

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Лизунова Наталья Владимировна

**ОПТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ИНСУЛЬТА:
КОРТИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ
ИЗМЕНЕНИЯ В МОДЕЛИ ФОТОТРОМБОЗА У МЫШЕЙ**

Специальность 1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологическом факультете, на кафедре физиологии человека и животных и в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Медико-генетический центр, лаборатория нейробиологии и основ развития мозга.

**Научные
руководители:**

Горбачева Любовь Руфэлевна, доктор биологических наук, доцент
Сурин Александр Михайлович, доктор биологических наук

**Официальные
оппоненты:**

Демьяненко Светлана Викторовна – доктор биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет»; Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского; лаборатория «Молекулярная нейробиология», ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией.

Бережнов Алексей Валерьевич – доктор биологических наук, Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», лаборатория клеточных механизмов нейрпатологий, ведущий научный сотрудник

Браже Алексей Рудольфович – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биофизики, старший научный сотрудник.

Защита диссертации состоится «23» декабря 2024 г. в 17:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

Email: belka.umarova.msu@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте Диссовет 2.0: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3181>

Автореферат разослан _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.015.7,
доктор биологических наук

Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень её разработанности. Изучение прижизненной активности мозга бодрствующих животных является самым передовым направлением экспериментальных исследований функционирования мозга. Среди всех созданных для этой цели методов оптические занимают особое положение, поскольку обладают наибольшим диапазоном пространственных и временных возможностей (от мкм до целого мозга, от мс до хронических исследований одних и тех же областей в течение месяцев) (Sejnowski, Churchland, Movshon, 2014). В последнее десятилетие всё большую популярность приобретают методы прижизненного исследования активности коры мозга лабораторных животных, к которым относится и широкопольная оптическая нейровизуализация (ШОН, (wide field imaging, WFI, wide field optical mapping, WFOM) Данный метод позволяет детектировать гемодинамическую и нейрональную активность с дорзальной поверхности коры мозга лабораторных животных как анестезированных, так и бодрствующих (Ma et al., 2016a; White et al., 2011; Winship, Murphy, 2008; Лизунова, Кислухина, Сурин, 2022). Преимущество ШОН - возможность наблюдения за морфологическими и функциональными изменениями в коре мозга в хроническом эксперименте. Кроме того, одновременная регистрация нейронального и гемодинамического сигнала может способствовать улучшению качества интерпретации данных функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) и спектроскопии в ближнем инфракрасном свете (фБИКС, fNIRS), применяемых в клинике и основанных на принципе нейроваскулярного сопряжения.

Возможности, предоставляемые ШОН, полезны для изучения механизмов патогенеза и поиска путей эффективной терапии такого тяжелого заболевания как ишемическое поражение мозга. Инсульт занимает второе место в структуре смертности населения, а также является одной из ведущих причин пожизненной инвалидизации населения (Feigin et al., 2022). Ишемический инсульт составляет 87% всех случаев острого нарушения мозгового кровотока, что делает его изучение одной из первостепенных задач современного здравоохранения (Saini, Guada, Yavagal, 2021).

Инсульт приводит к развитию нейровоспаления, нарушению гематоэнцефалического барьера, отеку (Qin et al., 2022). Данные процессы служат причинами нарушения нормальной работы нейро-глио-сосудистого комплекса, обеспечивающего метаболические потребности нервной ткани по механизму нейроваскулярного сопряжения (Hillman, 2014). Одновременная регистрация кальциевого и гемодинамического сигнала методом ШОН, позволяет производить оценку процессов сопряжения нейрональной и сосудистой активности коры мозга. С помощью ШОН уже удалось подтвердить нейрональную природу спонтанных флуктуации сигнала, зависящего от степени оксигенации крови, регистрируемого при фМРТ в норме (Ma et al., 2016). Более того удалось установить особенности развития нейроваскулярного сопряжения в раннем постнатальном периоде (Kozberg et al., 2016). Также всё больше данных указывают на различия параметров

гемодинамического ответа на активацию нейронов при разных физиологических состояниях (Eyre et al., 2022, Wang et al., 2024). Актуальной задачей является изучение нарушений нейроваскулярного сопряжения при патологиях, в частности, при инсульте.

При повреждении тканей мозга происходит перераспределение утраченных функций (Murphy, Corbett, 2009). Показано, в том числе методом ШОН, что в механизмы нейропластичности вовлечены не только прилежащие к повреждению области, но и отдаленные, в первую очередь ассоциативные зоны коры (Winship, Murphy, 2008; Zhang et al., 2021). Эффективность восстановления зависит от того, какие области приняли на себя утраченные функции (Kirton et al., 2021). Исследования в этом направлении сложны и очень затратны, поэтому наиболее актуальной задачей на данном этапе развития ШОН является разработка конкретных критериев для оценки тяжести патологий мозга методом ШОН и сравнение получаемых результатов с такими классическими подходами, как гистология и магнитно-резонансная томография (МРТ).

Цель диссертационной работы – сформировать критерии для оценки морфофункциональных изменений коры мозга, вызванных фотоиндуцированной ишемией, с использованием метода широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать алгоритм анализа данных нейрональной и гемодинамической активности, получаемых методом ШОН.
2. Оценить возможность регистрации внутриклеточного кальция с помощью сенсора GCaMP6f, экспрессируемого в нейронах у трансгенных мышей линии Thy1-GCaMP6f, в условии глутаматной эксайтоксичности, одного из факторов повреждения при ишемии.
3. Изучить влияние анестезии на гемодинамику коры больших полушарий у мышей при стимуляции конечностей и в покое.
4. Определить параметры функциональной активности коры мозга мышей, регистрируемые с помощью ШОН, которые позволяют оценить тяжесть ишемического повреждения.
5. Сопоставить размеры очага инсульта, оцененные методами гистологии и МРТ, с результатами измерений методом ШОН.

Научная новизна исследования. Работа вносит значительный вклад в развитие метода широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН), поскольку для выполнения исследования не только использованы уже применяемые в мире методические подходы, но также разработаны новые: модифицирован протокол операции по формированию краниального окна, протестированы различные протоколы регистрации активности мозга, создана методика сенсорной стимуляции бодрствующего животного, создан собственный алгоритм анализа данных. Впервые сопоставлены динамические изменения кортикальной активности и гемодинамики, регистрируемые с помощью ШОН у мышей, и тяжесть фотоиндуцированной ишемии. Выявлены

наиболее воспроизводимые и чувствительные параметры, позволяющие оценить тяжесть морфологических и функциональных нарушений мозга при фототромбозе у мышей.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы раскрывают закономерности активности коры мозга животных в разных физиологических состояниях: в условиях анестезии, спонтанном поведении при бодрствовании, при сенсорной стимуляции, до и после индукции инсульта. Проанализированы закономерности взаимосвязи гемодинамической и кортикальной активностей и их изменения в постишемическом периоде, а также паттерны пространственно-временной активности функциональных зон коры мозга.

Одним из итогов работы, без которого невозможно его практическое применение, является разработка параметров для оценки тяжести инсульта методом ШОН. В ходе выполнения работы создана программа, позволяющая оптимизировать анализ активности коры мозга мышей, получаемых методом широкопольной оптической нейровизуализации. Стандартизация и ускорение методов анализа ШОН позволит внедрить данный метод в процесс тестирования эффективности новых подходов терапии нейродегенеративных заболеваний мозга. Получаемые с помощью программы результаты обеспечат адекватную оценку действенности тестируемой терапии болезней мозга и выявят фундаментальные закономерности его работы. Внедрение ШОН и стандартизация методов его анализа снизят затраты на доклинические и фундаментальные исследования за счет улучшения качества экспериментов и анализа данных.

Методология и методы исследования. Работа была выполнена на мышцах линии C57BL/6J-Tg(**Thy1-GCaMP6f**)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393, Jackson Laboratory, США) (n = 36) и животных генетически родственной линии C57BL/6 [Dana et al., 2014] (n = 10). В экспериментах использовали животных обоих полов массой 25-30 г и возрастом 2,5-3 мес. Все эксперименты проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований.

Для регистрации активности коры головного мозга мышей использовали метод широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН). Животному предварительно проводили операцию по истончению черепа. Нейрональную активность детектировали по изменению флуоресценции генетически-кодированного белкового сенсора ионов кальция (GCaMP6f), гемодинамический сигнал регистрировали по изменению интенсивности рассеянного света. Регистрацию активности проводили как у бодрствующих мышей, так и в условии анестезии (1,5% изофлуран). Для изучения функциональной активности коры мозга животных мы оценивали с помощью ШОН как спонтанную активность мозга у мышей в покое, так и ответы в коре, вызванные сенсорной стимуляцией задних конечностей. Одновременно с регистрацией активности мозга проводили видеозапись поведения животного.

Инсульт у животных моделировали при помощи метода фотоиндуцированной ишемии. Для этого в кровоток через катетер вводили

фотосенсибилизатор Бенгальский розовый (БР) и через 5 мин на участок соматосенсорной коры ($\varnothing = 1.5$ мм; AP = -1; ML = -2) воздействовали лазером 532 нм (10 мВт, 10 мин). Тяжесть инсульта регулировали, варьируя дозу вводимого в кровоток фотосенсибилизатора (10 или 20 мг/кг). Степень сенсомоторного дефицита у животных в посттравматический период определяли в тесте «Решётка». Оценку размера повреждения головного мозга у мышей, вызванного фотоиндуцированной ишемией, осуществляли с помощью МРТ через 24 часа после фототромбоза, а также при помощи гистологической окраски по Нисслю срезов мозга на 21 сутки после инсульта.

Для оценки возможности регистрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) с помощью сенсора GCaMP6f, экспрессируемого в нейронах у трансгенных мышей линии Thy1-GCaMP6f, были проведены флуоресцентно-микроскопические измерения *in vitro*. В первичной нейроглиальной культуре, полученной из новорожденных мышат линии C57BL/6J-Tg, регистрировали $[Ca^{2+}]_i$, внутриклеточный pH и митохондриальный потенциал в условии действия высоких доз глутамата, имитирующего условия в области пенумбры.

Код для автоматизации обработки и статистического анализа изображений ШОН написан автором работы на языке Python в среде JupyterNotebook. Для анализа видеозаписей поведения животных использовали предварительно обученный нейросетевой алгоритм DeepLabCut [Mathis et al., 2018]. Для анализа гистологических изображений и МРТ сканов использовали программу FIJI ImageJ (US National Institutes of Health, США). Для регистрации изображений и анализа данных флуоресцентно-микроскопических исследований использовали программу Nikon NIS-Elements (Япония). Также для анализа данных использовали программы Excel 20 (Microsoft Corp, США) и пробную версию GraphPad Prizm 8 (GraphPad Software, США).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Метод ШОН обеспечивает комплексную функциональную характеристику кальциевых и гемодинамических событий в коре больших полушарий в состоянии бодрствования и анестезии, а также при сенсорной стимуляции у мышей.
2. Тяжесть поражения мозга, вызванного фотоиндуцированной ишемией, коррелирует с нарушением в острый период межполушарной функциональной связанности и нейроваскулярного сопряжения, которые метод ШОН позволяет регистрировать в динамике в хроническом эксперименте.
3. Метод ШОН дает адекватную оценку размера очага инсульта у мышей, которая согласуется с данными МРТ и классической гистологии.
4. Автоматизация анализа большого массива изображений, полученных с помощью ШОН, позволяет существенно оптимизировать их обработку, что упрощает внедрение данного подхода в фундаментальные и доклинические исследования нейродегенеративных поражений мозга.

Степень достоверности научных результатов. Представленные в исследовании результаты являются воспроизводимыми и основываются на

данных, полученных с использованием современных методов. Для анализа результатов использованы адекватные и обоснованные статистические тесты. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной литературы по теме исследования.

Публикации. По результатам работы опубликовано 6 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, индексируемых базами Web of Science, Scopus и RSCI. Получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Апробация результатов работы. Результаты данной были работы представлены на IV Национальном Конгрессе по Регенеративной Медицине, (Москва, Россия, 2019 год); V Национальном Конгрессе по Регенеративной Медицине, (Москва, Россия, 2022 год); 12-ой Международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, Россия, 2023 год); III Всероссийской научной конференции с международным участием и Школы по современным методам неинвазивного контроля нейрональной активности «Оптогенетика+», (Ст.-Петербург, Россия, 2023 год); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «ОРФА-ДА. Редкие болезни: от истоков к перспективам» (Москва, Россия, 2023 год); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024», (Москва, Россия, 2024); Международной конференции «Biomembranes 2024», (Долгопрудный, Россия, 2024).

Диссертация апробирована на заседании кафедры физиологии человека и животных МГУ имени М.В. Ломоносова и межлабораторном заседании Медико-генетического центра ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Личный вклад автора. Личный вклад автора присутствует на каждом этапе выполнения диссертационной работы: анализ научной литературы, планирование экспериментов, выбор адекватных методических подходов, проведение экспериментов, статистическая обработка и обобщение результатов, разработка и написание программы для анализа данных, написание статей и тезисов, представление результатов работы на российских и международных конференциях. Отработка методик работы *in vivo* с использованием ШОН осуществлялась совместно с Е.Н. Кислухиной. Флуоресцентно-микроскопические исследования *in vitro* проведены совместно с Р.Р. Шариповым. МРТ-исследования проведены совместно с М.В. Гуляевым.

Структура и объем работы. Работа изложена на 163 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Список литературы включает 190 источник. Работа проиллюстрирована 1 таблицей и 101 рисунком.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты проводили в полном соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза.

Протокол исследований был одобрен локальными этическими комитетами ФГБНУ «НИИОПП» (№05-06/12) и ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» (протокол заседания №1 от 30.01.2018).

Экспериментальные животные. В исследовании использованы самцы и самки мышей линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393, Jackson Laboratory) (n = 36) и генетически родственной линии C57BL/6 (Dana et al., 2014) (n = 10) в возрасте 2,5-3 мес. Животных содержали в стандартных условиях (температура 22°C, световой день – 12/12 ч) без ограничения доступа к воде и корму.

Исследование кальциевой и гемодинамической активности коры мозга мышей методом широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН)

Операцию по истончению черепа и установке краниального окна проводили под общим наркозом (Золетил (Virbac, Франция, доза 100 мг/кг) / Ксила (Interchemie, Эстония, доза 8 мг/кг) объем смеси 300 мкл/30 г мыши, и/п либо изофлуран 1.5% (Laboratories Karizoo, S.A., Spain) минимум за две недели до начала съемок методом ШОН. Животное анальгезировали (Дексаметазон (КРКА, Словения, доза 0,7 мг/кг, объем 20 мкл/10 г мыши, в/м), лидокаин (Solopharm, Россия, концентрация 20 мг/мл, местно), удаляли скальп и соединительные ткани. С помощью скоростной микродрели (#78001, RWD, Китай) истончали поверхность черепа до достижения прозрачности. Дальше кость укрепляли прозрачными полимерами (Base Coat и Top Coat, Brigitte Bottier, Франция), и при помощи цианакрилатного клея Loctite 401 (Heneken, Германия) и стоматологической пластмассы («Villacryl S V2», Everall7, Польша) прикрепляли титановый холдер для фиксации головы животного в установке ШОН. Диаметр краниального окна в самой широкой части составлял 10 мм. Для доставки электрического стимула на задние конечности устанавливали по 2 стальных или титановых кольца. После операции и далее раз в сутки в течение 3ех дней после операции животными подкожно вводили Кетонал (Sandoz, Словения, доза кетопрофена 8.5 мг/кг, объем 150 мкл/30 г мыши, п/к) и антибиотик Марбобел 2 (Белкаролин, Республика Беларусь, доза марбофлоксацина 8 мг/кг, объем 150 мкл/30 г мыши).

Через неделю после операции животных постепенно *приучали к съемкам в установке ШОН в бодрствующем состоянии*. Приучение включало 3 этапа в течение 6 дней с интервалом между этапами 1 день:

1-й этап – 30-ми-нутная адаптация к комнате с установкой ШОН, исследование платформы и приучение к фиксации головы в руках экспериментатора (не менее 2-ух повторений);

2-й этап – трехкратная фиксация мыши в установке не более чем на 1 мин (не менее 2-ух повторений);

3-й этап – 5-минутная фиксация мыши с включением светодиодов.

Система широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) включала светодиоды (470 нм, 505 нм, 530 нм, 656 нм), комбинированные светоделители, контроллер работы камеры и светодиодов (Mightex, США). Оптическая часть установки состояла из светофильтров и светоделителей производства Chroma и Edmund Optics (США). Сигнал фокусировали при

помощи 4x-эпиобъектива (P/N OBJ-MAO-04, Mightex, США) и регистрировали скоростной (до 40 Гц) высокочувствительной камерой (CXE-V013-U, Mightex, США). Для обеспечения свободы передвижения бодрствующему животному использовали левитирующую на воздушной подушке платформу (Mobile HomeCage, Neurotar, Финляндия).

Для детекции изменений концентраций разных форм гемоглобина кору мозга освещали светодиодами 505/530 нм и 656 нм. Излучение светодиодов направляли к коре через самодельную систему бокового освещения. Рассеянный свет регистрировали в конфигурации прямого микроскопа. Перевод значений интенсивности рассеянного света в значения концентраций гемоглобина проводили, используя модифицированную формулу Бугера-Лаберта-Бера (Ma et al. 2016). **Регистрацию кальциевой активности коры** проводили у мышей линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J, которые экспрессируют белковый кальциевый сенсор GCaMP6f под промоутером Thy1 в возбуждающих нейронах, главным образом в кортикальных слоях 2, 3, 5 и 6 (Dana et al., 2014). Флуоресценцию сенсора GCaMP6f возбуждали, используя светодиод длиной волны 470 нм. Излучение светодиода фокусировали на коре головного мозга с помощью 4x-эпиобъектива (P/N OBJ-MAO-04, Mightex, США).

При регистрации только гемодинамического сигнала мозг освещали двумя длинами волн поочередно, суммарная частота регистрации составляла 40 Гц или 20 Гц для каждой длины волны. Для одновременной регистрации кальциевой и гемодинамической активности использовали трехволновую систему освещения. Частота регистрации кадров составляла 20 Гц для регистрации флуоресценции и по 10 Гц для каждой длины волны для регистрации светорассеяния, диоды также включали поочередно. Максимальное время экспозиции во всех экспериментах составило 5 мс. Итоговое разрешение изображений - 344x464 пикселей.

Для изучения функциональной активности коры мозга животных с помощью ШОН оценивали как спонтанную активность мозга у мышей в покое, так и при вызванной сенсорной стимуляции конечности. Через специально разработанное крепление электродов на лапу животного подавали слабый электрический ток (30-300мкА). Гемодинамический сигнал в покое и при стимуляции регистрировали в норме при бодрствовании и под действием изфлурана. Для оценки нейроваскулярного сопряжения осуществляли одновременную регистрацию кальциевой и гемодинамической активности мозга у мышей с и без стимуляции в норме при бодрствовании, а также в на 1 и 7 сутки после инсульта или после «ложного» инсульта в группе контроль.

Алгоритм автоматизации анализа изображений ШОН был специально разработан и реализован в виде программных модулей на языке программирования Python автором в ходе выполнения работы. Алгоритм включает выравнивание изображений на основе опорных анатомических точек, удаление шумов, перевод интенсивности оптического сигнала в концентрации разных форм гемоглобина, удаление артефактов гемодинамики в флуоресцентном сигнале. Перечисленные выше функции были объединены

в программе с графическим интерфейсом для автоматизации анализа данных ШОН. В дополнительных программных модулях были реализованы аффинная трансформация анатомического атласа для выделения анатомических зон коры, автоматическое выделение области ответа в коре, вызванного сенсорной стимуляцией, корреляционный анализ функциональной связанности зон мозга при спонтанной активности, частотная фильтрация сигнала. Перед оценкой данных спонтанной активности из данных удаляли участки с активной локомоцией. Перед усреднением между мышами и статистическими тестами коэффициенты корреляции преобразовывали при помощи z-трансформации Фишера, после усреднённые z-значения переводили обратно в r.

Для удаления участков записи с активным поведением животного, его снимали на инфракрасную видеокамеру и затем с помощью алгоритма DeepLabCut (Mathis et al., 2018), предварительно обученного распознавать положения конечности мыши, определяли участки записи, где мышь активно двигалась и удаляли их из обчёта активности мозга в спокойном бодрствовании.

Моделирование инсульта методом фотоиндуцированной ишемии

Моделирование ишемического инсульта осуществляли посредством фототромбоза (ФТ). За два дня до эксперимента животным проводили операцию хронического введения полиуретанового катетера во внутреннюю яремную вену для введения фотосенсибилизатора бенгальского розового (БР) (Sigma-Aldrich, Германия). Тяжесть инсульта варьировали дозой БР 20мг/кг (группа «Инсульт», группа «Тяжелый инсульт») и 10мг/кг (группа «Средний инсульт») в/в. Ишемию индуцировали воздействием лазера 532 нм, 10 мВт, 10 мин; (диаметр луча $\varnothing = 1.5$ мм; AP = -1; ML = -2) через 5 минут после введения соответствующей дозы БР.

Оценку размера повреждения головного мозга у мышей, вызванного фотоиндуцированной ишемией, осуществляли с помощью *MPT* через 24 часа после фототромбоза. Измерение объема поражения мозга проводили с помощью томографа для мелких лабораторных животных BRUKER BioSpec 70/30 USR (Германия) с индукцией магнитного поля 7 Т, на основе T2-взвешенных изображений. Также для оценки размера очага поражения, вызванного фототромбозом, использовали классический способ **окрашивания срезов мозга по Нисслю**. На 21 сутки после фотоиндуцированного инсульта, животных усыпляли, используя эфир. Далее проводили транскардиальную перфузию 4% парафармальдегидом (Sigma-Aldrich, Германия). Извлекали головной мозг и фиксировали образцы в 10% формалине в фосфатно-солевом буфере (Биовитрум, Россия). Срезы толщиной 35 мкм получали с помощью вибратора Leica vt1200s (Leica, Германия). Через сутки проводили окрашивание по Нисслю, используя краситель крезиловый фиолетовый (Servicebio, Китай). Срезы фотографировали на микроскопе Nikon Ti2 на объективах 20x и 40x. У трансгенных мышей линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J в качестве дополнительной оценки площади и диаметра очага **измеряли область высокой флуоресценции сенсора GCaMP6f** на изображениях коры мозга, полученных методом ШОН. Оценку размера

очага проводили в программе FIJI ImageJ (US National Institutes of Health, США). Для *оценки сенсомоторного дефицита* у животных в посттравматический период использовали тест «Решётка» (Brooks, Dunnett, 2009; Galkov et al., 2020).

Флуоресцентно-микроскопические исследования *in vitro* в культуре клеток из мышей линии Thy1-GCaMP6f

Первичные нейроглиальные культуры получали из коры головного мозга новорожденных мышей (P0-P2) линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393) по стандартной методике (Surin et al., 2017). Генотипирования новорожденных не проводили, объединяя клетки коры мозга 4-х мышат. Вкратце, мышей анестезировали, декапитировали, кору извлекали и отделяли от мозговых оболочек. Суспензию кортикальных нейронов (10^6 клеток/мл) получали, обрабатывая мозговую ткань папаином (10ед/мл) и ДНКазой (Sigma-Aldrich, Германия), диссоциировали пипетированием и отмывали от разрушенных клеток 3-кратным осаждением в центрифуге (200 g, 5 мин, 4°C). Суспензию клеток (250мкл) переносили в 35мм чашки со стеклянными лунками диаметром 14мм (MatTek, США). Стекла предварительно покрывали полиэтиленмином (1 мг/мл) (Sigma-Aldrich, Германия). Клетки культивировали в нейробазальной среде, содержащей 2% Supplement B-27, 0.5мМ L-глутамин и смесь антибиотиков/антимикотиков (указанные реагенты фирмы Invitrogen, США). Клетки содержали при 37°C в атмосфере 5%CO₂/95% воздуха при 100% влажности. Культуры использовали в экспериментах через 14-16 дней после посева (14-16 days *in vitro*, DIV).

Флуоресцентно-микроскопические измерения выполнены с использованием мультиволновой системы регистрации флуоресценции на основе инвертированного микроскопа Nikon Ti2 Eclipse (Япония). Относительные измерения [Ca²⁺]_i выполнены с помощью синтетических флуоресцентных индикаторов Fura-FF или Fura2 (возбуждение 340 и 380 нм, регистрация 525 нм) и эндогенного Ca²⁺-сенсора GCaMP6f (возбуждение 485 нм, регистрация 525 нм). Значения Ca²⁺ в покоящихся нейронах приняты за 0; максимальные сигналы Fura-FF/2 и GCaMP6f, принятые за 1, достигнуты добавлением Ca²⁺-ионофора иономицина (Iono, 2 мкМ, при [Ca²⁺] в буфере 5 мМ). В используемой модели глутаматной эксайтотоксичности концентрация Glu составляла 10 мкМ (10 мкМ глицина, безмагниевого буфера); удаление Glu и добавление протонофора FCCP (1 мкМ) проводили в бескальциевом буфере (2 мМ Mg²⁺). Для записи сигналов флуоресцентного рН-индикатора BCECF использовали возбуждение на 440 и 485 нм, регистрация на 525 нм. Калибровку максимального сигнала Fura-FF осуществляли, добавляя иономицин. Калибровку сигналов рН-индикатора BCECF не проводили.

Статистический анализ полученных данных

Статистический анализ данных проводили с использованием специально написанного программного кода на языке Python. Данные проверяли на нормальность и гомоскедастичность. В зависимости от количества групп,

факторов и нормальности распределения использовали Mixed-model ANOVA, *rm*-ANOVA, критерий Краскела — Уоллиса, парный или непарный *t*-test, тест Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка алгоритма для анализа данных ШОН



Рис. 1. Схема основных этапов работы «Программы для автоматизации выделения физиологически значимых сигналов из данных широкопольной оптической нейровизуализации».

существующие в открытом доступе скрипты и пакеты сложно назвать универсальным.

Для анализа данных, получаемых на установке ШОН, нами был создан собственный программный код на языке Python. Мы протестировали различные подходы для реализации этапов анализа и выбрали наиболее оптимальные решения, которые объединили в программе с графическим интерфейсом «Программа для автоматизации выделения физиологически значимых сигналов из данных широкопольной оптической нейровизуализации» (Рис. 1). В программе реализовано выравнивание изображений коры мозга между животными на основе предварительно размеченных опорных анатомических

Данные, получаемые методом ШОН, представляют собой последовательности из тысяч изображений. Для получения полезного сигнала из исходных изображений необходимо осуществить их выравнивание, удалить шумы, преобразовать сигнал пикселей в относительные изменения концентрации соответствующих форм гемоглобина. Кроме того, изменения флуоресценции сенсора нужно откорректировать с учетом поглощения света гемоглобином. Также возникают дополнительные задачи при работе с данными ШОН, а именно, автоматизация и ускорение анализа, реализация эффективного хранения информации. Разными группам, занимающимися исследованиями с использованием ШОН, уже созданы алгоритмы для анализа данных, реализованные на таких языках программирования, как Matlab, Python (Brier, Culver, 2023; Vanni et al., 2017; Xiao et al., 2021). Однако ввиду различий в устройстве установки для ШОН, протоколах съемки, подходов к анализу,

точек. Для удаления шумов используется удаление тёмных пикселей на фоне за счет накладывание «маски» на области коры мозга, применяется Гауссово сглаживание, вычитание/регрессия «глобального» (суммарного по всей коре) сигнала, частотная фильтрация. Перевод значений интенсивности рассеянного света в изменения концентраций гемоглобина разной формы проводится с использованием модифицированного для неоднородных сред закона Бугера-Ламберта-Бэра, как показано в статье (Ma et al., 2016). Наиболее оптимальным алгоритмом коррекции флуоресценции на поглощение гемоглобином оказалась регрессия гемодинамического сигнала из данных изменения интенсивности флуоресценции. В условиях, когда технически невозможно точно оценить длину пути фотонов и рассеивающие свойства образца, данный подход является наиболее объективным.

Автор также разработала дополнительные программные модули для автоматического определения области ответа в коре, вызванного сенсорной стимуляцией; реализации корреляционного анализа функциональной связанности зон коры мозга с визуализацией матриц и карт корреляции; анализа нейроваскулярного сопряжения.

Оценка возможности регистрации внутриклеточного кальция с помощью сенсора GCaMP6f в условии ишемии

После фотоиндуцированной ишемии мы наблюдали резкое (более, чем на 200%, по сравнению с исходным) увеличение уровня флуоресценции сенсора в центре области, в которой был индуцирован тромбоз сосудов (Рис. 2, А), что свидетельствует о входе большого количества ионов Ca^{2+} в клетки очага ишемии. Фототромбоз приводит к нарушению ионного баланса как непосредственно в очаге, так и в переишемической области, это выражается в увеличении концентрации внутриклеточного кальция, внеклеточной концентрации ионов калия, выделению глутамата, закислению внутриклеточной среды (Duchen, 2012; Khodorov, 2004; Plotegher et al., 2021). Мы проверили в какой степени указанные выше аномалии проявляются в нейроглиальных культурах из мозга мышей линии C57BL/6J-Tg и как эти патологические изменения в состоянии нейронов отражаются на флуоресцентных сигналах Ca^{2+} -сенсора GCaMP6f. В дополнительных экспериментах на культуре нейронов, полученных из трансгенных мышей, мы зарегистрировали изменение концентраций кальция одновременно синтетическим красителем по сигналу GCaMP6f при действии высоких доз глутамата (Глу). Модель глутаматной эксайтотоксичности имитирует в культуре условия ионной дисрегуляции, наблюдаемые в области пенумбры при развитии инсульта (Вакаева и др., 2022). Поскольку размер молекулы GCaMP6f превышает размер ядерной поры и без адресной метки сенсор не может попасть в ядро, изменения сигнала GCaMP6f отражают изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). Синтетические Ca^{2+} -индикаторы, в том числе использованные в данной работе Fura-2 или Fura-FF, имеют малый размер, легко проникают в ядро и их сигналы отражают изменения концентрации Ca^{2+} , усредненные по цито- и нуклеоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Кислухина и др., 2023). Мы показали, что несмотря на нарушение ионного баланса сигнал

GCaMP6f позволяет оценивать изменения $[Ca^{2+}]_c$ (Рис. 2, Б). Что подтверждает возможность использования данного сигнала для оценки функциональной активности нейронов в условиях ишемии.

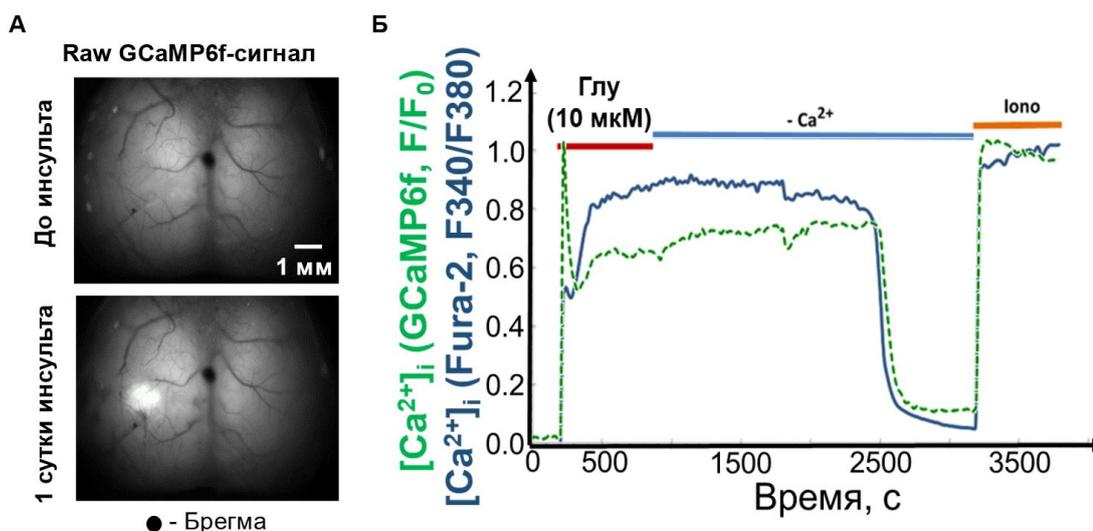


Рис. 2. Сенсор GCaMP6f в условии глутаматной эксайтотоксичности позволяет оценивать изменения $[Ca^{2+}]_i$. А - Пример изображения коры мозга животного, полученного в экспериментах ШОН при детекции флуоресценции сенсора GCaMP6f до фототромбоза и на 1 сутки после. Б - Изменения средней по клетке $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах первичной нейроглиальной культуры из кортекса мозга мыши линии C57BL/6J-Tg. Возраст культуры 13 дней. Приведены графики для репрезентативного нейрона, в котором за время действия глутамата (Glu, 10 мкМ) развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД). Нейрон экспрессирует GCaMP6f и одновременно нагружен синтетическим кальциевым индикатором Fura-2.

Влияние анестезии на гемодинамическую активность в коре больших полушарий

Одним из направлений широкопольной оптической нейровизуализации является анализ активности коры мозга мышей по регистрации изменений спектральных свойств поверхностных слоев тканей мозга - метод оптического картирования по внутреннему сигналу. В англоязычной литературе такой подход называют Intrinsic optical signal imaging (IOSI) (Kura et al., 2018). Метод основан на различиях в оптических свойствах окисленной и восстановленной форм гемоглобина, что позволяет по изменению интенсивности рассеянного света определённых длин волн регистрировать относительные изменения концентраций этих форм в ткани мозга. Данный подход анализа активности мозга базируется на теории тесного сопряжения нейрональной активности и локального кровотока, аналогично методу фМРТ или фБИКС (Wang et al., 2024).

Для подтверждения физиологической значимости сигналов, регистрируемых с помощью используемой в работе системы ШОН, мы проанализировали вызванные сенсорной стимуляцией изменения в поверхностных слоях коры концентраций разных форм гемоглобина. Также мы сравнили вызванные ответы при стимуляции бодрствующих животных и при действии газовой анестезии (изфлуран 1.5%, O₂). Стимул представлял собой подачу слабого электрического тока (300 мкА) к электродам,

закрепленным на конечностях животного. Подавали 4 пачки стимулов, каждая пачка состояла из 6 коротких стимулов длительностью 300 мс и частотой 1,17 Гц.

Стимуляция вызывала локальное увеличение притока крови в область первичной сенсорной коры, ответственной за чувствительность задних конечностей (SSp-II), которое продолжалось около 40 сек после начала стимуляции. Накладывание маски на суммарный сигнал, зарегистрированный в течение 4 с после начала подачи стимула, на основе эмпирически подобранного порога интенсивности (86% от максимальной суммарной интенсивности в области соматосенсорной коры) позволило выявить локальную область активации по сигналу, соответствующему изменениям концентраций окисленной формы гемоглобина (HbO-сигнал) и суммарного гемоглобина (HbT-сигнал) (Рис. 3, А). Локализация ответа на стимул у бодрствующих мышей совпадала между животными и соответствовала области чувствительности задних конечностей (SSp-II), определенной по анатомическому атласу мозга (The Allen mouse brain atlas) (Wang et al., 2020). Также стоит отметить билатеральную асимметрию в размере маски, бóльшая область сенсорной коры активируется в контралатеральном относительно стимулируемой лапы полушарии.

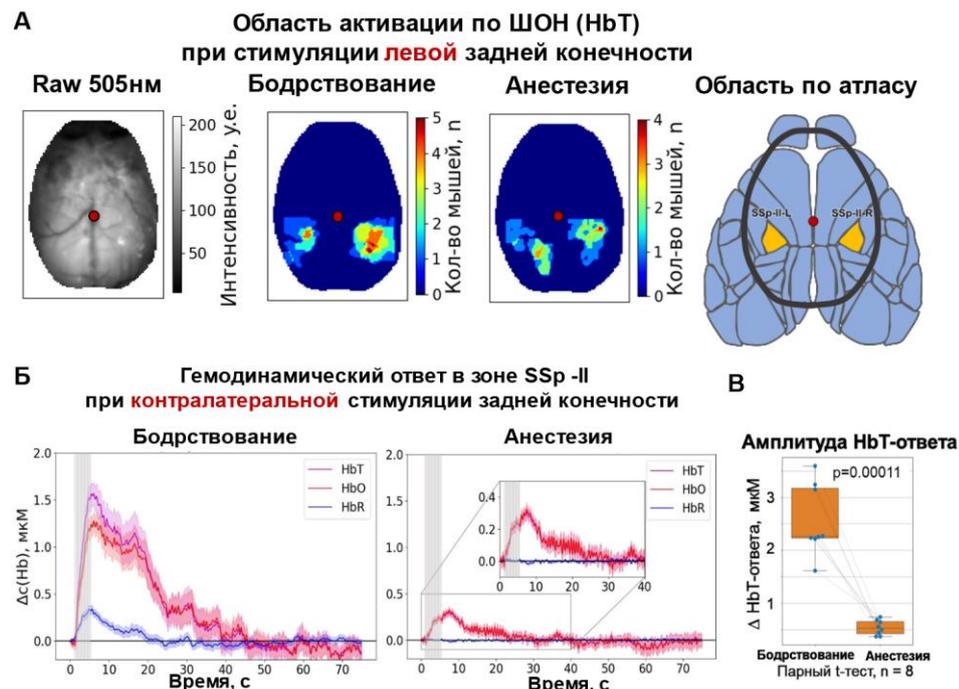


Рис. 3. Изфлурановая анестезия снижает выраженность вызванной сенсорной стимуляцией ответа в коре. А – Определение области активации в коре, вызванной сенсорной стимуляцией левой задней конечности, по изменению концентрации суммарного гемоглобина (HbT), зарегистрированного ШОН. На 2 и 3 изображениях в ряду представлены суммированные между мышами «маски ответов», теплота цвета отражает частоту активации одних и тех же зон между животными. Усреднены маски для 8 животных. Красная точка - расположение Брегмы. Изображение атласа адаптировано из [Wang et al., 2024]. Б - Усредненные графики относительных изменений концентраций окисленной (HbO - красная линия), восстановленной (HbR - синяя линия) форм гемоглобина и суммарного гемоглобина (HbT - малиновая линия) при стимуляции задней конечности, контралатеральной регистрируемой полушарию при бодрствовании и в условиях изфлурановой анестезии. Среднее \pm SEM, n = 32 (8 мышей,

по 4 усредненных стимула каждой). (ΔHb - изменения концентрации соответствующей формы гемоглобина). В - Изменение амплитуды HbT -ответа на стимуляцию контралатеральной задней конечности при действии изфлурановой анестезии. Парный t -тест. N до удаления выбросов по правилу $1.5\text{IQR} = 8$

Вызванный HbT -ответ в коре на сенсорную стимуляцию задней конечности в условии анестезии был менее локальным (Рис. 3, А). Область активации сильнее различалась между мышами, однако также совпадала с областью SSp-II (зона первичной чувствительности задних конечностей). Амплитуда увеличения концентрации суммарного гемоглобина (HbT – ответа) составила 1.73 ± 0.64 μM при стимуляции бодрствующих животных и статистически значимо снижалась до 0.31 ± 0.12 μM под действием анестезии ($p < 0.001$) (Рис. 3, Б-В).

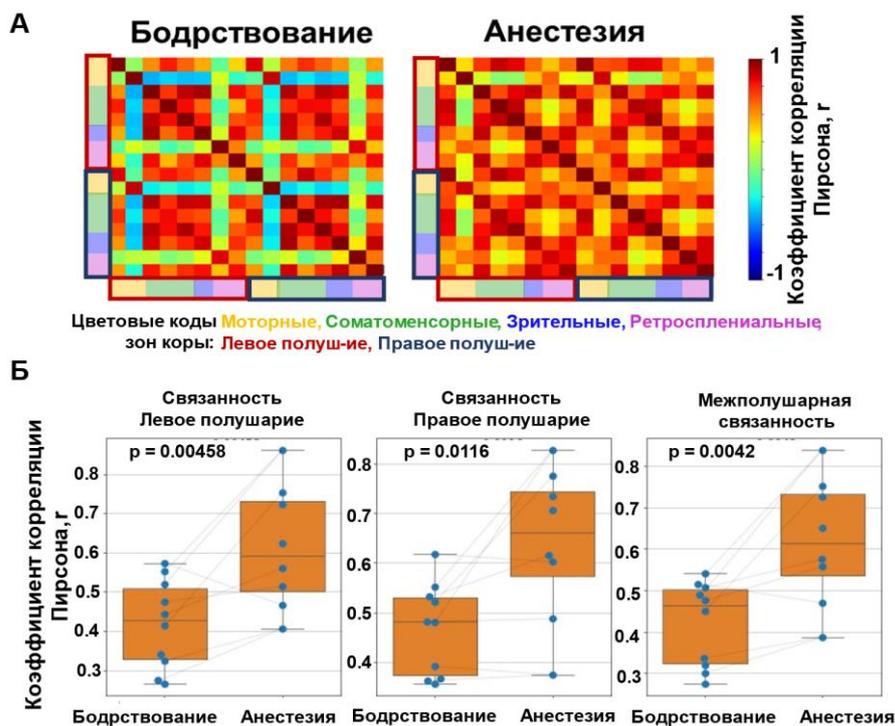


Рис. 4. Изофлурановая анестезия изменяет паттерн функциональной связанности зон коры мозга. А – Матрицы корреляции для бодрствующих и анестезированных животных (Изофлуран 1.5%) Б - Сравнение внутриволновых и межполушарных коэффициентов корреляции HbT -сигнала у бодрствующих животных и у животных под

изфлурановой анестезией. Парный t -тест. N до удаления выбросов по правилу $1.5\text{IQR} = 8$.

Мы оценили, как изофлурановая анестезия влияет на параметры функциональной связанности, построив карты корреляции HbT -сигнала между зонами, определенными по анатомическому атласу. На Рис. 4А можно видеть, что изофлурановая анестезия приводит к увеличению синхронизации активности зон, маскируя функциональные различия активности локальных нейронных сетей.

Таким образом, мы продемонстрировали, что ШОН в режиме детекции внутреннего сигнала, позволяет зарегистрировать локальный вызванный ответ в коре на сенсорную стимуляцию задних конечностей бодрствующих животных по относительному изменению концентраций окисленного и суммарного гемоглобина. В условиях изфлурановой анестезии вызванный ответ снижен по амплитуде и менее локализован. Анестезия значительно изменяет паттерн активности нейронных сетей мозга, оценив влияние анестезии на функциональную связанность, что подтверждается и ранее

проведенными исследованиями (Wright et al., 2017). Это ещё раз указывает на важность разработки подходов для анализа активности мозга у бодрствующих животных, поэтому в дальнейших исследованиях мы сконцентрировались на анализе активности коры мозга бодрствующих животных.

Одновременная регистрация Ca^{2+} и гемодинамической активности коры больших полушарий мозга бодрствующих животных

Появление трансгенных линий мышей, селективно экспрессирующих в нейронах белковые кальциевые сенсоры, например, GCaMP6f расширило возможности ШОН, позволив напрямую детектировать нейронную активность коры мозга животных. Сравнение кальциевой и гемодинамической активностей позволяет оценивать изменения нейроваскулярного сопряжении при различных состояниях.

Мы оценили особенности Ca^{2+} и гемодинамической активности сенсомоторной зоны коры в ответ на стимуляцию конечности бодрствующего животного. На Рис. 5 представлен репрезентативный усредненный Ca^{2+} - и ΔHbT -ответ одного животного на повторную сенсорную стимуляцию правой задней конечности. В ответ на каждый стимул наблюдали локальное увеличение кальция в соматосенсорной коре в первые миллисекунды после начала стимуляции. Затем происходит увеличение притока крови к активированной области.

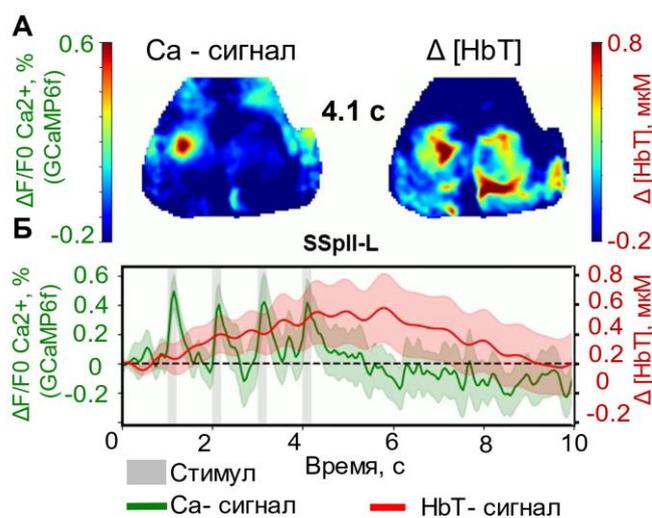


Рис. 5. Ca^{2+} и гемодинамическая активность сенсомоторной зоны коры при стимуляции правой конечности бодрствующего животного. А – Изображения ШОН по $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta[\text{HbT}]$ -сигналу через 4.1 с после начала подачи стимула. Б – Динамика $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta[\text{HbT}]$, усредненная с области чувствительности задних лап левого полушария (SSpII-L). Усреднены 10 повторных стимулов для одного репрезентативного животного. Данные представлены в виде среднего \pm SEM. Стимул представлял собой слабый электрический ток силой 60 мкА, длительность одного стимула – 200 мс.

ШОН позволяет отслеживать локализацию функциональных зон коры. Наложённые друг на друга «маски ответов», определённые по Ca^{2+} - и ΔHbT -активности, для разных мышей представлены на Рис. 6. Шкала показывает, насколько часто между мышами и повторами стимуляций активировались одни и те же области при стимуляции задних конечностей. Разработанный нами алгоритм позволяет определить функциональную область как по Ca^{2+} , так и по и гемодинамической активности. Сила стимула величиной 30 мкА недостаточна для регистрации локального ответа. При силе

стимула 60 и 90 мкА в полушарии, контралатеральной стороне стимуляции, можно наблюдать совпадающую между животными область увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в соматосенсорной зоне коры, отвечающей за чувствительность задних конечностей. К этой же области притекает больше крови, что приводит к появлению области с повышенной $[HbT]$. При этом при увеличении стимула от 60 до 90 мкА возрастает частота активации между мышцами одной той же локальной области в контралатеральном стимулу полушарии, но появляются более выраженная активность в ипсилатеральном полушарии.

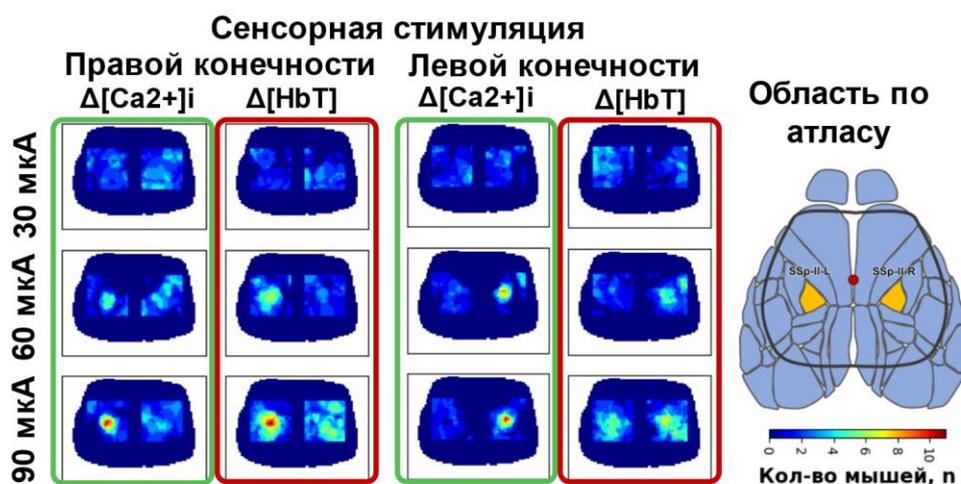


Рис. 6.
Локализация
вызванного
ответа в коре
на стимул
разной силы
(30, 60, 90
мкА),
подаваемый
на правую или
левую
конечность
бодрствующи
х животных.
Маску
определяли по
суммарному
сигналу за
время
действия
стимула.

Регистрация ответа на сенсорную стимуляцию в коре у бодрствующего животного неизбежно накладывается на спонтанное поведение животного (локомоция, груминг и др.) во время съемки ШОН и поведенческой реакцией на сам стимул. Мы оценили, как изменяются параметры ответа на стимул в зависимости от поведенческой реакции животного (Рис. 7). При просмотре видеозаписей поведения животного стимулы были классифицированы по наличию или отсутствию локомоции при подаче электрического стимула на конечность. Наибольшее влияние поведение оказывает на амплитуду гемодинамического ответа, кроме того, вариабельность изменений «базовой» гемодинамической активности, связанной в том числе и с поведением животного, значительно превышает изменения, вызванные сенсорной стимуляцией. Поэтому для анализа ответа на стимул мы вычитали базовый уровень гемодинамической активности.

Более яркая поведенческая реакция животного соответствует более сильному изменению $[Ca^{2+}]_i$ в области коры, отвечающей за чувствительность задних конечностей. Площадь под кривой Ca^{2+} -ответа на стимуляцию без разделения на силу стимула, при отсутствии выраженной поведенческой реакции («без локомоции») составила -0.13 ± 0.34 у.е. (появление отрицательных значений связано с осциллирующей вокруг нулевого значения

природой сигнала). При выраженной поведенческой реакции во время подачи стимула площадь под кривой кальциевого ответа статистически значимо увеличилась до 1.26 ± 1.64 у.е. при реакции, классифицируемой как «вздрагивание», и до 2.09 ± 2.44 у.е. при реакции, классифицируемой как бег (локомоция) ($p = 0.027$ и $p = 0.018$ соответственно по сравнению с отсутствием поведенческой реакции («без локомоции»). Площадь под кривой гемодинамического ответа при вздрагивании также возросла от -0.81 ± 0.29 у.е. до 0.64 ± 1.24 у.е. по сравнению с неподвижной мышью ($p = 0.004$). При беге относительно неподвижности увеличение составило 4.23 ± 2.15 у.е. ($p = 0.001$). Нам не удалось выявить статистически значимого влияния силы стимула. Вариабельность значений по признаку «тип поведения» была больше, чем по признаку «сила стимула».

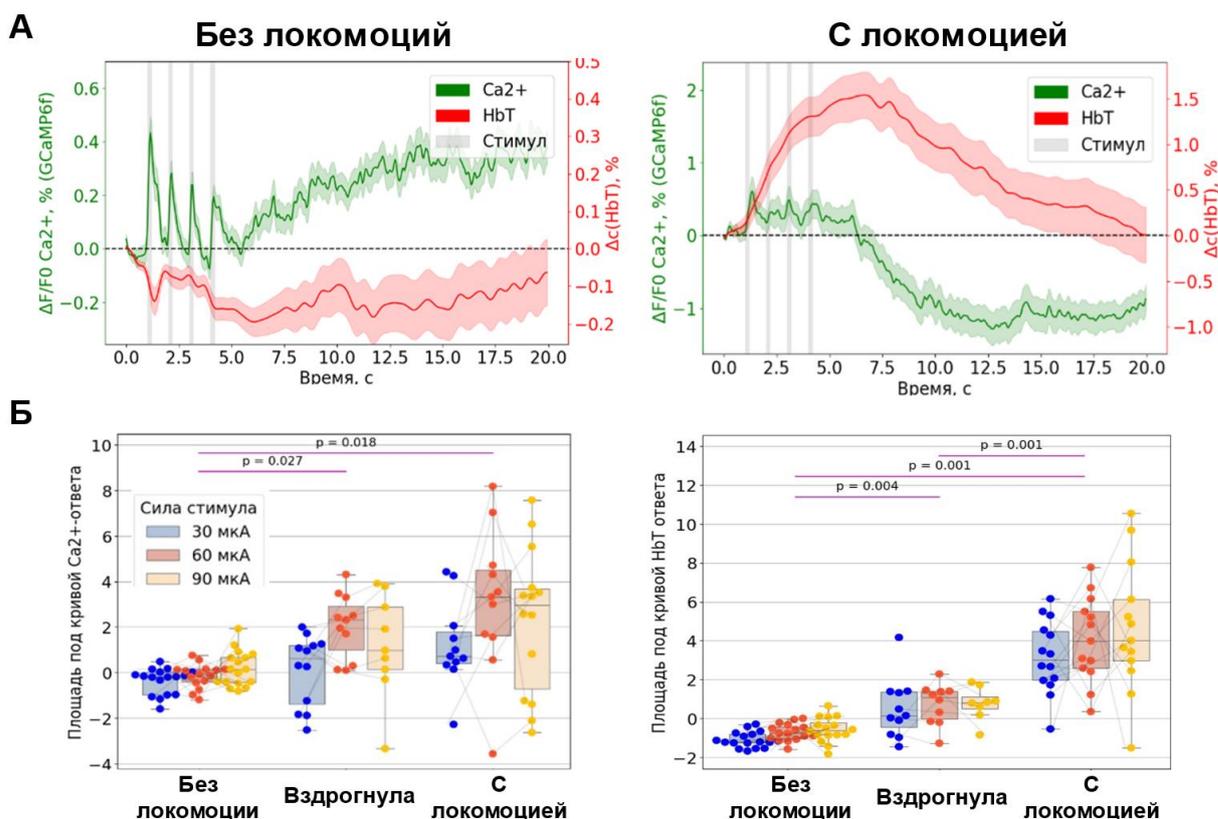


Рис. 7. Поведенческая реакция искажает ответ в коре на сенсорную стимуляцию. А - Динамика $\Delta[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta[HbT]$ ответов в коре больших полушарий на контра-латеральную стимуляцию задней конечности электрическим током силой 90 мкА, не сопровождающихся и сопровождающихся локомоцией. С целью демонстрации влияния «базового уровня» гемодинамических изменений представлены данные без его вычитания. Б - Площадь под кривой $\Delta[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta[HbT]$ ответа на сенсорную стимуляцию задней конечности в норме при варьировании силы стимула и разной поведенческой реакции у мышей линии C57BL/6J-Tg. Two-way repeated-measures ANOVA. N до удаления выбросов по правилу $1.5IQR = 16$.

Таким образом, поведение оказывает более значимое влияние на параметры сенсорного ответа в коре больших полушарий мозга у мышей, чем сила стимула. Наши выводы совпадают с литературными данными, в которых также продемонстрировано значимое влияние локомоции на гемодинамические вызванные ответы в коре и спонтанную кальциевую и гемодинамическую активность (Eyre et al., 2022; Huo, Gao, Drew, 2015; West et al., 2022).

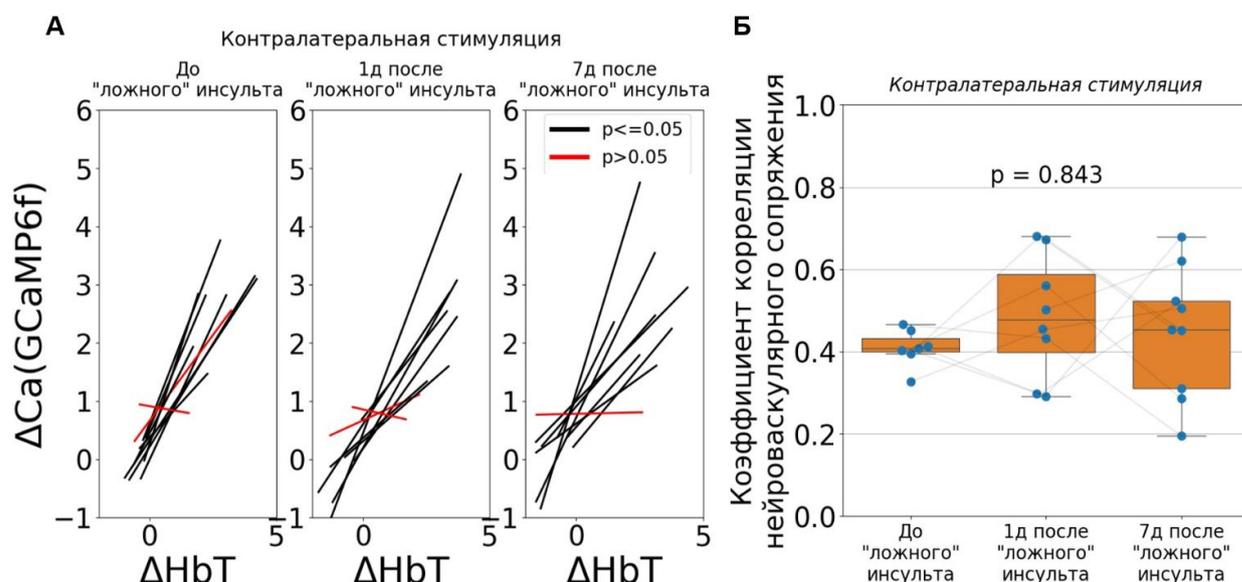


Рис. 8. Оценка нейроваскулярного сопряжения по корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа. А - Линейная регрессия $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta[\text{HbT}]$, построенная по всем ответам вне зависимости от силы стимула и поведения; каждая линия представляет одну мышь. Б - Вариабельность по дням корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих мышей линии C57BL/6J-Tg (N до удаления выбросов по правилу $1.5\text{IQR} = 8$) в норме. Корреляции для данных контралатеральной стимуляции без разделения на левое и правое полушария. ANOVA для повторяющихся измерений.

Важным параметром нормальной физиологии мозга является **сопряжение нейронального и сосудистого ответа** для обеспечения метаболических потребностей ткани мозга. Одновременная регистрация кальциевого и гемодинамического ответа на стимул позволяет провести оценку нейроваскулярного сопряжения методом ШОН. Высокая вариабельность интенсивности ответов на стимул позволила нам рассчитать корреляции для каждого животного между амплитудой кальциевого и гемодинамического ответа. Мы показали, что оценка нейроваскулярного сопряжения по измерению индивидуальных коэффициентов корреляции между амплитудой вызванного кальциевого и гемодинамического ответов в коре достаточно стабильна как между мышами, так и во времени (Рис. 8).

Функциональная связанность является важным параметром фМРТ, который коррелирует с различными неврологическими нарушениями. Поэтому мы оценили, как в норме выглядят матрицы корреляции кальциевой и гемодинамической активности коры мозга при спокойном бодрствовании у мышей линии Thy1-GCaMP6f (Рис. 9). При рассмотрении матрицы корреляции, построенной по спонтанному кальциевому сигналу у бодрствующих мышей в покое, можно отметить высокую корреляцию близко расположенных и, следовательно, функционально связанных зон внутри одного полушария (зеленые овалы на Рис. 9). Заметно снижение корреляции сенсомоторных и ассоциативных областей, вплоть до отрицательных корреляции с ретроспленальной областью коры (желтые квадраты на Рис. 9). Активность гомологичных, билатерально симметричных областей разных полушарий, также

высоко коррелирует (фиолетовый овал на Рис. 9).

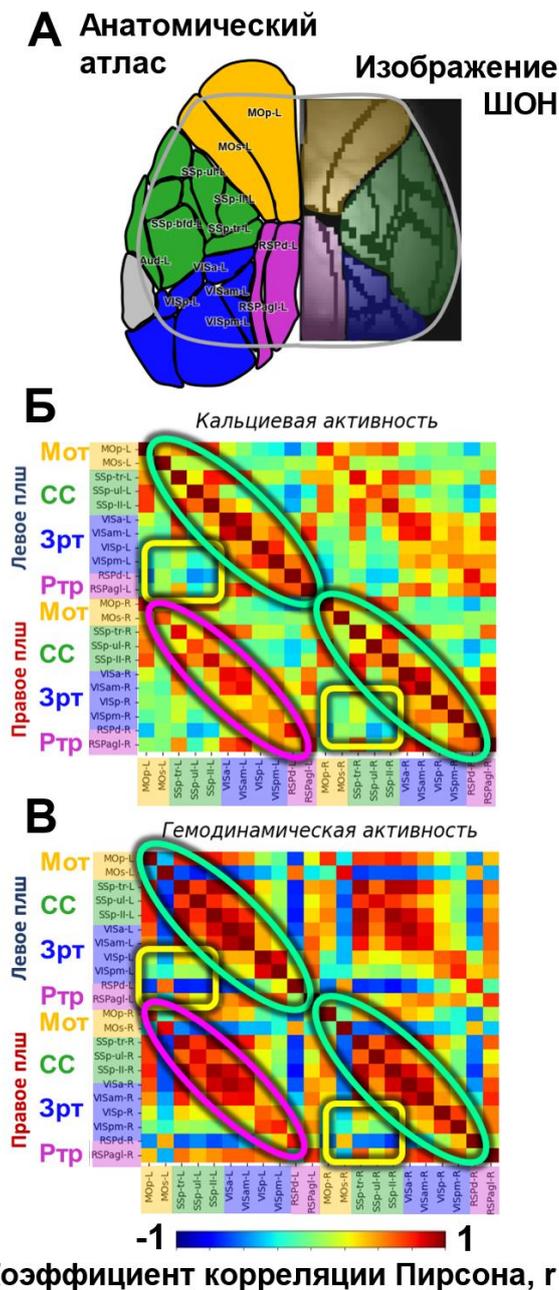


Рис. 9. Паттерн функциональной связанности между анатомическими зонами коры у бодрствующих мышей линии C57BL/6J-Tg в спокойном состоянии. А – схема расположения зон. Б - Матрица корреляции Ca²⁺- сигналов. В - Матрица корреляции HbT-- сигналов. Перед анализом применен Ca активности применен Vand-pass частотный фильтр (0.7-3 Гц), для HbT активности Low-pass до 1.5 Гц, в анализ включены только участки без локомоции. N мышей = 19. Мот – моторные, СС –соматосенсорные, Зрт – зрительные области коры, Ртр – ретроспленальная кора. Выделение областей овалами расшифровано в тексте.

Гемодинамическая активность повторяет особенности, наблюдаемые по кальциевой активности, но характеризуется более высокими коэффициентами корреляции и меньшей специфичностью отдельных зон. Полученные результаты согласуются с литературными данными (Cramer et al., 2019; Vanni et al., 2017; White et al., 2011). Мы установили, что паттерн функциональной связанности остается стабильным в течение 3-х дней повторной регистрации в норме.

Таким образом, в ходе оценки стабильности и разброса различных параметров функциональной активности коры мозга, регистрируемых методом ШОН, наиболее перспективными для дальнейшей оценки последствий инсульта оказались следующие:

1. Локализация кальциевого и гемодинамического вызванного ответа на сенсорную стимуляцию задней конечности.
2. Нейроваскулярное сопряжение, оцененное по коэффициенту корреляции между амплитудой кальциевого и гемодинамического ответа в коре на сенсорную стимуляцию.
3. Коэффициенты межполушарной и внутриполушарной функциональной связанности зон коры мозга.

Влияние фототромбоза на кальциевую и гемодинамическую активность в остром и подостром

периодах у мышей линии Thy1-GCaMP6f

Для выяснения возможностей метода ШОН в оценке функциональных последствий инсульта мы смоделировали методом фототромбоза фокальный очаг ишемии у группы животных и оценили, как инсульт повлиял на параметры функциональной активности коры мозга.

До и после инсульта у бодрствующего животного
(стимуляция **правой** конечности)

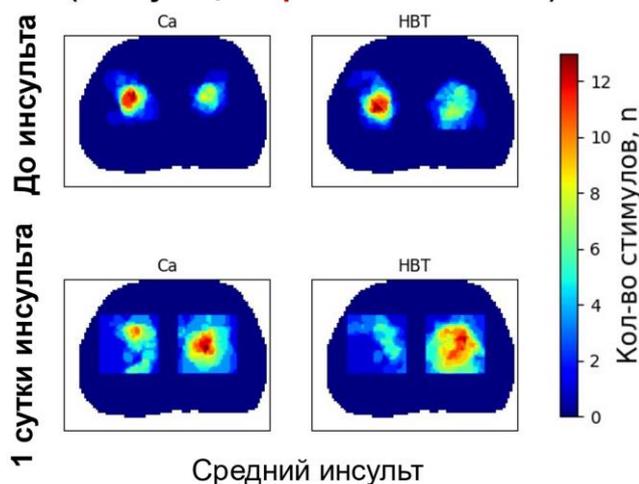


Рис. 10. Пространственное представление ответа в коре на сенсорную стимуляцию для группы «средний» инсульт при контралатеральной стимуляции поврежденного полушария. Объединены данные для силы стимула 60 и 90 мкА. Фототромбоз во всех экспериментах индуцировали в левом полушарии области SSp-II-L.

полушарии увеличивалась частота активации соматосенсорной зоны, что может быть связано с растормаживанием нейронных сетей.

В виду того, что гемодинамический ответ ослабевает в поврежденном полушарии на первые сутки после инсульта, интересно было **оценить, как инсульт влияет на корреляцию амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре**, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих животных (Рис. 11). Фототромбоз вызывает статистически значимое снижение коэффициента корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре на первые сутки после индукции фототромбоза по сравнению с группой «Контроль» ($p = 0.0006$) (Рис. 11Б). Средние значения коэффициента корреляции в группе «Инсульт» составили 0.46 ± 0.24 , -0.02 ± 0.24 , 0.10 ± 0.34 , до индукции фототромбоза, на 1 сутки и на 7 суток после ложного инсульта соответственно. При этом внутри группы «Инсульт» различия между днем до и 7 сутками статистически не значимо что указывает на тенденцию к восстановлению данного параметра к 7 суткам после инсульта и согласуется с описанным ранее (Sunil et al., 2023). Статистически значимых различий в нейроваскулярном сопряжении в интактном полушарии выявлено не было. Аналогичные результаты были получены в эксперименте, где были смоделированы две тяжести инсульта (Рис. 11А). Как средний, так и тяжёлый

Инсульт повлиял на локализацию кальциевого и гемодинамического вызванного ответа на сенсорную стимуляцию задних конечностей в поврежденном полушарии мыши (Рис. 10).

Фотоиндуцированная ишемия приводила к снижению степени совпадения в локализации ответа по кальциевому и гемодинамическому сигналу между мышами на 1 сутки после инсульта. Как по кальциевому, так и по гемодинамическому сигналу в ипсилатеральной стороне стимуляции

инсульт вызывали снижение коэффициента корреляции между амплитудами изменений $[HbT]$ и $[Ca^{2+}]_i$ в соматосенсорной коре в ответ на сенсорную стимуляцию в повреждённом полушарии. Среднее значение коэффициента в среднем без деления на тяжесть инсульта снизилось от 0.72 ± 0.12 до 0.29 ± 0.32 ($p=0.0004$). Коэффициент корреляции между амплитудой ответа на сенсорный стимул по кальцию и гемодинамике в поврежденном полушарии отрицательно коррелировал с размером очага, определенном по МРТ ($r = -0.63$, $p = 0.027$) (Рис. 11В).

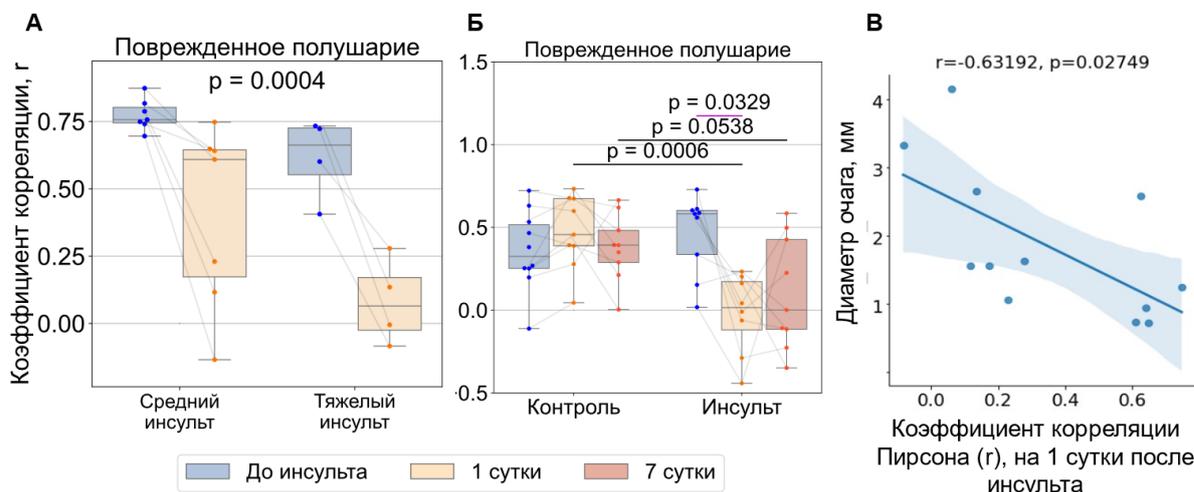


Рис. 11 Влияние инсульта на нейроваскулярное сопряжение в остром и подостром периоде у мышей линии *Thy1-GCaMP6f*. А - Сравнение коэффициентов корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре в группе «средний» и «тяжёлый» инсульт. Mixed-ANOVA, *pared-ttest /wilcoxon*, *Ttest/mwu*. *N* до удаления выбросов по правилу 1.5IQR: «средний» = 8, «тяжёлый» = 8. Б - Коэффициенты корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих мышей в группе «Контроль» и «Инсульт». Mixed-ANOVA, *rm-ANOVA with post-hoc (Bonferroni)* - розовая линия, *Ttest* - черная линия. *N* до удаления выбросов по правилу 1.5IQR: «контроль» = 9, «инсульт» = 9. В - Корреляция диаметра очага на первые сутки, определенного по МРТ и коэффициента нейроваскулярного сопряжения.

Мы оценили, как инсульт влияет на функциональную активность нейронных сетей коры мозга, оценив функциональную связанность полушарий до и после инсульта по кальциевой и гемодинамической активности (Рис. 12). Инсульт приводит к снижению коэффициента межполушарной связанности на 1 сутки после инсульта, как при сравнении со значением внутри группы до инсульта ($p = 0.0001$), так и при сравнении с группой «Контроль» ($p = 0.0066$) (Рис. 12В). Через неделю после инсульта значения возвращаются в пределы нормы. Среднее значения коэффициента до фототромбоза в группе «Инсульт» составило 0.24 ± 0.03 , на первые сутки инсульта 0.09 ± 0.06 и к 7 дню после инсульта 0.21 ± 0.08 . В эксперименте с моделированием двух тяжестей инсульта фототромбоз приводил к снижению межполушарной корреляции (от 0.41 ± 0.07 до 0.31 ± 0.11 , $p=0.0144$), при этом тяжёлый инсульт вызывал более выраженное снижение данного параметра (от 0.41 ± 0.05 до 0.21 ± 0.04 , $p=0.0032$). (Рис. 12Б). По гемодинамическому сигналу не удалось обнаружить статистически значимых различий в коэффициентах корреляции.

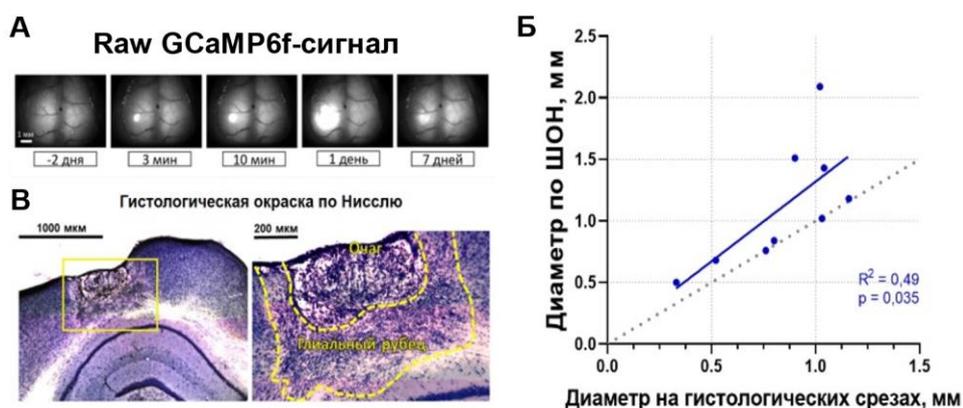


Рис. 13. Размер ишемического очага в коре мозга мышей линии *Thy1-GCaMP6f*, сформированного в результате фототромбоза. А - Репрезентативные флуоресцентные изображения

поверхности коры больших полушарий, полученные методом ШОН для одной мыши; изображения представлены без обработки. Б - Сопоставление диаметра области инсульта, определенного по ШОН на 3 и 10 минуте после индукции фототромбоза, с диаметром инсульта, определенного по гистологическим срезам (корреляция Пирсона). В - Репрезентативное изображение среза мозга, окрашенного по Нислю. (Опубликовано в (Кислухина и др., 2023)).

Мы также оценили, насколько точно методом ШОН можно определить размер очага по сравнению с таким традиционно используемым методом, как МРТ (Рис. 14). Диаметр очага, измеренный методом ШОН, высоко коррелировал с диаметром очага, измеренным МРТ ($r = 0.87$, $p < 0.001$). Однако МРТ позволяет дополнительно оценить размер пенумбры и глубину повреждения.

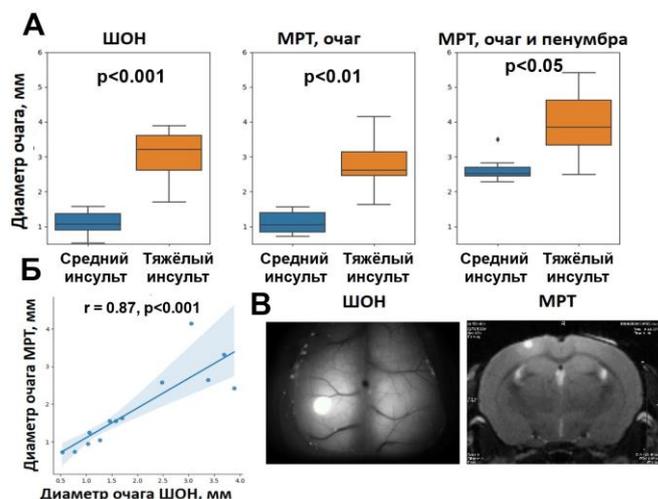


Рис. 14. Измерение диаметра очага при помощи ШОН и МРТ. А - Сравнение диаметров очага, определенных методом ШОН и МРТ. Непарный *t*-test, $n = 8$. Б - Корреляция между размером очага, определенным ШОН и размером очага, определенным МРТ. В - Репрезентативное изображение ШОН, которое использовали для оценки размера очага, и репрезентативный МРТ скан для того же животного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования мы разработали алгоритмы для проведения базового анализа данных активности мозга мышей, получаемых методом ШОН. Была проверена эффективность трех разных подходов для удаления артефактов гемодинамики из регистрируемого флуоресцентного сигнала. Каждый из подходов обладает своими преимуществами и недостатками, наиболее перспективными оказались подходы с использованием данных об изменениях окисленной и восстановленной форм гемоглобина и регрессионный-подход.

Разработанный алгоритм детекции ответа в коре на сенсорный стимул позволил детально описать параметры ответа на сенсорный стимул при разных

физиологических состояниях. Он также позволил оценить изменение локализации ответа на стимул, что в более длительных экспериментах позволит изучить механизмы нейропластичности в процессе восстановления после инсульта. Нами были подобраны две силы стимула 60 и 90 мкА, при которых в большинстве попыток можно наблюдать локальный кальциевый ответ в коре мозга мыши. Установлено, что поведение животного оказывает сильное влияние на кальциевый и гемодинамический ответ на сенсорную стимуляцию. Для более четкого анализа необходима дальнейшая конкретизация поведенческих реакций, в том числе покадровая детекция положения лап.

Для описания стимула мы выбрали условия, которые позволяют сравнить ответы до и после индукции инсульта у животных, с целью поиска параметров, отражающих тяжесть инсульта. Индивидуальные разбросы значений, не позволили обнаружить статистически значимые эффекты фототромбоза при сравнении групп. Однако одним из преимуществ ШОН является возможность в хроническом эксперименте наблюдать за динамикой различных параметров у одного и того же животного. Поэтому нам удалось обнаружить статистически значимую корреляцию между интенсивностью гемодинамического и кальциевого ответа в коре на сенсорный стимул задних конечностей и размером очага, определенным методом ШОН, а также сенсомоторным дефицитом у мышей.

Сенсорная стимуляция задних конечностей и регистрация ответа в соматосенсорной зоне позволили оценить нейроваскулярное сопряжение, по индивидуальному анализу корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответов. Данный параметр оказался стабильным в контрольной группе, снижался на первые сутки после инсульта и восстанавливался к 7 дню после инсульта.

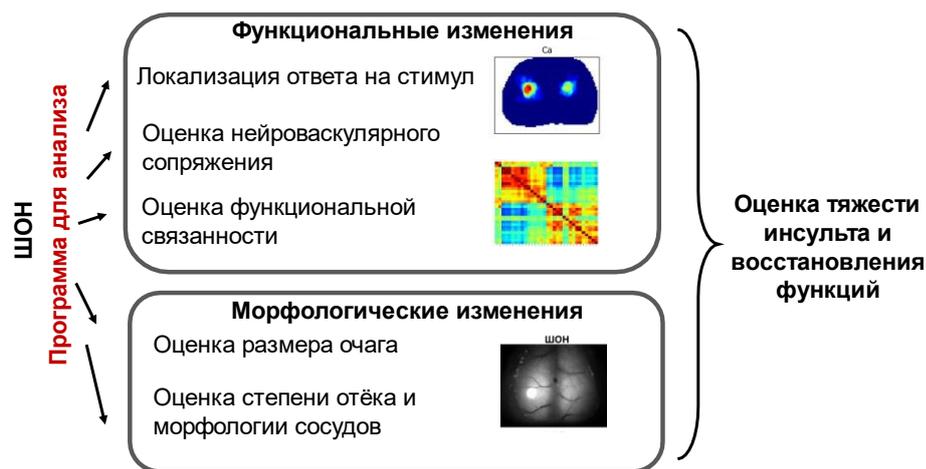


Рис. 15. Оптический подход для изучения последствий инсульта у лабораторных животных.

Мы провели корреляционный анализ спонтанной активности мозга, для оценки функциональной связанности и нарушения работы нейронных сетей при инсульте. Нами показано снижение коэффициентов межполушарной корреляции в постишемический период, с последующим восстановлением на 7

сутки. Степень нарушения межполушарной корреляции коррелирует с размером очага инсульта.

Размер очага инсульта, определенный методом ШОН у мышей, высоко коррелирует с размером очага, определенным методом МРТ и классической гистологией. Поэтому метод ШОН может быть использован для наблюдения за динамикой размера очага, а также оценки степени отека ткани.

В ходе выполнения работы был создан и апробирован программный код для автоматизации анализа данных ШОН.

Таким образом, метод ШОН может быть успешно использован для оценки последствий инсульта у мышей, в дополнение к традиционным методам анализа тяжести инсульта он предоставляет дополнительную информацию об изменении функционирования коры мозга на фоне разных состояний организма животного в условиях нормы и при развитии инсульта.

ВЫВОДЫ

1. Разработан алгоритм анализа изображений, получаемых методом ШОН, создана программа с графическим интерфейсом для автоматизации обработки.
2. Кальциевый белковый сенсор GCaMP6f, экспрессируемый в нейронах трансгенных мышей, может быть использован для оценки нарушения кальциевого гомеостаза при эксайтотоксичности, одного из повреждающих факторов ишемии.
3. Установлено, что изофлурановый наркоз снижает в 4 раза амплитуду, а также уменьшает локальность вызванного сенсорной стимуляцией гемодинамического ответа в коре у мышей по сравнению с бодрствующими животными.
4. Метод ШОН позволяет оценить морфофункциональное состояние коры мозга при ишемии и определить тяжесть поражения, по измерению размера ишемического очага, нейроваскулярного сопряжения, функциональной связанности и локализации ответа на сенсорную стимуляцию у мышей.
5. Фотоиндуцированная ишемия вызывает в острый период инсульта (на 1 сутки) снижение нейроваскулярного сопряжения в поврежденном полушарии в 2 и 4,9 раз соответственно для группы животных со средним и тяжелым инсультом, а также снижение межполушарной связанности в 2 раза в группе животных с тяжелым инсультом. Данные параметры коррелируют с размером ишемического очага и восстанавливаются на 7 сутки после инсульта.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных»:

1. Bakaeva, Z., Lizunova, N., Tarzhanov, I., Boyarkin, D., Petrichuk, S., Pinelis, V., Fisenko, A., Tuzikov, A., Sharipov, R., and Surin, A. Lipopolysaccharide from *e. coli* increases glutamate-induced disturbances of calcium homeostasis, the functional state of mitochondria, and the death of cultured cortical neurons //Frontiers in molecular neuroscience. – 2022. – Т. 14. – С. 811171. (JIF - 3.5, WoS) (2.31/1.15) *
2. **Лизунова Н. В.**, Кислухина Е. Н., Сурин А. М. Перинатальный инсульт:

моделирование и возможности нейровизуализации //Российский педиатрический журнал. – 2022. – Т. 25. – №. 2. – С. 128-138. (IF - 0.34, РИНЦ) (1.34/0.65) *

3 Кислухина, Е.Н., **Лизунова, Н.В.**, Лисина, О.Ю., Шарипов, Р.Р., Красильникова, И.А., Бакаева, З.В., Пинелис, В.Г. и Сурин, А.М. Индуцированные глутаматом и ишемией изменения ионного гомеостаза в нейрональной культуре и коре головного мозга мышей, экспрессирующих Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67. – №. 1. – С. 5-20. (IF - 0.4, РИНЦ) (1.61/0.5). *

Свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ:

1. **Лизунова Н. В.**, Кислухина Е. Н., Сурин А. М., Горбачева Л.Р., Бакаева З.В.; правообладатель Лизунова Н.В. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024666595, Российская Федерация. Программа для автоматизации выделения физиологически значимых сигналов из данных широкопольной оптической нейровизуализации: Бюл. № 7 / 2024 – Зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ.

* – Объем в усл. печ. л./вклад автора в усл. печ. л.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ШОН - широкопольная оптическая нейровизуализация
 $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация кальция
 $[Ca^{2+}]_c$ – концентрация кальция в цитозоле
HbO - окисленная форма гемоглобина
HbR - восстановленная форма гемоглобина
HbT - суммарный гемоглобин
GCaMP6f - генетически-кодируемый белковый сенсор ионов кальция
БР - Бенгальский розовый
ФТ - фотоиндуцированная ишемия (фототромбоз)
МРТ - магнитно-резонансная томография
фМРТ - функциональная магнитно-резонансная томография
фБИКС / fNIRS - лазерная спектроскопия в ближнем инфракрасном диапазоне
OISI - метода оптического картирования по внутреннему сигналу
BOLD-сигнал – сигнал, зависимый от уровня оксигенации крови

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность Е.Н. Кислухиной за помощь в отладке метода ШОН, планировании и реализации экспериментов. Автор признательна Р.Р. Шарипову за помощь в реализации флуоресцентно-микроскопических измерений. Автор благодарна А.М. Сурина и Л.Р. Горбачевой за ценные советы, руководство исследованием и материально-информационную поддержку. Автор благодарна и.о. заведующей лаборатории нейробиологии и основ развития мозга З.В. Бакаевой и начальнику Медико-генетического центра ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» К.В. Савостьянову за финансовое и материальное обеспечение исследований на базе ФГАУ «НМИЦ здоровья детей».