

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Metody měření elektrického napětí na  
buněčné membráně**

Diplomová práce

**Bc. Karel Divoký**

Školitel: Mgr. Josef Lazar, Ph..D.

České Budějovice 2013

Diplomová práce:

**Divoký K. (2013):** Metody měření elektrického napětí na buněčné membráně

[Methods of measurement of electrical voltage on the cell membrane.]

Master thesis in Czech, 64p, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

**Anotace:**

Cílem této práce bylo sestavit přehledný seznam metod, které se zabývají výzkumem napětí na buněčné membráně. Práce by měla pomoci při orientaci v těchto metodách a také k porozumění jejich fyzikálnímu a biologickému principu. První část se zabývá rozborem fyzikálních vlastností membránového potenciálu. V druhé části jsou zpracované nejdůležitější metody, které membránový potenciál měří. Důležité je také porovnání těchto metod z hlediska jejich zaměření, lokálnosti, fyzikální náročnosti nebo zátěže pro zkoumaný objekt.

**Annotation:**

The aim of this work was to compile a comprehensive list of methods that deal with the research of voltage on the cell membrane. The work should help in orientation in these methods, as well as understanding of their physical and biological principle. In the first part is analysis of physical properties of membrane potential; in the second part are the most important methods for measuring membrane potential. Very important is the comparison of these methods in terms of their focus, localization, physical demands or in terms degree of damage of object under examination.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 24.4.2013

.....

Karel Divoký

**Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat především své rodině a přítelkyni, ale také všem lidem kolem mě, kteří mě ve studiu a v životě podporují.

## Obsah:

<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Výzkum na úrovni jednotlivých buněk.....</b>	<b>1</b>
2.1. Buňka.....	2
2.2. Struktura membrán.....	2
2.3. Iontové kanály – jejich funkce a rozdělení .....	4
<b>3. Elektrické vlastnosti membrány.....</b>	<b>7</b>
3.1. Faradayova konstanta (F).....	7
3.2. Napětí (V nebo $\psi$ ).....	7
3.3. Proud ( I ).....	7
3.4. Rezistence (R) .....	8
3.5. Měrný odpor ( $\rho$ ) .....	8
3.6. Kapacita (C) .....	8
3.7. Práce potřebná k přemístění iontu dovnitř dvojvrstvé membrány.....	10
3.8. Vnitřní dipólový potenciál.....	11
3.9. Potenciál na povrchu membrány.....	11
<b>4. Transmembránový potenciál.....</b>	<b>12</b>
4.1. Charakteristika transmembránového potenciálu.....	12
4.2. Klidový membránový potenciál .....	13
4.3. Rovnovážné podmínky.....	15
4.4. Ustálený difúzní proud iontů .....	18
<b>5. Principy fluorescenční spektroskopie.....</b>	<b>23</b>
5.1. Fluorescence.....	23
5.2. Fosforescence.....	23
5.3. Zpožděná fosforescence.....	23
5.4. Základní charakteristiky fluorescence.....	25
5.5. Fluorescentní proteiny.....	26
<b>6. Rozdílné přístupy pro zobrazování membránového potenciálu .....</b>	<b>27</b>
6.1. Zkoumání částí buněk.....	27
6.2. Zkoumání jednotlivých buněk.....	29

6.3. Zkoumání celého systému buněk.....	31
<b>7. Zkoumání mozku .....</b>	<b>19</b>
7.1. Metoda elektroencefalografie (EEG).....	19
7.2. Funkční magnetická rezonance fMRI .....	20
7.3. OIS .....	22
<b>8. Metody zkoumání membránového potenciálu.....</b>	<b>32</b>
8.1. <u>Metody bez využití fluorescence</u> .....	32
8.1.1. Buněčná elektrofyziologie .....	32
8.1.2. Vnitrobuněčné zaznamenávání potenciálu pomocí destiček s nano- jehličkami.....	35
8.1.3. Metoda druhé harmonické emise.....	36
8.2. <u>Metody využívající fluorescenci</u> .....	38
8.2.1. Zobrazení membránového potenciálu pomocí barviv citlivých na napětí.....	38
8.2.2. Geneticky kódované sondy.....	41
8.2.2.1. Monitorování kanálů citlivých na změnu elektrického napětí pomocí fluorescentních proteinů.....	41
8.2.2.2. Metoda zhášení fluorescence.....	43
8.2.2.3. Metoda FRET.....	45
8.2.2.4. Metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM).....	48
8.2.2.5. Použití mikrobiálního rhodopsinu.....	52
<b>9. Diskuse.....</b>	<b>55</b>
9.1. Metody bez využití fluorescence.....	55
9.2. Metody s využitím fluorescence.....	56
<b>10. Závěr.....</b>	<b>58</b>
<b>11. Použité zkratky.....</b>	<b>59</b>
<b>12. Seznam použité literatury.....</b>	<b>60</b>

## **1. Úvod:**

### **Proč je důležité sledovat elektrické napětí na membráně buňky?**

Sledování a zkoumání elektrického napětí a jeho změn na membráně buňky je velice důležité a přínosné pro řadu vědních disciplín. Pomocí porozumění vlastnostem membrány a membránového potenciálu bychom byli schopni objasnit řadu otázek. A to zejména těch, které se týkají zkoumání mozku, výzkumu působení léků na buňku a buněčnou membránu nebo nám výzkum může pomoci při objasnění procesů, které v buňce a na buněčné membráně probíhají.

Metody, které z různých úhlů tento membránový potenciál zobrazují jsou velice pestré a založené na rozdílných fyzikálních principech. Tato práce proto poskytuje ucelený pohled do této problematiky.

## **2. Výzkum na úrovni jednotlivých buněk:**

První možností jak získat informace o funkcích a vlastnostech mozku je přístup přes jednotlivé buňky. Výzkum na úrovni jednotlivých buněk nám může poskytnout velice důležité informace, které při zkoumání celku nejsme schopni rozpoznat. Studium buněk může probíhat pomocí několika metod, které se dají částečně rozlišit na metody využívající fyzické elektrody a na metody, které naopak využívají optického snímání aktivity. Při použití optického snímání aktivity buňky je nutno aplikovat fluorescentní barviva nebo geneticky kódované sondy, které zajistí dostatečně silný a přesný signál nesoucí informace o stavu buňky. Pro pochopení jednotlivých metod je ale nutno pochopit základní stavbu buněčných membrán, pohyb nábojů skrz tyto membrány a základy elektroniky, které jsou pro studium membránového potenciálu nezbytné. Těmto informacím jsou věnované následující kapitoly.

## **2.1. Buňka:**

Všechny živé organismy se skládají z buněk. Buňku stručně můžeme charakterizovat, jako malý komplex koncentrovaného vodného roztoku chemických sloučenin ohraničený buněčnou membránou a schopností růstu a dělení (ALBERTS, Bruce, 1998).

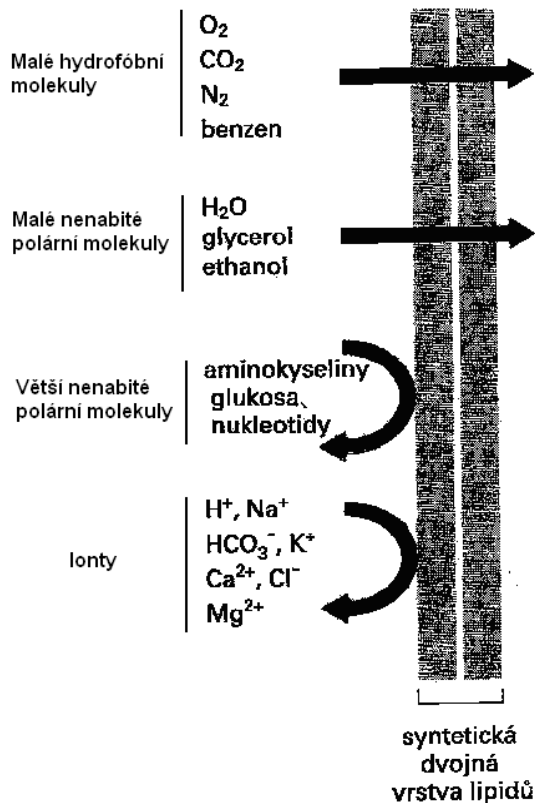
Ve struktuře a funkci buněk mají ústřední roli membrány. Membrány ohraničují celou buňku, udávají jí tvar a definují také oddělení buňky. Každá membrána také odděluje vnitřní a vnější prostředí. Biologické membrány jsou určující pro celou řadu aktivit odehrávajících se v buňce a také podstatu všech komunikací mezi vnitřkem a vnějškem buňky (GENNIS, Robert B, 1989).

## **2.2. Struktura membrán:**

Pro život buňky je naprosto nezbytná plasmatická membrána, která obklopuje celou buňku a tím od sebe odděluje dvě naprosto rozdílné prostředí. Zabraňuje promíchání těchto dvou prostředí, respektive zabraňuje úniku obsahu buňky do okolního média.

Její základním stavebním prvkem je asi 5nm tenká vrstva lipidů. Stavba těchto lipidů je velice specifická. Každá molekula se sestává ze dvou odlišných částí: hydrofilní hlavička a jeden až dva hydrofóbní uhlovodíkové konce. Díky těmto vlastnostem jednotlivých částí, mohou molekuly vytvořit takzvanou lipidovou dvojvrstvu. Ta je nejvýhodnější strukturou z hlediska energetické náročnosti (ALBERTS, Bruce, 1998).

Lipidová membrána neodděluje pouze dvě rozdílná prostředí, ale je zodpovědná i za transport živin směrem do buňky a naopak transport odpadních látek ven z buňky. Tuto výměnu látek mezi buňkou a okolním prostředím zajišťují vysoce selektivní proteiny nazývané kanály a transportéry (pumpy). Tyto proteiny prostupují skrz membránu a jsou zodpovědné za transport specifických látek. Proteiny, které jsou obsaženy v plasmatické membráně mohou sloužit také jako receptory, díky nim je buňka schopna reagovat na změny ve svém okolí (ALBERTS, Bruce, 1998).



Obr. 1: Propustnost syntetické dvojně vrstvy lipidů vztahovaná pro jednotlivé třídy molekul. Molekuly difundují lipidovou dvojvrstvou v závislosti na jejich velikosti a polaritě. Čím je molekula menší a čím méně ochotně interaguje s vodou, tím lépe prochází membránou. Mnohé molekuly, které buňka využívá jako živiny, jsou příliš velké a polární na to, aby mohly projít skrz. Proto jsou ve fosfolipidové membráně buněk umístěné membránové proteiny sloužící k přenosu těchto látek ( upraveno podle: ALBERTS, Bruce, 1998).

Transmembránové proteiny zprostředkovávají velice důležité biologické funkce. Jejich výzkum je ale velice omezený, a to jak zkoumání jejich přesné sekundární a terciární struktury a změny v této struktuře, tak s tím také velice omezené zkoumání jejich přesné funkce. Hranice a struktury domén začleněných v membráně mohou být u integrovaných proteinů určeny například pomocí metody založené na sloučení mutace na určeném místě a označení rotačním nitroxidem (Altenbach. C.,1990 ).



### **2.3. Iontové kanály:**

Fosfolipidová membrána je velice dobrá bariéra pro většinu malých molekul. Jsou zde však obsaženy kanály a transportéry, které transport těchto molekul přes membránu umožňují.

Iontové kanály jsou velice důležité pro udržení správné hodnoty membránového potenciálu. Mají velice důležité funkce, od vedení iontů skrz buněčnou membránu přes specifické rozeznávání iontů a především jejich dynamika otevírání a zavírání. Tento děj je reakcí na specifické elektrické, mechanické nebo chemické signály.

Velkou vodivost mají iontové kanály v nervových a svalových buňkách. Při jejich plném otevření je možný jedním kanálem průchod více jak 100miliónů iontů za sekundu. Tento mohutný tok iontů zapříčiní rychlé změny v membránovém potenciálu, které jsou využívány jako signalizace . Výměna iontů skrz iontové kanály je mnohem rychlejší než například většina enzymů, jejichž rychlost je pouze od 10 do 1000 přenesených iontů za sekundu (KANDEL, Eric R, 2000).

Iontové kanály jsou i přes tuto obrovskou rychlost přenosu velice selektivní. Každý jeden typ kanálu dovoluje přenos pouze jednoho nebo jen několika typů iontů. Například klidový membránový potenciál nervových buněk je určený především iontovými kanály, které jsou ve výběru selektivní k propuštění iontů  $K^+$ . Jsou 100krát průchodnější pro ionty  $K^+$  než pro ionty  $Na^+$ . Během akčního potenciálu (přechodné změny membránového potenciálu) jsou aktivované iontové kanály 10-20krát propustnější pro ionty  $Na^+$  než pro ionty  $K^+$ . Tato změna je rozhodující při neuronové signalizaci. Ta spočívá právě v aktivaci rozdílných tříd iontových kanálů, kde každý z nich je selektivní pro specifické ionty (KANDEL, Eric R, 2000).

Klasifikace některých transportních proteinů založených na mechanice a energetice:

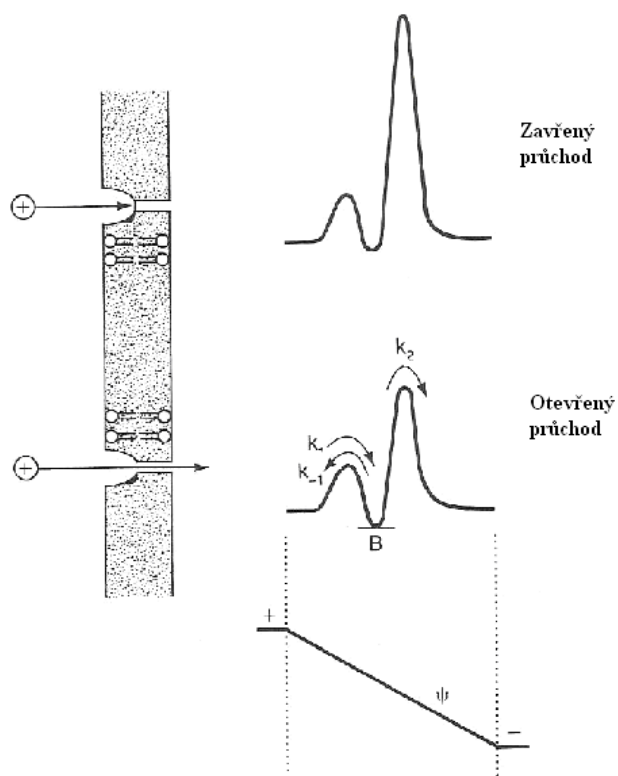
1) Kanály

- a. Napětově řízené kanály ( Na<sup>+</sup> kanály)
- b. Chemicky regulované kanály (Nikotinový acetylcholinový receptor)
- c. Jiné ( neregulované, citlivé na tlak, atd.)

2) Transportéry

- a. Pasivní uniporty ( Glukosový transporter v erytrocytu)
- b. Aktivní transportéry
  - i. Primárně aktivní
    1. Spojené s redukcí ( Oxidáza cytochromu c)
    2. spojené se světlem ( Bakteriorhodopsin)
    3. ATPázy ( Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPáza)
  - ii. Sekundárně aktivní transportéry
    1. Symporty ( laktoza – permeasa )
    2. Antiporty ( Band 3)

(GENNIS, Robert B. *Biomembranes*)



Obr. 2 : Schématické znázornění iontového kanálu, který se skládá z místa rozšířeného a z místa zúženého, kudy musí projít iont. Profily volné energie napravo korespondují s případem, kdy je v kanálu jedno vazebné místo, nejspíše lokalizované někde v ústí kanálu. Dolní hladina B je hladina slabé vazby. V přítomnosti rozdílu transmembránového potenciálu musí být profil elektrického potenciálu ( $\psi$ ) sečtený s profilem volné energie. V tomto případě bude výška bariéry korespondující s  $K_1$  a  $K_2$  redukována, a bude urychlovat přenos iontů skrz membránu (GENNIS, Robert B. , 1989).

### **3. Elektrické vlastnosti membrány:**

Chceme-li zjistit celkový profil elektrického potenciálu na membráně, je potřeba vědět, kolik elektrické práce je potřeba k přesunu náboje z jednoho místa na druhé. Abychom byli schopni toto vypočítat je potřeba porozumět tomu, jak jsou náboje distribuovány okolo a uvnitř membrány.

Definice několika potřebných pojmů:

#### **3.1. Farradayova konstanta, ( F )**

Množství náboje jednoho molu jednomocného iontu.

$$\begin{aligned} F &= \text{Avogadrova konstanta} \times \text{elementární náboj} \\ &= (6,022 \times 10^{23}) \times 1,602 \times 10^{-19} \text{ coulomb} \\ &= 10^5 \text{ coulomb/mol} \end{aligned}$$

#### **3.2. Napětí, ( V nebo $\psi$ )**

Výrazy jako „napětí“, „potenciál“, „rozdíl potenciálů“ a „napěťové rozdíly“ je, pokud jde o membrány, možné zaměňovat. Napětí je proto rozsah toho, kolik je zapotřebí elektrické práce k tomu aby se náboj přesunul z jednoho bodu do druhého. Jeden volt je proto definován jako rozdíl potenciálu požadující jeden joule práce k přesunutí náboje o velikosti jeden coulomb. Pro výpočet napětí je potřeba referenční bod, většinou je to bod daleko od membrány a je definovaný jako bod s nulovým potenciálem (GENNIS, Robert B. , 1989).

#### **3.3. Proud, ( I )**

Jeden ampér je definován jako proud jednoho coulombu za jednu sekundu. Ampér je tedy míra toku náboje. U buněčných membrán proud určuje množství iontů prošlých skrz membránu.

### **3.4. Rezistance (R)**

Míra snadnosti nebo naopak obtížnosti průchodu proudu mezi dvěma body. Tuto průchodnost definuje Ohmův zákon.

$$R = U/I$$

Rezistance je měřena v ohmech ( $\Omega$ )

### **3.5. Měrný odpor ( $\rho$ )**

Měrný odpor je rezistance vztažená k jednotkovému průřezu a jednotkové délce prostředí, kterým prochází proud, a je užívána u homogenních materiálů, jako je solný roztok. Může být použit k odhadu proudu iontů skrz vodné kanály skrz membránu. Měrný odpor je rezistance aktuálního proudu mezi dvěma elektrodami o ploše  $1\text{cm}^2$  vzdálené od sebe  $1\text{cm}$ . Jeho jednotkou jsou ( $\Omega\text{-cm}$ ). Rezistance mezi dvěma elektrodami může být proto počítána pomocí měrného odporu mezi elektrodami, jejich plochy  $A$  a jejich vzdálenosti  $X$ .

$$R = \rho X/A$$

### **3.6. Kapacita, (C)**

Oddělení náboje mezi dvěma body je schopné vytvořit potenciálový rozdíl. Oddělit náboje může například dvojlipidová membrána. Kapacita je míra toho, jaké množství náboje je potřeba k vytvoření rozdílu napětí.

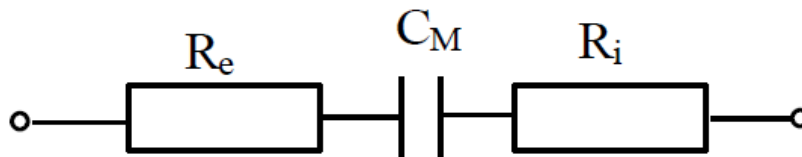
$$C = Q/V$$

Kde  $Q$  je množství náboje na každé straně membrány, kladné na straně jedné a záporné na straně druhé.  $V$  je vytvořený rozdíl napětí. Kapacita je měřena v jednotkách faradů. Je to důležitá elektrická vlastnost membrány, protože uvádí jak velký náboj je potřeba převést z jedné strany na druhou k vytvoření existujícího rozdílu napětí. Typická kapacita je kapacita na jednotku plochy a závisí na množství separovaného náboje na jednotku plochy membrány.

V nejjednodušším pohledu, dvojvrstvá membrána může být elektricky modelována jako tenká destička z nevodivého materiálu oddělující dva vodné roztoky. Membrána vystupuje tudíž jako jednoduchý paralelní deskový kondenzátor, kde náboj může být vybudovaný na rozhraní obou vrstev membrány. Kapacita membrány závisí pouze na vzdálenosti mezi dvěma nabitými povrchy ( $d$ ) a na dielektrické konstantě ( $\epsilon$ ) materiálu mezi nimi (v případě lipidové dvojvrstvy to jsou uhlovodíky).

$$C = \epsilon\epsilon_0 A/d$$

Kde  $\epsilon_0$  je nazýváno permeabilita vakua a její hodnota je  $8,85 \times 10^{-12}$  coulomb  $V^{-1}m^{-1}$ . Pro fosfolipidovou dvojvrstvu a pro biomembrány je měřená hodnota specifické kapacitance (*jímavost, kapacitní odpor*) podobná:  $1\mu F/cm^2$ , tato hodnota koresponduje s dielektrickou konstantou 2 a vzdáleností okolo  $25 \text{ \AA}$ . Zatímco kapacitance biomembrán je čistě určená vlastnostmi lipidové dvojvrstvy, resistance aktuálního proudu je závislá na typu a počtu obsažených iontových kanálů, a tato hodnota je v mnoha rozdílných membránách rozdílná (GENNIS, Robert B., 1989).



Obr. 3 : Náhradní obvod buňky, při aplikaci elektrod na obou stranách membrány. ( $R_e$ ) resistance media, které je na externí straně membrány, ( $C_M$ ) kapacita vytvořená na buněčné membráně, ( $R_i$ ) resistance media na interní straně membrány (ADAMEC, Ondřej a Martin AUGUSTYNEK, 2010).

Nyní můžeme zhodnotit celkový elektrický potenciál energetického profilu membrány. Celkově je zde mnoho faktorů, které přispívají k množství práce, která je potřeba k přemístění náboje vzdáleného od membrány, na membránu a poté do středu dvojvrstvy. Tyto faktory jsou:

Práce potřebná k přemístění iontu mezi medii, které mají rozdílnou dielektrickou konstantu, například z vodné fáze dovnitř membrány.

Dipólový potenciál, pravděpodobně nejvíce ovlivněn orientací ester-karbonylů na fosfolipidové molekule.

Povrchové napětí, díky nabitým skupinám na povrchu membrány.

Trasmembránový potenciál, vytvořený buďto protein-zprostředkovanou nebo nezprostředkovanou iontovou propustností vytvářející rozdělení náboje na dvojvrstvě.

### **3.7. Práce potřebná k přemístění iontu dovnitř dvojvrstvé membrány**

Iont ve vodě je stabilizovaný aktivními interakcemi dipólů molekul vody, hydratační energie. Přemístit iont z vody do středu membrány je nepříznivé z důvodu ztráty hydratační energie. Nejvíce úspěšný model, který toto kvantifikuje je Bornův model, který přináší vysvětlení pro práci, která je potřeba k přenosu iontu o náboji  $q$  a vzdálenosti  $r$ , z media s dielektrickou konstantou  $\epsilon_2$  do media s dielektrickou konstantou  $\epsilon_1$ .

$$W_b = \frac{q^2}{2r} \left( \frac{1}{\epsilon_1} - \frac{1}{\epsilon_2} \right)$$

Dielektrická konstanta vody ( $\epsilon_2$ ) je 80. Hodnota často používaná pro vnitřek membrány je  $\epsilon_1 = 2$ , je to hodnota uhlovodíkových molekul. Pro iont s mocností  $Z$ , může být tato rovnice zjednodušena na  $W_b = (81Z^2/r)$  kcal/mol. Takže pro jednomocný iont

s poloměrem  $2\text{Å}$  je práce přenosu iontu do membrány rovna  $40\text{kcal/mol}$ . Tato hodnota nám potvrzuje, že lipidová dvojvrstva je pro ionty velice účinnou bariérou bránící v jejich pohybu (GENNIS, Robert B. , 1989).

### **3.8. Vnitřní dipólový potenciál**

Experimentální výsledky i teoretické předpoklady ukazují, že dipóly orientované na povrchu membrány mají za následek vytvoření potenciálu o velikosti  $+240\text{mV}$  ve středu membrány. To je ekvivalentní příspěvku volné energie o velikosti okolo  $5,5\text{ kcal/mol}$ , favorizující anionty.

Pro malé ionty jako je  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  profil elektrického potenciálu ukazuje, že membrána je při průchodu více propustnou bariérou pro anionty než pro kationy. Nicméně bariéra je pro malé anionty a kationty stále velká a výsledný koeficient propustnosti je velice malý.

### **3.9. Potenciál na povrchu membrány**

Potenciál na povrchu membrány je ve většině případů záporný, obecně díky přítomnosti kyselých fosfolipidů. Typicky 10-20% membránových lipidů je záporně nabitých – anionických. K negativnímu náboji ale také přispívají jiné membránové komponenty, například některé proteiny (GENNIS, Robert B. , 1989).



## **4. Transmembránový potenciál**

### **4.1. Charakteristika transmembránového potenciálu**

Rozdíl elektrického potenciálu mezi jednou a druhou stranou membrány, který existuje téměř u všech buněk, nazýváme membránový potenciál. Za vytvoření a následné změny tohoto elektrického potenciálu jsou zodpovědné ionty, které jsou buď pozitivně (kationty) nebo negativně (anionty) nabité. Membránový potenciál je tudíž řízen propustností membrány pro specifické ionty. (ALBERTS, Bruce., 1998)

Tok iontů, které proudí skrze iontové kanály ven nebo naopak dovnitř buňky, je měřitelný jako elektrický proud (KANDEL, Eric R., 2000). Hromadění iontů na jedné straně membrány je poté měřitelné jako akumulace elektrického náboje neboli membránový potenciál (ALBERTS, Bruce., 1998).

Žádný druh iontu nemá stejnou koncentraci uvnitř a vně buňky. Rozdíly v koncentracích na vnitřní a vnější straně membrány najdeme i mezi nejhodnějšími ionty. Vně buňky jsou více koncentrované ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$ , naproti tomu ionty  $\text{K}^+$  a organické anionty ( $\text{A}^-$ ) jsou více koncentrované uvnitř buňky. Organické anionty představují především aminokyseliny a proteiny (KANDEL, Eric R, 2000).

Záporné náboje organických molekul nacházejících se v buňce jsou z velké části vyrovnávány  $\text{K}^+$ , převažujícím kladným nábojem v buňce. Výsledná vysoká vnitrobuněčná koncentrace  $\text{K}^+$  je z části vytvářena sodno-draselnou ATP-ázou, která aktivně čerpá  $\text{K}^+$  do buňky. To vede k velkému rozdílu koncentrace  $\text{K}^+$  na jedné a na druhé straně membrány, uvnitř buňky je proto mnohem vyšší koncentrace  $\text{K}^+$  iontů než v okolí buňky. Plasmatická membrána ale také obsahuje řadu  $\text{K}^+$ -kanálů, známých jako výtokové kanály. Tyto kanály se bez ohledu na stav uvnitř buňky přepínají z otevřeného do zavřeného stavu a naopak. Když jsou otevřené, tak umožňují volný pohyb  $\text{K}^+$ . V klidové buňce jsou hlavními otevřenými iontovými kanály v plasmatické membráně a zajišťují větší průchodnost plasmatické membrány pro  $\text{K}^+$  ve srovnání s ostatními ionty. Ionty  $\text{K}^+$  se snaží proudit těmito kanály ven z buňky po svém strmém koncentračním gradientu. Ale každý přenos kladného náboje do okolí zmenšuje kladný náboj uvnitř

buňky, to vede až k tomu, že klesající náboj zastaví proud  $K^+$  ven z buňky (ALBERTS, Bruce., 1998).

## 4.2. Klidový membránový potenciál

Oddělením změn probíhajících na obou stranách buněčné membrány se vytvoří výsledný klidový membránový potenciál.

Buňka, která viditelně využívá změny membránového potenciálu je například buňka neuronová neboli neuron. Každá taková buňka má odlišné separované náboje na obou stranách membrány. Udržení rozdílných nábojů je realizováno pomocí difosfolipidové membrány, která blokuje difusi iontů. Membránový potenciál je definován jako rozdíl potenciálu, který je na vnitřní straně membrány  $\psi_{in}$  a potenciálu na vnější straně membrány  $\psi_{out}$  (ALBERTS, Bruce., 1998).

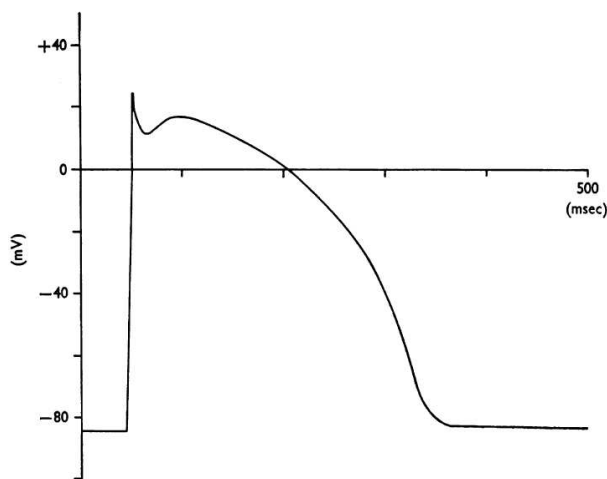
$$\Delta\psi = \psi_{in} - \psi_{out}$$

Když je buňka v klidu, nazývá se její potenciál klidovým. Protože podle konvence je potenciál vně buňky definován jako nula, je klidový potenciál totožný s vnitřním potenciálem. Jeho obvyklá hodnota u neuronů se pohybuje mezi -60mV až -70mV. Základem k vytvoření elektrického signálu jsou změny tohoto klidového potenciálu, zapříčiněné otevíráním a zavíráním iontových kanálů.

Směr proudu je definován jako směr pohybu pozitivního náboje. Kationty se pohybují ve směru výsledného elektrického proudu, aniony se pohybují obráceným směrem. Kdykoli nastane proud iontů ven nebo dovnitř buňky, naruší se klidový potenciál ustavený na membráně a změní se polarizace membrány. Pokles množství separovaných nábojů vede k méně negativnímu membránovému potenciálu, což je též nazýváno **depolarizace**. Zvýšení separace nábojů vede ke zvýšení negativity membránového potenciálu, zvanému **hyperpolarizace**.

Když se depolarizace přiblíží ke kritické mezi zvané **prahové napětí**, odpověď buňky může být velice aktivní. Reakce na hyperpolarizaci membrány je skoro vždy pasivní, ale depolarizace může vést k otevírání napěťově řízených iontových kanálů, které při prahovém napětí produkují **akční potenciál** (viz. níže) (ALBERTS, Bruce., 1998, KANDEL, Eric R, 2000) .

**Akční potenciál** je tedy způsobený otevřením napěťově řízených kanálů. Těmito kanály putuje obrovské množství iontů (především  $\text{Na}^{2+}$ ), které způsobí velice rychlou, ale krátkodobou změnu v elektrickém membránovém potenciálu buňky, dochází tak k extrémní depolarizaci. Rovnovážný potenciál je ale rychle obnoven (BEELER, G. W. a H. REUTER. 1977).



Obr. 4. Záznam akčního potenciálu na membráně neuronu. Při otevření napěťově řízených kanálů zde dochází k extrémní depolarizaci membrány, která je ale rychle, díky funkci  $\text{K}^+$ ATPázy, vrácena na původní hladinu membránového potenciálu (BEELER, G. W. a H. REUTER. 1977).

### 4.3. Rovnovážné podmínky

Jestliže je membrána je propustná pro určité ionty (např.:  $\text{Na}^+$ ) a nepropustná pro ostatní, potom bude difúzní potenciál zjištěný pomocí poměru logaritmu rozdílu koncentrace propustných iontů na obou stranách membrány. Probíhá iontová difuze přes membránu, ale přitom se vytváří separace náboje. Rozdíl potenciálů je generován právě opačným směrem než je iontová difuze skrz membránu. Množství odděleného náboje odpovídá generovanému existujícímu transmembránovému potenciálu  $\Delta\psi$  a může být vypočítán pomocí membránové kapacity (*jímavost, kapacitní odpor*). Transmembránový potenciál  $\Delta\psi$  hodnoty 100mV odpovídá ekvivalentu hustoty náboje asi 1 z 250 fosfolipidových molekul. Je proto zjevné, že je efekt na hustotu náboje na membráně malý.

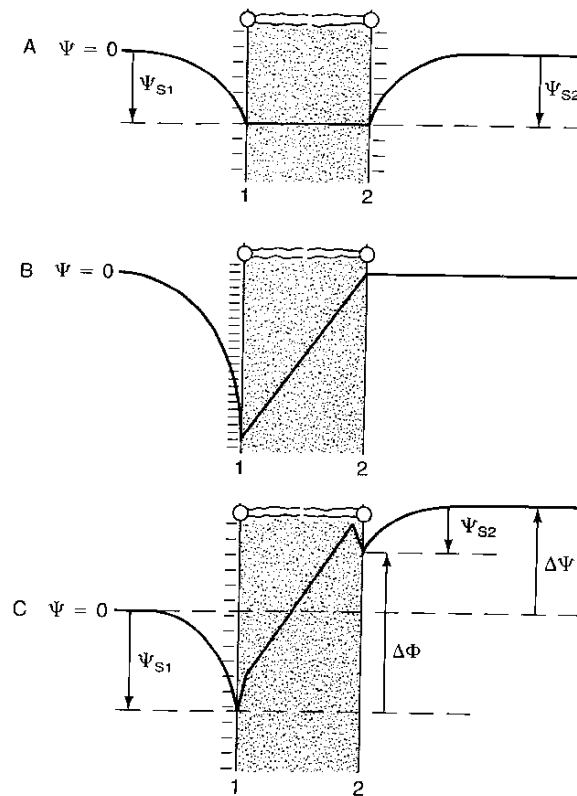
Rovnováhu transmembránového potenciálu  $\Delta\psi$  udává **Nernstova rovnice**:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{FZ} \cdot \ln\left(\frac{c_o}{c_i}\right)$$

Tato rovnice je použitelná jakoukoli propustnost iontu o mocenství  $Z$  ( $Z=1$  je hodnota rovna  $\text{Na}^+$ ).  $C_o$  je koncentrace iontu vně buňky  $C_i$  je koncentrace iontu obsažená uvnitř buňky. V biomembránách je propustnost určena pomocí otevírání specifických iontových kanálů. Experimentálně je možné zvýšit iontovou propustnost použitím specifických nosičů náboje jako je valinomycin ( $\text{K}^+$ ).

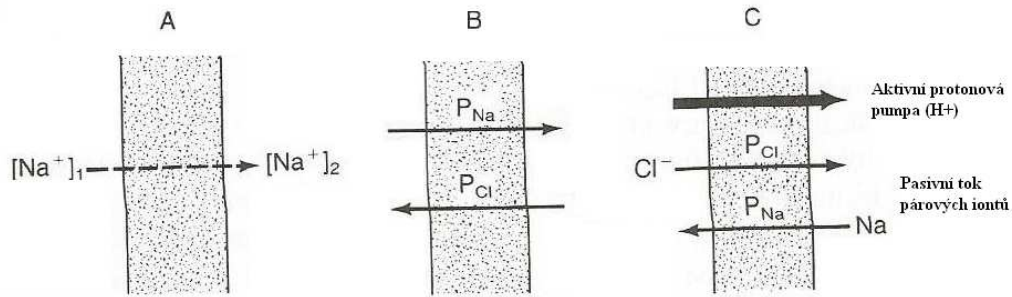
Nernstova rovnice vyjadřuje rozdíl v elektrických potenciálech, který brání difusi iontů podél koncentračního gradientu.

Transmembránový potenciál je tedy definovaný jako rozdíl potenciálů dvou vodných fází separovaných membránou. Na následujícím obrázku (Obr. 5.) je znázorněn vztah mezi transmembránovým potenciálem ( $\Delta\psi$ ) a potenciály na povrchu membrány ( $\psi_{S1}, \psi_{S2}$ ).



Obr. 5: Schéma některých případů profilů potenciálů na membráně. Je zde dobře viditelný efekt nabitého povrchu ( $\psi_{s1}$ ,  $\psi_{s2}$ ) a transmembránový potenciál ( $\Delta\psi$ ). (A) Membrána se stejnou hustotou negativního náboje na obou stranách membrány, ale nevyskytuje se zde žádný transmembránový potenciál. (B) Membrána s velkou hustotou náboje na jedné straně, ale žádný náboj na straně druhé. Je zde patrný rozdíl potenciálů mezi stěnami, ale není zde opět žádný transmembránový potenciál mezi oddělenými roztoky. (C) Rozdíl transmembránového potenciálu na membráně, na které je z jedné strany záporný náboj a na druhé straně náboj nulový. V tomto případě profil potenciálu, zahrnuje také dipólový potenciál uvnitř membrány, který vytváří potenciál uvnitř membrány více kladně nabitý a také na každé straně pro anionty vytváří dvě lokální minima. Rozdíl potenciálů na stěnách membrány je znázorněn jako  $\Delta\Phi$  (GENNIS, Robert B., 1989).

Potenciálový rozdíl mezi dvěma membránovými stěnami ( $\Delta\Phi$ ), může být odlišný od  $\Delta\psi$ , díky nesymetricky rozloženému náboji na obou stěnách.  $\Delta\psi$  je také nazýván jako klidový potenciál, to je rozdíl napětí, který je možné měřit například pomocí páru elektrod.



Obr. 6: Nákresy způsobů, kterými může být transmembránový potenciál generovaný. (A) Membrána propustná pouze pro jeden iont. Její difúzní potenciál může být vypočítaný z Nernstovy rovnice. (B) Ustálený proud může také generovat transmembránový potenciál. Ten můžeme zjistit využitím Goldmanovy rovnice. (C) Energeticky podporované Iontové pumpy mohou iont přesunout z jedné strany membrány na druhou, ale ostatní ionty musí difundovat skrz membránu v reakci na udržení elektroneutality. Jestliže pohyb párových iontů je dostatečně volný (vysoká propustnost), potom bude celková změna separace náboje a transmembránového potenciálu, generovaná iontovou pumpou, rovna nule (GENNIS, Robert B. , 1989).

#### 4.4. Ustálený difúzní proud iontů

Reálná membrána je ale propustná pro celou řadu iontů. Některé ionty procházejí skrz membránu rychleji než ostatní. V rovnovážném stavu se pak může objevit rozdělení nábojů, a to v důsledku rozdílů koeficientů propustnosti. Rovnice, která popisuje tento stav se nazývá **Goldmanova rovnice**:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K(K^+)_o + P_{Na}(Na^+)_o + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K(K^+)_i + P_{Na}(Na^+)_i + P_{Cl}[Cl^-]_o}$$

Tok iontů bude v takovém případě pokračovat až do té doby pokud se neustaví rovnováha.

## 5. Principy fluorescenční mikroskopie:

Při zkoumání elektrických vlastností membrány se uplatňují také metody, které jako indikátoru probíhajících procesů využívají především optického zobrazování fluorescence. Proto je v této kapitole uvedeno několik základních principů fluorescenční mikroskopie, založené na využití fluorescence.

Fluorescence je jedním ze tří druhů luminiscence, tj. přebytku světelného záření nad tepelným vyzařováním tělesa, způsobeného emisí světla z excitovaných stavů elektronů. Luminiscenci můžeme rozdělit do tří druhů: fluorescence, fosforescence a zpožděná fluorescence.

### 5.1. Fluorescence :

Fluorescence je jev, při kterém dochází k emisi záření z excitovaného singletového elektronového stavu jedním či více samovolnými energetickými přechody základního do stavu. Fluorescence je zaznamenávána jen během excitačního záření a po jeho vypnutí prakticky ihned mizí, doba dohasínání je většinou řádově  $10^{-8}$ s.

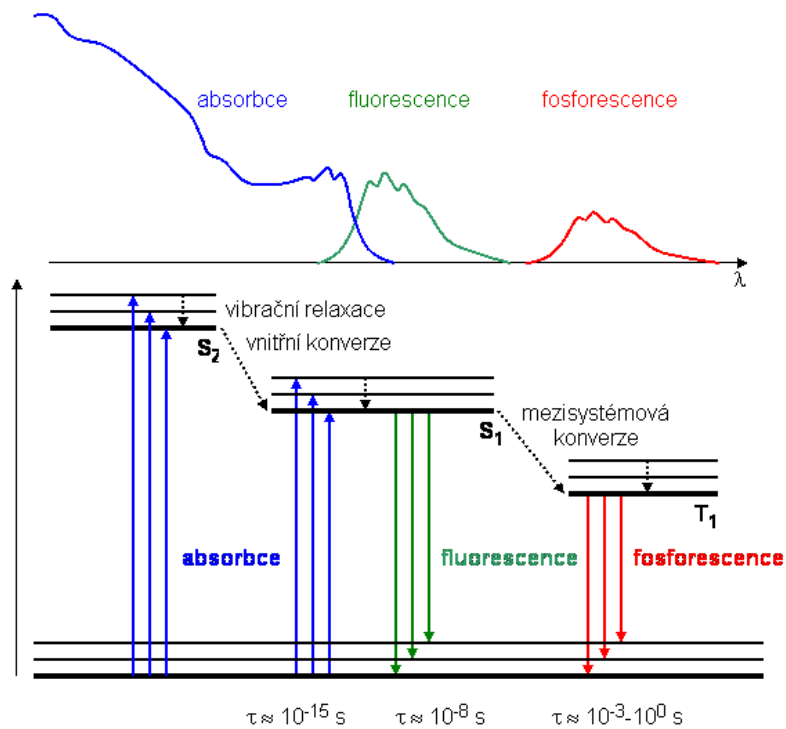
### 5.2 Fosforescence:

Fosforescence je jev, při kterém dochází k emisi záření z excitovaného tripletového elektronového stavu. Fosforescence má prodloužený čas dohasínání než fluorescence a běžně ji nelze sledovat při pokojové teplotě. Doba trvání je mnohem delší než  $10^{-8}$  s, což jsou často milisekundy až sekundy.

### 5.3. Zpožděná fluorescence:

Zpožděná fluorescence je taktéž zářivý přechod (stejně s fluorescencí) ze singletního stavu ( $S_1$ ), ale její doba dohasínání je prodloužená o čas pobytu molekuly v metastabilním tripletovém stavu. Doba trvání je asi  $10^{-4}$ - $10^{-12}$  s.





Obr. 7: Nákres formy Jablonského diagramu složité molekuly, kde je znázorněn zářivý a nezářivý přechod mezi elektrovibračními stavy. V horní části jsou znázorněny tvary absorpčních a emisních spekter ( $\lambda$  – vlnová délka). Po absorpci světelného kvanta excitačního záření, modré šipky, přechází elektron ze singletového stavu  $S_0$  do excitovaných singletních stavů  $S_1$ ,  $S_2$ , ... a tripletových stavů  $T_1$ ,  $T_2$ , ... . Zářivými přechody nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, vibrační relaxace) poté dochází k přechodu molekuly zpět do základního stavu (FIŠAR, Zdeněk, 2009).

#### **5.4. Základní charakteristiky Fluorescence:**

**Intenzita** - počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času

**Spektrální složení** – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí

**Polarizace** – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny

**Doba dohasínání** – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; souvisí s pochody vedoucími k nežádoucí deaktivaci tohoto stavu.

**Koherenční vlastnosti** – vztahy mezi fázemi světelných vln  
(Principy fluorescenční spektroskopie. Cuni.cz [online].2013)

Další důležité vlastnosti, které se pojí s fluorescencí jsou :

**Emisní spektrum** – závislost fluorescence na vlnové délce (energii nebo frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření.

**Kashovo pravidlo** - Před emisí dochází obvykle k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu  $S_1$  (FIŠAR, Zdeněk, 2009).

**Emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace**, protože celkový kvantový výtěžek a doba v excitovaném stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření.

**Stokesův posun** – rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu. Jestliže molekula absorbuje foton, získá tak energii a přejde do excitovaného stavu. Tuto přebytečnou energii může systém vyzářit ve formě tepla nebo formou elektronu. Jestliže má emitovaný foton nižší energii než foton absorbovaný, tak se jejich rozdíl dá nazvat Stokesovým posunem. Ten můžeme detekovat jako foton o delší vlnové délce než byla vlnová délka absorbovaného fotonu.

**Zhášení fluorescence** – proces snižující kvantový výtěžek fluorescence. Při zhášení se fluorofor nevrací z excitovaného stavu do stavu základního zářivě, ale nezářivou cestou v důsledku srážky s molekulou zhášedla. Zhášedlem může být například molekulární kyslík O<sub>2</sub> nebo molekula vody.

**Vybělování (photobleaching)** – snížení výtěžku fluorescence v důsledku nevratné destrukce excitovaného fluoroforu (FIŠAR, Zdeněk, 2009)

## 5.5. Fluorescentní proteiny

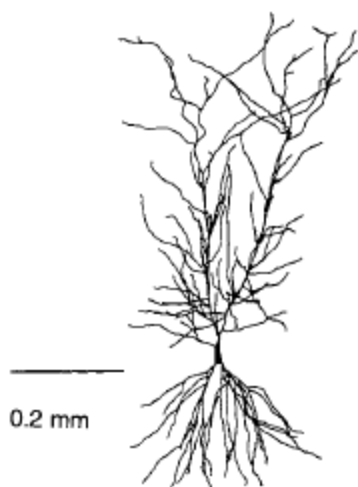
Fluorescentní proteiny jsou základem téměř všech geneticky kodovaných optických sond. Základem jejich struktury je  $\beta$ -souděk složený z jedenácti  $\beta$ -vláken. Středem této soudkové struktury prochází jedna  $\alpha$ -šroubovice, skládá se ze tří aminokyselin (u GFP se jedná o serin-65, tyrosin-66 a glycin-67) ty navzájem spontánně reagují, za vytvoření fluoroforu. Ve středu  $\beta$ -soudku je fluorofor chráněn před molekulami vody, které by jinak zhášely jeho fluorescenci. Substituce některé ze tří aminokyselin (např. glycinu za serin, nebo tryptofanu za tyrosin) vedou ke změnám v optických vlastnostech fluoroforu, jako např. v excitačních a emisních spektrech (TSIEN, R.Y. , 1998, DIVOKÝ Karel, 2011).

Molekula fluoroforu má také zajímavé optické vlastnosti mezi které patří především rozdílná fluorescence v závislosti na orientaci dopadajícího lineárně polarizovaného světla.

## **6. Rozdílné přístupy pro zobrazování membránového potenciálu**

Membránový potenciál lze sledovat v různých přiblíženích, od největšího (části buněk) až po nejmenší (sledování dějů probíhajících například v celém mozku obratlovců).

### **6.1. Zobrazení části buňky**



Obr.8: Jediná pyramidální kortikální nervová buňka. Světelný signál z těla neuronu nebo z okolních dendritů a axonu je přijímán fotodiodou. Každý pixel této fotodiody pak snímá světelný signál jen z malé oblasti těla neuronu nebo okolních dendritů. Optická měření membránového potenciálu poskytují informace o tom, jak neuron převádí synoptický vstup akčního potenciálu na vrcholový výstup (ZOCHOWSKI, Michal. a kol., 2000).

Jestliže chceme pochopit, jak náš mozek pracuje, musíme porozumět základním procesům a biofyzikálním vlastnostem jednotlivých neuronů a způsobu jakým dokáží neurony zpracovat informace. Během posledních 20 let došlo s vývojem nových měřících technik, které dovolují více přímý výzkum jednotlivých nervových buněk,

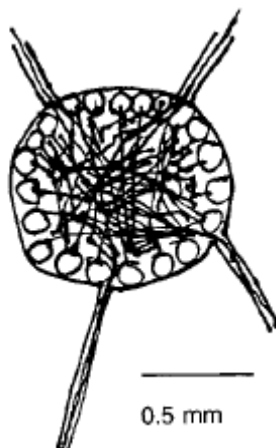
k širokému rozpoznání, že na membránách dendritů nervových buněk centrální nervové soustavy obratlovců se vyskytují aktivní napěťově řízené kanály pro ionty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{K}^+$  (STUART a SAKMANN, 1994 ). Důležitým důsledkem bylo proto zjištění, že regionální elektrické vlastnosti nervového procesu budou mimořádně komplexní, dynamické a bez detailního měření nebude možné předpovědět nervovou aktivitu.

K získání takového měření by bylo ideální monitorovat zároveň mnoho míst v buňce. Je potřeba zaznamenat například zesílení událostí, jak putují z místa vzniku a jak integrují ve specifickém místě k tomu, aby iniciovaly vznik akčního potenciálu. Kvůli technickým limitacím měření pomocí použití elektrod není možno tohoto cíle dosáhnout u žádného neuronu. Bylo proto nutné vyvinout lepší prostorové zobrazování, které se změní z přímého zaznamenání napěťových impulsů k nepřímému optickému měření. Citlivost optického měření s použitím barviv citlivých na napětí je využito například pro monitorování nervových procesů, jako jsou přímo zesílení signálu akčního potenciálu neuronů obratlovců (ARTIĆ, Srdjan a Dejak ZAČEVIĆ, 1995 ).

Důležité u těchto nepřímých optických metod je relativní hladiny šumu, která je určujícím prvkem při získání kvalitních informací. Pokrok ve snížení hladiny šumu je tedy především založen na nalezení barviva, které poskytuje relativně velkou změnu ve fluorescenci, a pokrok v přístroji, který je efektivně detekovat fluorescenci. Podrobněji jsou vlastnosti optického snímání vysvětleny v následujících metodách zkoumání membránového potenciálu.

Barviva citlivá na napětí, ale mají i nevýhody, jednou z nich je například možná interakce s okolním prostředím. Proto bylo vyvinuta technika měření pomocí fluorescentního proteinu, který je syntetizován přímo v místech, které jsou důležité pro změny napětí. Fluorescentní proteiny, kterých je mnoho druhů, jsou například geneticky kódované přímo jako součást kanálu pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a přímo tedy sledují aktivitu jen jedno děje.

## 6.2. Jednotlivé buňky:



Obr. 9: Nákres řezu skrz ganglium bezobratlých, kde je možné vidět na vnitřní straně stěny kortexu těla nervových buněk a uprostřed mezi nimi je znázorněna síť vláken, kterými se neurony rozvětvují. Zde získávají detektory signál z jednoho nebo malého počtu buněčných těl. Sledováním těchto ganglií je možné pomocí barviva citlivého na napětí získat informace jak je generována neuronová reakce (ZOCHOWSKI, Michal. a kol., 2000 ).

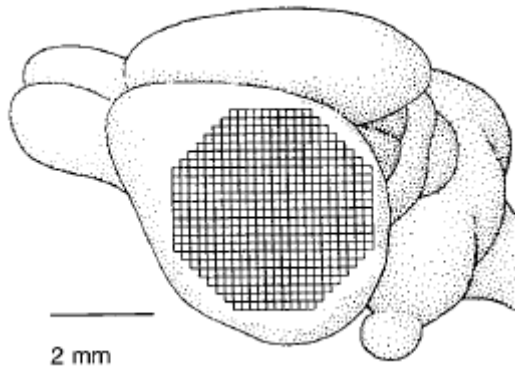
Protože nervové systémy jsou vytvořeny z velkého počtu neuronů a mnoho z nich je aktivních, je tendence o vyvinutí metody, které by byla schopna v dobrém rozlišení zaznamenat všechny akční potenciály například ganglia obratlovců během jejich fungování. Komplexní metody, které by ale dokázaly vysvětlit, jak nervový systém generuje akční potenciál a současně zaznamenávaly aktivitu mnoha podílejících se neuronů, nejsou v současné době vyvinuty. Techniky, které používají mikroelektrody jsou limitovány skutečností, že jsou schopny zkoumat současně jen tolik buněk, do kterých je možno současně aplikovat elektrody.

Přesto informace o aktivitě mnoha buněk zároveň, je základní informací k tomu abychom pochopili, jakou roli hraje jednotlivý neuron v generování reakce a pro pochopení, jak je náš nervový systém organizovaný.

V prvních pokusech při využití barviv citlivých na elektrické napětí na gangliích, které by nahrazovaly v tomto případě nevhodné elektrody, se tyto barviva ukázala jako velmi pokroková, i když nebylo možné monitorovat aktivitu jednoho neuronu. Vyskytovalo se zde totiž velice vysoké fotodynamické poškození a protože procento šumu od úrovně signálu bylo velice malé, docházelo také ke značnému zkreslení signálu. Nyní je už možno, díky pokroku v kvalitě barviv, sledovat aktivitu několika neuronů zároveň viz. následující kapitoly o metodách měření membránového potenciálu (ZOCHOWSKI, Michal. a kol., 2000 ).

Své místo v tomto přiblížení mají i geneticky kódované fluorescentní proteiny. Fluorescentní proteiny mohou podávat informace přímo z procesů, kde jsou syntetizovány, neovlivňují tak okolí a umožňují sledovat větší množství buněk.

### 6.3. Populace buněk (neuronů):



Obr.10: Mozek obratlovců s přiloženým 464- prvkovým fotodiodovým polem. Každý pixel v poli přijímá světlo z tisíců buněk a procesů. Zaznamenaný signál je souborem průměrné změny v membránovém potenciálu těchto buněk a procesů (ZOCHOWSKI, Michal. a kol., 2000 ).

Na rozdíl od předchozích přístupů, kdy jeden detektor zaznamenává signál pouze z jednoho nebo dokonce jen z části neuronu, tato metoda musí být schopna zaznamenat informace ze značného množství neuronů (ZOCHOWSKI, Michal. a kol., 2000 ). Měření elektrické aktivity velkého počtu buněk s velkým prostorovým a časovým rozlišením byl vždy veliký problém. Většina metod zaznamenávající aktivitu mozku a jeho oblastí je proto založena na nepřímých jevech spojených se změnou elektrického potenciálu na membráně buněk. Metody, které jsou v současnosti využívány, jsou shrnuty již v předchozích kapitolách. Mezi nejdůležitější patří metody EEG, fMRI a metoda OIS. Zaznamenání přímo změn v transmembránovém potenciálu buněk zprostředkovávají geneticky kódovaných sondy (SIEGEL, M.S.; ISACOFF, E.Y., 1997). Tento způsob má také za úkol zpracovávat informace z celých oblastí mozku obratlovců, kde jsou obsaženy tisíce neuronů a procesů. Záleží vždy také na citlivosti zobrazení, které přináší opět řadu komplikací.



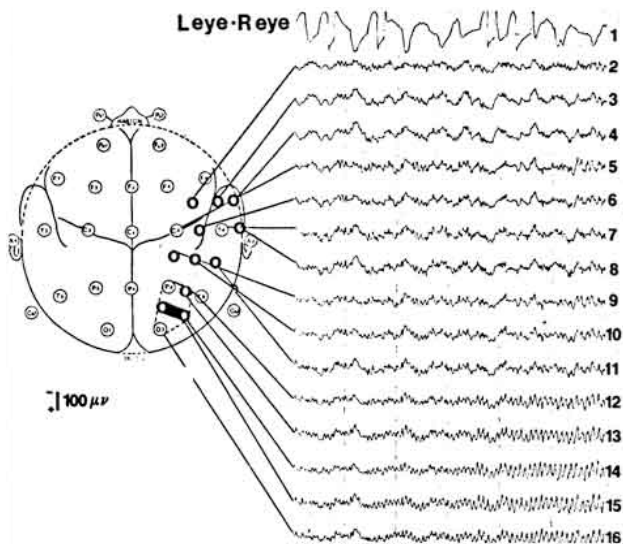
## **7. Zkoumání mozku:**

Mozek nás fascinoval už odnepaměti. Fascinovaní jsme doteď jeho složitostí, množstvím obsažených buněk a buněčných spojení. Udivuje nás také, jak velké množství informací dokáže například lidský mozek zaznamenat a udržet v paměti. Nemáme zatím metody, pomocí kterých se může mozková aktivita a funkce mozku zkoumat do detailů. Všechny tyto metody mají bohužel ale i svá omezení. Tato omezení jsou například dána oblastí, kterou dané metody vyšetřují, malým rozlišením výzkumných metod nebo přímo stavbou mozku. Mezi nejčastější metody výzkumu na úrovni celého mozku slouží metoda elektroencefalografie (EEG), funkční magnetická rezonance fMRI a metoda optical imaging of intrinsic signals OIS.

Tyto metody jsou velice důležité pro využití v současné medicíně, proto jsou zde pro úplnost zařazeny. Všechny jsou ale založeny na principech, které nejsou schopné zaznamenávat jednotlivé akční potenciály neuronů, proto nejsou vypsány v závěrečném srovnání.

### **7.1. Metoda elektroencefalografie (EEG)**

Při této metodě je většinou používáno 18 nebo více elektrod, které jsou umístěny na povrch hlavy. Zde dokáží snímat i malé změny elektrického potenciálu vytvořené neurony ve vnějších vrstvách mozku. Každá elektroda detekuje elektrickou aktivitu asi miliardy kortikálních neuronů (KAISER, David A., 2005). Metoda elektroencefalografie neumožňuje sledování jednotlivých neuronů, to znamená ani hodnoty jednotlivých potenciálních napětí na membránách těchto neuronů.



Obr.11 : Příklad výsledku měření elektrické aktivity mozku pomocí EEG. Na obrázku je znázorněno vyšetření mozku při vestibulárním záchvatu. Změny elektrické aktivity jsou dobře rozeznatelné například v pravém dolním rohu (Tusa RJ, a kol., 1990).

## **7.2. Funkční magnetická rezonance, fMRI (functional magnetic resonance imaging)**

Další metoda pro zobrazování aktivity mozku je založena na principu měření přítomnosti okysličené krve v různých místech mozku. Jakmile dojde k navázání molekuly kyslíku na molekulu hemoglobinu obsaženou v krvi, tak se molekula hemoglobinu začne chovat diamagneticky (FMRI TEAM Brno,2004).

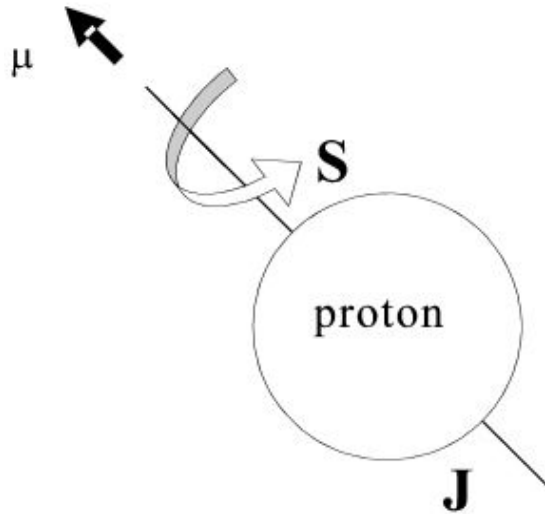
Dojde k vytvoření lokální nehomogenity magnetického pole, které je dále detekováno. Vnější magnetické pole interaguje s jádry atomů, které mají svůj magnetický moment - tento jev se nazývá magnetická rezonance. Jádra atomů například  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  nebo  $^{31}\text{P}$  se chovají ve vnějším magnetickém poli jako magnetické dipóly. Mohou být ve

vysokoenergetickém stavu, kde je jejich magnetický dipól orientován proti vnějšímu magnetickému poli, nebo ho mohou mít orientovaný po směru vnějšího magnetického pole. V tomto případě se nacházejí ve stavu nízkoenergetickém.

Důležitý je přechod mezi těmito stavy, při kterém se vyskytuje absorpce nebo emise energie v radiofrekvenčním pásmu. Poté je frekvence emitované energie, jádru převedenými do excitovaného stavu, přímo úměrná intenzitě vnějšího magnetického pole. Díky tomuto vztahu je možno pomocí MRI detekovat rozdílný obsah různých atomových jader. Kolem jader se pohybují také elektrony, které jsou nositelem elektrického náboje a jsou proto schopny vytvářet také své magnetické pole. Intenzita takového magnetického pole není příliš vysoká, řádově v ppm rezonanční frekvence protonů, a není metodou fMRI detekována (KANDEL, Eric R, 2000).

Molekuly obsažené v lidském těle jsou z významné části tvořeny vodíkem  $^1\text{H}$ . Ten tvoří téměř dvě třetiny atomů celého lidského těla. Při působení vnějšího magnetického pole dojde ke srovnání jejich magnetických momentů. Výsledný vektor tkáňové magnetizace  $M_0$  bude proto orientován ve stejném směru jako vnější magnetické pole.

Aby mohl být tento společný magnetický moment všech jader  $^1\text{H}$  detekován, je potřeba změnit jeho orientaci. Toho lze dosáhnout dodáním určitého množství energie například ve formě elektromagnetických impulsů, označovaných také jako radiofrekvenční impulsy (RF impulsy) (FMRI TEAM Brno, 2004).



Obr.12 : Nákres protonu a jeho magnetického momentu ve směru osy rotace (FMRI Team Brno, 2004).

Metodou fMRI je možno neinvazivně snímat aktivitu celého mozku. Snímání mozkové aktivity ve formě externích elektrod, ale nemá dostačující rozlišovací schopnosti pro zobrazení úrovně jednotlivých neuronů a elektrického napětí na jejich membráně.

### **7.3. Optical imaging of intrinsic signals (OIS)**

Tato méně známá technika vyvinutá v nedávné době, mapuje aktivitu mozku měřením změn v odrazivosti tkáně, vztažených k odehrávajícím se aktivním procesům. OIS je odlišnou alternativou k existujícím metodám zobrazování mozkové aktivity, jako je zobrazení pomocí fluorescentních barviv, kterým se práce věnuje dále.

Výhodou metody OIS je její neinvazivnost a rychlost, to se uplatňuje především u reálného snímání změn při operacích mozku. Tato metoda však zatím nemá potřebné rozlišení pro sledování jednotlivých změn membránového potenciálu na membránách jednotlivých buněk (Laboratory of neuro imaging, 2008).

## **8. Metody zkoumání membránového potenciálu**

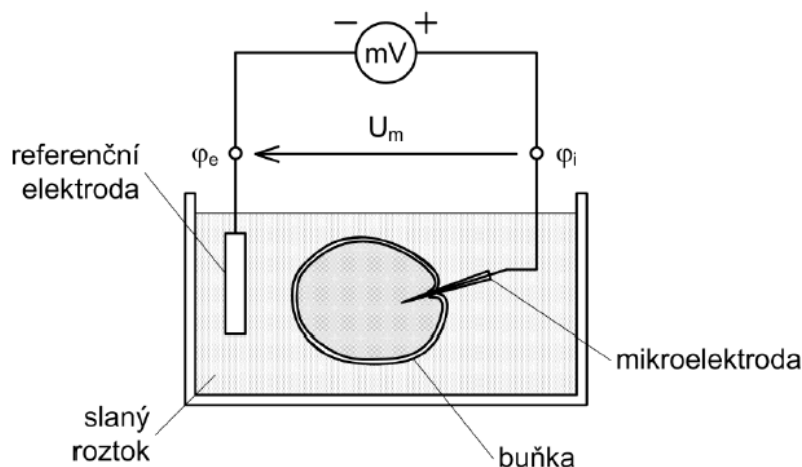
Určující veličinou pro elektrické změny na membráně je změna membránového potenciálu. Na zkoumání velikosti a změn membránového potenciálu bylo vyvinuto mnoho metod. Většina těchto metod se zaměřuje na zkoumání změn napětí v neuronech. Proto i tato práce se z větší části věnuje způsobům měření membránového potenciálu využitelným pro výzkum neuronů.

### **8.1. Metody zkoumání membránového potenciálu bez využití fluorescence**

#### **8.1.1. Buněčná elektrofyziologie**

Buněčná elektrofyziologie je jedna ze základních metod pro zkoumání membránového potenciálu (GENNIS, Robert B. , 1989) a je jednou z nejpoužívanějších metod měření elektrické aktivity neuronu(. Zaznamenání elektrického potenciálu na buněčné membráně tímto způsobem bylo vyvinuto koncem 40 let 20. století.

Buněčná elektrofyziologie využívá elektrod, které sledují elektrické napětí na membráně buňky přímo. Jako elektrody jsou použity skleněné mikropipety, které jsou naplněny koncentrovaným roztokem soli a každá z těchto mikroelektrod je umístěna na jiné straně membrány. Do vnějších konců obou elektrod jsou připevněny vodiče které předávají signál pomocí zesilovače k oscilátoru, který zobrazuje ve voltech velikost membránového potenciálu.



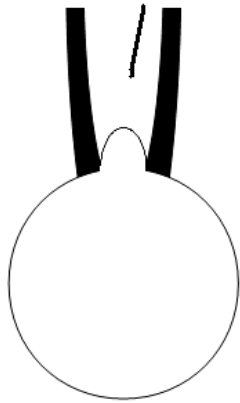
Obr. 13 : Nákres elektrických parametrů, při buněčné elektrofyziologii (ADAMEC, Ondřej a Martin AUGUSTYNEK, 2010).

V případě, že jsou obě dvě elektrody mimo buňku, nedochází k žádné změně elektrického potenciálu. Jakmile se však jedna elektroda dostane za buněčnou membránu do buňky, osciloskop zaznamená změnu v hodnotě elektrického napětí. Tato změna je jednorázová a trvalá, dochází tedy k zaznamenání klidového membránového potenciálu. Ve většině nervových buněk je hodnota klidového membránového potenciálu kolem -65mV. Hodnoty membránového potenciálu mohou být však v čase proměnné.

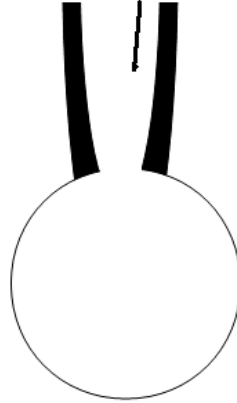
Protože je průměr špičky mikroelektrody velice malý ( $<1\mu\text{m}$ ), může být zavedena do buňky s minimálním poškozením její buněčné stěny (KANDEL, Eric R, 2000).

Na úrovni jednotlivých buněk poskytuje tato metoda velice dobré výsledky. Je umožněno sledování jednotlivých akčních potenciálů, ale i elektrickou stimulaci neuronů. Omezením této metody je obtížné pozorování více než jedné buňky a invazivnost při sledování aktivity neuronů v živých organismech (DIVOKÝ, Karel. 2011).

Připojení elektrody  
na membránu buňky



Zaznamenávání vlastností  
celé buněčné stěny



Obr. 14 : Nákres skleněné elektrody s vloženou vlastní kovovou elektrodou a její přilehnutí na membránu buňky a následné porušení a proniknutí dovnitř buňky. Zaznamenávání vlastností celé buněčné membrány, může být například celkový odpor membrány k průchodu proudu nebo maximální proud částic procházejících skrz membránové kanály. Tato skutečnost je poté uplatněna při měření počtu a druhu membránových iontových kanálů na membráně.

### **8.1.2. Vnitrobuněčné zaznamenávání potenciálu pomocí destiček s nano-jehličkami**

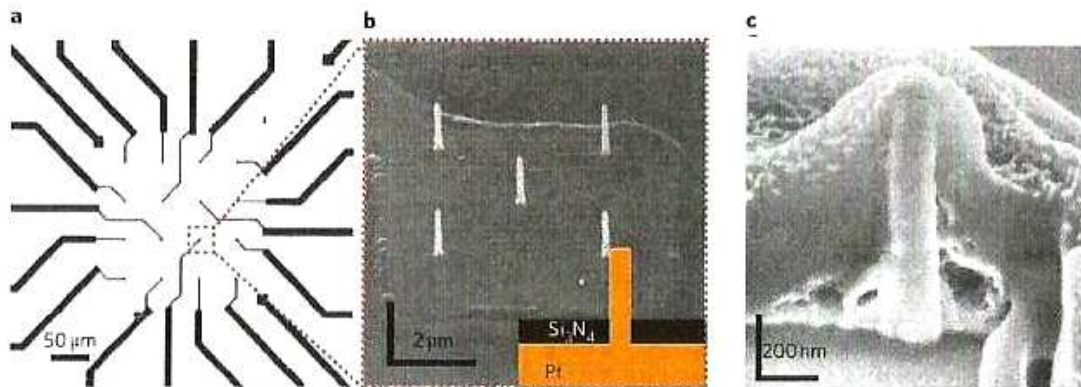
Použití skleněných mikroelektrod má své technické limitace. Jednou z nich je například neschopnost monitorovat více míst najednou (ZOCHOWSKI, Michal. a kol., 2000). Tato slabina by mohla být částečně vyřešena pomocí destiček, na kterých je připevněn větší počet nano-elektrod, schopných zaznamenávat potenciál na různých místech buňky.

Metoda využívá čtyři palce širokou destičku, která je rozdělena na části o velikosti  $20 \times 20 \text{ mm}^2$ . Na každou část jsou připevněny čtyři elektrody, které připomínají jehly. Každá elektroda je vyrobená z platiny a titanu, je vysoká  $1 \mu\text{m}$  a má průměr 150-200nm. Mohou být použity i podklady, které využívají standardní fotolitografické metody. Povrch destičky, ze které vystupují jehly je pokryt izolační vrstvou  $\text{SiN}_4/\text{SiO}_2$ . Zařízení je dokončeno pomocí uchycení čipu na desce s tištěným obvodem a elektricky spojeno s přijímačem.

Metoda je využívána, díky růstu buněk přímo na elektrodách, například k neinvazivnímu měření vlastností akčního potenciálu neuronů po aplikování látek, které blokují iontové kanály pro přenos iontů  $\text{Ca}^{2+}$  ( XIE, Chong, Ziliang LIN, 2012 ).

Výhodou této metody je proměření hodnoty membránového potenciálu za nepřítomnosti pohyblivých elektrod, které by mohly buňky poškodit a také možné proměření potenciálu na různých místech buňky. Nevýhodou této metody může být použití pouze na omezené množství buněk.





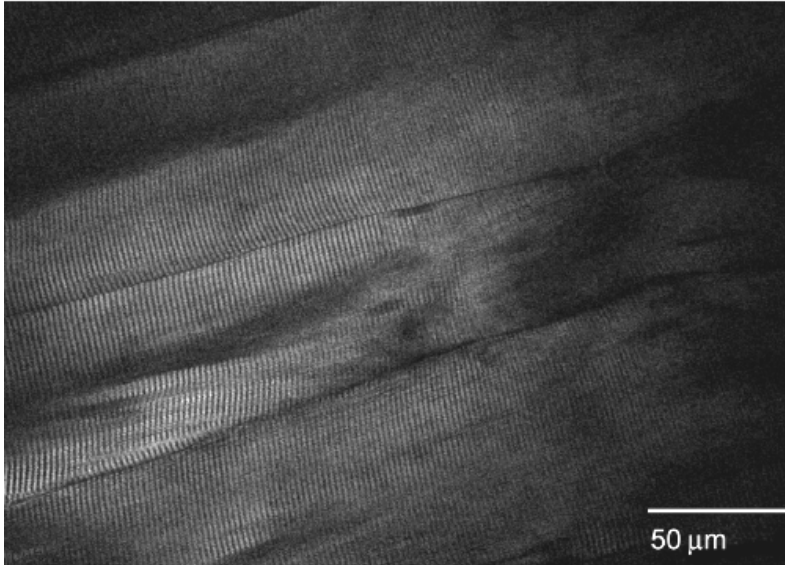
Obr.15: Nanojehličky a jejich interakce s buňkami HL-1. a) Nákres struktury tištěných spojů převádějících signál do detektoru. b) Zobrazení struktury pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu, v pravém dolním rohu je nákres stavby a složení jedné nano elektrody. c), Zobrazení nanoelektrody, která je vnořena do těla buňky. Pořízeno opět pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu ( XIE, Chong, Ziliang LIN, 2012 ).

### 8.1.3. Metoda druhé harmonické emise

Technika druhé harmonické emise je založena na snímání konverze laserového světla na světlo o dvojnásobné frekvenci. K tomu může docházet při průchodu intenzivního světla vysoce polarizovatelnými materiály skládajícími se z centrálně nesymetrických molekul (harmonoforů). Molekulární prostředí v okolí harmonoforu je určující pro účinnost této konverze, tj. např. na elektrické pole v buněčné membráně (transmembránové napětí).

Dříve byla tato mikroskopická technika užívána hlavně k zobrazování endogenních proteinů, například molekul kolagenu. Metoda druhé harmonické emise by mohla být v budoucnu plnohodnotnou metodou pro pozorování změn membránového napětí v neuronech, doposud je ale jen málo vhodných molekulárních sond. Nepříznivým faktorem je také využití vysoce intenzivního světla, které nepříznivě působí na zkoumané buňky (CAMPAGNOLA, Paul J, 2003, DIVOKÝ Karel, 2011).

Touto metodou byly zkoumány například dendritické hroty, které zprostředkovávají většinu dráždivých vstupů v mozku. Bylo tak možno zjistit přímé elektrické funkce hrotů a membránového potenciálu v neuronových buňkách. (NURIYA, Mutsuo. 2006)



Obr. 16 : Svalová tkáň na noze myši, zobrazená pomocí metody druhé harmonické emise (Campagnola, Paul J, 2003).

## **8.2. Metody využívající fluorescenci**

Metody pro sledování membránového potenciálu, které využívají optickou fluorescenci mají potenciál odstranit jednu slabinu metod, které využívaly elektrody. Měření může být vhodné pro studování funkce membrány na úrovni jednotlivých buněk, ale i například pro určení chování skupin neuronů. Optická metoda zkoumání membránového potenciálu se může uskutečňovat za použití různých molekulárních sond, ty mohou být například ve formě barviv citlivých na napětí nebo ve formě geneticky kódovaných sond s přítomností fluorescentního proteinu.

### **8.2.1. Zobrazení membránového potenciálu pomocí barviv citlivých na napětí.**

Optické měření membránového potenciálu využívající molekulární sondy má mnoho předností. Jednou z výhod je možnost měření na mnoha místech současně. To je obzvláště důležité ke studiu nervové soustavy, ve které mnoho částí jedné buňky nebo jednotlivých buněk i jednotlivých oblastí nervového systému aktivních ve stejný okamžik.

Barviva citlivá na membránový potenciál přichycená na membránu mohou mít několik optických vlastností, jako je fluorescence, absorpce, dichroismus, dvojlom, fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET), nelineární druhá harmonická generace nebo Ramanova absorpce. Nicméně drtivá většina vyvinutých aplikací je založena na fluorescenci nebo absorpci.

Syntetická fluorescentní barviva sloužící jako optické indikátory rozdílů membránového potenciálu mají velké využití v buňkách, izolovaných organelách a lipidových vezikulech, které jsou příliš malé na to, aby měření bylo provedeno standardní mikroelektrodou. Tato technika spoléhá na potenciálově závislém rozdělení nabitých lipofilních barviv přes biologickou membránu. Změny v trans-membránovém potenciálu se projevují změnami intenzity fluorescence barviv, které závisí jejich koncentracích na membránách. Tyto změny se často nazývají přerozdělení signálů. Fluorescentní vlastnosti těchto sloučenin dovolují jejich kvantifikaci pomocí spektro-fluorometrických technik a

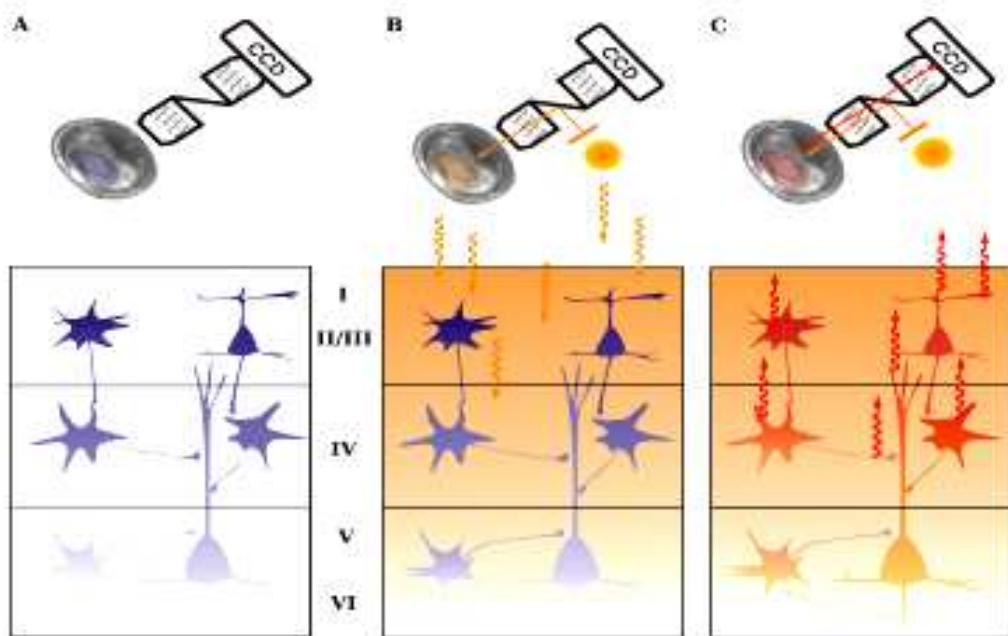
pomocí fluorescenční mikroskopie je možné detekovat jejich vnitrobuněčnou distribuci (Lincoln, V. Johnson., at al., 1981). Distribuce je poté závislá na dějích probíhajících v okolí i v samotné buňce.

Výběr samotného barviva závisí na zkoumaném objektu. Žádné syntetické fluorescentní barvivo není díky svým fyzikálním vlastnostem a interakcím s buněčnými procesy vhodné pro všechny situace. Důležitými vlastnostmi barviva musí být:

- (a) Fotostabilita – to znamená, že dokážou emitovat miliony fotonů před tím, než vyblednou (ztratí schopnost emitovat další fotony).
  - (b) Světlost – vysoký koeficient zhášení a kvantový výtěžek.
  - (c) Vykazování změn intenzity záření v čase, které bude závislé na zkoumaných událostech v buňce.
  - (d) Excitovatelné světlem a emitující světlo o viditelné vlnové délce.
  - (e) Relativně malé velikosti, tak aby svou velikostí způsobila minimální komplikace hostitelské buňce.
  - (f) Barviva musí být také komerčně dostupná ve správné formě, ve které dokáží konjugovat s biomolekulami.
- (SELVIN, Paul R a Taekjip HA., c2008).

Nevýhodou fluorescentních barviv jsou:

- (a) Toxicita – buňky nedlouho po aplikaci barviv hynou.
- (b) Ovlivňování buněčných procesů.



Obr.17: Princip zobrazení membránového potenciálu pomocí barviv citlivých na elektrické napětí ve třech krocích. Obrázky reprezentují mozkovou kůru vrstvy jednotlivých neuronů. (A) Aplikování barviva na povrch mozkové kůry, které proniká do hlubších vrstev. (B) Všechny buňky v mozkové kůře, neurony i ostatní buňky, jsou obarvené barvivem. V situaci, kdy je mozková kůra osvětlena, tak se molekuly barviva začínají chovat jako čidla, které transformují změny v membránovém potenciálu na optické signály. (C) Fluorescentní signál je zachycen pomocí CCD kamery (červená šipka) (Chemla, S a F Chavane. 2010 ).

Fotodynamický efekt (fototoxita) popisuje expozici neuronu k chromoforu a intenzivnímu světelnému svazku, s následným zvýšením membránové permeability. Membránová depolarizace může mít za následek snížení transportu sodíkových iontů do buňky a ovlivnění funkce neuronu. Fotodynamické poškození biologických membrán způsobené touto elektromagnetickou radiací, je úměrné zvýšené intenzity světla, kyslíku a přítomnosti určitých chromoforů. Mechanismus, který je konzistentní napříč měřicími experimenty popisuje, že excitace chromoforu intenzivním světlem, za přítomnosti

kyslíku, generuje volné kyslíkové radikály, které způsobují tukovou peroxidaci a denaturaci bílkovin (ŠVRČEK, Martin, 2010).

Použitá fluorescentní barviva mohou být citlivá na iontovou koncentraci nebo na membránový potenciál. Měřením hodnot membránového potenciálu pomocí citlivých fluorescentních barviv lze například měřit aktivaci nikotinového receptoru (FITCH, Richard W. 2003).

### **8.2.2. Geneticky kódované sondy**

#### **Genetické označení fluorescentními proteiny citlivých na změnu napětí.**

Mnohé nevýhody spojené s používáním syntetických optických sond odstraňují geneticky kódované sondy.

Geneticky kódované sondy bývají nejčastěji konstruovány tak, že k proteinu citlivému na zkoumaný jev je připojen autofluorescentní protein tak, aby změny ve zkoumaném jevu nějakým způsobem ovlivnily optické vlastnosti autofluorescentního proteinu (Suter et al., 2000). Následující odstavce se proto zabývají autofluorescentními proteiny a různými způsoby jejich využití v geneticky kódovaných optických sondách neuronové aktivity.

#### **8.2.2.1. Monitorování kanálů citlivých na změnu elektrického napětí pomocí fluorescentních proteinů**

Fluorescentní proteiny citlivé na napětí (VSFP) jsou velice často využívaným způsobem k monitorování elektrické aktivity buňky.

Jednou ze základních výhod geneticky modifikovaných sond s fluorescentními proteiny je skutečnost, že mají na rozdíl od syntetických barviv obecně velmi nízkou toxicitu. To jim umožňuje využití při *in vivo* zobrazování mozkové aktivity v delším časovém intervale. Znamená to, že je možné opakovat zkoumání mozku té samé myši

několikrát v průběhu dnů i dokonce měsíců. Vizualizace pomocí VSFP může být proto použita v pokusech navržených pro dlouhodobě trvající výzkumy kortikální oblasti (AKEMANN, Walter, a kol. 2010).

Další obrovskou výhodou je skutečnost, že buňky si proteiny syntetizují samy, což umožňuje cílení sondy do přesně definované skupiny buněk. Ale co více, geneticky kódované sondy jsou často specifické pro jeden buněčný proces. To umožňuje výzkum aktivity pouze jednoho buněčného děje a odlišení tohoto zkoumaného procesu od okolních. Uplatnění je například při zkoumání přesného účinku léků, přesného sledování funkce membránových iontových kanálů a změn v napětí na membráně nebo sledování procesů probíhajících uvnitř buňky (sledování principu vnitrobuněčné signalizace G-proteinů).

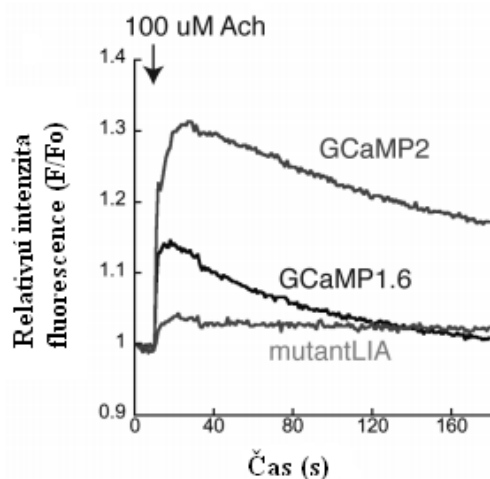
Monitorování elektrické aktivity s použitím fluorescentních referentů má ale také své nejasnosti, například získaný signál je vždy kompromisem mezi vysokým koeficientem činitele šumu a interferencí s provozní integritou zkoumaného systému. Geneticky kódované indikátory vápníku například neodmyslitelně ovlivňují dynamiku vápníku tím, že vápník částečně ukládají a velmi pravděpodobně narušují buněčné procesy svou interakcí se signální dráhou. V kontrastu s konvenčními barvivy citlivými na elektrické napětí, ale nemají geneticky kódované sondy přímé farmakologické a toxikologické účinky.

Důležitou vlastností, která je mnohdy pro geneticky kódované sondy limitující je jejich dynamická stránka. Sondy musí být dostatečně rychlé na to, aby mohly v reálném čase odpovídat na změny napětí. Obecně lze říci, že sondy jsou pomalejší, čím je v na nich obsaženo větší množství fluorescentních proteinů. Fluorescentní sondy, které reagují na změnu elektrického potenciálu změnou své konformace a tím i změnou fluorescentního proteinu, jsou při větším počtu fluorescentních proteinů značně omezeny. Například metoda FRET, při které musejí být v sondě obsažené nejméně dva fluorescentní proteiny, mohou mít díky své velikosti možné zpomalení oproti sondám pouze s jedním fluorescentním proteinem, například metoda zhášení fluorescence (AKEMANN, Walter, a kol. 2010). Metoda zhášení fluorescence je například svou rychlostí reakce velice pomalá a pro rychlé změny na membráně neuronu málo použitelná.

### 8.2.2.2. Metoda zhášení fluorescence:

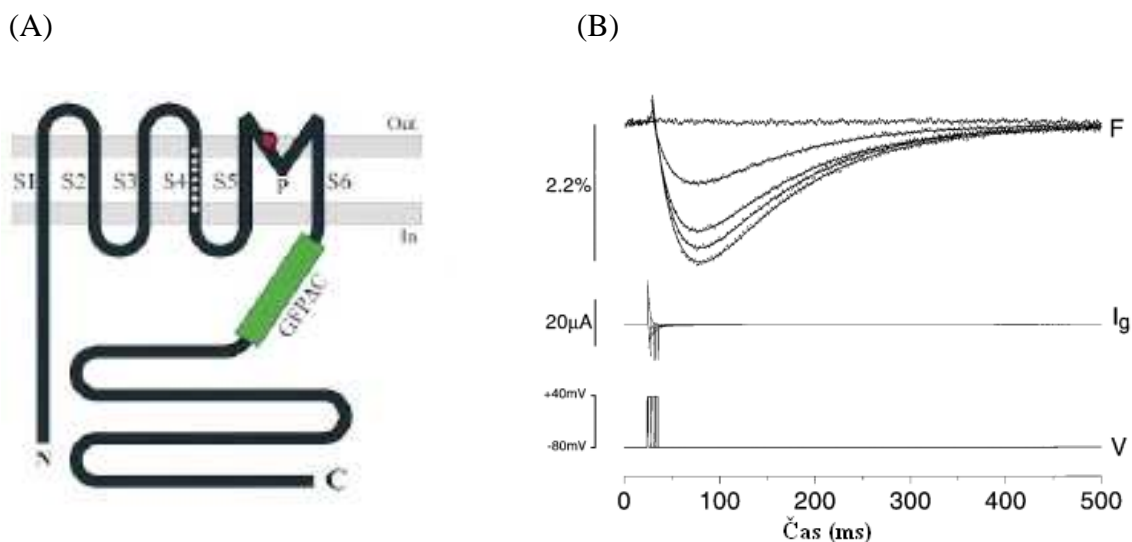
Jedním z procesů užívaných při vývoji molekulárních sond na bázi fluorescentních proteinů je zhášení fluorescence. Genetické sondy navržené na využití zhášení fluorescence, využívají citlivost fluoroforu fluorescentních proteinů na okolní přítomnost zhášedel, především chloridových iontů a molekul vody.

Tato technika je využita například při použití kódované sondy citlivé na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  zvaná GCaMP. Tento konstrukt obsahuje fluorofor zeleného proteinu a upravené konce fluorescentního proteinu. Na první nově vytvořený konec je umístěna molekula calmodulinu, na tu se v případě nízké koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  váže peptid (M13) přichycený na druhém konci proteinu. Tím dochází ke konfirmačním změnám barelu fluorescentního proteinu a pronikání zhášedla k nechráněnému fluoroforu. To je pak příčinou snížení hladiny fluorescence (TIAN, Lin, a kol., 2009).



Obr. 21 : Relativní intenzita fluorescence v závislosti na čase. Jedná se o sledování změny v intenzitě fluorescence, při aplikování  $100\mu\text{M}$  acetylcholinu v čase 20s. To mělo za následek otevření membránových kanálů a průchod iontů  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Nejlepší výsledky v tomto případě má sonda citlivá na změnu koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  - GCaMP2. Ale ani tato molekula není schopna v savčím mozku zkoumat změny v koncentraci vápníku způsobené jedním akčním potenciálem (TIAN, Lin, a kol., 2009).





Obr. 22: (A) Nákres konstruktů FlaSh citlivého na změnu membránového napětí. Zeleně je vyznačeno umístění zeleného fluorescentního proteinu GFP $\Delta$ C Membránový kanál pro ionty K<sup>+</sup>, zodpovědný za reakci na změnu elektrického potenciálu je označen černou barvou. (B) Záznam reakce fluorescence (F) proteinu GFP $\Delta$ C na rychlou depolarizaci membrány(V). (Siegel, M.S.; Isacoff, E.Y., 1997).

Praktická využitelnost tohoto konstruktů je však malá, protože změny fluorescence nastávají pomalu (~100 ms) a nejsou pozorovatelné v savčích neuronech, ale pouze v oocytech.

Konstruktů využívající zhášení fluorescence jsou poměrně jednoduché (např. ve srovnání s konstruktů využívajícími FRET), relativně fotostabilní, a změny fluorescence jsou dobře patrné. Jejich nevýhodou, zejména při vývoji sond umožňujících sledovat jednotlivé akční potenciály, bývá nedostatečná rychlost (TIAN, Lin, at al., 2009, Divoky Karel, 2011).

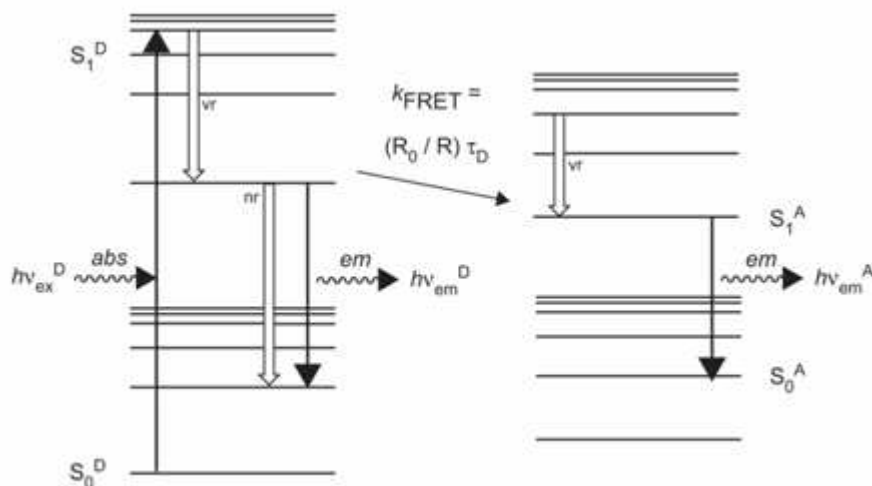
### 8.2.2.3. Metoda FRET

Metoda FRET ( fluorescence resonance energy transfer) má své využití jak při použití s fluorescentními barviv, tak při použití s geneticky kódovanými fluorescentními proteiny. Na principu metody FRET je proto založen velký počet geneticky kódovaných optických sond molekulárních procesů i mnoho barviv.

FRET je nezářivý přenos energie mezi dvěma molekulami. Energie, kterou zachytí molekula donoru, excituje tuto molekulu do vyššího energetického stavu. Z excitovaného stavu se snaží molekula uniknout zpět do stavu základního a zbavit se přebytečné energie, například tepelným vyzářením nebo nezářivým přenosem energie na jinou molekulu. Aby k přesunu energie na druhou molekulu mohlo dojít je potřeba splnit podmínku správného překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru, jejich dostatečně malou vzdálenost (10-100Å) a vzájemnou orientaci přechodových dipólů chromoforů. Molekula donoru tedy při splnění podmínek předá molekule akceptoru energii a ten se excituje do vyšších energetických hladin. Zde molekula ale dlouho nevydrží, klesne zpět do základního stavu a zbaví se přebytečné energie ve formě vyzáření kvanta energie – fluorescence (MIYAWAKI, Atsushi, 2003).

$$K_{DA} = \left( \frac{1}{T_D} \right) \left( \frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6$$

Tato rovnice vyjadřuje pravděpodobnost přenosu rezonanční energie ( $K_{DA}$ ), kde  $T_D$  - je doba dohasínání fluorescence donoru,  $R_0$  - je vzdálenost, která je potřeba pro dokonalý nezářivý přenos energie,  $R_{DA}$  - vzdálenost mezi donorem a akceptorem (FIŠAR, Zdeněk, 2009).



Obr .23 : Princip metody FRET. Nákres je rozdělen do dvou částí, kde každá část představuje jednu molekulu fluorescentního proteinu (donor a akceptor) a její energetické stavy. (STRYER, L., 1978) První molekula je donor, který absorbuje excitační záření o energii  $h\nu_{ex}^D$  a tím dochází k jeho přechodu na excitovaný stav. Jsou li molekuly daleko od sebe nedochází mezi nimi k žádnému přenosu energie a excitovaná molekula donoru přebytečnou energii vyzáří ve formě fluorescence. Jestli že se ale molekuly dostanou do dostatečně blízkosti, dochází k přenosu vibrační energie z jednoho (donor) fluorescentního proteinu na druhý (akceptor). Molekule akceptoru je tedy dodána energie potřebná k excitaci do vyšších energetických stavů  $S_1^A$ , tam ale molekula dlouho nezůstane a pomocí emise fluorescentního záření klesne zpátky na svou základní hladinu  $S_0^A$ . Toto záření jsme schopni detekovat a vyhodnotit.

Metoda FRET umožňuje zkoumat závislosti mezi molekulami proteinů a změny v konformaci proteinů.

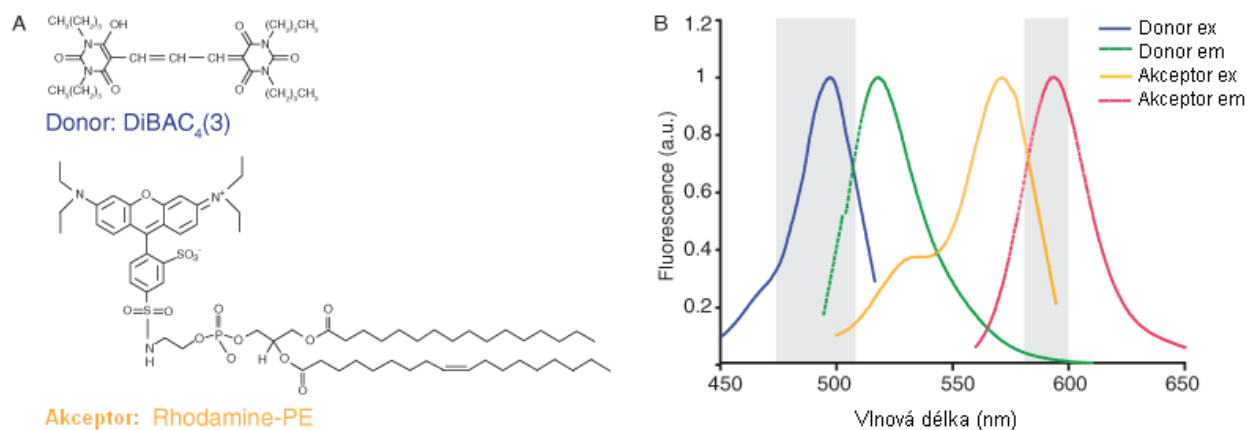
Příkladem může být sonda D3cpV, která je citlivá na zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$ . Při zvýšení koncentrace dojde k přiblížení fluorescentních molekul CFP a YFP, což vede ke zvýšení přenosu energie z CFP na YFP a změnám v emisním spektru (Palmer, A.E., et al., 2006)

Navrženy jsou také proteiny, které sledují membránového napětí. Jedná se především o konstrukt VSFP2.3. Skládá se z dvou potřebných fluorescenčních proteinů

(CFP, YFP) a proteinu, který je citlivý na změny membránového napětí (Ci-VSP) (AKEMANN, Walther , 2010).

Technika využívající FRET má výhodu oproti ostatním metodám ve velké citlivosti vzdáleností mezi molekulou donoru a molekulou akceptoru. Sondy využívající FRET nemají také velkou závislost na vlastnostech okolního prostředí.

Mezi nevýhody můžeme zařadit objemnost molekul, složitost jejich přípravy, přítomnost dvou fluorescentních proteinů nebo barviv a sklony CFP k bělení. Signál FRET také bývá často slabý na pozadí fluorescence CFP a YFP (AKEMANN, Walther , 2010, DIVOKÝ, Karel. 2011).



Obr. 24 : Charakteristika barviv citlivých na membránové napětí použitých jako sondy při výzkumu membrány lizozomu. (A) Molekula DiBAC<sub>4</sub>(3) je v tomto případě donor a molekula Rhodamine-PE je akceptor. (B) Excitační a emisní spektra obou barviv. Důležitý je překryv emisního spektra donoru a excitačního (absorpčního) spektra akceptoru. Šedivé pruhy znázorňují vlnové délky použité pro FRET mikroskopii ( KOIVUSALO, Mirka, a kol., 2011).

#### **8.2.2.4. Metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM)**

Novým způsobem sledování procesů v membránových proteinech je dvoufotonová polarizační mikroskopie (2PPM). Využívá anisotropických vlastností molekuly fluoroforu fluorescentních proteinů (LAZAR, Josef., 2011).

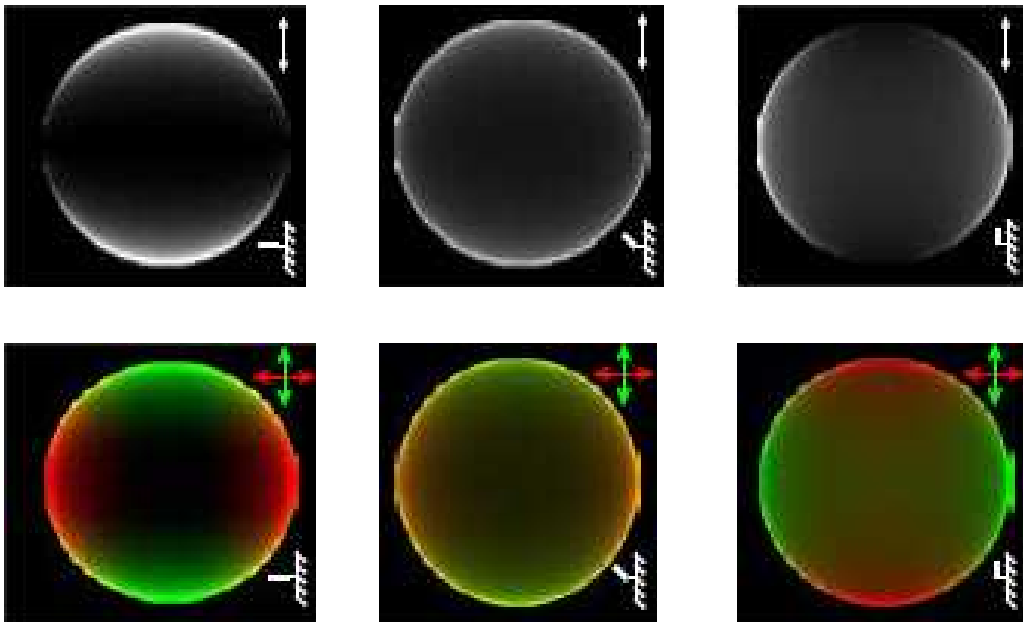
Rychlost absorpce jednofotonové absorpce světla (1P) na molekule je dána druhou mocninou kosinu úhlu mezi vektorem přechodu dipólového momentu (TDM) absorbující molekuly a vektorem elektrického pole excitujícího paprsku. Rychlost absorpce je proto maximální, při orientaci dopadajícího polarizovaného světla, které má rovinu polarizace ve směru vektoru TDM (LAKOWICZ, Joseph R., 2006).

TDM je při dvoufotonové absorpci (2P) tenzorem druhého řádu. Proto není možné uvést jednoduchou závislost rychlosti absorpce na orientaci tohoto TDM. Dvoufotonová polarizace ale zajistí vyšší míru projevu anisotropických vlastností fluoroforů (LAKOWICZ, Joseph R., 2006).

Další vlastností, kterou 2PPM využívá je rozdílná účinnost absorpce světla molekulou, která má definovaný takzvaný lineární dichroismus (LD). Tento LD je tedy vlastnost molekuly různě absorbovat světlo o různých (nejlépe na sebe kolmých) rovinách polarizace. Při použití takového proteinu s těmito vlastnostmi při sledování membránového napětí na membráně, je možné zaznamenávat změny intenzity fluorescence vzhledem ke konfirmačním změnám v těchto proteinech (LAZAR, Josef., 2011, DIVOKÝ, Karel. 2011).

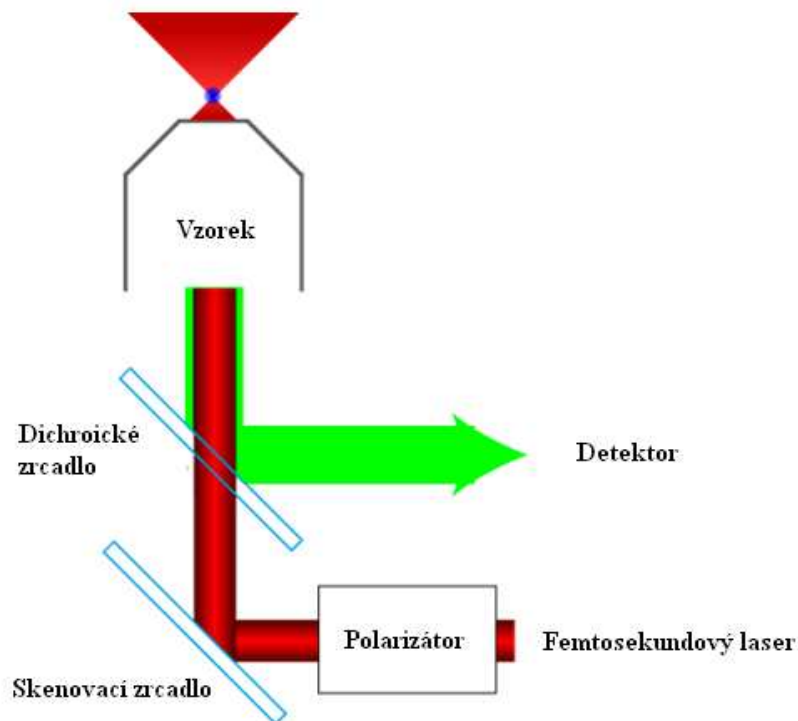
Reálný výzkum probíhá tak, že je potřeba snímat buňku při ozáření excitacího záření o dvou různých, na sebe kolmých, polarizacích. Při získání obrazu fluorescence buňky s aplikovanými proteiny dochází při otočení horizontálně polarizovaného laserového světla na vertikálně polarizované dochází k získání dvou obrazů, každý o jiném rozložení fluorescence. Pro polarizaci takového laserového svazku je použito polarizačního modulátoru, který nám zajistí dostatečnou rychlost ve výměně polarizací. Takovéto rychlé změny polarizace lze poté použít pro osvětlení jednotlivých pixelů obrazu a dosažení tak funkce skenovacího mikroskopu. Výhodou takového snímání je

částečné odstranění nepřesností vycházejících z rušivých pohybů buněk. Vhodný polarizační modulátor byl proto vyvinut v laboratoři Josefa Lazara, Ph.D na Ústavu nanobiologie a systémové biologie v Nových Hradech (LAZAR, Josef., 2011).



Obr. 25: Matematické modely buněk kulovitého tvaru na kterých je ilustrována fluorescence membránového fluorescentního proteinu v závislosti na polarizaci excitujícího záření a orientaci fluoroforu. Šipky v pravých horních rozích odpovídají směru polarizace a následnému zabarvení. V dolním pravém rohu každého modelu je vyznačena orientace fluoroforu vzhledem k buněčné membráně. Lineární dichroismus se projevuje jako přítomnost zelených či červených odstínů a absence žluté (podle DIVOKÝ, Karel. 2011).

Výsledné zobrazení fluorescence s osvětlené rozdílnou polarizací lze následně obarvit, například získané snímky s horizontální polarizací červeně a snímky s vertikální polarizací zeleně. Tyto obrazy lze následně sloučit do jednoho (Obr. 25) a dochází tak k rozlišení orientací jednotlivých fluorescenčních proteinů. Poměr intenzit fluorescence získaných oběma polarizacemi určuje takzvaný dichroický poměr (LAZAR, Josef., 2011).



Obr. 26 : Schéma mikroskopu pro využití 2PPM. Přes polarizátor vstupuje paprsek femtosekundového laseru a pomocí skenovacího zrcadla postupně skenuje vzorek, vždy každý pixel s jednou i druhou polarizací. Exitační záření odchází vrchem mikroskopu, ale vyzářené fluorescentní záření je možné odlišit pomocí dichroického zrcadla umístěného pod vzorkem, pomocí zrcadla se výsledná fluorescence odráží do detektoru, který už zaznamenává pouze fluorescentní záření a jeho změny (LAZAR, Josef., 2011).

V metodě 2PPM je využita mikroskopická technika využívající multi-fotonovou fluorescenci, která byla realizována s nedávným rozvojem extrémně rychlých a vysoce energetických laserových systémů. Protože pravděpodobnost dvou-fotonové excitace je úměrná kvadrátu excitační intenzity, fluorescence může být získána pouze v ohniskovém svazku objektivové čočky, který osvětluje vzorek. Takováto lokalizace emise fluorescence umožňuje tří-dimensionální rozlišení, to samé jako při konfokální mikroskopii, dále se tak redukuje vybělování vzorku. Mimoto, blízké infračervené světlo používané pro dvou-fotonovou excitaci může proniknout hlouběji do vzorku (FURUKAWA, Toshiyuki, 2004).

Využití 2PPM má i jiné uplatnění, její vlastnosti získávat informace z jednotlivých vrstev vzorku s kombinací pevně ukotvených fluorescentních proteinů k buněčné membráně, dokáží získat tří-dimenzionální obraz živé buňky. To znamená že není potřeba buňku krájet na mikrořezy. Dají se tak získávat i informace například o rozmístění membránových kanálů.

Metoda 2PPM v sobě kombinuje výhody, které mají geneticky kódované sondy. To je především aplikace fluorescentních proteinů přesně na místa zkoumání a také netoxikace pro zkoumanou buňku.

Další výhodou 2PPM je její rychlost snímání okolo 200mikrosekund, která může být použita například pro rozlišení mezi aktivovaným a klidovým stavem G-proteinů (LAZAR, Josef., 2011).



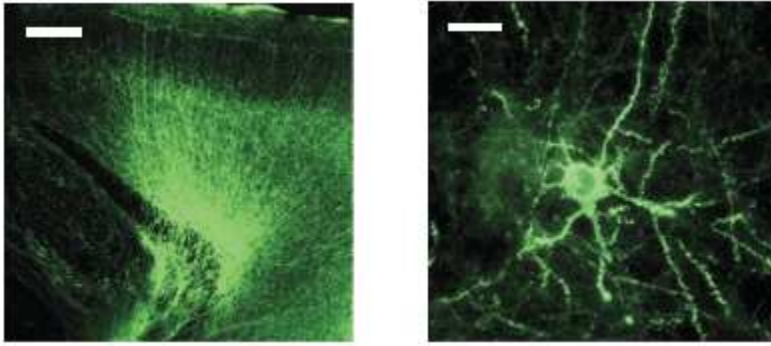
#### 8.2.2.5. Použití mikrobiálního rhodopsinu

Tato nová metoda využívající fluorescentních vlastností mikrobiálního rhodopsinu byla publikována teprve nedávno. Její výsledky ale dávají vědět, že by mohla být spolehlivou optickou metodou při detekci jednotlivých akčních potenciálů.

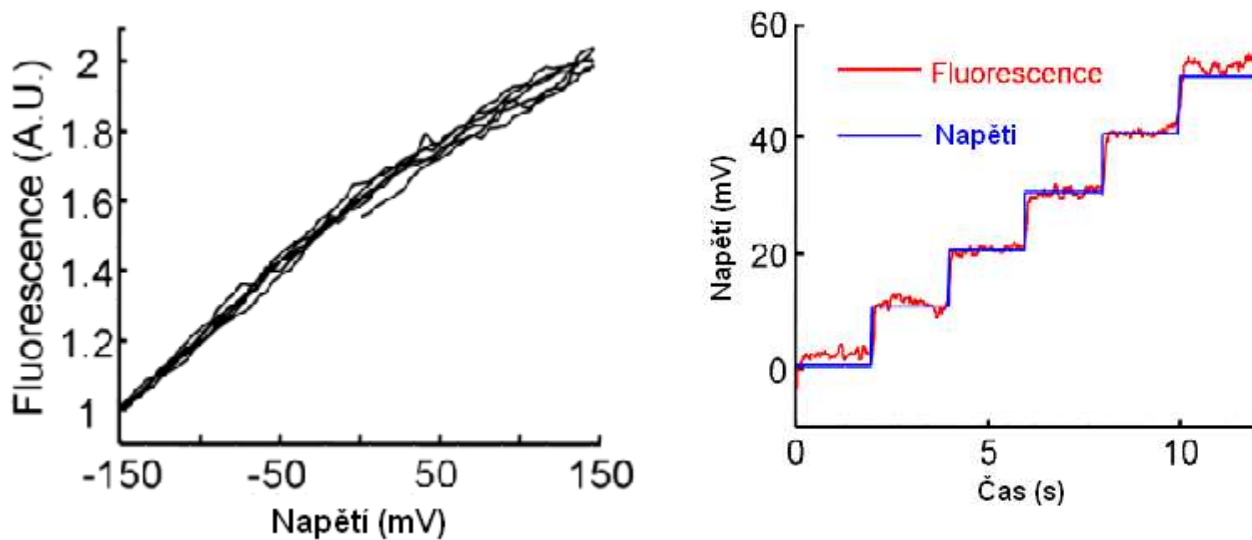
Metoda využívá molekul mikrobiálního rhodopsinu, Archærhodopsin 3 (Arch). Tyto geneticky kódované detektory napětí byly vyexpresovány v napěstovaných hippokampálních buňkách myši. Ukazuje se, že jsou oproti již existujícím indikátorům napětí založených na proteinech přibližně 10x zdokonalené v citlivosti a rychlosti. Dalšími vlastnostmi je téměř lineární dvojnásobné zvýšení jasnosti mezi -150mV a +150mV a rychlý reakční čas, který se pohybuje pod milisekundami. Arch je schopný detekovat jednotlivé akční potenciály s optickým poměrem signálu k šumu >10 (KRALJ, Joel M, 2012).

Vyvinutý byl také konstrukt Arch(D95N), který má oproti divokému kmenu o 50% vyšší citlivost, ale má pomalejší odezvu (41ms) (KRALJ, Joel M, 2012).

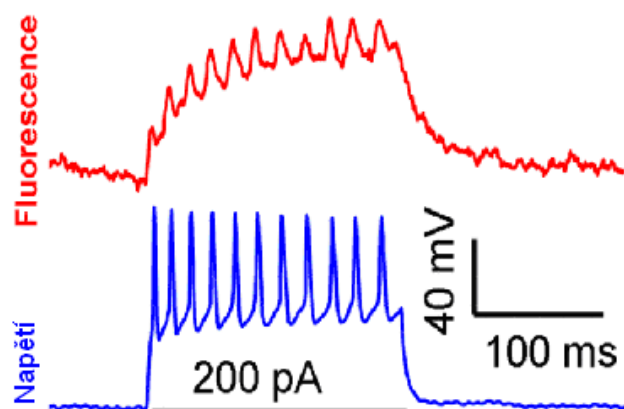
Je zde také možnost použití *in vivo* (například v mozku myši). Pro vložení Arch přímo do myšního mozku je zapotřebí využití žijícího viru kódujícího Arch. Zaznamenávání nervových odpovědí je možné jeden měsíc po aplikaci viru. Arch je v buňce dobře expresovaný a je lokalizovaný na plazmatickou membránu, označuje tělo buňky a probíhající procesy v něm (CHOW, Brian Y., at al., 2010).



Obr. 18: Fluorescentní zobrazení exprese Arch-GFP v myší mozkové kůře. Měření bylo provedeno jeden měsíc po aplikaci živého viru (FCK-Arch-GFP) (CHOW, Brian Y., at al., 2010).



Obr. 19 : Vpravo: Lineární změna fluorescence Arch jako funkce membránového potenciálu. Hodnota fluorescence je zde dělená podle hodnoty při potenciálu -150mV. Vlevo: Reakce konstruktu Arch(D95N) na 10mV změny v membránovém potenciálu (KRALJ, Joel M, 2012).



Obr. 20: Zaznamenání membránového potenciálu (modrá) celé jedné buňky a získaná fluorescence (červená) konstruktů Arch(D95N) během tohoto sledu akčních potenciálů (KRALJ, Joel M, 2012).

Metoda použití mikrobiálního rhodopsinu má mnoho výhod, díky nimž má obrovský potenciál při zobrazování membránového potenciálu. Je schopna zobrazit potenciál jednotlivých buněk, ale také je schopna pomocí viru exprese i v živých organismech (CHOW, Brian Y., at al., 2010). Důležitá je také vysoká citlivost a rychlá odezva na změny v akčním potenciálu (KRALJ, Joel M, 2012).

## 9. Diskuse :

Následující část diskutuje rozdílnost zpracovaných metod měření membránového potenciálu se soustředěním na porovnání výhod a nevýhod jednotlivých metod.

### 9.1. Metody bez využití fluorescence:

#### **Buněčná elektrofyziologie:**

Tato nejstarší metoda je založená na mechanickém dopravení elektrody dovnitř buňky. Využívá tedy jednoduchého elektrického principu, kdy je měřeno napětí mezi dvěma elektrodami na obou stranách membrány.

Výhodou použití této metody je velmi přesné měření vlastností membrány jedné buňky. Nevýhodou může být její omezení právě na měření potenciálu jen na jedné buňce.

#### **Vnitrobuněčné zaznamenávání potenciálu pomocí destiček s nano-jehličkami:**

Metoda vycházející z buněčné elektrofyziologie. Destičky s jehličkami jsou úspěšnější v zaznamenávání informací z více částí buňky najednou. Její nevýhodou je ale opět lokální omezení.

#### **Metoda druhé harmonické emise:**

Velice nadějnou metodou pro měření elektrického potenciálu na větší ploše vzorku s dobrým přiblížením na jednotlivé buňky je metoda druhé harmonické emise. Základním principem je detekce konverze laserového světla na světlo o dvojnásobné frekvenci, které vzniká při průchodu intenzivního světla vysoce polarizovatelnými materiály skládajících se z harmonoforů.

Její výhodou je použití bez vnějších elektrod. Důležité je také měření rozsáhlejších zkoumaných oblastí. Nevýhodou je zatím nedostatek vhodných molekulárních sond. Nepříznivým faktorem je také potřeba vysoce intenzivního světla, které negativně působí na zkoumané buňky.

## 9.2. Metody využívající fluorescence

### **Zobrazení membránového potenciálu pomocí barviv citlivých na napětí:**

Fluorescentní barviva, které jsou schopna reagovat na změny napětí jsou pro svou jednoduchost velice hojně využívány. Jedná se o fluorescentní barviva, která podle svých vlastností reagují s oblastí v buňce.

Jejich výhodou je komerční dostupnost barviv, jednoduchost aplikace a kvalitní výsledky, které nám mohou poskytnout informace jak o jedné buňce, tak o celém souboru. Jejich nevýhodou je však intoxikace vzorku, takže pro využití v živých organismech je jejich použití velmi omezené.

### **Metoda zhášení fluorescence:**

Metoda založená na geneticky kódovaném fluorescentním proteinu, který je přesně zakódován na místo, o kterém má podávat informace.

To odstraňuje nevýhodu fluorescentních barviv, které se rozptýlí po celém vzorku. Jejich výhodou je také nepřítomnost toxických látek, které by ovlivnily buňku. Konstrukty fluorescentních sond jsou tedy použitelné i pro výzkum v déle trvajících procesech. Jsou také relativně fotostabilní a změny fluorescence jsou dobře patrné. Jejich nevýhodou je ale nedostatečná rychlost pro sledování akčního potenciálu.

### **Metoda FRET:**

Tato metoda je založená na rezonančním přenosu excitační energie mezi dvěma molekulami fluorescentních proteinů (donor a akceptor). Jedná se tedy buď o geneticky kódovanou sondu s dvěma fluorescentními proteiny nebo je možné použít fluorescentní barviva. Výběr proteinů nebo barviv je velice důležitý, protože emisní spektrum molekuly donoru se musí překrývat s excitačním spektrem akceptorové molekuly .

Výhodou této metody je možnost pozorovat interakce mezi molekulami proteinů a konformační změny v nich, velká citlivost na změny vzdálenosti mezi donorem a akceptorem a malá závislost přenosu energie na vlastnostech okolního prostředí. Mezi nevýhody patří velikost molekul sond, složitost jejich přípravy, přítomnost dvou

fluorescentních proteinů nebo barviv a sklony CFP k bělení. Signál FRET také bývá často slabý na pozadí fluorescence.

### **Metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM):**

Dvoufotonová polarizační mikroskopie je metoda založená na aplikaci geneticky kódovaného fluorescentního proteinu. Použití dvoufotonového laseru, který je výhodný pro zvýšené množství fluorescence, spolu s rychlým polarizátorem, který mění polarizaci světla dopadajícího na vzorek, dává velice dobré výsledky při zobrazování molekulárních dějů.

Výhodou této metody je netoxikace pro zkoumanou buňku, vysoká citlivost a rychlost snímání okolo 200mikrosekund, která může být použita například pro rozlišení mezi aktivovaným a klidovým stavem G-proteinů. Částečnou nevýhodou může být právě genetické kódování.

### **Použití mikrobiálního rhodopsinu:**

Použití rhodopsinu pro zobrazení membránového potenciálu není příliš rozšířená metoda. Její výsledky jsou ale velice spolehlivé a ukazují na možnou detekci jednotlivých akčních potenciálů i celého souboru buněk. Princip této metody spočívá v molekule rhodopsinu (Arch), která má své specifické fluorescentní vlastnosti.

Reakce na akční potenciál je 10x citlivější, rychlejší a jasnější než jiné metody využívající fluorescenci a není ani toxický. Tuto metodu lze ale také díky možnosti vložení Arch do buněk za pomoci virů aplikovat na pozorování *in vivo*. Použití mikrobiálního rhodopsinu má proto velký potenciál při detekci akčního potenciálu v celém komplexu buněk i v přiblížení na jeden neuron.

## 10. Závěr:

Vytvořený přehled základních metod používaných pro měření elektrického napětí na membráně buňky, je základem pro toho, kdo hledá často nedostupnou českou literaturu k měření elektrického napětí na membránách. Postupně jsou v práci vysvětleny nutné základy pro výzkum membránového potenciálu a základy, které jsou použity pro výzkumné metody. V druhé polovině se práce věnuje samotným metodám, vysvětlení jejich fyzikálního principu, interakce s biologickým vzorkem, příklady využití a jejich výhody a nevýhody použití na různých vzorcích. Nutno podotknout, že metody pro výzkum membránového potenciálu je velice dynamicky se rozvíjející obor. Proto je možné v následujících letech čekat další rozvoj těchto metod. Metody s geneticky kódovanými sondami mají potenciál k tvoření stále dalších citlivějších sond se stále se zlepšujícími optickými vlastnostmi. Fluorescentní barviva, ale také mohou ve svém vývoji jistě hodně pokročit. Je možné očekávat všestranné využití například metody mikrobiálního rhodopsinu, který je schopen velice dobře snímat změny v membránovém potenciálu jednotlivých buněk, ale s použitím virové transfekce i částí živého mozku. Mnoho metod je ale příhodné dokonce kombinovat, například užití dvoufotonového laseru přispívá ke zlepšení intenzity fluorescence fluorescentních proteinů i barviv.

## 11. Seznam použitých zkratk:

**1P** – jednofotonový

**2P** – dvoufotonový

**2PPM**-dvoufotonová polarizační mikroskopie (two photon polarization microscopy)

**Arch** - Archaerhodopsin 3

**CFP** – modrý fluorescenční protein (cyan fluorescent protein)

**EEG** - elektroencefalografie

**fMRI** - metoda magnetické rezonance (functional magnetic resonance imaging)

**FP** – fluorescenční protein (fluorescent protein)

**FRET**- fluorescenční metoda za použití rezonančního přesunu energie  
(Fluorescent resonant energy transfer)

**LD** – Lineární dichroismus (linear dichroism)

**OIS** - Optical imaging of intrinsic signals

**TDM**- přechodu dipólového momentu (transition dipol moment)

**VSFP**- Fluorescenční proteiny citlivé na elektrické napětí (voltage sensitive fluorescent proteins)

**YFP** – žlutý fluorescenční protein (yellow fluorescent protein )



## 12. Seznam literatury

ADAMEC, Ondřej a Martin AUGUSTYNEK. LABORATOŘE BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ, <http://bmeng.vsb.cz>. Elektrické děje v živých organismech: Publikační kit Biomedicínské laboratoře. 2010.

AKEMANN, Walther, Hiroki MUTOH, Amélie PERRON, Jean ROSSIER a Thomas KNÖPFEL. Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nature Methods.*, 2010 roč. 7, č. 8, s. 643-649. ISSN 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth.1479.

ALBERTS, Bruce. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 80-902-9062-0.

ALTENBACH, C. a kol., Transmembrane protein structure: spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science (New York, N.Y.)* c1990, 248(4959), s. 1088-92.

ANDREOLI, Thomas E. *Membrane physiology*. 2nd ed. New York: Plenum Medical Book Co., c1987, xvi, 396 p. ISBN 03-064-2697-8.

ARTIĆ, Srdjan a Dejak ZAČEVIĆ. Optical Signals from Neurons with Internally Applied Voltage- Sensitive Dyes. *The journal of neuroscience*. 1995, 15(2), s. 1392-1405.

BEELER, G. W. a H. REUTER. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J. Physiology*. 1977, č. 268, s. 177-210.

CAMPAGNOLA, Paul J a Leslie M LOEW. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotechnology*., 2003, roč. 21, č. 11, s. -. ISSN 1087-0156. DOI: 10.1038/nbt894.

DIVOKÝ, Karel. *Fluorescentní protein citlivý na elektrické napětí, využívající motorický protein prestin*. České Budějovice, 2011. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

FIŠAR, Zdeněk. Principy fluorescenční spektroskopie. FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH [online]. 2009 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>

FITCH, Richard W. Membrane potential fluorescence: A rapid and highly sensitive assay for nicotinic receptor channel function. *PNAS*. 2003, roč. 100, č. 8.

FMRI TEAM BRNO. Funkční magnetická rezonance [online]. 2004, 2013 [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <http://fmri.mchmi.com/>

FURUKAWA, Toshiyuki. *Biological imaging and sensing*. Berlin: Springer, 2004, xv, 298 p. ISBN 35-404-3898-X.

GENNIS, Robert B. *Biomembranes: molecular structure and function*. New York: Springer-Verlag, c1989, xvii, 533 p. ISBN 03-879-6760-5.

CHEMLA, S a F CHAVANE. Voltage-Sensitive Dye Imaging: Technique review and Models. *Journal of Physiology-Paris: Elsevier*. 2010, roč. 104, 1-2, 40–50.

CHOW, Brian Y., at al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*.2010, roč. 463, č. 7277, s. 98-102. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/nature08652.

KAISER, David A. Basic Principles of Quantitative EEG. *Journal of Adult Development*. 2005, č. 12.

KANDEL, Eric R, James H SCHWARTZ a Thomas M JESSELL. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, c2000, xli, 1414 p. ISBN 08-385-7701-6.

KOIVUSALO, Mirkka, Benjamin E. STEINBERG, David MASON a Sergio GRINSTEIN. In situ Measurement of the Electrical Potential Across the Lysosomal Membrane Using FRET. *Traffic*. 2011 roč. 12, č. 8, s. 972-982. ISSN 13989219. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01215.x.

KRALJ, Joel M, Adam D DOUGLASS, Daniel R HOCHBAUM, Dougal MACLAURIN a Adam E COHEN. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin.- author manuscript, *Nature Methods*. 2012, roč. 9, č. 1, s. 90-95. ISSN 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth.1782.

LABORATORY OF NEURO IMAGING. Optical Intrinsic Signals [online]. LONI, 2008 [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <http://www.loni.ucla.edu/Research/Projects/OIS.shtml>

LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.

LAZAR, Josef, Alexey BONDAR, Stepan TIMR a Stuart J FIRESTEIN. Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. *Nature Methods*. roč. 8, č. 8, s. 684-690. ISSN 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth.1643. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.1643>

LAZAR, Josef. Two-photon polarization microscopy (2PPM): Introduction and tools for biologists by the Lazar lab. [online]. 2011 [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.usbe.cas.cz/people/lazar/celler/index.php>

LINCOLN, V. JOHNSON. A kol., Monitoring of Relative Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells by Fluorescence Microscopy. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY*. 1981, č. 88, s. 526-535.

MIYAWAKI, Atsushi. Visualization of the Spatial and Temporal Dynamics of Intracellular Signaling. *Developmental Cell*. 2003, č. 4, 295–305.

NURIYA, Mutsuo. Imaging membrane potential in dendritic spines. *PNAS*. 2006, č. 3, 786–790.

PALMER, Amy E., at al. Ca<sup>2</sup> Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chemistry*., 2006, roč. 13, č. 5, s. 521-530. ISSN 10745521. DOI: 10.1016/j.chembiol.2006.03.007.

SELVIN, Paul R a Taekjip HA. Single-molecule techniques: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2008, vii, 507 p. ISBN 08-796-9775-X.

SIEGEL, M.S.; ISACOFF, E.Y., A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage. *Cell Press : Neuron*.,1997, Vol. 19., s. 735–741.

STRYER, L. Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annual Review of Biochemistry*., 1978 roč. 47, č. 1, s. 819-846. ISSN 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.bi.47.070178.004131.

STUART a SAKMANN. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature: letters to nature*. 1994, č. 367, s. 69-72.

ŠVRČEK, Martin. NOVÉ PŘÍSTUPY PRO OPTICKÁ MĚŘENÍ ELEKTRICKÉ AKTIVITY MYOKARDU. Brno, 2010. Disertační práce. VYSOKÉ UČENÍ

TECHNICKÉ V BRNĚ, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství.

TIAN, Lin, at al., Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods.*, 2009 roč. 6, č. 12, s. 875-881. ISSN 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth.1398.

TUSA RJ, Kaplan PW, Hain TC, Naidu S: Ipsiversive eye deviation and epileptic nystagmus. *Neurology.* 1990

TSIEN, R.Y. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. 1998, Biochem.*, 67, s. 509-544.

XIE, Chong, Ziliang LIN, Lindsey HANSON, Yi CUI a Bianxiao CUI. Intracellular recording of action potentials by nanopillar electroporation. *Nature Nanotechnology.* roč. 7, č. 3, s. 185-190. ISSN 1748-3387. DOI: 10.1038/NNANO.2012.8.

ZOCHOWSKI, Michal. Imaging membrane potential with voltage-sensitive dyes. *The biological bulletin.* 2000, č. 198, s. 1-21.