

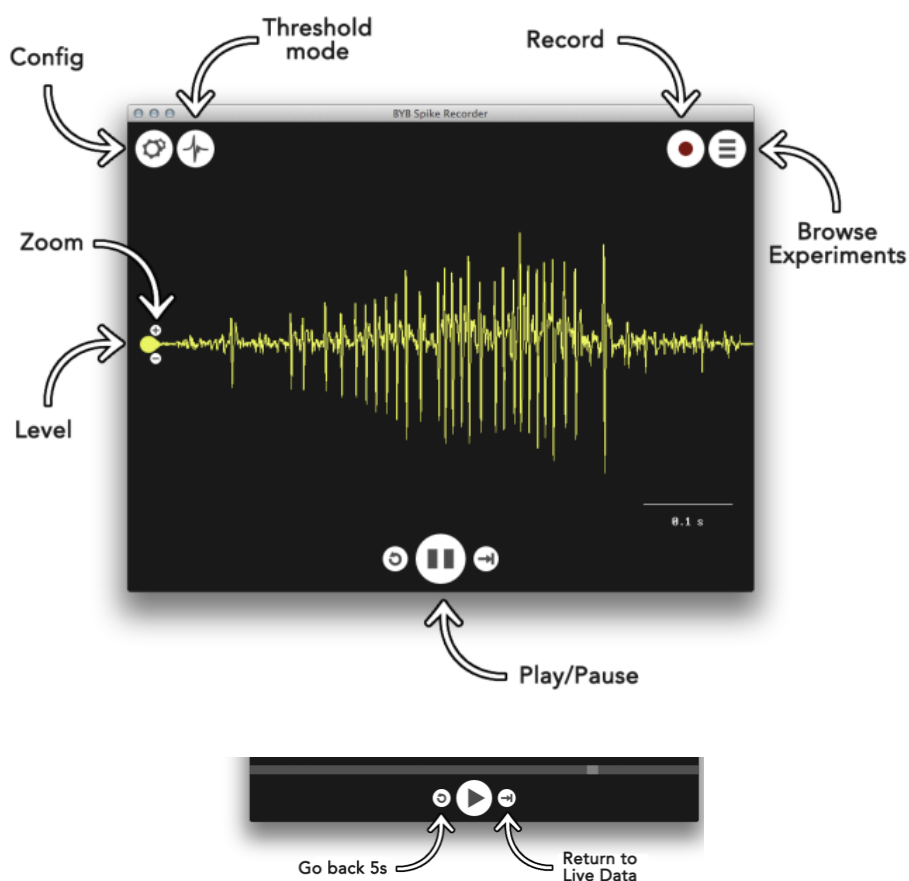
Rejestracja czynności bioelektrycznej układu nerwowego

Zagadnienia:

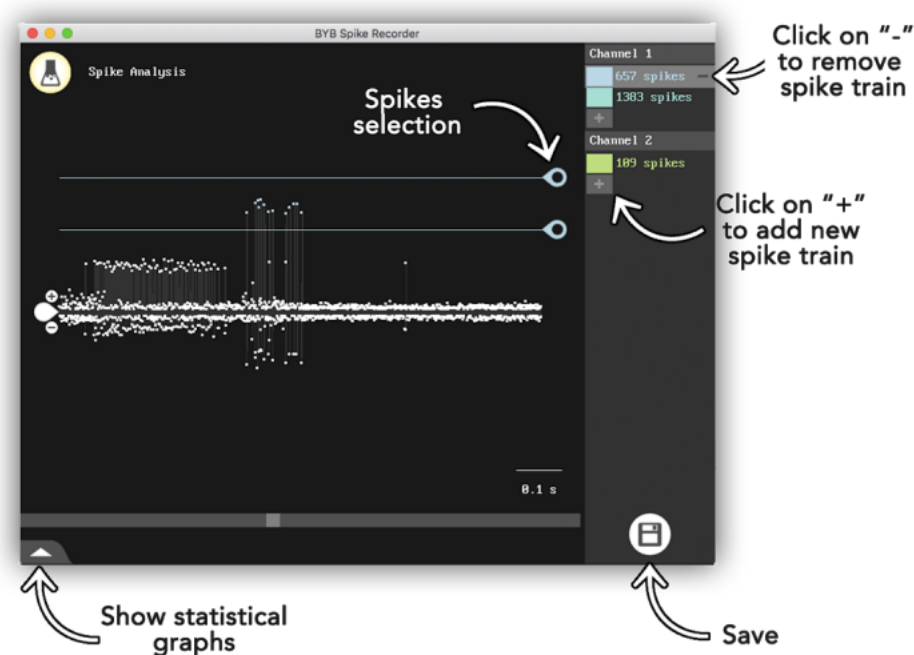
1. Potencjał spoczynkowy błony komórkowej, potencjał czynnościowy
2. Przekazywanie sygnału na drodze elektrycznej w układzie nerwowym
3. Przekazywanie sygnału na drodze chemicznej w układzie nerwowym (synapsa cholinergiczna)
4. Typy rejestracji elektrofizjologicznej ze szczególnym uwzględnieniem metody zewnątrzkomórkowej
5. *Periplaneta americana* jako model w badaniach biofizycznych
6. Działanie toksyn na aktywność neuronalną (w odniesieniu do substancji testowanych na zajęciach - efekt fizjologiczny, mechanizm działania).

A. Zanim rozpoczniesz

Zapoznaj się programem „Spike Recorder”.



Nagrane doświadczenia zapisują się automatycznie w folderze: C:\Users\...\Documents\BYB. Można je tam odszukać a następnie przeanalizować.



B. Zestaw do rejestracji

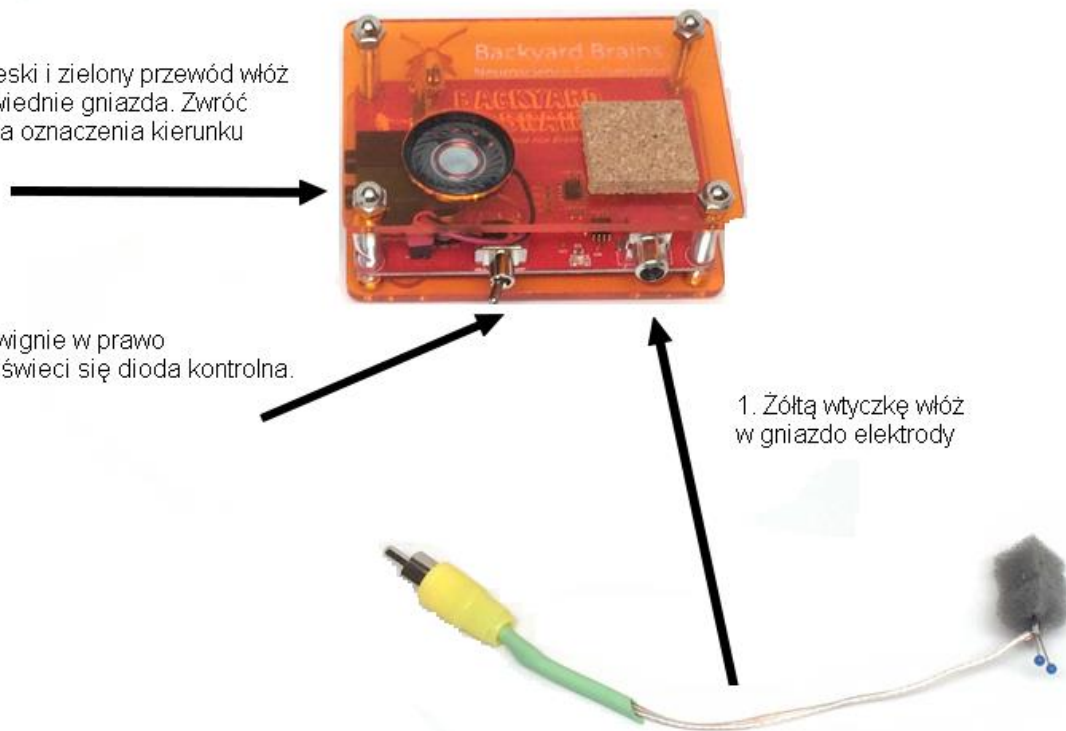
1. Podłącz zestaw tak, jak wskazano na rysunku:

3. Wolny koniec niebieskiej wtyczki podłącz do gniazda audio komputera

2. Niebieski i zielony przewód włóż w odpowiednie gniazda. Zwróć uwagę na oznaczenia kierunku

4. Przełącz dźwignie w prawo i sprawdź, czy świeci się dioda kontrolna.

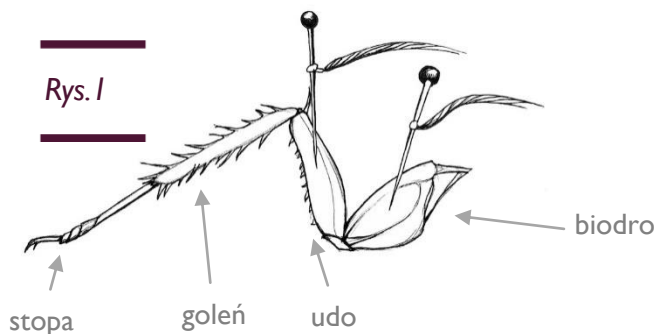
1. Żółtą wtyczkę włóż w gniazdo elektrody



2. Sprawdź, czy dioda kontrolna świeci się równomiernie. Jeżeli nie świeci, lub gaśnie, zgłoś prowadzącemu konieczność wymiany baterii.
3. Otwórz program SpikeRecorder (pomarańczowo-biała ikona z mózgiem).

4. Sprawdź, czy program wykrył automatycznie podłączony wzmacniacz. W tym celu zweryfikuj, czy przebiegi na ekranie są wynikiem odbieranych przez mikrofon wewnętrzny dźwięków. Jeżeli tak, to otwórz „Ustawienia”, przełącz pierwsze dwa kanały na OFF a następnie trzeci lub czwarty kanał na ON wybranym kolorem.
5. Sprawdź, czy obserwowany przebieg to linia prosta, bez nadmiernych szumów. Możesz lekko dotknąć palcem elektrody, aby zweryfikować jak duża będzie odpowiedź rejestrowana przez elektrody w stosunku do szumu. W razie potrzeby zmniejsz czułość rejestracji korzystając z przycisku ze znakiem minus po lewej stronie ekranu.
6. Wyłącz wzmacniacz.

C. Rejestracja czynności bioelektrycznej odnóża karaczana



1. Za pomocą dużych nożyczek pobierz jedno odnóże, najlepiej z ostatniej pary, i umieść je na korkowej podkładce.
2. Umieść elektrody jak pokazano na rysunku. Elektrody muszą być sztywno umocowane w podkładce korkowej.
3. Za pomocą dźwigni włącz wzmacniacz SpikerBox.
4. Zaobserwuj generowane sygnały bioelektryczne przy różnych podstawach czasu. Zapoznaj się z kształtem pojedynczych potencjałów czynnościowych. Zanotuj zapis przy największej podstawie czasu (1 s) oraz zapis pojedynczego potencjału czynnościowego (przy podstawie czasu 0.01 s). Uwzględnij wszystkie kształty potencjałów, które jesteś w stanie wyodrębnić przy małej podstawie czasu.

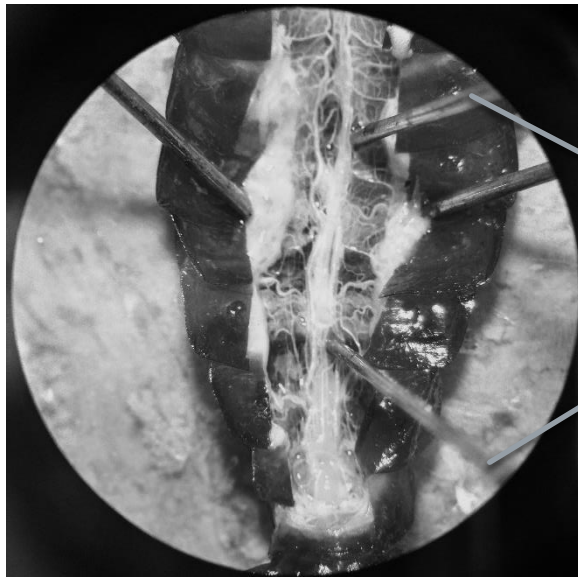
Uwaga- obserwacje należy zaczynać po upływie co najmniej 1 min od momentu umieszczenia elektrod.

5. Pęsetą poruszaj stopą nogi owada. Przeanalizuj przebieg odpowiedzi oraz ilość (częstotliwość) i wielkość (amplitudę) potencjałów w spoczynku i po stymulacji. Opisz obserwacje.
6. Podmuchaj delikatnie, przez końcówkę do pipety na podudzie nogi – zaobserwuj i zanotuj zależność między siłą dmuchnięcia i odpowiedzią – wielkością i czasem trwania.

D. Rejestracja czynności nerwowej rejestrowanej z centralnego układu nerwowego owada

1. Przygotuj preparat – odsłonięty łańcuszek nerwowy karaczana na podstawie filmu dostępnego pod linkiem: https://youtu.be/ldLj0yi_SL8?si=RrNBdWRYo_QDPbvo
2. Etapy preparacji, o których musisz pamiętać to:
 - a. Usunięcie głowy, odnóży oraz skrzydeł

- b. Przymocowanie karaczana do korkowej podkładki za pomocą 2 szpilek wbitych w 1) pierwszy segment tułowia oraz 2) pod blaszką rylcową.
- c. Usunięcie kutikuli z części odwłokowej. Pamiętaj, że zależy nam na dostępie do ostatniego zwoju odwłokowego. Cięcia wykonuj między środkiem a krawędzią odwłoka.
- d. Usuń układ pokarmowy i nasieniowody.
- e. Oczyszczyć preparat z ewentualnych resztek innych tkanek, np. tłuszczowej.
- f. Podaj jedną kroplę płynu fizjologicznego na odsłonięty łańcuszek nerwowy.
- g. Podłącz elektrody do łańcuszka nerwowego. Elektrody nie mogą go bezpośrednio przebijać, ale muszą go dotykać. Elektrody powinny być wbite w odległości min. 0,5 cm od siebie, tak jak na załączonym zdjęciu:



Elektrody

3. Obserwuj aktywność spontaniczną łańcuszka nerwowego – staraj się nie stymulować mechanoreceptorów swoim zachowaniem – receptory te znajdują się głównie na wyrostkach rylcowych.
7. Ponownie obserwuj generowane sygnały bioelektryczne przy różnych podstawach czasu. Zapoznaj się z kształtem pojedynczych potencjałów czynnościowych. *Zanotuj zapis przy największej podstawie czasu (1 s) oraz zapis pojedynczego potencjału czynnościowego (przy podstawie czasu 0.01 s). Uwzględnij wszystkie kształty potencjałów, które jesteś w stanie wyodrębnić przy małej podstawie czasu.*

Uwaga- obserwacje należy zaczynać po upływie co najmniej 1 min od momentu umieszczenia elektrod.

Ile różnych kształtów zbiorczych potencjałów jesteś w stanie wyodrębnić w czasie rejestracji z łańcuszka nerwowego, a ile w czasie rejestracji z odnóży? Jak myślisz, jaka jest tego przyczyna?

4. Stymuluj mechanoreceptory na wyrostkach rylcowych ruchami powietrza z lewej i prawej strony na lewy i prawy wyrostek. *Opisz obserwacje.*
5. Po zapoznaniu się z działaniem preparatu wykonaj zapis kontrolny aktywności spontanicznej preparatu trwający 10 s, za pomocą ikony nagrywania znajdującej się w prawym górnym rogu programu .
6. Na preparat, najlepiej w okolice ostatniego zwoju odwłokowego, podaj 20 μ l bendiokarbu:
 - a. Najpierw w stężeniu 10^{-6} M i obserwuj efekt. Kiedy zaobserwujesz zmianę aktywności, wykonaj kolejny 10s zapis (może to potrwać kilka minut).
 - b. Następnie podaj wyższe stężenie: 10^{-4} M. Podobnie jak poprzednio, wykonaj 10 s zapis aktywności.

7. Przeanalizuj ilościowo liczbę potencjałów generowanych przez preparat w kontroli (przed podaniem toksyny) i po podaniu toksyny. W tym celu:
- Otwórz pierwszy z zapisów wyszukując go po dacie i godzinie wykonania klikając w ikonę .
 - Wybierz opcję analizy zapisu, klikając w ikonę kolbki .
 - Program za pomocą białych kropek zaznaczył wszystkie wykryte szczyty amplitud potencjałów. Jednakże, jeżeli w twoim zapisie znajdowało się sporo szumów, program mógł uwzględnić także je. Ustaw fioletowe kursory (prawa strona zapisu) tak, aby górny znajdował się powyżej najwyższych potencjałów, natomiast dolny znajdował się NAD szumem ale POD najniższymi z potencjałów.
 - Program w prawym górnym rogu podał ile potencjałów zarejestrował. Możesz wykorzystać tę wartość do poniższej analizy ilościowej, pamiętając że $1\text{Hz} = \frac{1}{s}$.
 - Możesz też wrócić ikoną kolby do widoku rejestracji. Teraz program również zaznacza białymi punktami szczyty amplitud potencjałów. Zaznaczając dowolny obszar prawym klawiszem myszy możesz odczytać częstotliwość generowanych potencjałów (pojawia się ona w lewym górnym rogu).
 - Przeprowadź analizę ilościową podając częstotliwość generowanych sygnałów w obecności różnych toksyn
 - Pamiętaj, że efekt toksyny może zależeć od jakości przygotowanego preparatu.