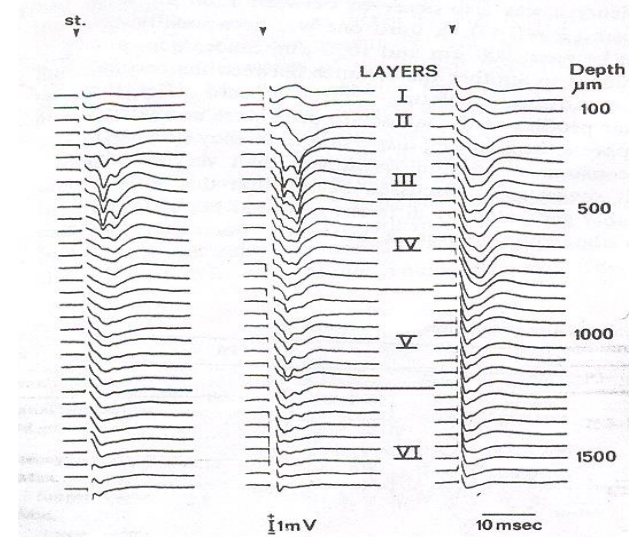
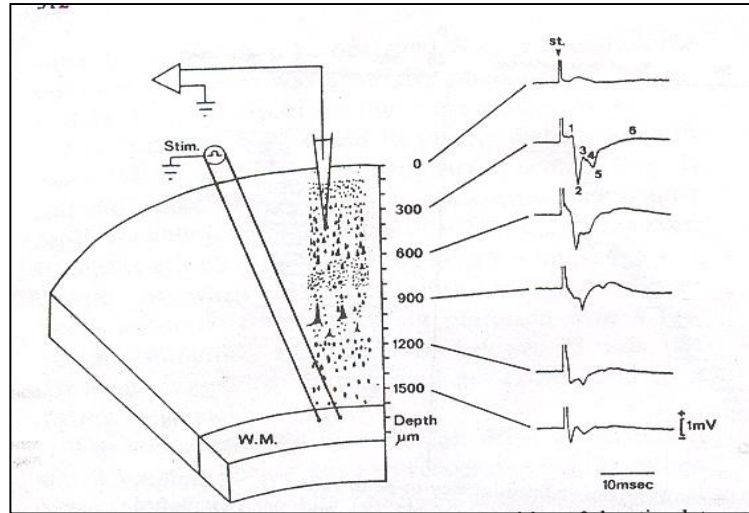
# Extracelluláris módszerek

## Hippokampuszból kiváltott mezőpotenciál válaszok mérése (LTP indukció)



# Extracelluláris módszerek

Agykérgi kiváltott mezőpotenciál válaszok mérése (több elvezetés lehetséges)



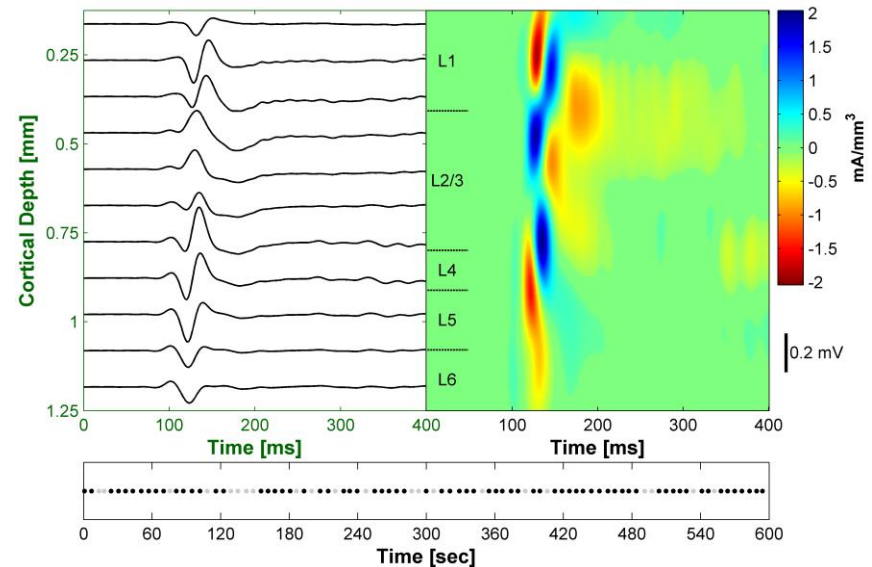
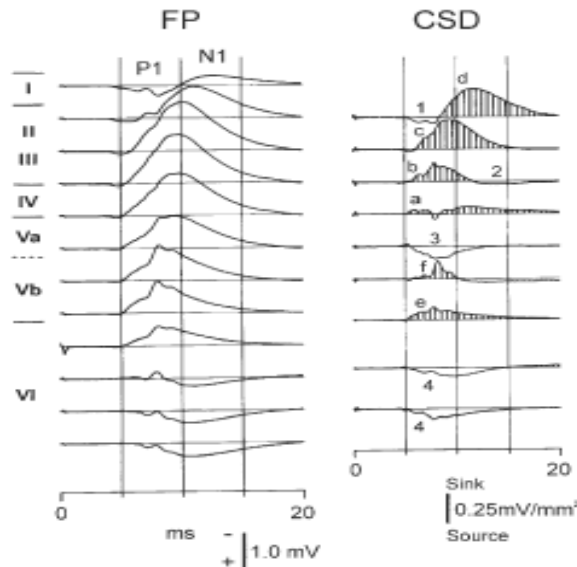
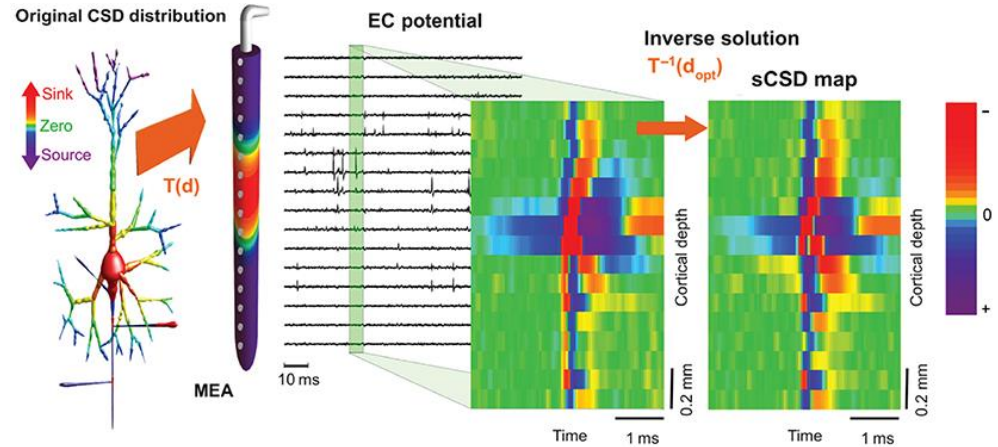
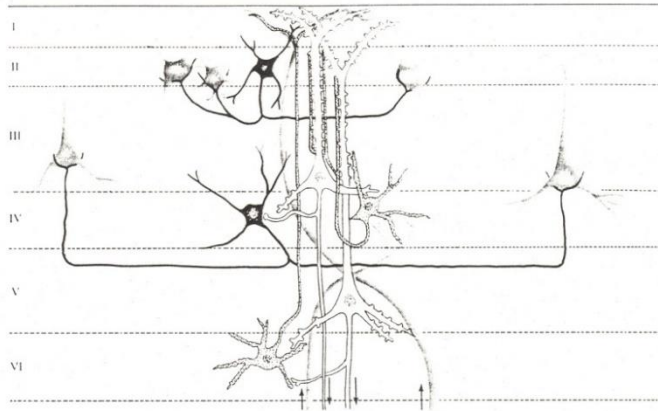
Értékelési paraméterek

meredekség (rise time)

csúcstól-csúcsig (peak-to-peak) amplitúdó

görbe alatti terület

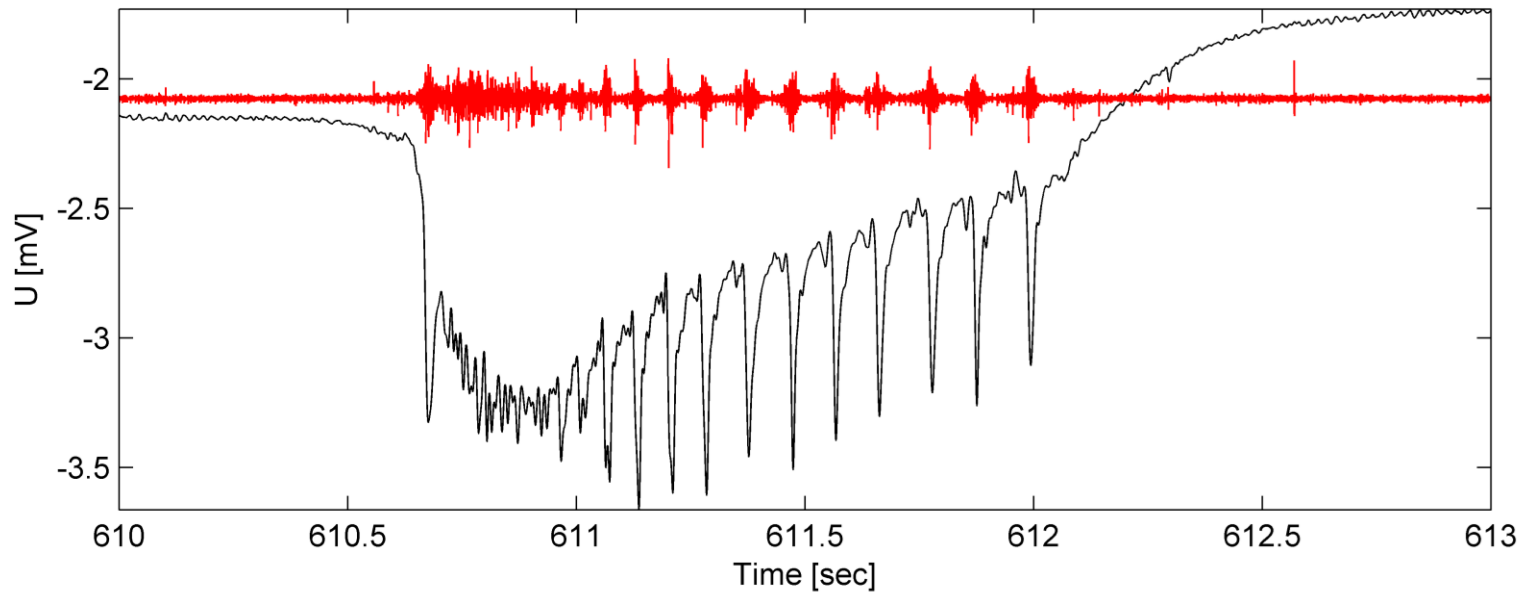
# Extracelluláris módszerek, áramforrás-sűrűség meghatározás (CSD analízis)



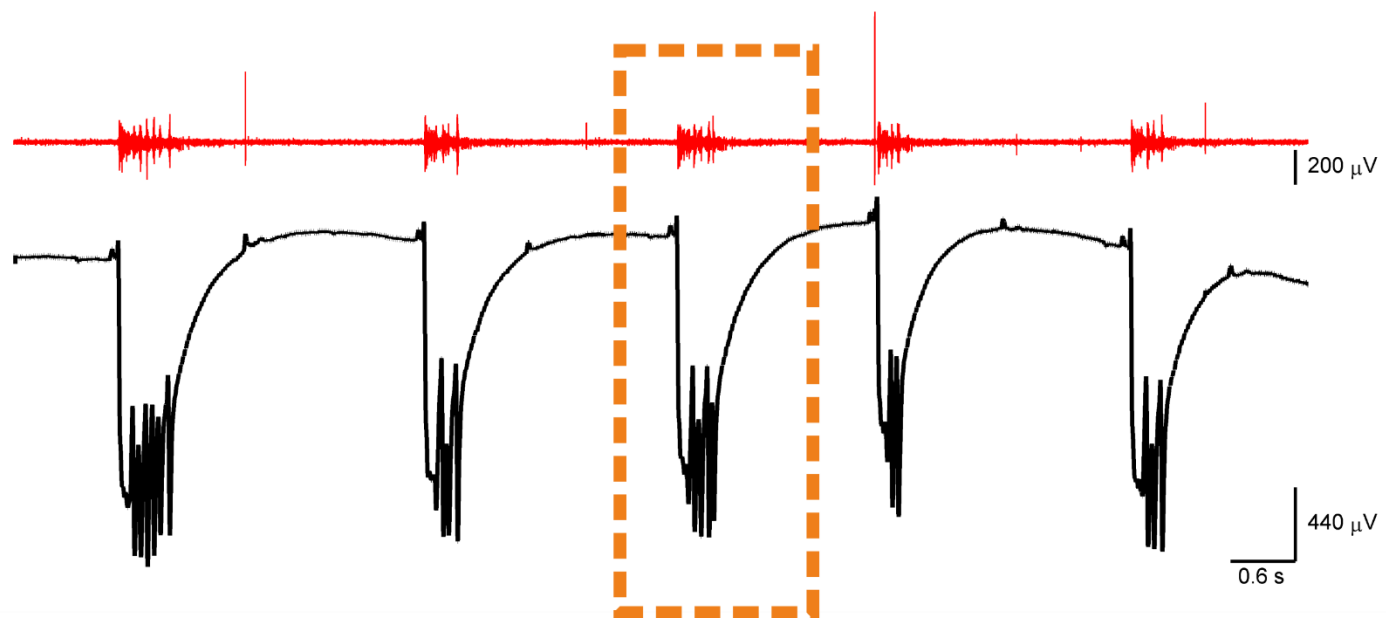
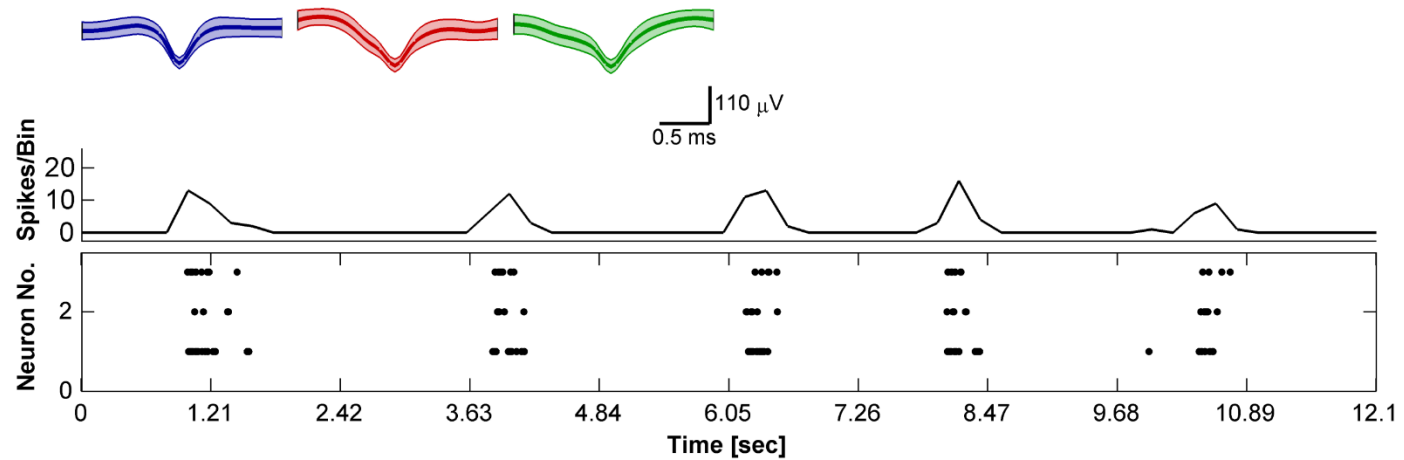
# Extracelluláris módszerek, single- és multi-unit

## Multi unit (több-sejt aktivitás mérés):

- Ha az elektród mérete nagyobb, több közeli sejt aktivációja is megjelenik a regisztrátumon
- „Spike sorting”: adott sejt mindig azonos kisülést hoz létre  $\Rightarrow$  a sejtek aktivitása szétválasztható.

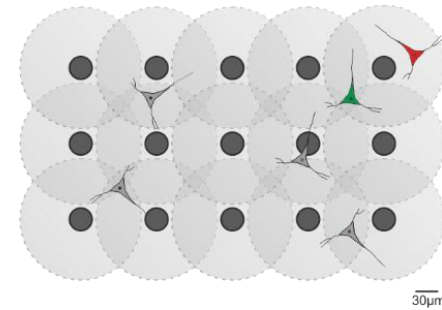
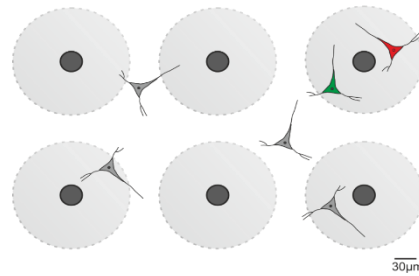
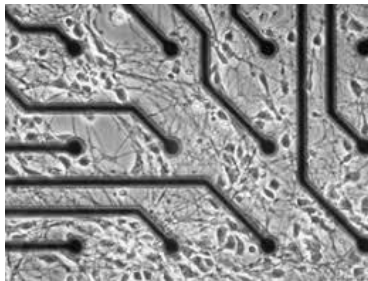
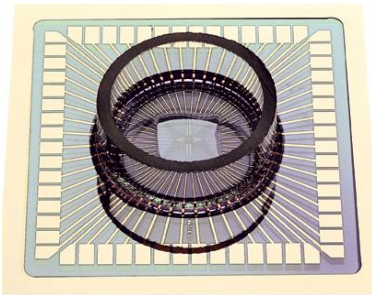


# Extracelluláris módszerek, single- és multi-unit

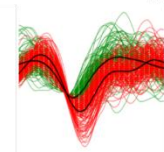
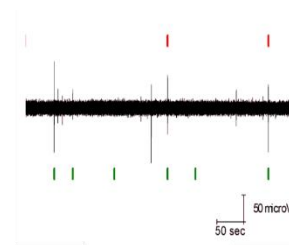
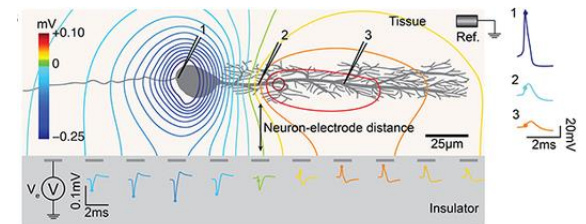
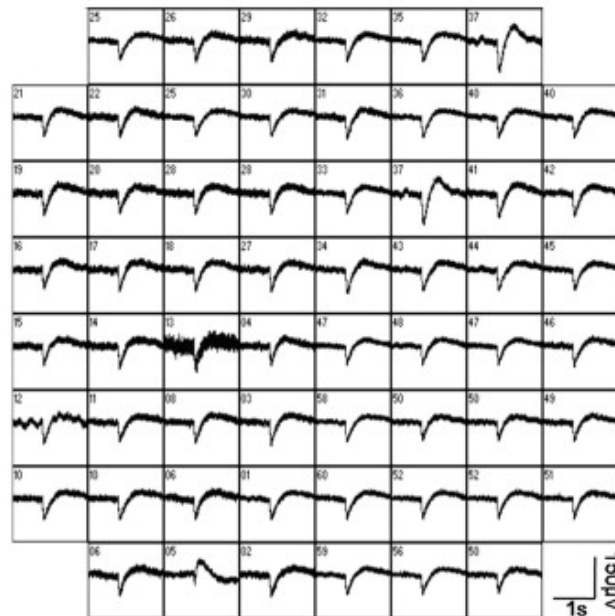


# Extracelluláris módszerek, single- és multi-unit

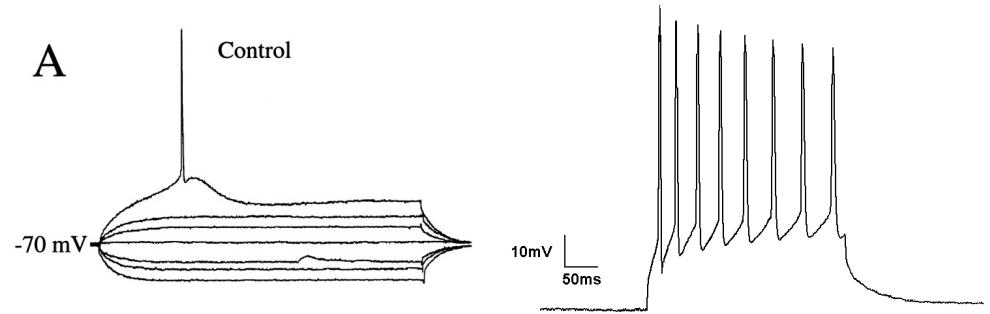
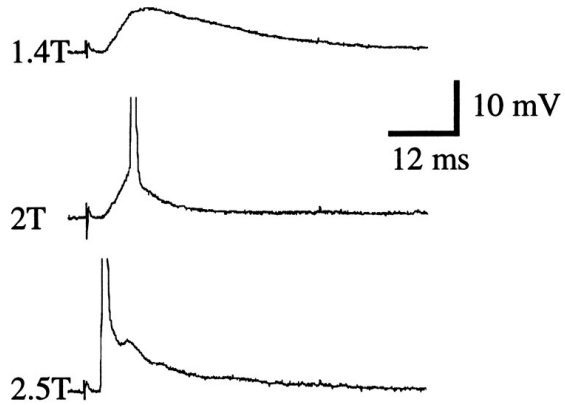
## MEA rendszerrel mérés



C

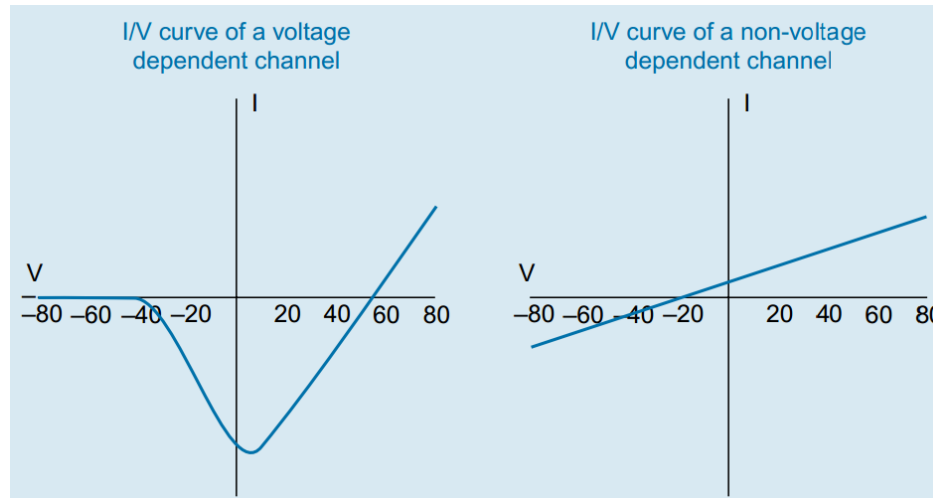


# Intracelluláris regisztrálás, voltage clamp



Intracelluláris ingerlés

Extracelluláris ingerlés

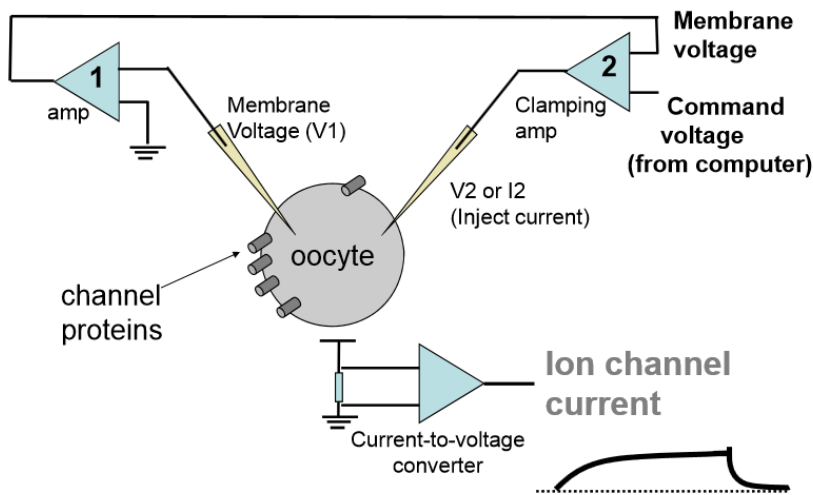


I/V curve: áramerősség-feszültségváltozás összefüggésének ábrázolása

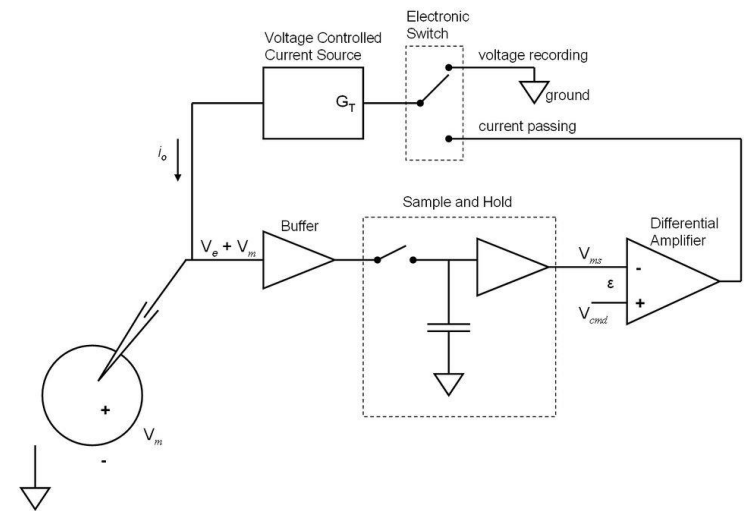


# Intracelluláris regisztrálás, voltage clamp

- A membrán potenciál a kívánt értéken rögzíthető
- Mérhető a membránon áthaladó ionáram nagysága adott membránpotenciál értéken



TEVC – két csatornás mérés

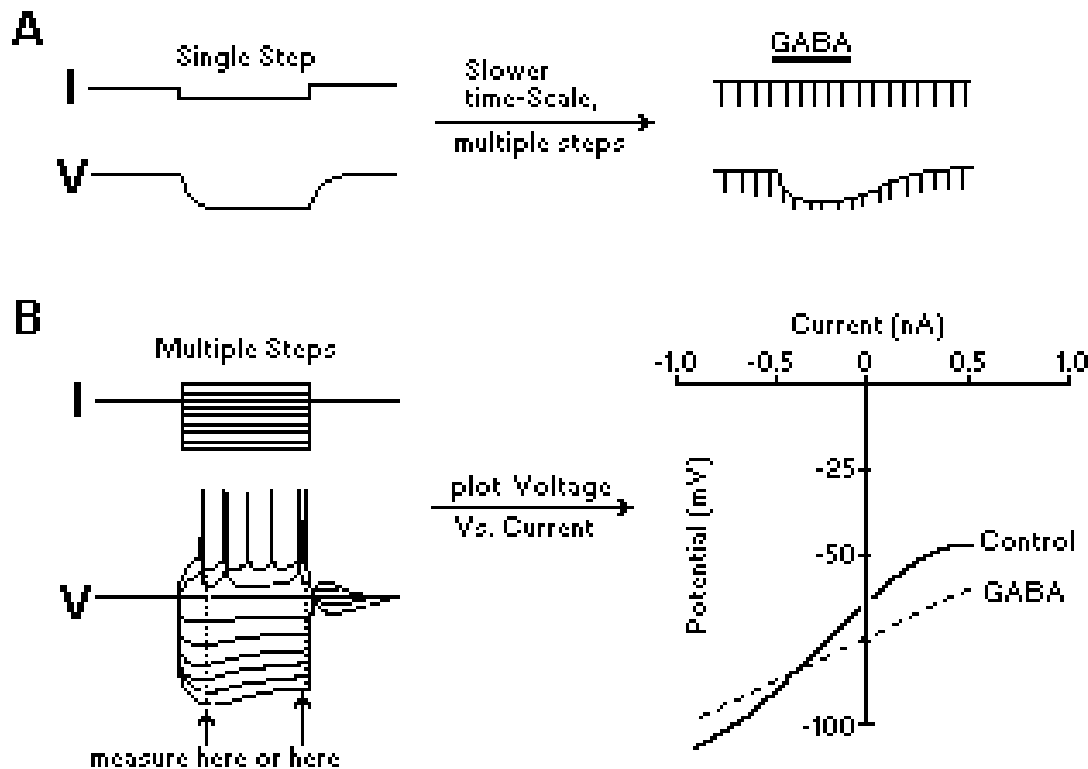


SEVC - egy csatornás mérés

# Intracelluláris regisztrálás, current clamp

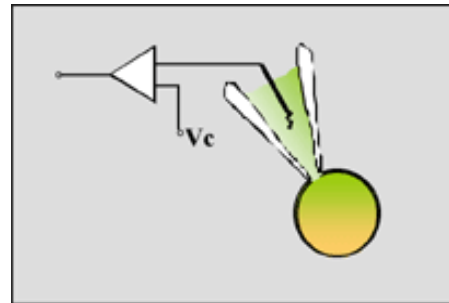
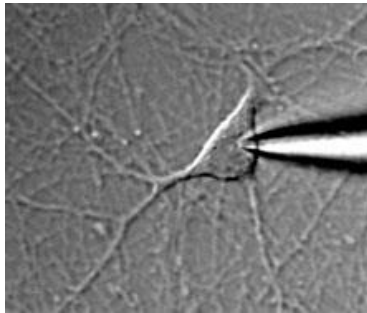
- Adott áram hatására kialakuló transzmembrán feszültség mérhető
- Az idegsejt elektromos áram belépésére adott válasza tanulmányozható (neurotranszmitterek hatása modellezhető)

## Current Clamp

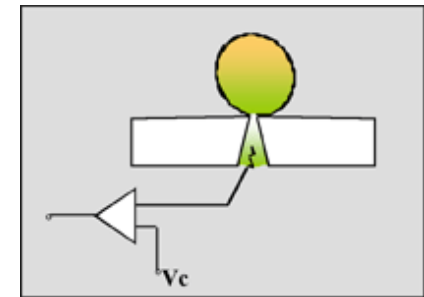


# Patch clamp

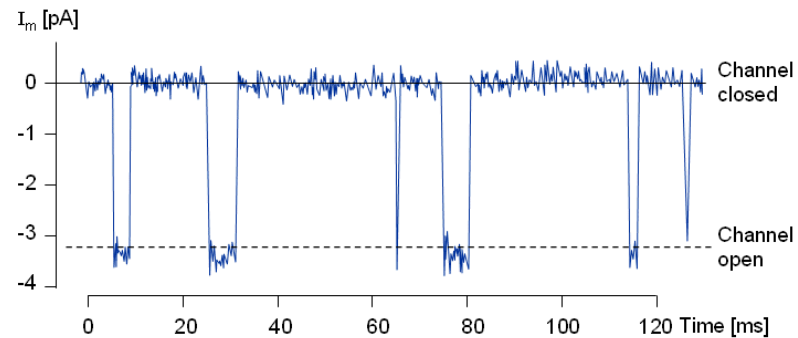
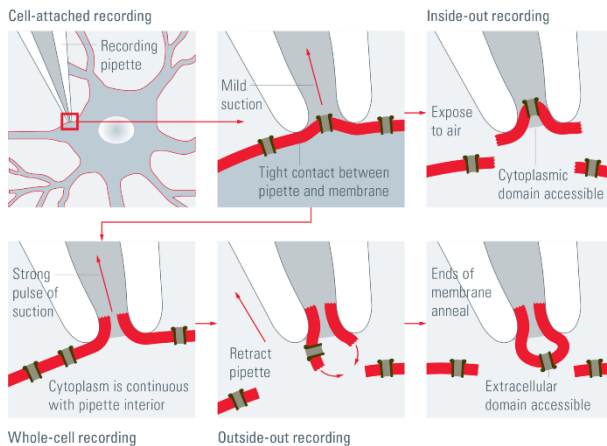
- Erwin Neher, Bert Sakmann (Nobel-díj, 1991)
- Segítségével egyetlen ioncsatorna működése vizsgálható
- Módosított voltage clamp
- Típusai:
  - Klasszikus patch clamp (cell attached, whole cell inside-out outside-out, perforált patch)
  - Planar patch clamp (cyto patch, flip the tip)



Hagyományos patch clamp  
Mérés, üvegelektrodával



Planar patch clamping

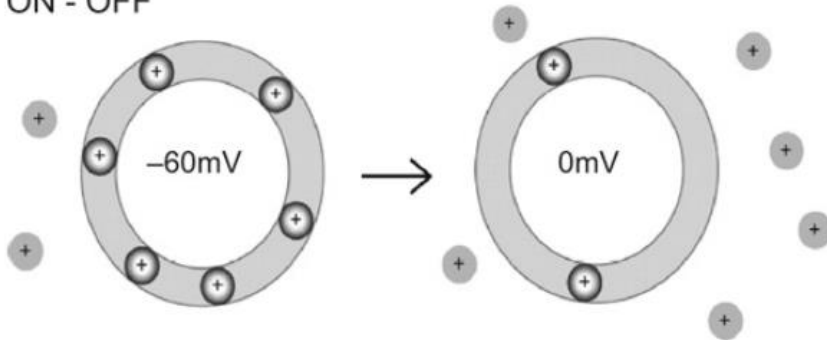


# Optikai jelek vizsgálata

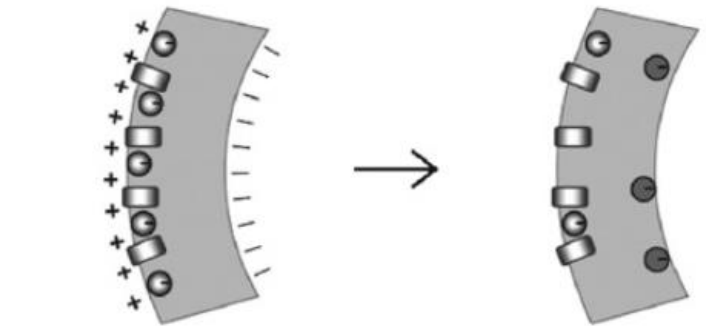
## Extrinsic optikai jelek :

- Lassú feszültségérzékeny festék: a festék átranzportálódik a membránba a nyugalmi potenciál megváltozásakor
- Gyors feszültségérzékeny festék: a festék megkötődik a sejt felszínén. A fluoreszcencia vagy abszorpció mértéke változik a membránpotenciállal. Pl.: Amino-naftil-vinil-piridinium (ANEP) festékek

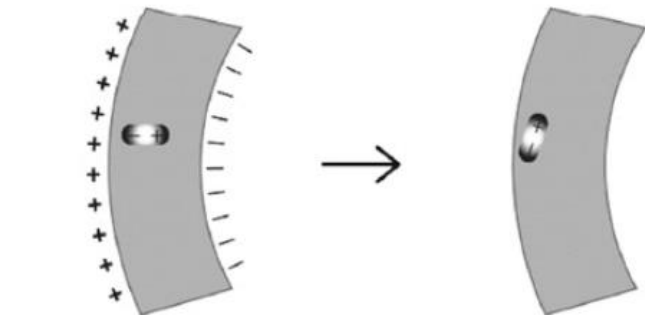
ON - OFF



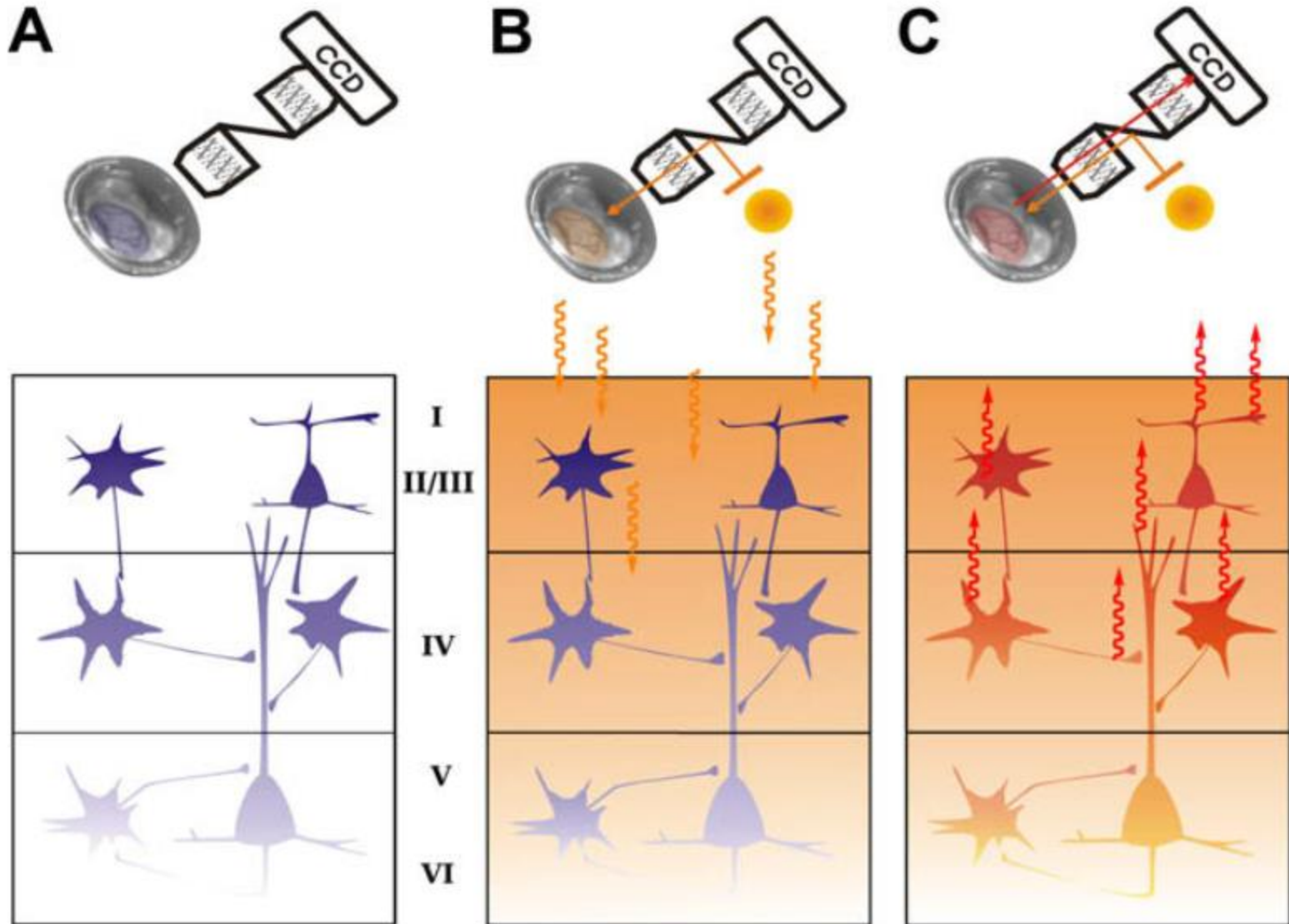
FRET



REORIENTATION



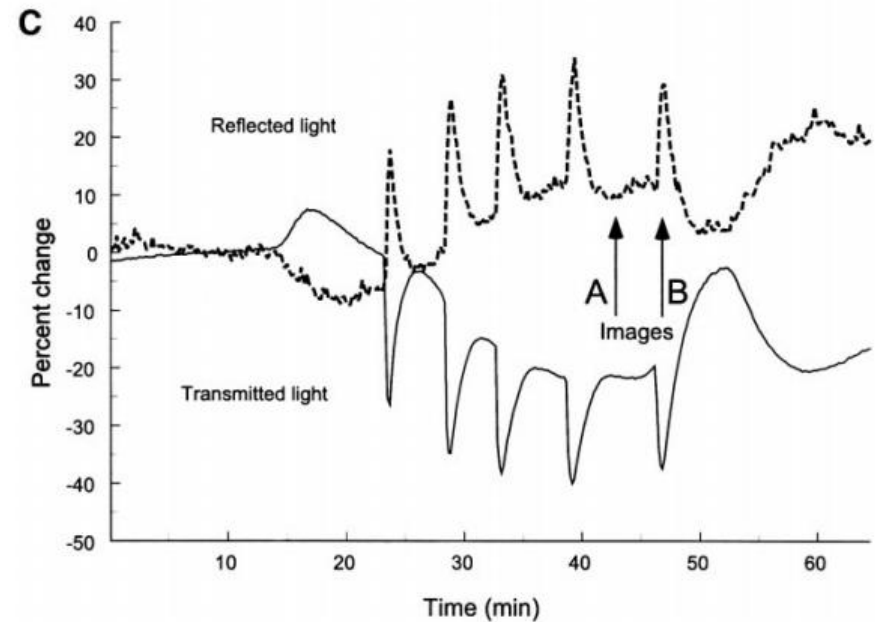
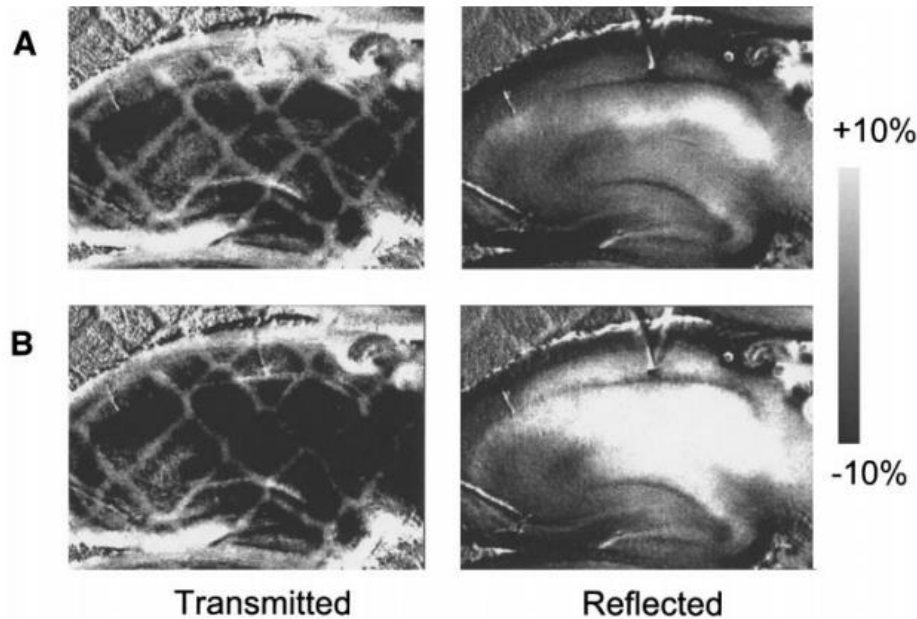
# Extrinsic optikai jelek



# Belső optikai jelek

## Intrinsic optikai jelek:

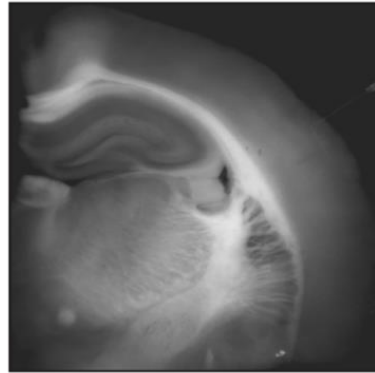
- Fokozott ionáramlás esetén a sejtek víztartalma megváltozik, ami a neuronok duzzadásához vagy zsugorodásához vezet. Ennek következtében a szövet fénytörése megváltozik, ami mérhető optikai jelet generál. Két típus létezik: visszavert fény  $\leftrightarrow$  átjutó fény detektálása
- In vivo méréseknél a vérátáramlás lokális különbségei is módosíthatják az optikai jelet. (Hb két oxidáltsági állapota)



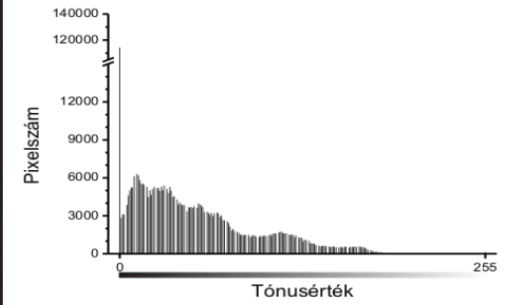
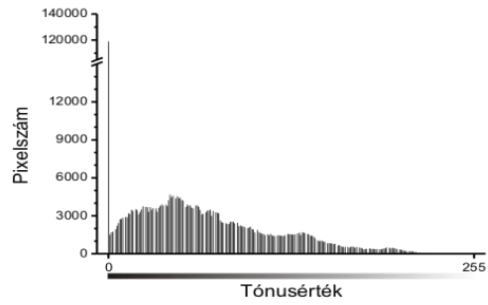
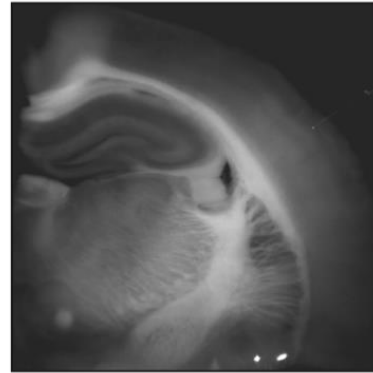
Hypotóniás közeg hatása a szeletpreparátum optikai tulajdonságaira.

# Belső optikai jelek

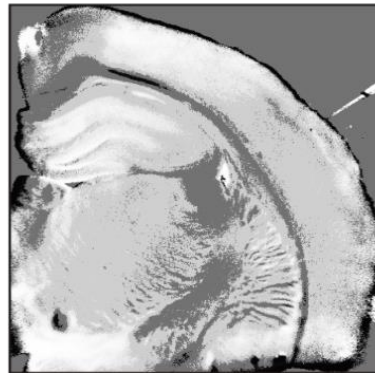
**A**



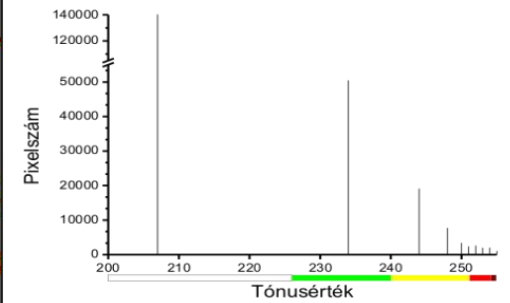
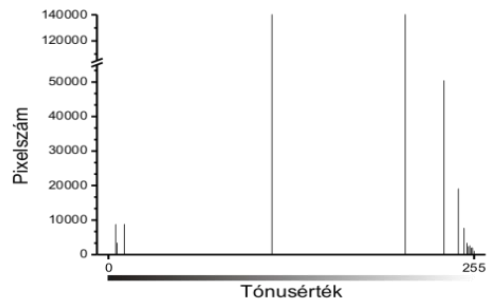
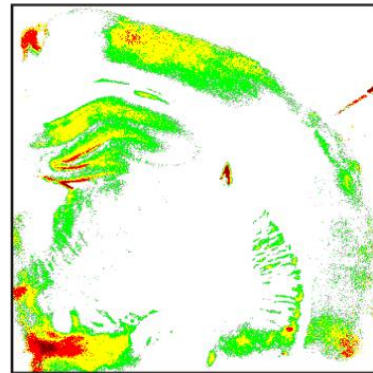
**B**



**C**



**D**



# Belső optikai jelek

