

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Горбачева Любовь Руфэлевна,
доктор биологических наук, доцент

Сурин Александр Михайлович,
доктор биологических наук

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ И СТЕПЕНЬ ЕЁ РАЗРАБОТАННОСТИ.....	6
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	7
НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ	7
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.....	8
МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	8
ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.....	9
СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ ДАННЫХ	10
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.....	10
ПУБЛИКАЦИИ.....	10
ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. ПОДХОДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ МОЗГА.....	11
1.2. ШИРОКОПОЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИЯ.....	18
1.2.1. Принцип широкопольной оптической нейровизуализации	18
1.2.2. Нейроваскулярное сопряжение и его оценка методом ШОН.....	22
1.2.3. Функциональное картирование зон мозга с помощью ШОН.....	32
1.2.4. Спонтанная активность коры мозга в покое.....	34
1.2.5. Функциональная связанность и способы её оценки методом ШОН.....	36
1.3. ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ИНСУЛЬТА И ЕГО МОДЕЛИРОВАНИЕ НА ЖИВОТНЫХ.....	44
1.3.1. Моделирование инсульта на лабораторных грызунах	45
1.3.2. Изучение инсульта методами нейровизуализации	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	50
2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
2.2. ХИРУРГИЧЕСКИЕ МАНИПУЛЯЦИИ С ЖИВОТНЫМИ.....	50
2.3. ШИРОКОПОЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИЯ.....	51
2.4. СТИМУЛЯЦИЯ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ МЫШИ	54

2.5. МОДЕЛЬ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ	56
2.6. МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ (МРТ).....	56
2.7. ОЦЕНКА СЕНСОМОТОРНОГО ДЕФИЦИТА С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА РЕШЕТКА.....	57
2.8. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	57
2.9. ВОЗДЕЙСТВИЯ И МАНИПУЛЯЦИИ С ЖИВОТНЫМИ В ХОДЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	58
2.10. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ И АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ ШОН.....	60
2.11. ПРОТОКОЛ ЭКСПЕРИМЕНТОВ С ИССЛЕДОВАНИЕМ КАЛЬЦИЕВЫХ ОТВЕТОВ КЛЕТОК IN VITRO	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	65
3.1. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ ШОН	65
3.1.1. Разработка алгоритма для выравнивания изображений ШОН	65
3.1.2. Разработка алгоритма для минимизации шумов.....	66
3.1.3. Подбор оптимальных алгоритмов для перевода значений интенсивности в полезный сигнал.	69
3.1.4. Подбор оптимального подхода для автоматической детекции вызванного ответа в коре мозга на сенсорную стимуляцию.....	73
3.1.5. Стандартизация протокола анализа данных ШОН	78
3.2. ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОРЕ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ В НОРМЕ.....	82
3.2.1. Регистрация вызванного гемодинамического ответа в коре больших полушарий при стимуляции задних конечностей бодрствующих и анестезированных животных	82
3.2.2. Частотные характеристики внутреннего сигнала коры мозга при спонтанном свободном поведении.....	87
3.2.3. Анализ функциональной связанности мозга при бодрствовании и в условиях анестезии у мышей	90
3.3. ОДНОВРЕМЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ГЕМОДИНАМИЧЕСКОЙ И КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ КОРЫ МОЗГА МЫШЕЙ В НОРМЕ	91
3.3.1. Локализация вызванного ответа в коре на стимуляцию задних конечностей у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	92
3.3.2. Параметры кальциевого и гемодинамического ответа на сенсорную стимуляцию конечностей в коре больших полушарий у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	94
3.3.3. Оценка влияния силы стимула и поведения на ответ в коре на сенсорную стимуляцию конечности индивидуально по мышам линии Thy1-GCaMP6f.....	98
3.3.4. Оценка нейроваскулярного сопряжения в норме у мышей	100

3.3.5. Оценка функциональной связанности работы мозга по кальциевой и гемодинамической активности коры в норме у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	103
3.4. ВЛИЯНИЕ ФОТОТРОМБОЗА НА КАЛЬЦИЕВУЮ И ГЕМОДИНАМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В ОСТРОМ И ПОДОСТРОМ ПЕРИОДАХ У МЫШЕЙ ЛИНИИ THY1-GCAMP6F.....	106
3.4.1. Влияние инсульта на локализацию вызванного ответа в коре на сенсорную стимуляцию у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	106
3.4.2. Влияние инсульта на параметры вызванного ответа в коре у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	108
3.4.3. Влияние инсульта на нейроваскулярное сопряжение у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	111
3.4.4. Влияние инсульта на функциональную связанность зон мозга у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	113
3.4.5. Валидация регистрации внутриклеточного нейронального кальция в экспериментах на первичных нейроглиальных культурах <i>in vitro</i> в модели глутаматной эксайтотоксичности..	116
3.4.6. Определение размера очага повреждения при помощи ШОН у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	118
3.4.7. Корреляция параметров активности мозга, определенных по ШОН, с размером ишемического очага у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	120
3.4.8. Корреляция параметров активности мозга, определенных по ШОН, со степенью сенсомоторного дефицита.....	122
3.5. СОПОСТАВЛЕНИЕ ТЯЖЕСТИ ИНСУЛЬТА И ПАРАМЕТРОВ АКТИВНОСТИ МОЗГА, РЕГИСТРИРУЕМЫХ ТРЁХВОЛНОВОЙ СИСТЕМОЙ ШОН У МЫШЕЙ ЛИНИИ THY1-GCAMP6F...	123
3.5.1. Влияние тяжести инсульта на локализацию вызванного ответа в коре на сенсорную стимуляцию конечности в остром периоде у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	123
3.5.2. Влияние инсульта на параметры сенсорного ответа в коре в острый период у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	125
3.5.3. Влияние инсульта на нейроваскулярное сопряжение в коре в острый период.....	128
3.5.5. Влияние инсульта на функциональную связанность зон коры у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	133
3.5.5. Особенности оценки размера ишемического очага методами ШОН и МРТ у мышей линии Thy1-GCaMP6f.....	141
3.5.6. Корреляция параметров активности коры мозга, определенных по ШОН, с размером очага.....	143
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	148
ВЫВОДЫ.....	151

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	151
БЛАГОДАРНОСТИ	152
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	152

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень её разработанности

Исследование 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 et al., 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., 2016b; White et al., 2011; Winship, Murphy, 2008; Лизунова et al., 2022]. Преимущество ШОН - возможность наблюдения за морфологическими и функциональными изменениями в коре мозга в хроническом эксперименте. Кроме того, ШОН сочетает в себе достоинства применяемых в клинике методов регистрации активности мозга, таких как электроэнцефалограмма (ЭЭГ) и функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ), что обеспечивает возможность трансляции получаемых на животных данных в клиническую практику.

Возможности, предоставляемые ШОН, очень 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 et al., 2021].

При повреждении тканей мозга происходит перераспределение утраченных функций [Murphy, Corbett, 2009]. Методы, позволяющие количественно и в реальном времени исследовать процесс восстановления функций коры в посттравматический период, становятся самыми актуальными в экспериментальных исследованиях и начинают применяться (пока единично, в стадии попыток) в клинику посттравматического восстановления. 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-резонансной томографии (МРТ).

Цели и задачи исследования

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

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, регистрируемые с помощью ШОН у мышей, 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 разных видов анестезии, в условиях бодрствования при спонтанном поведении и сенсорной стимуляции, в 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 болезнью 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

Для регистрации активности коры головного мозга мышей использовали метод широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН). ШОН позволяет регистрировать на видеокамеру через заранее подготовленное оптически прозрачное краниальное окно одновременно активность нейронов в коре мозга мышей и изменения концентраций окисленной и восстановленной формы гемоглобина в сосудистом русле коры. Нейрональную активность детектировали по изменению флуоресценции генетически-кодированного белкового сенсора ионов кальция (GCaMP6f), гемодинамический сигнал регистрировали по изменению интенсивности рассеянного света определённых длин волн. Регистрацию активности проводили как у бодрствующих мышей, так и в условиях анестезии (1,5% изофлуран). Установка для ШОН включала мультиволновую систему освещения, 4х-эпиобъектив, высокоскоростную камеру (40 Гц). Объект облучали поочередно светом трех длин волн (470, 530 или 505 и 656 нм) с частотой 20, 10 и 10 Гц соответственно. Результатом съемки являлся набор 8-битных изображений с разрешением 348x256 пикселей. Количество

изображений в каждой серии варьировало от 8800 до 17600 в зависимости от протокола съемки. Одновременно с регистрацией активности мозга проводили видеозапись поведения животного.

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

Мышей линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393, Jackson Laboratory, США) и животных генетически родственной линии C57BL/6 содержали в стандартных условиях (22°C, 12-часовой цикл день/ночь) с неограниченным доступом к воде и пище. Эксперименты с участием животных проводили в соответствии с рекомендациями директивы № 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследований был одобрен локальными этическими комитетами ФГБНУ «НИИОПП» (№05-06/12) и ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» (протокол заседания №1 от 30.01.2018).

Код для автоматизации анализа изображений написан на языке Python в среде JupyterNotebook.

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 данных

Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик и соответствуют поставленным задачам. Результаты, представленные в диссертационной работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Для анализа данных использованы адекватные и обоснованные статистические тесты. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной тематической литературы.

Апробация работы

Результаты данной 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).

Публикации

По результатам работы опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, индексируемых базами Web of Science, Scopus и RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ. 1.5.5 – физиология человека и животных, и 4 тезиса в сборниках докладов международных и всероссийских конференции. Получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

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 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Подходы для исследования активности мозга

Функциональная активность нервной ткани во многом определяется её электрохимическими свойствами, поэтому в течение уже многих десятилетий электрофизиологические методы являются «золотым стандартом» в нейробиологии [Scanziani, Häusser, 2009]. Электрофизиология обладает высоким временным разрешением (микросекунды) и оптимальным соотношением сигнал-шум [Lewis et al., 2023; Scanziani, Häusser, 2009]. Пространственное разрешение электродов ограничивается записью активности единичных клеток, либо суммарной активности небольшой популяции клеток. Развитие подхода с использованием имплантируемых мультиэлектродных матриц увеличивает доступную область регистрации, позволяя регистрировать внеклеточные потенциалы с пространственным разрешением, которое зависит от размера и плотности регистрирующих микроэлектродов [Lewis et al., 2023]. Однако рассмотренные методы предполагают непосредственный контакт электрода с тканью мозга, что неизбежно сопровождается воспалением и повреждением нейронов, нарушением гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [Erofeev et al., 2022]. Нейроны организуют сложные функциональные сети за счет коротких и длинных проекций, а также взаимодействуют с другими компонентами ткани мозга, такими как астроциты, микроглия и сосуды. Поэтому для изучения принципов функционирования мозга необходима возможность регистрации популяционной активности одновременно в разных областях мозга, а также изменений в функционировании отличных от нейронов компонентов нервной ткани.

В последние годы всё большую популярность в нейробиологии набирают оптические методы исследования мозга [Lewis et al., 2023]. Оптический подход позволяет детектировать широкий спектр физиологических параметров (концентрацию ионов кальция [Tian et al., 2009], хлора и pH [Batti et al., 2013], калия [Bazzigaluppi et al., 2015], нейромедиаторов [Xie et al., 2016], мембранный потенциал [Brown et al., 2009], насыщенность ткани кислородом [Ma et al., 2016a], скорость кровотока [Miao et al., 2017], температуру [Musolino et al., 2016]. Более того, с помощью оптогенетики, метода, основанного на применении трансмембранных белков опсинов, способных изменять свою конформацию под воздействием света, появилась возможность использовать оптические

инструменты не только для регистрации процессов, но и для стимуляции нервной ткани [Nazempour et al., 2022]. Доставку света осуществляют при помощи имплантации в интересующий участок мозга оптического волокна. Через подобные оптические волокна возможна регистрация флуоресцентного сигнала различных сенсоров, такой подход называется оптоволоконная фотометрия. Преимущество данного метода – возможность регистрации сигнала с глубоких структур мозга. Однако, как и в случае с электродами, подход позволяет регистрировать сигнал лишь небольшой области (диаметр оптоволоконна в среднем около 200-400 мкм), а имплантация волокна сопряжена с повреждением ткани мозга. Большого пространственного разрешения и регистрации сигнала с большей области (около 1 мм) можно добиться, используя имплантируемые миниатюрные микроскопы (минископы). Минископы позволяют визуализировать активность одновременно сотен нейронов у животного в свободном поведении в таких структурах, как гиппокамп [Sotskov et al., 2021]. Но стоит также отметить необходимость имплантации линзы и других оптических частей минископа в мозг, что сопряжено с нарушением нормальной физиологии ткани.

В последние два десятилетия двухфотонная микроскопия стала популярным методом исследования интактного мозга [Grienberger et al., 2022]. Преимуществами метода по сравнению с рассмотренными ранее являются меньшая инвазивность, поскольку подход не требует нарушения твердой мозговой оболочки и ткани мозга, высокое пространственное разрешение, позволяющее регистрировать отдельно активность субклеточных структур (тела клеток, дендритов, аксонов), а также возможность наблюдать за активностью не только нейронов, но и астроцитов [Fedotova et al., 2023], микроглии [Vok et al., 2015], целостностью ГЭБ [Kucharz et al., 2022]. Использование генетически-кодированных сенсоров, возбуждаемых в ближнем инфракрасном свете, позволяет регистрировать через краниальное окно активность нейронов в нижних слоях коры и даже в гиппокампе на глубине до 1000 мкм [Kondo et al., 2017; Tischbirek et al., 2015]. Скорость регистрации сигнала зависит от многих параметров, таких как разрешение, экспозиция, настроек сканирования, но в среднем составляет около 30 Гц, что достаточно для регистрации активности нейронов с помощью наиболее часто используемых кальциевых белковых сенсоров [Grienberger et al., 2022]. Однако область одновременной регистрации при двухфотонной микроскопии ограничена (< 1 мм) и обратно пропорциональна скорости регистрации изображений, кроме того для обеспечения оптического доступа для объектива необходимо удаление участка черепа и имплантация покровного стекла для хронических экспериментов, что может сопровождаться воспалительной реакцией и приводить к повреждению мозговых оболочек [Grienberger et al., 2022].

С появлением генетически-кодируемых флуоресцентных сенсоров и подходов для создания животных, экспрессирующих данные сенсоры в определенных клетках мозга, получил развитие метод широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) [Brier et al., 2019; Cramer et al., 2019; Murphy et al., 2018; Ren, Komiyama, 2021; West et al., 2022; Wright et al., 2017]. Технически простой подход подразумевает использование диодных источников подходящей длины волны и фиксирующей изображения высокоскоростной камеры (**рисунок 1**). Несмотря на то, что ШОН не обеспечивает визуализации отдельных нейронов или капилляров, он предоставляет возможность картировать нейрональную и гемодинамическую активность одновременно на большой поверхности мозга (диаметр краниального окна коло 8 мм) даже бодрствующего животного со скоростью, достаточной для наблюдения распространяющихся нейрональных возбуждений [Lewis et al., 2023]. Подготовка животного к экспериментам с использованием ШОН не обязательно требует удаления кости черепа, распространенным подходом является истончение поверхностных слоев кости до достижения прозрачности, однако, некоторые группы успешно применяют данный метод и без истончения с минимальным инвазивным воздействием [Padawer-Curry et al., 2023; Silasi et al., 2016]. Ещё одним важным достоинством метода ШОН является возможность одновременной регистрации нескольких параметров, например, флуоресценции кальциевого сенсора и относительных изменений концентраций окси- и дезоксигемоглобина, что важно для оценки взаимосвязи нейрональных и метаболических процессов в мозге в норме и при патологиях.

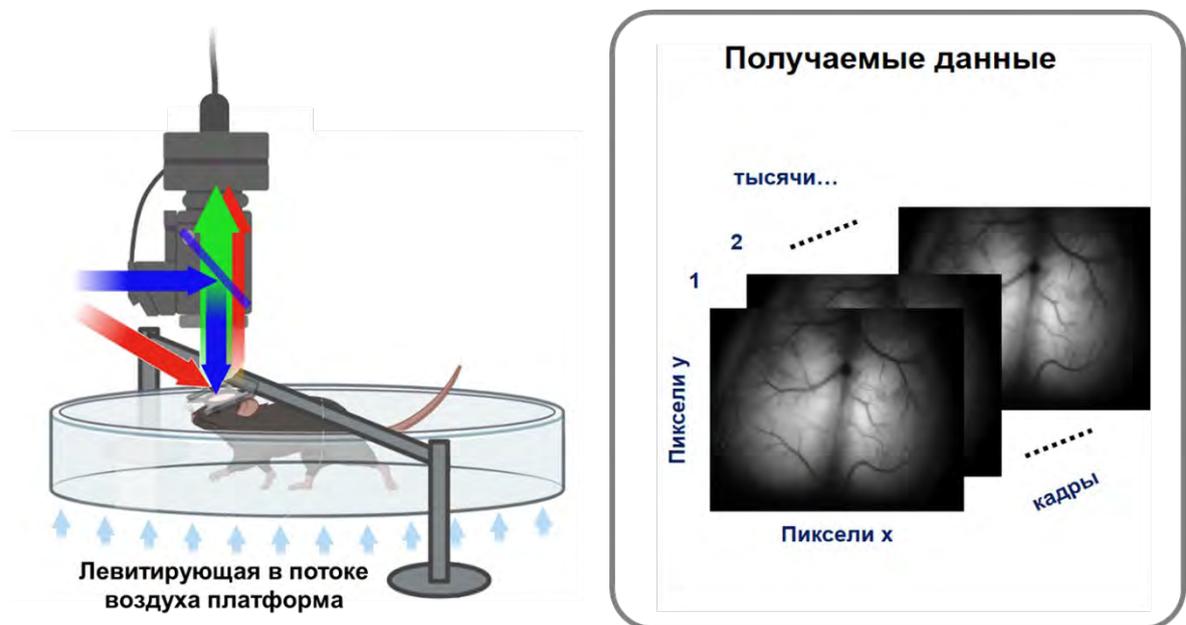


Рисунок 1. Принцип метода широкопольной оптической нейровизуализации.

В **таблице 1** суммированы недостатки и преимущества основных подходов для изучения мозга, используемых в нейробиологии.

Таблица 1. Сравнение подходов для изучения активности мозга. Взято с дополнениями и изменениями из [Lewis et al., 2023; Ma Ying, 2018].

	Имплантируемые мультиэлектродные матрицы	Фотометрия	Двухфотонная микроскопия	ШОН	ЭЭГ и МЭГ	ПЭТ	фМРТ	фБИКС
Временное разрешение	< 1 мс	< 1 мс	< 1 с, обычно частота регистрации в диапазоне единиц – десятков Гц. Существуют специальные сканирующие системы, способные регистрировать изображения со скоростью до 1 кГц.	< 100 мс, обычно в диапазоне от 10 до 40 Гц. При использовании высокоскоростных камер и уменьшении разрешения изображения возможна частота регистрации до нескольких сотен Гц.	<1 мс	Около 45 сек	200 мс-1 сек	< 100 мс (До 100 Гц)
Пространственное разрешение	Регистрация суммарной электрической активности с области диаметром несколько сотен микрон. По отдельным потенциалам действия можно разделить отдельные нейроны.	Суммарный оптический сигнал с области вокруг вершины оптоволокну (диаметр оптоволокну 200-400 мкм)	Субклеточное (меньше микрона)	Десятки микрон. Разрешение зависит от объектива и матрицы камеры, суммарный сигнал популяции нейронов.	0.5 (МЭГ)-1 (ЭЭГ) см	>5 мм	1-5 мм	>1 см
Область регистрации	Популяция из тысяч клеток в области расположения импланта. Возможна регистрация с глубоких структур мозга.	Популяция из тысяч клеток в области расположения волокна, зависит от экспрессии сенсора. Возможна регистрация с глубоких структур мозга.	Популяция из тысяч клеток в области расположения краниального окна, зависит от объектива и заданной области сканирования (Глубина до 1000 мкм)	Дорзальная поверхность коры головного мозга лабораторных грызунов	Кора больших полушарий головного мозга, кора мозжечка	Весь мозг	Весь мозг	Кора больших полушарий головного мозга

Стабильность во времени	> 1 года. Можно регистрировать долговременные данные из одной и той же популяции, но однозначная идентификация одного и того же нейрона во времени может быть сложной задачей	Можно регистрировать долговременные данные из одной и той же популяции, но однозначная идентификация одного и того же нейрона во времени может быть сложной задачей	Месяцы, Возможна визуализация одних и тех же областей.	Месяцы, Возможна визуализация одних и тех же областей.	-	-	-	-
Инвазивность	Средняя степень, необходимо выполнить краниотомию и имплантировать матрицу в мозг. Возможно повреждение тканей и развитие воспаления.	Средняя степень, необходимо выполнить краниотомию и имплантировать волокно в мозг. Возможно повреждение тканей и развитие воспаления.	Низкая степень, необходимо выполнить краниотомию и установку краниального окна. Возможно развитие воспаления.	Низкая степень, без краниотомии, для улучшения качества сигнала применяют истончение костей черепа.	Неинвазивный подход	Неинвазивный подход, (необходимо введение радиоактивного трейсера)	Неинвазивный подход	Неинвазивный подход
Источник сигнала	Электрические потенциалы	Флуоресцентные сенсоры	Флуоресцентные сенсоры	Флуоресцентные сенсоры, поглощение света гемоглобином	Электрические потенциалы	Радиоактивный трейсер, вводимый в организм (например, аналог глюкозы с изотопной меткой)		сигнал, зависимый от уровня оксигенации крови
Применение в клинике	Доклиника (единичные случаи испытаний на людях)	Доклиника	Доклиника	Доклиника	Доклиника, клиника	Доклиника, клиника	Доклиника, клиника	Доклиника, клиника
Ссылки	[Hong, Lieber, 2019; Lewis et al., 2023]	[Lewis et al., 2023]	[Lewis et al., 2023]	[Lewis et al., 2023; Ma Ying, 2018]	[Hari, Puce, 2023; Ma Ying, 2018]	[Ma Ying, 2018]	[Gorges et al., 2017; Ma Ying, 2018]	[Ferrari, Quaresima, 2012; Yatsyk et al., 2023]

Все ранее описанные подходы недоступны для применения на человеке, за исключением единичных случаев имплантации микроэлектродных чипов и проведения электрофизиологических регистраций при операциях на открытом мозге. Однако при исследовании механизмов функционирования мозга животных в норме и при патологиях необходимо обеспечить транслируемость результатов, получаемых на животных и возможность сравнения получаемых данных. Далее будут рассмотрены используемые в клинике методы анализа активности мозга.

Инвазивность процедуры имплантации электродов значительно ограничивает клиническое применение электрофизиологии. Это ограничение преодолевается при регистрации электрических сигналов с поверхности черепа – электроэнцефалографии (ЭЭГ), а также магнитоэнцефалографии (МЭГ), детектирующей магнитные поля, возникающие вследствие электрической активности мозга [Nagi, Puce, 2023]. Несмотря на высокое временное разрешение (< 1 мс), метод характеризуется слабым пространственным разрешением, высоким уровнем шума и сложностями при установлении точного источника регистрируемой активности [Yatsyk et al., 2023]. Для преодоления этих недостатков были разработаны методы неинвазивной компьютерной визуализации активности мозга, такие как однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ).

В случае SPECT для визуализации используют гамма-излучение радиоактивного трейсера, вводимого в кровоток, при этом данный метод, являясь самым дешёвым, обладает минимальной пространственной (сантиметры) и временной (десятки секунд) разрешающей способностью [Davis et al., 2020].

ПЭТ также основана на детекции гамма-излучения. Радиоактивный трейсер, вводимый в организм (например, аналог глюкозы с изотопной меткой) претерпевает один из видов бета-распада с испусканием позитронов, позитроны аннигилируют при встрече с электронами атомов ткани с испусканием антипараллельных 2-ух гамма-квантов. Эти гамма-кванты фиксируются циклическим детектором, что позволяет установить место аннигиляции позитрона. При помощи ПЭТ можно определять метаболизм глюкозы в разных зонах мозга, активность потребления аминокислот, степень связывания конкурентных агонистов с различными рецепторами (чем меньше этот искусственный радиоактивный агонист связывается с рецептором, тем больше естественного агониста в данной области), определять наличие молекул, к которым придуманы безопасные лиганды с изотопной меткой, активность ферментов, если ввести его субстрат и наблюдать за его распадом [Tai, Piccini, 2004]. Однако необходимость введения в кровоток радиоактивного индикатора ограничивает его применение в исследовательских целях.

фМРТ основана на феномене ядерного магнитного резонанса и исследует динамические изменения в мозге посредством повторяющихся МРТ-сканирований. При выполнении статических МРТ-исследований используют свойства повсеместно распространенных в живой ткани атомов водорода, однако в динамике их распределение изменяется минимально, поэтому для изучения функциональной активности используют парамагнитные свойства молекулы дезоксигемоглобина. При этом скорость гемодинамических реакции попадает в диапазон частоты фМРТ-сканирования (до 1 Гц). Поскольку сигнал, получаемый при фМРТ, отражает содержание в рассматриваемой области дезоксигемоглобина, он называется сигнал, зависимый от уровня оксигенации крови (Blood Oxygenation Level Depended signal – BOLD signal) [Logothetis, 2008]. Применение фМРТ на лабораторных грызунах сопряжено с рядом сложностей из-за малого размера мозга грызунов, однако при помощи модифицированных аппаратов фМРТ возможно даже совмещение оптической визуализации и фМРТ на грызунах [Lake et al., 2020]. Серьёзным ограничением для исследования нормальной физиологии работы мозга является необходимость анестезии животного при проведении исследования.

Функциональная ближняя инфракрасная спектроскопия (фБИКС — functional near-infrared spectroscopy; fNIRS) и лазерная доплеровская флуориметрия (LDF) в сочетании со спектральным анализом данных являются ценными инструментами для диагностики цереброваскулярных патологий в клинике. Высокое временное разрешение позволяет более детально анализировать гемодинамические и метаболические изменения [Goltsov et al., 2017]. фБИКС и LDF позволяют неинвазивно измерять среднее артериальное давление крови, скорость кровотока и уровень оксигенации крови. фБИКС позволяет получать данные аналогичные по природе сигналу, регистрируемому при фМРТ, несмотря на ограничение области измерения корой головного мозга, этот метод, так же как и фМРТ, позволяет оценивать взаимосвязь работы различных зон мозга и определять маркеры нарушений работы мозга [Yatsyk et al., 2023].

Широкопольная оптическая нейровизуализация позволяет регистрировать одновременно, как сигнал, зависимый от уровня оксигенации крови, так и изменения концентрации кальция в нейронах, напрямую отражающие нейрональную активность. Таким образом ШОН позволяет получать данные, аналогичные получаемым в клинику методами фМРТ, фБИКС и ЭЭГ/МЭГ (в дельта диапазоне активности). Это обеспечивает возможность трансляции получаемых методом ШОН данных в клинику.

В целом оптические подходы занимают особое положение среди доступных методов исследования мозга, поскольку обладают наибольшим диапазоном пространственных и временных возможностей (**рисунок 2**).

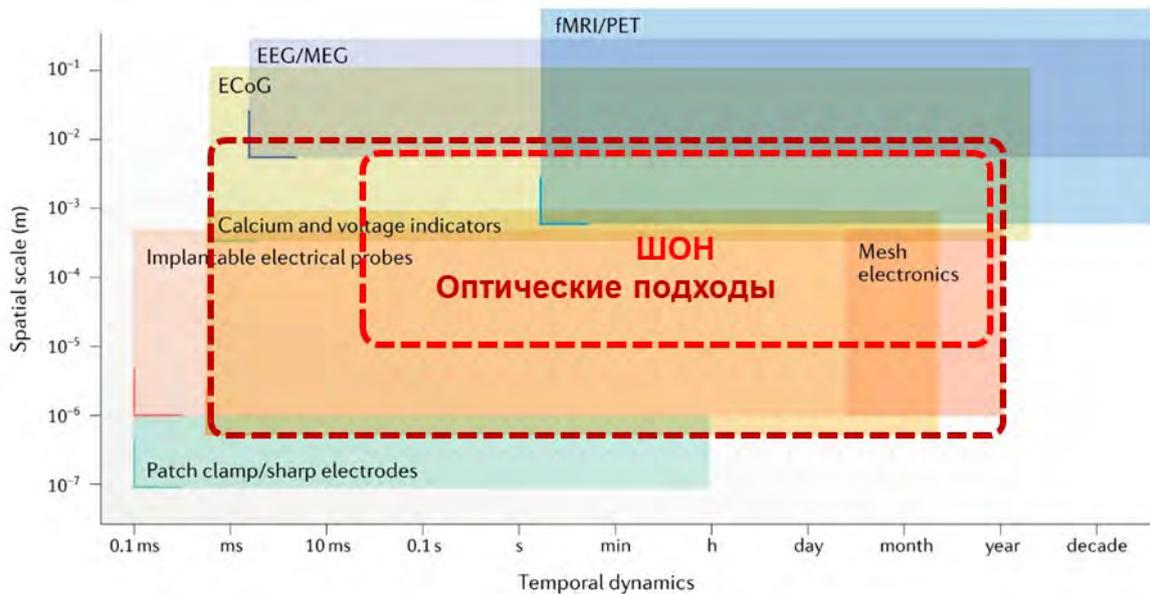


Рисунок 2. Пространственно-временные возможности различных существующих методов в нейробиологии. ECoG, электрокортикография; EEG, электроэнцефалография; fMRI, функциональная магнитно-резонансная томография; ЛФП, локальный потенциал поля; MEG, магнитоэнцефалография; PET, позитронно-эмиссионная томография. Взято с дополнениями из [Hong, Lieber, 2019]

Широкопольная оптическая нейровизуализация расширяет наши возможности в исследовании сложных взаимосвязанных процессов, обеспечивающих работу мозга, позволяя наблюдать одновременно за разными параметрами работы мозга и сопоставлять с поведением бодрствующего животного.

1.2. Широкопольная оптическая нейровизуализация

1.2.1. Принцип широкопольной оптической нейровизуализации

Метод широкопольной оптической нейровизуализации – активно развивающийся относительно малоинвазивный метод анализа активности мозга лабораторных животных. ШОН обеспечивает возможность анализировать пространственно-временную активность нейронов на больших участках коры головного мозга как наркотизированных, так и бодрствующих животных [Silasi et al., 2016; Vanni et al., 2017; Wright et al., 2017]. Современное оборудование для ШОН включает мультиволновую систему светодиодов со светофильтрами и чувствительную высокоскоростную камеру с фильтрами, установленными перед объективом, для детекции оптических сигналов с поверхности мозга. В качестве оптического сигнала можно использовать отраженный свет или флуоресценцию, причем как обусловленную эндогенными коферментами, так и экзогенными синтетическими красителями и генетически-кодируемыми белками. При

регистрации отраженного света возможна оценка относительных изменений концентраций молекул в коре мозга, которые поглощают свет в определенном диапазоне длин волн (гемоглобин, флавиновые нуклеотиды) [Ma et al., 2016a; Takahashi et al., 2018].

С появлением генетически-кодированных флуоресцентных белковых сенсоров и технологий получения трансгенных линий животных, которые экспрессируют данные сенсоры специфично в нейронах, появилась возможность оптической регистрации непосредственно нейронной активности посредством регистрации флуоресценции белка-сенсора. В настоящее время в подавляющем большинстве случаев применяют сенсоры ионов кальция [Inoue, 2021; Tian et al., 2009]. В нейробиологии чаще всего используют несколько вариантов сенсоров Ca^{2+} на основе белка GCaMP [Erofeev et al., 2023]. На данный момент создано уже 8 поколение GCaMP-индикаторов, каждое такое поколение является всё более совершенным (улучшенный динамический диапазон флуоресценции, более быстрая кинетика) для проведения исследований [Zhang et al., 2023]. Данный тип сенсоров состоит из модифицированного зеленого флуоресцентного белка, заключенного между Ca^{2+} -связывающим белком кальмодулином (CaM) и CaM-связывающим белком RS20 (рисунк 3). В присутствии Ca^{2+} происходят конформационные изменения молекулы, приводящие к увеличению интенсивности флуоресценции [Tian et al., 2009].

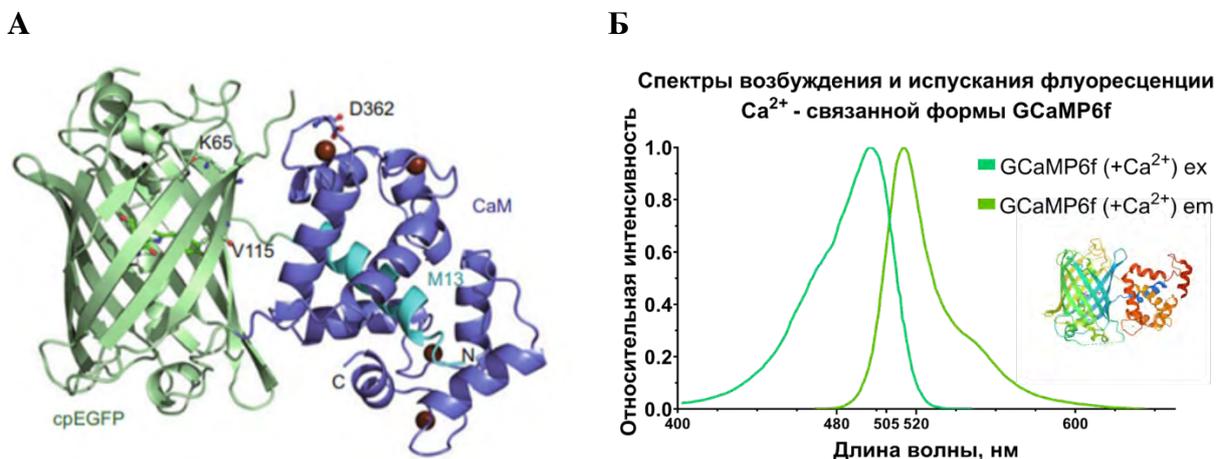


Рисунок 3. Структура белка семейства GCaMP и спектральные свойства сенсора GCaMP6f. А) Кристаллическая структура связанного с кальцием GCaMP3ΔRSET·Ca²⁺[Chen et al., 2013b]. Б) Спектральные свойства Ca-связанной и не связанной Ca формы GCaMP6f (по данным <https://www.fpbases.org>).

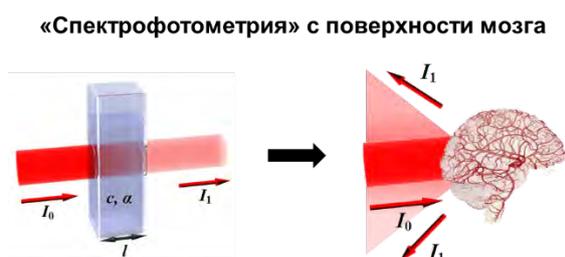
Для доставки флуоресцентного сенсора в мозг часто используют внутримозговую инъекцию аденоассоциированных вирусных (AAV) векторов [Fedotova et al., 2023]. С помощью такого подхода возможно добиться экспрессии сенсора в нейронах, или других типах клеток, определяемых специфичностью серотипа вируса и используемого промотора для экспрессии, в

области диаметром около 500-1000 мкм. Этого достаточно при использовании таких методов, как фотометрия, микроскопы, двухфотонная микроскопия, поскольку данные методы имеют пространственные ограничения в размере области регистрации. Однако при помощи внутримозговых инъекций невозможно добиться равномерной экспрессии сенсора на большой области коры, которую способна охватывать ШОН. Создание трансгенных линий животных, экспрессирующих в заданных клетках мозга флуоресцентные сенсоры, позволило преодолеть это ограничение. В данной работе используется трансгенная линия мышей C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (Jackson Laboratory). Эти мыши экспрессируют белок GCaMP6f под промоутером Thy1 в возбуждающих нейронах, главным образом в кортикальных слоях 2, 3, 5 и 6 [Dana et al., 2014].

До развития технологий с применением генетически-кодируемых сенсоров метод ШОН применялся для оптического картирования по внутреннему сигналу (Optical Intrinsic Signal Imaging, OISI) [Kura et al., 2018]. Так называют подход, основанный на регистрации рассеянного от поверхности коры мозга света. Интенсивность поглощения света в коре зависит от притока в данную область гемоглобин разных форм, способных поглощать свет в широком диапазоне видимого спектра. Метод начал свое развитие ещё в начале 1990-х годов, когда был применён для картирования зрительной коры у кошек [Bonhoeffer, Grinvald, 1991]. В настоящее время метод применяется для картирования мозга разных видов животных и при оперативных вмешательствах на человеке, а также в сочетании с другими подходами, такими как фМРТ, кальциевый имиджинг [Ma et al., 2016a; Morone et al., 2017; Shumkova et al., 2021; White et al., 2011; Кожухов et al., 2022].

Молекула гемоглобина имеет спектр поглощения, зависящий от уровня оксигенации в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах длин волн (**рисунок 4 Б**). Таким образом измерение диффузного отражения излучения определенных длин волн с поверхности коры мозга дает информацию об уровне локальной концентрации в ткани мозга окси- и дезоксигемоглобина ($\Delta[\text{HbO}]$ и $\Delta[\text{HbR}]$), а также информацию о суммарном объеме крови ($\Delta[\text{HbT}] = \Delta[\text{HbO}] + \Delta[\text{HbR}]$) [Ma et al., 2016a].

А



Б

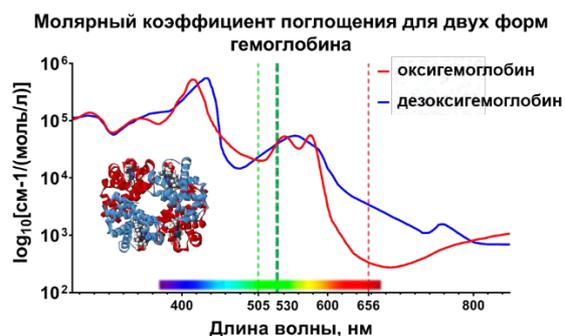


Рисунок 4. Принцип метода оптического картирования по внутреннему сигналу (OISI).

А) Сравнение OISI со спектрофотометрией. **Б)** Спектральные свойства окси- и дезоксигемоглобина. Вертикальными линиями обозначены длины волн, наиболее часто используемые для OISI.

Из спектра поглощения разных форм гемоглобина (**рисунок 4 Б**) видно, свет с длиной волны 530 нм одинаково поглощается двумя формам, то есть 530 нм - изобестическая точка в спектре поглощения разных форм гемоглобина. Таким образом измерение отражения в данной точке спектра дает информацию о суммарном количестве крови, поступающей в данный участок ($\Delta[\text{HbT}]$). В то время отражение света длиной волны 650 нм чувствительно в большей степени к изменениям в концентрации $\Delta[\text{HbR}]$. Артериолы при освещении данной длиной волны имеют минимальный контраст, поскольку содержат совсем немного $\Delta[\text{HbR}]$. При стимуляции, сначала происходит увеличение поглощения света с длиной волны 530 нм, отражающее увеличение притока крови к активной области мозга, затем снижение поглощения света с длиной волны 650 нм, что говорит об увеличении оксигенации венозной крови (**рисунок 5**).

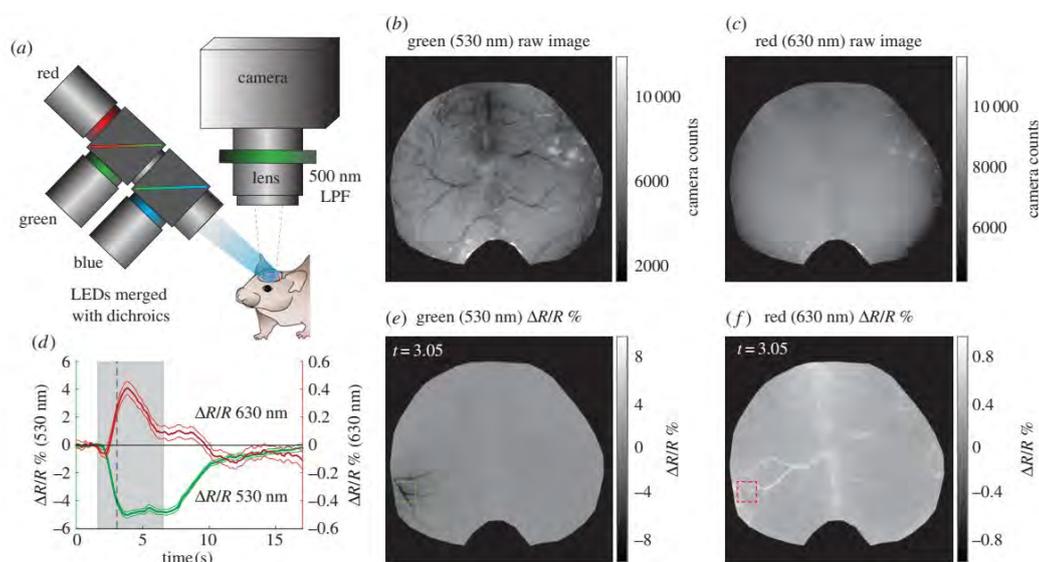


Рисунок 5. Гемодинамический ответ на тактильную стимуляцию вибрисс бодрствующей мыши. Демонстрация установки (**a**), изображения в отражённом свете разных длин волн до стимуляции (**b-c**), изменения, вызванные стимулом (**e-f**), сигнал во времени для областей, указанных на изображениях (**e-f**) (**d**). Взято из [Ma et al., 2016a].

Основываясь на модифицированном для оптических условий ШОН законе Бугера-Ламберта-Бэра, можно перевести наблюдаемые изменения в изменения концентрации окси- и дезоксигемоглобина [Ma et al., 2016b]. Также этот закон позволяет внести коррекцию в сигналы генетически-кодируемых сенсоров, в которые также могут вносить вклад гемодинамический сигнал, поскольку возбуждающее и испускаемое излучение частично поглощается кровью.

1.2.2. Нейроваскулярное сопряжение и его оценка методом ШОН

Несмотря на многие годы исследований, до сих пор в научной среде обсуждают механизм нейроваскулярного сопряжения, увеличения притока крови к области активации нейронов, которое непосредственно связано с интерпретацией данных, получаемых методом фМРТ [Hillman, 2014]. Более того, до сих пор ведутся споры о физиологическом значении функциональной гиперемии [Drew, 2022]. В большинстве наблюдаемых случаев увеличение кровотока, вызванное сенсорной стимуляцией и нейронной активностью, превосходит уровень увеличения потребления кислорода нейронами. Даже исходных уровней кровотока более чем достаточно для снабжения кислородом нейронов с повышенным уровнем активности [Leithner, Royl, 2014]. Мнения исследователей в объяснении необходимости избыточного увеличения притока крови расходятся, есть точка зрения, что это необходимо для увеличения градиента кислорода, чтобы активные клетки могли его быстро поглощать [Devor et al., 2011], также рассматриваются такие функции гиперемии как удаление продуктов жизнедеятельности клеток [Veluw van et al., 2020] и регуляция температуры в области активации клеток [Royl et al., 2008].

При фМРТ измеряют T2 релаксацию, которая чувствительна к локальной концентрации дезоксигемоглобина (HbR), обладающего парамагнитными свойствами. При снижении HbR данный сигнал увеличивается. Зависимый от оксигенации крови сигнал (BOLD-сигнал) не является прямым измерением потребления кислорода нейрональными клетками, наоборот стандартным ответом на активацию нейронов является повышение BOLD-сигнала, которое говорит об увеличении уровня оксигенации области, развивающееся в течение примерно 500мс с момента начала активации нейронов в данной области, и достигающее пика через 3-5 сек после начала активации, даже для коротких стимулов, менее 1сек [Hillman, 2014].

Чтобы правильно понять пространственно-временные характеристики гемодинамической реакции, важно сначала понять структурную организацию сосудистой сети коры головного мозга (**рисунок 6 А**). Основные кортикальные кровеносные сосуды расположены на поверхности коры в мягкой оболочке, ответвляющиеся от них проникающие артериолы перпендикулярно уходят в глубину коры и разветвляются на капиллярные сети. Кровь из капилляров собирается по перпендикулярно ориентированным восходящим венам, которые соединяются с сетью крупных дренажных вен на поверхности в мягкой оболочке мозга.

В работе [Hillman, 2014] детально описывается вызванная сенсорной стимуляцией функциональная гиперемия в коре головного мозга на примере данных, полученных методом оптической регистрации внутреннего сигнала (OISI) в соматосенсорной коре крысы при электрической стимуляции задней конечности.

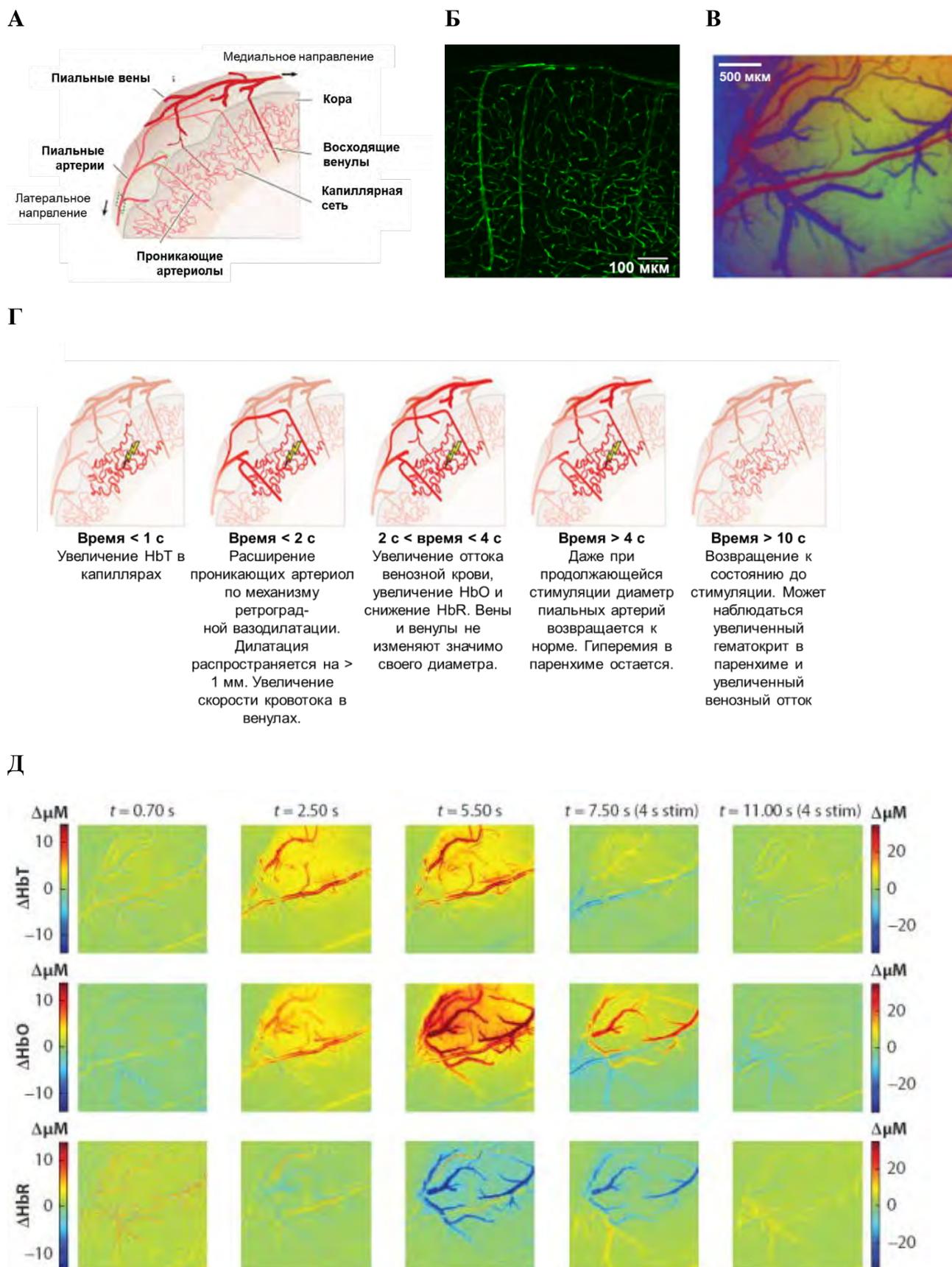


Рисунок 6. Вызванная сенсорной стимуляцией функциональная гиперемия в коре головного мозга. Взято с изменениями из [Hillman, 2014]. **А)** Схематический разрез коры головного мозга млекопитающих. **Б)** Артериолы и капилляры в поперечном сечении мышцы линии Tie2-GFP (с

флуоресцирующим маркером эндотелиальных клеток). Взято из [Shaik, 2019]. В) Изображение, показывающие поле зрения соматосенсорной коры крысы в эксперименте, изображенном на панели (Д). Цветом выделены артерий (красный), вены (синий) и паренхима (зеленый). Взято с изменениями из [Hillman, 2014]. Г) Схематическая последовательность реакции сосудов коры на сенсорную стимуляцию. Взято с изменениями из [Hillman, 2014]. Д) Последовательность данных визуализации оптических внутренних сигналов (OISI), полученных в соматосенсорной коре головного мозга крысы в ответ на стимуляцию задних лап электрическим стимулом длительностью 4 с и частотой 3 Гц.

В ответ на стимуляцию раньше всего увеличивается диаметр капилляров, что приводит к увеличению суммарного гемоглобина в паренхиме. Затем расширяются проникающие артериолы (по механизму ретроградной вазодилатации). Вены не изменяют свой диаметр, но в них сначала увеличивается скорость кровотока, затем увеличивается и уровень оксигенации крови в венах. После окончания стимуляции кровотоки снижаются, при этом есть остаточное увеличение НвТ в капиллярах, что может быть причиной последующей временной вазоконстрикции [Hillman, 2014] (рисунок 6).

Некоторые исследователи наблюдают в своих данных так называемое начальное увеличение НвR, которое на BOLD-сигнале отражается падением, поэтому называется "Initial dip", и интерпретируется как первоначальное увеличение потребления кислорода активированными клетками [Hu, Yasoub, 2012]. Однако не все исследователи наблюдают этот феномен, кроме того, в разных экспериментах было показано, что это падение может быть связано с резким увеличением НвТ [Sirotnin et al., 2009]. Возможно, наличие роста НвR может иметь место в случае, если по тем или иным причинам сосудистый ответ на стимуляцию запаздывает.

Стоит отметить, что поскольку фМРТ сигнал измеряет уровень НвR и наибольшее изменение уровня НвR (в %) наблюдается в венах, поэтому по сравнению с оптическим ответом может быть сдвинут во времени и пространстве (более поверхностный и ближе к центру из-за особенностей анатомического расположения венозной системы) [Hillman, 2014].

Нейроваскулярное сопряжение обеспечивается скоординированным взаимодействием разных типов клеток и систем. Ещё в начале 2000-х годов была предложена концепция нейроваскулярной единицы (neurovascular unit, NVU), состоящей из нейронов, интернейронов, астроцитов, гладкомышечных клеток, перицитов, эндотелиальных клеток и внеклеточного матрикса [Harder et al., 2002; Iadecola, 2017]. Взаимодействие между клетками происходит за счет щелевых контактов, воздействия вазоактивных медиаторов, ионов, метаболитов [Lee et al., 2017]. С развитием концепции NVU появляется всё больше деталей о механизмах нейроваскулярного сопряжения, которые указывают на то, что неправильно рассматривать мозг как систему из

повторяющихся отдельно и независимо работающих единиц, вместо этого существует более сложный нейроваскулярный комплекс [Schaeffer, Iadecola, 2021]. Далее рассмотрены компоненты нейроваскулярного комплекса и их связь с регуляцией диаметра сосудов (рисунок 7).

Активация NMDA-рецепторов в пирамидных нейронах может запускать опосредованный циклооксигеназой-2 (COX-2) синтез простагландина E₂ (PGE₂), который действует на рецепторы EP₂ и EP₄ на гладкомышечных клетках, вызывая их расслабление [Lacroix et al., 2015]. Также нейроны способны продуцировать NO при активации нейрональной NO-синтазы (nNOS), который также вызывает вазодилатацию [Lourenço, Laranjinha, 2021].

Выделяющийся при активации возбуждающих нейронов глутамат действует на метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR5) на астроцитах, что через IP₃-путь приводит к высвобождению Ca²⁺, активации фосфолипазы A₂ (PLA₂), высвобождению арахидоновой кислоты и продукции PGE₂ и эпоксэйкозатриеновые кислоты (EETs) [Iadecola, 2017]. Ca²⁺ может также напрямую проникать в цитозоль астроцитов — например, через ионотропные глутаматные рецепторы, пуринергические P₂X и никотиновые холинергические рецепторы — в ответ на активность нейронов [Semyanov et al., 2020]. Однако исследования с помощью двухфотонной микроскопии установили, что вазодилатация капилляров происходит раньше, чем увеличение кальция в астроцитах [Nizar et al., 2013], есть и другие противоречивые данные об участии астроцитов в нейроваскулярном сопряжении, см [Bazargani, Attwell, 2016; Nedergaard, Verkhratsky, 2012].

Показано, что перициты, которые в основном окружают именно капилляры, могут отвечать сокращением или расслаблением в ответ на воздействие разных метаболитов, однако медленная кинетика этих процессов в перицитах предполагает их бóльшую роль в поддержании тонуса в капиллярном русле в покое [Hartmann et al., 2022].

Появляющиеся данные свидетельствуют о решающей роли эндотелия в ретроградном распространении гиперемии, вызванной активностью нейронов [Iadecola, 2017]. Вазодилатация опосредована распространением гиперполяризации в эндотелии и влиянии на гладкомышечные клетки через «классический» эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF) и миоэндотелиальные щелевые контакты и «неклассический» EDHF, задействующий генерацию EETs и NO [Hillman, 2014; Wit De, Griffith, 2010]. Группой Hillman была предложена модель, заключающаяся в том, что пороговые значения внутриклеточного кальция могут вызывать быструю дилатацию по типу EDHF в ответ на интенсивные начальные нейрональные реакции, в то время как более медленная дилатация, зависящая от NO и EETs, может поддерживаться более низкими уровнями текущей активности [Hillman, 2014].

В различных экспериментах установлена способность интернейронов вызывать вазодилатацию (например, активация NO-синтезирующих нейронов [Vazquez et al., 2018]), либо вазоконстрикцию (например, при активации парвальбуминовых нейронов [Vo et al., 2023]).

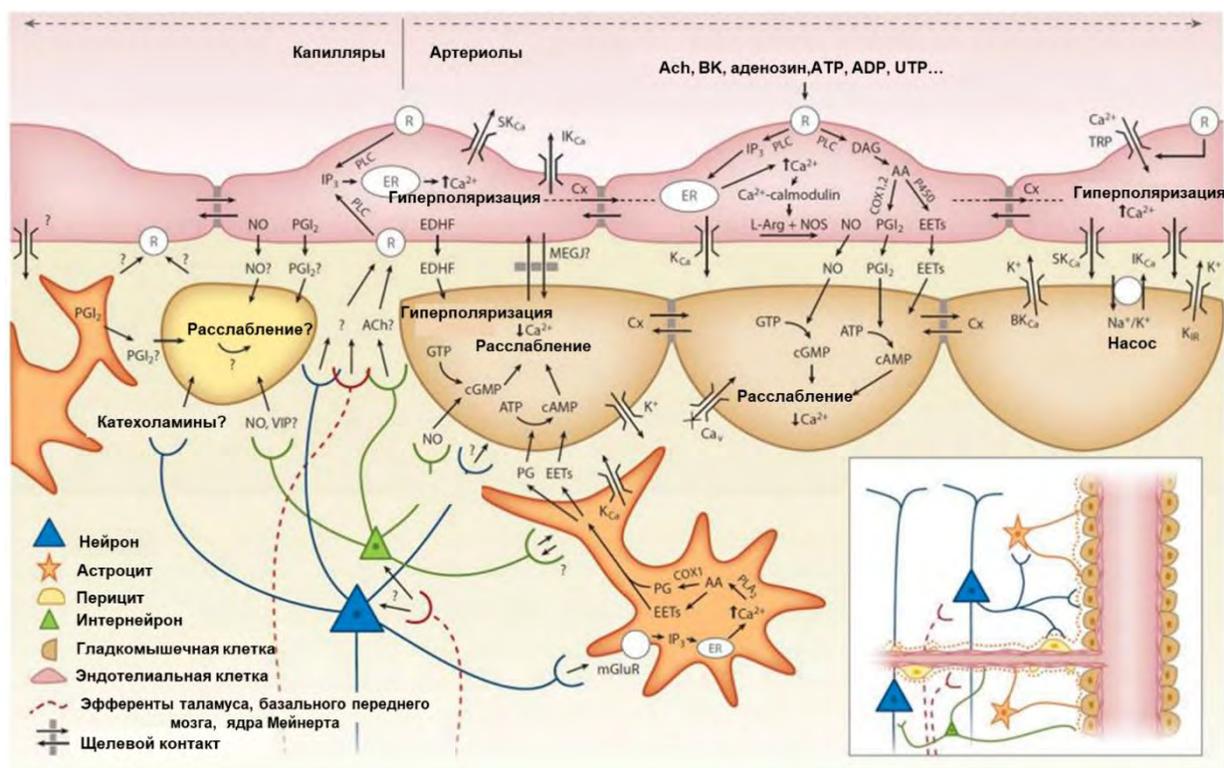


Рисунок 7. Предполагаемые механизмы нейроваскулярного сопряжения. Адаптировано из [Hillman, 2014]. Астроциты могут воспринимать глутамат через метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR) и увеличивать количество внутриклеточного кальция (Ca^{2+}), который может генерировать арахидоновую кислоту (AA) посредством фосфолипазы A2 (PLA₂), AA преобразуется COX1(2) в простагландины (PG) и эпоксигеназой P450 в эпоксидэйкозатриеновые кислоты (EETs). Как PGs, так и EET могут расслаблять гладкомышечные клетки (SMC) путем превращения аденозинтрифосфата (ATP) в циклический аденозинмонофосфат (cAMP). Эндотелиальные клетки могут увеличивать содержание внутриклеточного кальция через катионные каналы с переходным рецепторным потенциалом (TRP) и в ответ на связывание с рецептором (R) посредством IP₃-опосредованного высвобождения кальция из внутриклеточных запасов [эндоплазматический ретикулум (ER)]. Мишенями для эндотелиальных рецепторов являются ацетилхолин (ACh), брадикинин (BK), аденозиндифосфат (ADP), ATP, уридинтрифосфат (UTP) и аденозин. Связывание с рецептором может активировать фосфолипазу C (PLC) (или PLA₂), которая через диацилглицерин (DAG) может также продуцировать EETs и производные AA, включая простагландин (PGI₂), которые могут стимулировать расслабление SMC посредством cAMP. Увеличение внутриклеточного

кальция может стимулировать выработку эндотелиального оксида азота (NO), который может влиять на релаксацию SMC посредством превращения гуанозинтрифосфата (GTP) в циклический гуанозинмонофосфат (сGMP). Увеличение содержания внутриклеточного кальция также приводит к гиперполяризации эндотелия за счет открытия кальций-зависимых калиевых каналов (K_{Ca}). Гиперполяризация эндотелия может быть передана соседним SMC через миоэндотелиальные щелевые соединения (MEGJs) или какой-либо другой эндотелиальный гиперполярирующий фактор (EDHF), такой как отток K^+ через эндотелиальные калиевые каналы SK_{Ca} и IK_{Ca} , путем активации K_{IR} на SMCs и/или Na^+/K^+ АТФазы. Гиперполяризация SMC вызывает расслабление за счет инактивации потенциал-зависимых кальциевых каналов (Ca_v). Гиперполяризация эндотелия может быстро распространяться на соседние эндотелиальные клетки, вероятно, через щелевые соединения. Перicyты обладают многими SMC-подобными свойствами и могут расслабляться в ответ на NO и PGI_2 , поступающие из астроцитов, нейронов или эндотелиальных клеток, или в ответ на нейропептиды, такие как вазоинтенсивные пептиды (VIPs). Перicyты или астроциты также могут быть вовлечены в передачу сигналов эндотелиальным клеткам. Вопросительные знаки обозначают множество других потенциальных сигнальных путей, которые еще предстоит идентифицировать [Hillman, 2014].

Таким образом, нейроваскулярное сопряжение – комплексный процесс, главные компоненты которого могут отличаться от рассматриваемых условий и области мозга [Hosford, Gourine, 2019; Schaeffer, Iadecola, 2021]. Поэтому важно изучить принципы нейроваскулярного сопряжения и его особенности при разных физиологических состояниях в норме и при патологиях.

В работе [Ogawa et al., 1992], положившей начало развитию метода фМРТ, продемонстрировано увеличение BOLD-сигнала в области первичной зрительной коры человека в ответ на предъявление зрительного стимула. Для интерпретации фМРТ BOLD-сигнала часто используется линейная модель нейроваскулярного сопряжения, которая заключается в том, что гемодинамическая активность может быть получена при помощи операции свертки («перемножения») нейрональной активности и функции гемодинамического ответа (hemodynamic response function, HRF) [Cardoso et al., 2012; Ma et al., 2016b]. Были предложены математические подходы для моделирования гемодинамического ответа в мозге на стимул, такие как подбор параметров Гамма-функции, линейная комбинация двух Гамма-функций, более сложные нелинейные модели [Lindquist et al., 2009]. Основными параметрами, используемыми для характеристики HRF, являются амплитуда ответа, полуширина (full width at half maximum,

FWHM), время до пика (**рисунок 8**). Эти характеристики являются непосредственным отражением степени нейроваскулярного сопряжения в мозге.

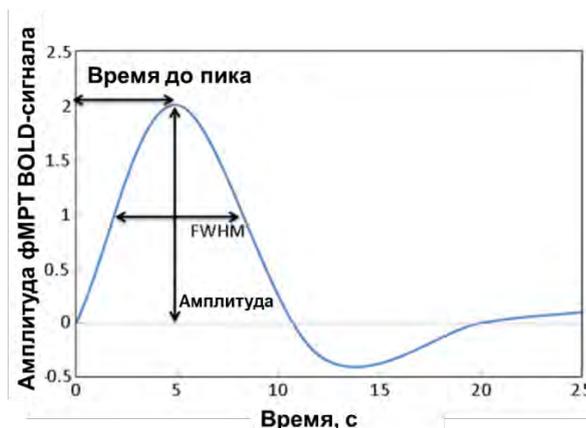


Рисунок 8. Типичная функция гемодинамического ответа с ее тремя параметрами. За нулевую точку принято время предъявление условного «короткого» стимула. Переведено из [Rangaprakash et al., 2018].

Следует отметить, что метод фМРТ не позволяет достоверно определить форму HRF. Используемые для анализа фМРТ функции представляют собой приблизительную оценку, основанную на известных биологических и математических концепциях с определенными допущениями [Rangaprakash et al., 2018]. Такой подход не оптимален, поскольку показано, что функция гемодинамического ответа, а следовательно, и нейроваскулярное сопряжение могут иметь особенности, если рассматривать разные области мозга, а также могут изменяться в патологических условиях [Lambers et al., 2020].

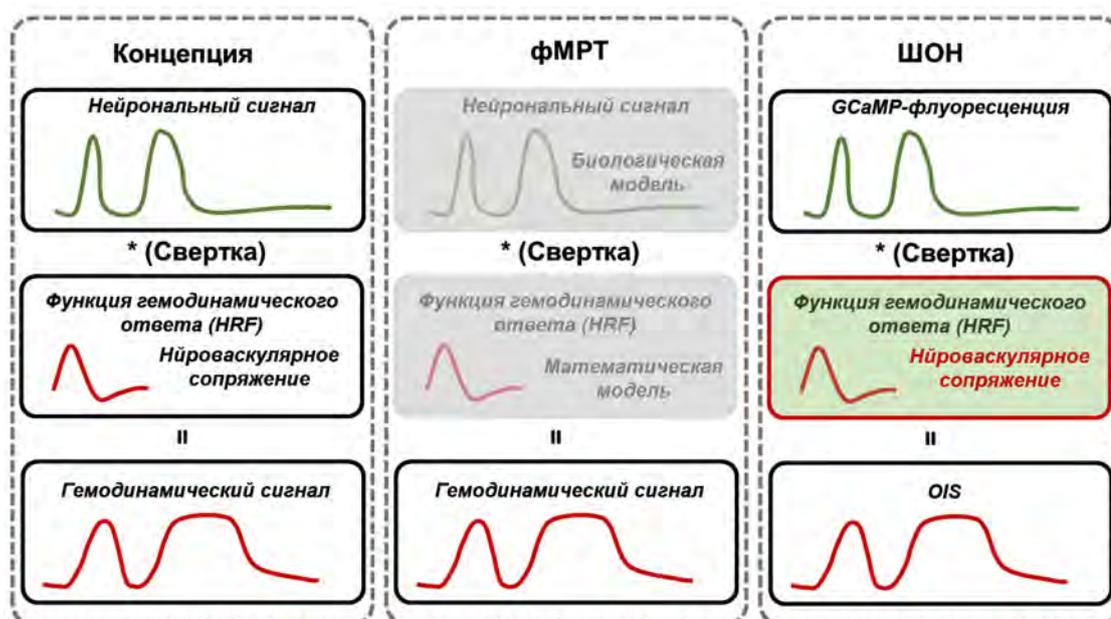


Рисунок 9. Сравнение возможностей фМРТ и ШОН для оценки нейроваскулярного сопряжения.

Широкопольная оптическая нейровизуализация (ШОН) позволяет одновременно регистрировать как нейрональный, так и гемодинамический сигнал, что делает данный метод перспективным инструментом для оценки нейроваскулярного сопряжения. (**рисунок 9**)

В работе [Ma et al., 2016b] исследователи продемонстрировали, что гемодинамический сигнал, можно довольно хорошо предсказать ($r > 0.8$), используя кальциевый сигнал, зарегистрированный методом ШОН по флуоресценции сенсора GCaMP. Ученые оценили HRF-функцию при записи активности соматосенсорной коры бодрствующего и анестезированного животного. Для оценки формы функции использовали несколько подходов: подбор коэффициентов Гамма-функции и сравнение с кальциевым сигналом, обратную свертку гемодинамического сигнала на основе кальциевого сигнала, усреднение единичных ответов по пику (spike-triggered averaging). Для всех перечисленных подходов получили схожие результаты: уретановая анестезия приводит к увеличению полуширины HRF-функции и удлиняет время до пика (**рисунок 10**). Однако недостатком работы является использование разных видов кальциевого сенсора GCaMP3 и GCaMP6f, которые обладают хоть и схожей, но всё же разной кинетикой и разными коэффициентами диссоциации.

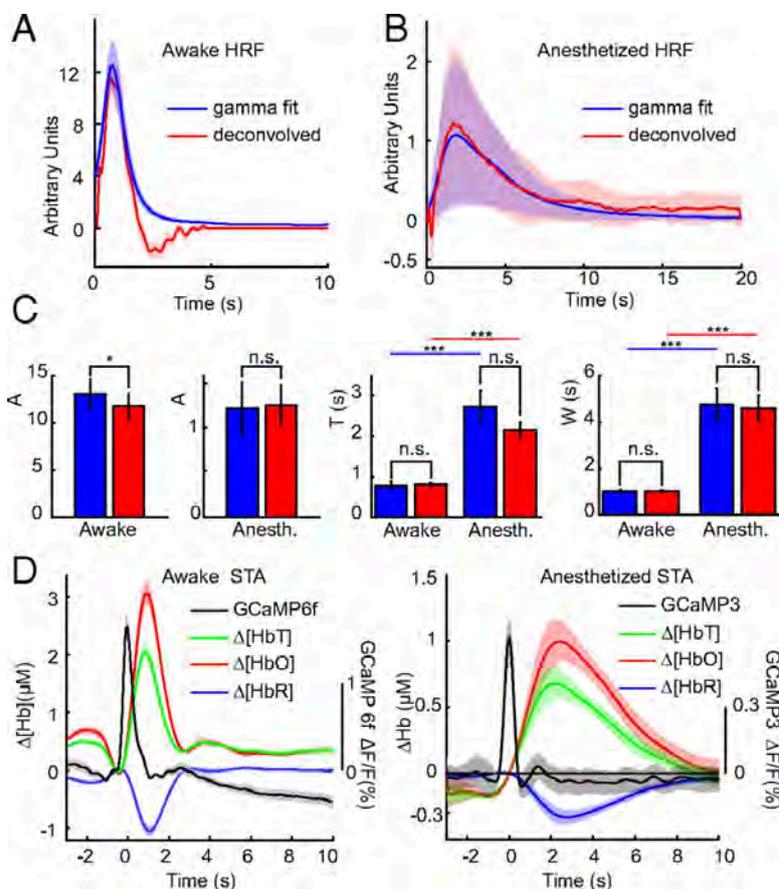


Рисунок 10. Сравнение HRFs, полученных разными методами. **(А и В)** Сравнение HRF, полученной с использованием подбора коэффициентов гамма-функции (синий) и методом обратной свертки (красный) у бодрствующих (awake) **(А)** и анестезированных (anesth) **(В)** животных в соматосенсорной коре. Тень - SEM (n = 6 мышей в каждой группе). **(С)** Сравнение параметров функций HRF, полученных с использованием подбора коэффициентов гамма-функции, А – амплитуда HRF (*P = 0.024, n.s. P = 0.66), T – время до пика (n.s. awake P = 0.76, anesth P = 0.094, ***P < 0.005), W - полуширина (n.s. awake P = 0.88, n.s. anesth P = 0.76, ***P < 0.005) (all paired-wise t test, n = 6) group. **(D)**, Усреднение единичных ответов по пику (spike-triggered averaging); Тень - SEM (n = 6 мышей в каждой группе). Взято без изменений из [Ma et al., 2016b].

Ещё одним подходом для оценки нейроваскулярного сопряжения является оценка взаимной корреляция кальциевого и гемодинамического сигнала. В области анализа сигналов взаимная корреляция является мерой сходства двух рядов в зависимости от смещения одного относительно другого. С помощью взаимной корреляции можно оценить временной сдвиг между двумя сигналами, необходимый для достижения максимальной корреляции. Ма и соавт. также оценили зависимость величины взаимной корреляции кальциевого и гемодинамического сигнала от диапазона частот активности и показали, что максимальная корреляция ($r = 0.66 \pm 0.02$) наблюдается при сдвиге кальциевого сигнала относительно гемодинамического на 0.86 ± 0.05 с вперед при частоте 0.21 Гц [Ma et al., 2016b].

На основе анализа взаимной корреляции можно строить карты для оценки региональных особенностей нейроваскулярного сопряжения по всей дорзальной коре (neurovascular correlation maps, NVCM) (**рисунок 11**). Chen и соавт. показали, что активность нейронов в различных областях коры головного мозга в разной степени связана с гемодинамическим сигналом. Исследователи также продемонстрировали снижение нейроваскулярного сопряжение при действии изофлурановой анестезии (от $r = 0.701 \pm 0.19$ при бодрствовании до $r = 0.539 \pm 0.12$) [Chen et al., 2021].

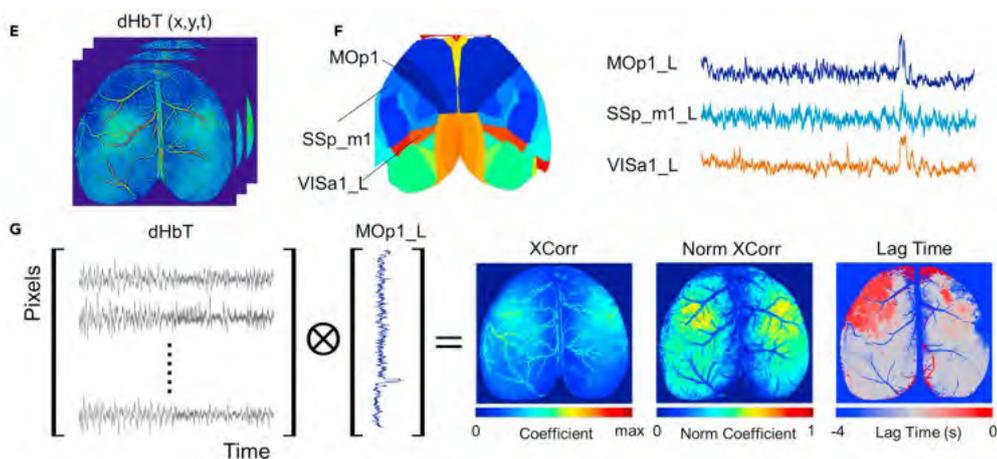


Рисунок 11. Схема процедуры расчета карт нейроваскулярного сопряжения (NVCMs), использованной в статье [Chen et al., 2021]. Изображения изменений dHbT (E). Карта анатомических зон, использованная для усреднения нейронального сигнала и примеры усреднённых сигналов (F). Подсчет взаимной корреляции для сигнала dHbT для каждого пикселя и усредненного сигнала соответствующей зоны (G). (XCorr – карта не нормализованных коэффициентов взаимной корреляции, NormXCorr - нормализованная взаимная корреляция, Lag Time - время задержки для достижения максимальной корреляции). Взято из [Chen et al., 2021].

Sunil и соавт. использовали для оценки нейроваскулярного сопряжения параметры вызванного в коре кальциевого и гемодинамического ответа на сенсорную стимуляцию [Sunil et al., 2023]. Учёные предложили использовать сравнение областей активации коры по кальциевому и гемодинамическому сигналу с использованием коэффициента схожести (Dice coefficient) (рисунок 12), а также коэффициент корреляции между амплитудой кальциевого и гемодинамического ответа на сенсорную стимуляцию передней конечности. HbT и HbO сигнал показали высокое совпадение (60 %) в области активации при сравнении с GCaMP в норме, что указывает на пространственную колокализацию кальциевых и гемодинамических реакций. HbR-сигнал имел более слабое пространственное совпадение с GCaMP (20 %).

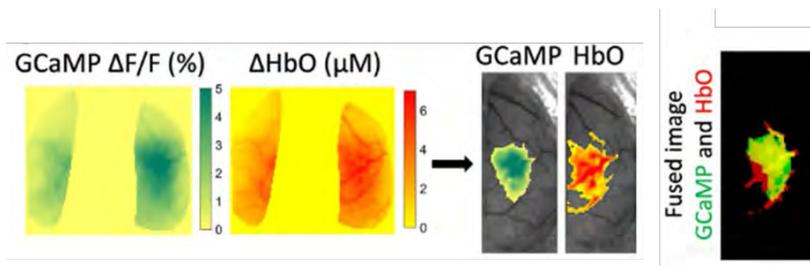


Рисунок 12. Сравнение областей активации коры по кальциевому и гемодинамическому сигналу в ответ на сенсорную стимуляцию передней конечности бодрствующего животного. Взято из [Sunil et al., 2023].

1.2.3. Функциональное картирование зон мозга с помощью ШОН

Функциональное картирование подразумевает установление соответствия между структурами мозга и проявлением то или иного поведения. Антероградное, ретроградное и транссинаптическое отслеживание проекций в мозге, методы трактографии, уже позволили установить распределение анатомических связей по всему мозгу мыши [Osten, Margrie, 2013]. Однако таких данных недостаточно для определения того, как области мозга соединяются, образуя функциональные цепи, управляющие различным поведением. Более того, они не позволяют отслеживать индивидуальные изменения в функционировании областей мозга в развитии и перестройки при патологических изменениях в мозге.

Поэтому одним из важных направлений ШОН является функциональное картирование зон коры мозга. При этом подходы с использованием флуоресцентных сенсоров позволяют анализировать пространственно-временные паттерны активности при различных состояниях, расширяя знания об анатомических связях и закономерностях работы мозга [Vanni, Murphy, 2014a].

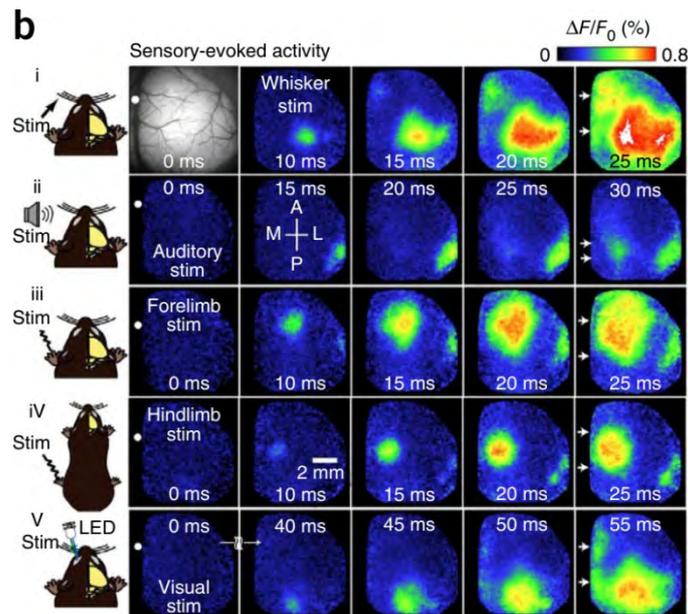


Рисунок 13. Визуализация активности зон коры мозга, окрашенных потенциал-чувствительным красителем, в ответ на разнообразные сенсорные стимулы. Взято из [Mohajerani et al., 2013]. Изображения сигнала $\Delta F/F_0$ сигнала области коры, окрашенной синтетическим потенциал-чувствительным красителем RH-1692. Брегма, обозначена белым кружком на каждом снимке. Паттерны активации коры головного мозга показаны у мыши, анестезированной изофлураном (0,5%), после (i) стимуляции (stim) контралатеральных вибрисс, (ii) слуховой стимуляции, (iii) контралатеральной стимуляции передних конечностей, (iv) контралатеральной стимуляции задних

конечностей и (v) визуальной стимуляции контралатерального глаза с помощью светоизлучающий диод (LED). Ответы являются средними по результатам 20 повторов. На втором рисунке слева во втором ряду показаны переднее (A), заднее (P), медиальное (M) и боковое (L) направления.

Часто функциональная активность различных зон мозга оценивается при помощи сенсорной стимуляции с целью активации соответствующих участков (**рисунок 13**) [Mohajeri et al., 2013]. Однако данный подход приемлем для картирования и анализа функциональных связей только первичных сенсорных областей. Для анализа функциональной активности зон, которые недоступны через периферическую стимуляцию, такие как ассоциативные области и вторичные сенсорные области был разработан подход с комбинацией измерения потенциала посредством загрузки потенциал-чувствительного красителя в клетки коры и стимуляции *in vivo* зон мозга посредством оптогенетических методов [Lim et al., 2012].

ШОН, позволяя регистрировать оптические сигналы с больших площадей коры головного мозга мыши одновременно, может обеспечить оценку целого спектра параметров, характеризующих нейрональную активность. Для того чтобы исследовать связь получаемых нейронных сигналов с функциональным состоянием животного, его поведением, крайне важно разделить записи на значимые пространственные и временные компоненты, которые могут быть сопоставлены с четко определенными областями мозга. Различные научные группы, занимающиеся развитием данного метода, предлагают свои подходы к анализу получаемых данных, среди которых частотный анализ, анализ кросс-корреляции, подходы с применением машинного обучения и искусственных нейронных сетей [Cramer et al., 2019; Haupt et al., 2017; Saxena et al., 2020; Xiao et al., 2021].

В результате созданы разные варианты картирования зон мозга на основе спонтанной активности (**рисунок 14**).

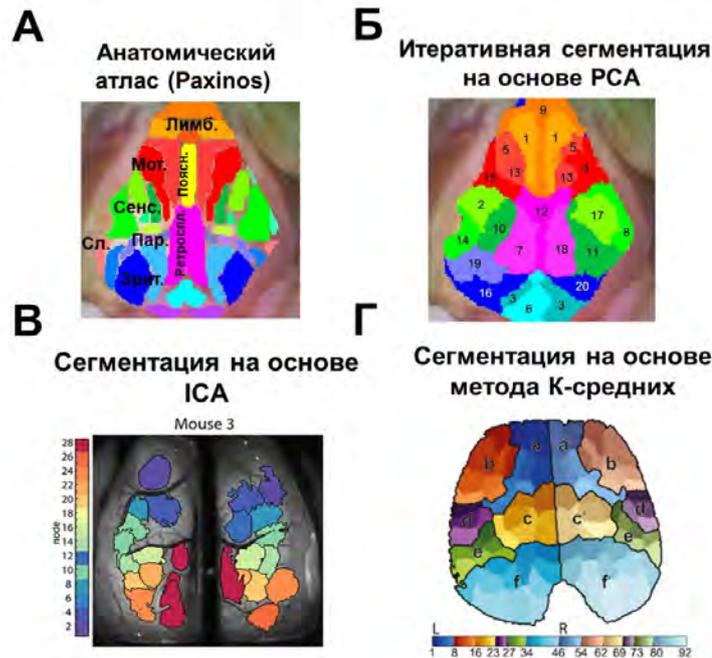


Рисунок 14. Примеры картирования зон коры мозга мыши на основе спонтанной активности. А) Зоны по анатомическому атласу (Paxinos) [Franklin, Paxinos, 2007]. Адаптировано из [White et al., 2011] Б) Результаты итеративной парцелляции с использованием первых двадцати сингулярных векторов из корреляционной матрицы в качестве начального условия. Можно увидеть четкие очертания лобной/обонятельной/поясной (лимбической) сети (оранжевые), моторной сети (красные), соматосенсорной сети (зеленые), зрительной сети (синие), ретроспленальной коры (пурпурные) и верхнего двухолмия (светло-голубые). Номера на участках являются произвольными обозначениями из начального условия. Взято из [White et al., 2011] В) Пространственная сегментация коры головного мозга с использованием анализа главных компонент. Взято из [West et al., 2022]. Г) Функциональное топографическое разделение коры головного мозга на двусторонне симметричные ROI с использованием пространственно-временной кластеризации нейронной активности в состоянии покоя, упрощенная карта, созданная на основе объединения похожих кластеров у группы мышей. Взято из [Shahsavaranani et al., 2023]. PCA (principal component analysis) – анализ главных компонент, ICA (independent component analysis) – анализ независимых компонент.

1.2.4. Спонтанная активность коры мозга в покое

С середины 1990-х годов стали появляться исследования, в которых оценивали спонтанные флуктуации фМРТ сигнала в покое [Biswal et al., 1995]. Было показано, что активность BOLD-сигнала в области низких частот (<0.1 Гц) функционально или анатомически

связанных зон в покое, без предъявления стимулов и в отсутствии определенных задач характеризуется высокой степенью корреляции [Fox et al., 2005; Fox, Raichle, 2007].

Сосудам свойственны спонтанные вазомоторные осцилляции в норме [Borovik et al., 2005]. В исследованиях цереброваскулярной системы человека, выполненных с помощью функциональной ближней инфракрасной спектроскопии (фБИКС) и лазерной доплеровской флуориметрии выделяют несколько диапазонов частот, связанных с разными механизмами контроля вазомоторики [Goltsov et al., 2017]:

1. 0.6-2 Гц с сердечной активностью;
2. 0.145-0.6 Гц с дыхательной активностью;
3. 0.052-0.145 Гц с активностью гладкой мускулатуры сосудов;
4. 0.021-0.052 Гц с иннервацией микроциркуляторного русла;
5. 0.005-0.0095 Гц с активностью эндотелия.

В работе [Munting et al., 2023] сравнили вызванные стимулом и спонтанные изменения диаметра пиальных артериол у бодрствующих мышей с помощью двухфотонной микроскопии. Исследователи показали, что волны вазомоторики в пиальных сосудах распространяются не только в случае наличия сенсорной стимуляции, но и в случае спокойного состояния. Авторы предполагают участие этих волн в удалении продуктов обмена веществ из мозга. Частота изменения диаметра сосудов в спокойном состоянии была около 0.1 Гц.

В различных экспериментах показано, что изменение мощности γ -диапазона электрической активности коррелирует с вазомоторной активностью мозга [Mateo et al., 2017; Thompson et al., 2014]. На основе этих данных Drew и соавт. предложили гипотезу, согласно которой именно изменения амплитуды γ -диапазона нейрональной активности по механизму нейроваскулярного сопряжения приводит к изменениям диаметра артериол в спокойном состоянии. Синхронизация происходит за счет аксонов мозолистого тела и общих модулирующих входов [Drew et al., 2020].

Существуют обширные данные о спонтанной Ca^{2+} активности мозга. Наиболее часто выделяют два диапазона частот активности [Wright et al., 2017]: медленный (меньше 0.1-1 Гц) и быстрый (1-5 Гц), иногда также исследуют инфрамедленный диапазон (0.09-0.1 Гц), наиболее соответствующий диапазону частот при фМРТ измерениях [Chan et al., 2015].

В одной из работ [Vanni et al., 2017] ставится задача сравнения различных диапазонов частотной активности и их связей с физиологическим состоянием. Для того, чтобы проанализировать специфические временные и пространственные свойства кальциевых сигналов, для каждого пикселя выполнили преобразование Фурье. Усреднённый амплитудный спектр для разных областей мозга показал, что ретроспленальная кора достоверно более активна, чем сенсомоторные области в диапазоне быстрых (1-5 Гц) частот. При этом в любом

диапазоне частот наблюдается высокая корреляция сигнала между гомологичными областями двух полушарий, а также между функционально связанными областями внутри одного полушария. Например, между ретроспленальной корой и чувствительной зоной вибрисс, которые участвуют в пространственной ориентации. При этом при анализе отдельных частотных диапазонов у не анестезированных мышей в области медленных частот были обнаружены отличия в распределении кластеров активности, что привело исследователей к выводу о том, что именно в низкочастотном диапазоне активны зоны, отвечающие за бодрствование, тогда как высокочастотная активность ассоциирована с обработкой сигналов «по умолчанию» [Vanni et al., 2017].

Под наркозом сигналы GCaMP6f в дельта-диапазоне (0,4-4 Гц) частот распространяются от передних областей (например, двигательных) к задним областям (например, зрительным) и согласуется с данными ЭЭГ исследований человека и электрофизиологических экспериментов на анестезированных животных [Кнуязев, 2012]. Предположительно, функция наблюдающихся во сне распространяющихся дельта-волн заключается в консолидации памяти. Эта нейронная осцилляция отражает изменения между периодами гиперполяризации мембранного потенциала и деполяризации. В естественном сне эти колебания происходят примерно с частотой 0,4 Гц, но могут быть фармакологически модулированы. Например, в присутствии кетамина/ксилазина продолжительность состояния деполяризации уменьшается, увеличивая общую частоту колебаний до ~1Гц [Wright et al., 2017].

1.2.5. Функциональная связанность и способы её оценки методом ШОН

Сложная работа мозга в значительной степени обусловлена его высокой степенью взаимосвязанности; поэтому изучение связанности зон мозга приобрело огромное значение за последнее десятилетие [Xu et al., 2022]. Функциональная связанность отражает пространственно-временную организацию нейронных сетей мозга. Данный параметр - один из наиболее изучаемых в исследованиях с использованием методов нейровизуализации. В подобных исследованиях мозга человека наиболее продуктивным является метод фМРТ.

Рассматриваются следующие механизмы, координирующие активность зон в коре мозга (рисунок 15):

1. Прямая связь через мозолистое тело, или корковые проекции. В многочисленных экспериментах по изучению анатомических связей в мозге методами диффузионной трактографии или отслеживания метки после вирусной инъекции показано сходство структурных связей в мозге с матрицей функциональных связей. Однако коэффициент корреляции между структурными и функциональными картами не превышает 0.6, что указывает на наличие других механизмов,

обеспечивающих синхронную работу различных областей [Díaz-Parra et al., 2017; Nori et al., 2020]. Также показано, что билатеральная симметрия активности коры мозга снижается у животных с поврежденным мозолистым телом [Mohajeri et al., 2010].

2. Синхронизация двух областей, получающих одинаковый сигнал от третьей, источника нейромодуляции. Так, например, показана способность таламуса и гиппокампа влиять на функциональную связанность [Chan et al., 2017; Wang et al., 2019]. Кроме того, нейромодуляторные ядра, такие как ядра шва, голубое пятно, вентральная тегментальная область также способны изменять параметры активности мозга, зарегистрированные методом фМРТ [Pais-Roldán et al., 2021]. Однако поскольку нейромедиаторные системы мозга способны оказывать влияние на сосудистый тонус, то наблюдаемые изменения могут быть частично связаны с изменениями в параметрах нейро-васкулярного сопряжения.
3. С точки зрения нелинейной динамики, координация внутренней мозговой активности может возникать в результате взаимодействия между локальными популяциями нейронов, что не сразу очевидно на основе одних только структурных связей.

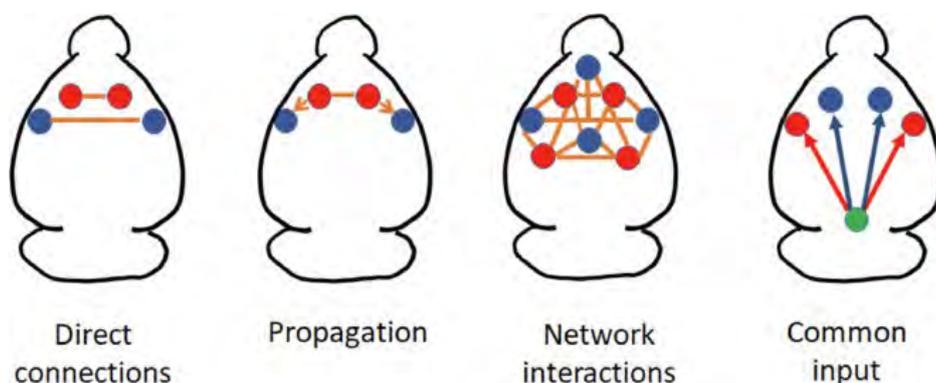


Рисунок 15. Возможные механизмы синхронизации работы областей в коре мозга. Взято с изменениями из [Pais-Roldán et al., 2021].

Области мозга, которые демонстрируют высокую степень синхронизации в работе объединяют в нейронные сети покоя (resting state network, RSN). Классификация таких сетей немного разнится, но в основном у человека выделяют следующие нейронные сети покоя: Default Mode Network (DMN), соматомоторную сеть, зрительную, сеть управляющих функций (Executive control), слуховую, лимбическую [Xu et al., 2022; Гаврон et al., 2019].

Исследования мозга лабораторных животных всегда ориентированы на то, чтобы результаты, полученные на мышах (на экспериментальных животных), могли быть применимы к мозгу человеку. Поэтому далее проведено краткое сопоставление особенностей

функционирования сетей мозга мыши, доступных для исследований методом ШОН, с данными о функционировании мозга человека.

Зрительная сеть имеет общие структурные и функциональные принципы устройства у человека и грызунов. Соматомоторный кластер у грызунов подразделяют на соматосенсорную, моторную, слуховую и обонятельную сети, которым соответствуют одноименные области коры больших полушарий. В исследованиях на человеке соматосенсорную, моторную и слуховую кору объединяют в одну соматомоторную. Важным отличием является то, что помимо сенсорных и двигательных функций, данным зонам приписывают функцию управляющего контроля, которой у человека занимается отдельная фронтопариетальная сеть. Обонятельная сеть хорошо развита у грызунов и выполняет свои прямые функции, тогда как у человека она более разрознена и ей приписывают такие дополнительные функции, как контроль эмоционального состояния. Лимбическая сеть у человека и грызунов характеризуется сходными паттернами активности при обработке эмоций и других социальных сигналов [Xu et al., 2022].

Default Mode Network - это сеть, активность которой снижена при выполнении каких-то определенных задач и повышена во время состояния покоя, её активность связывают с регуляцией внимания и уровнем бодрствования [Ferrier et al., 2020]. Характерной особенностью данной сети является выраженная отрицательная корреляция между фронтальными и париетальными областями. Особый интерес данная область вызывает при изучении нарушений при патологиях у человека и изучении активности мозга у животных, поскольку анализ данной сети не требует от субъекта выполнения определенных команд.

Функциональная связанность в покое (rest-state functional connectivity) — это оценка пространственно-временных паттернов корреляции спонтанной активности мозга. Несмотря на многочисленные исследования биофизическая основа корреляций спонтанного BOLD-сигнала в медленном диапазоне частот до сих пор точно не установлена. Однако предположение о возможной нейронной основе сигналов фМРТ в состоянии покоя подтверждается тем, что наиболее сильные корреляции в состоянии покоя, как правило, возникают между областями мозга, которые перекрываются как в функциональном, так и в нейроанатомическом отношении [Heuvel van den, Hulshoff Pol, 2010].

Широкопольная оптическая нейровизуализация на основе внутреннего сигнала (Optical Intrinsic Signal Imaging, OISI) аналогична фМРТ методу, что позволяет использовать ШОН для оценки функциональной связанности коры головного мозга в покое у лабораторных грызунов. Наиболее простой и часто используемый в области фМРТ и ШОН метод оценки взаимосвязи двух сигналов – коэффициент корреляции Пирсона. Данный коэффициент измеряет линейную зависимость между двумя случайными величинами. В представлении линейного моделирования коэффициент корреляции в квадрате (R^2) представляет собой долю дисперсии одной из

переменных (или сигналов), которая может быть объяснена другой, и наоборот. К недостаткам данного подхода можно отнести то, что он игнорирует временную структуру данных и рассматривает временные ряды как случайные величины. Другими словами, связанность, оцененная при помощи коэффициент корреляции Пирсона, будет одинаковой независимо от того, были ли временные ряды случайным образом перетасованы или нет [Bastos, Schoffelen, 2016]. Однако благодаря простоте интерпретации и реализации данный метод популярен в фМРТ и ШОН исследованиях.

Данные ШОН — это 3D массивы из последовательности изображений, размер которых варьирует от разрешения камеры и используемого «бининга», но в среднем составляет 64 x 64 пикселя. Мощности современных компьютеров позволяют проанализировать связанность всех пикселей со всеми, для изображения (64x64) это будет почти 17 млн. сравнений временных рядов, что затрудняет дальнейшую интерпретацию данных. Поэтому разработаны подходы, позволяющие упростить анализ функциональной связанности в покое.

Одним из подходов для оценки функциональной связанности является «seed-based» анализ. При этом методе выделяют небольшую область интереса (region of interest (ROI) или Seed) и рассчитывают коэффициент корреляции Пирсона между активностью в этой зоне и активностью других пикселей. Значения коэффициентов корреляции представляют в виде карт с тепловой разметкой. Чтобы определить структуру функциональных связей в мозге мыши, в качестве ROI выбирают области (площадью 10-30 пикселей) в центре основных функциональных зон коры, выделенных по анатомическому атласу [White et al., 2011] (**рисунок 16**).

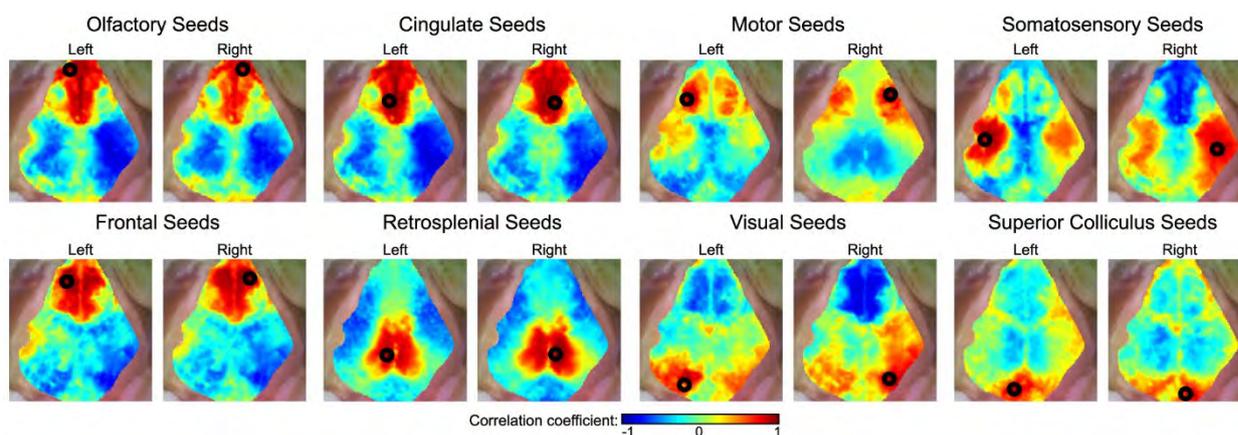


Рисунок 16. Пример «seed-based» корреляционных карт, построенных по НвО-сигналу для репрезентативной мыши (животное под кетамин-ксилазиновой анестезией) Расположение и размеры областей интереса обозначены черными кружками. Можно наблюдать двусторонне симметричные паттерны для всех областей интереса. Взято из [White et al., 2011].

Перед статистическим усреднением и сравнением групп между собой полученные коэффициенты корреляции подвергают z-преобразованию Фишера, что позволяет нормализовать распределение коэффициентов корреляции и стабилизировать дисперсию значений. Для визуализации усредненные значения подвергают обратному преобразованию. С целью сравнения групп проводят попиксельно t-тест с поправкой на множественные сравнения. При помощи такого анализа Wright и соавт. показали, что функциональная связанность, оцененная по сигналу GCaMP6 в диапазоне частот 0.4-4 Гц значительно изменяется при переходе от состояния бодрствования к анестезии (**рисунок 17**) [Wright et al., 2017]. При кетамин-ксилазиновой анестезии функциональная связанность GCaMP6 демонстрирует обратную корреляцию в ростра-каудальном направлении, что связано с распространением дельта-волн активности. Структура корреляции функциональных связей в бодрствующем состоянии характеризуется пространственной специфичностью [Wright et al., 2017].

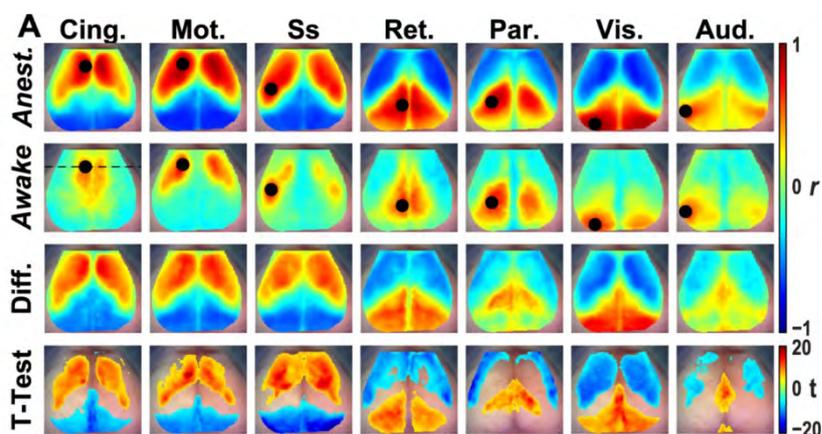


Рисунок 17. Карты функциональной связанности, построенные на основе исходных данных для семи канонических функциональных сетей у мышей GCaMP6, находящихся под наркозом (Anest.) и в состоянии бодрствования (Awake) ($N = 7$), на частотах дельта-диапазона (0,4-4,0 Гц). Diff. = Anest. - Awake. Cing. - поясная кора, Mot. - моторная кора, SS.- соматосенсорная кора, Ret. - ретросплениальная кора, Par.- париетальная кора, Vis. - зрительная кора, Aud. - слуховая кора. Взято из [Wright et al., 2017].

Симметричные области полушарий обладают одинаковыми функциями и связаны через мозолистое тело, поэтому в покое в коре мозга преобладает билатерально симметричная активность. Для оценки такой активности создают карты межполушарной гомотопической функциональной связанности (interhemispheric homotopic functional connectivity)[Nakon et al., 2018]. Рассчитывают корреляцию между сигналом каждого пикселя в правом полушарии и зеркально симметричного ему пикселя в левом. Поскольку такие карты математически симметричны, обычно визуализируют только одно полушарие. Далее для статистической оценки используют индекс гомотопической функциональной связанности (interhemispheric homotopic

connectivity index), который получают путем усреднения значений внутри карты межполушарной гомотопической функциональной связанности. Также высчитывают площадь карты, где значение связанности превышает заданный порог, для оценки более сильных связей. С помощью такого подхода Xie и соавт. показали, что такие виды анестезии, как Авертин (2,2,2-трибромэтанол), кетамин-ксилазин, уретан характеризуются большими значениями гомотопической функциональной связанности, чем хлоралгидрат и изофлуран (**рисунок 18**) [Xie et al., 2020].

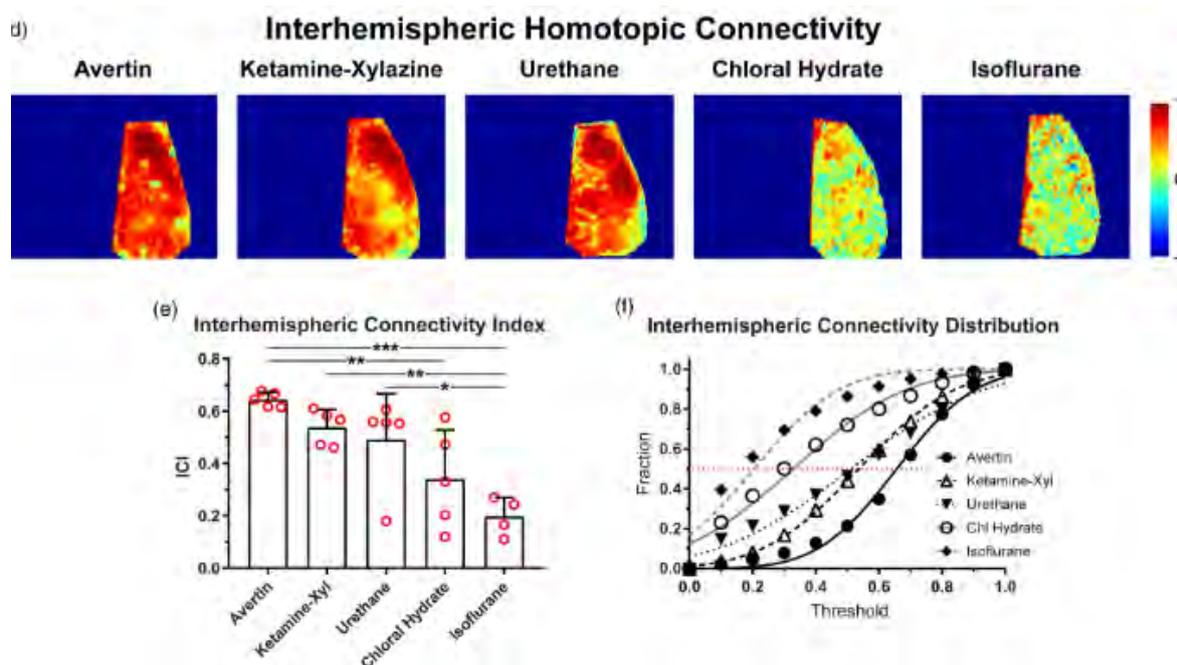
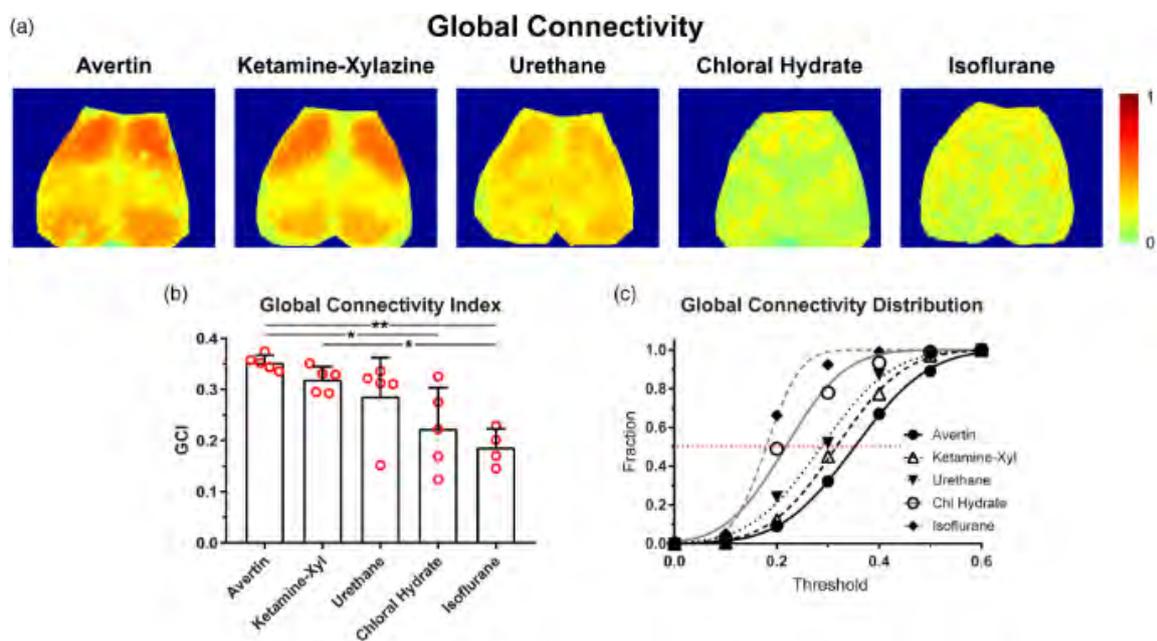


Рисунок 18. Межполушарная гомотопическая функциональная связанность при разных протоколах анестезии мышей, оцененная по изменению концентрации суммарного гемоглобина. **(d)** Репрезентативные карты, показывающие коэффициент корреляции пикселя в одном полушарии с его зеркальным пикселем в противоположном полушарии (т.е. с его гомотопическим партнером в противоположном полушарии). **(e)** Индекс гомотопической функциональной связанности (interhemispheric connectivity index) - среднее значение всех пикселей на картах из **(d)** для каждого анестетика. **(f)** Доля пикселей ниже порогового значения среднего коэффициента корреляции отображается на графике и аппроксимация кумулятивной кривой гауссовского распределения. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ с поправкой на Бонферрони. Взято без изменений из [Xie et al., 2020]. Сигнал был отфильтрован в диапазоне 0.008-0.09 Гц.

Ещё один подход при оценке функциональной связанности подразумевает расчёт коэффициентов корреляции активности каждого пикселя изображения мозга со всеми другими пикселями, затем для каждого пикселя подсчитывают либо среднее значение для случаев положительной корреляции, либо число пикселей, сила положительной корреляции с которыми

превышала выбранный порог. В первом случае получают карты глобальной функциональной связанности (global connectivity maps) (**рисунок 19**) [Sunil et al., 2023; Xie et al., 2020], во втором – «node degree» карты (node degree maps) [Након et al., 2018]. Далее можно отдельно рассчитать показатели внутри-полушарной связанности, учитывая пиксели только в ипсилатеральном полушарии, либо наоборот, показатель межполушарной связанности, учитывая пиксели в контралатеральном полушарии. Кроме того, можно усреднить полученные показатели по интересующим зонам, например, соответствующим анатомическим зонам атласа [Након et al., 2018].

А



Б

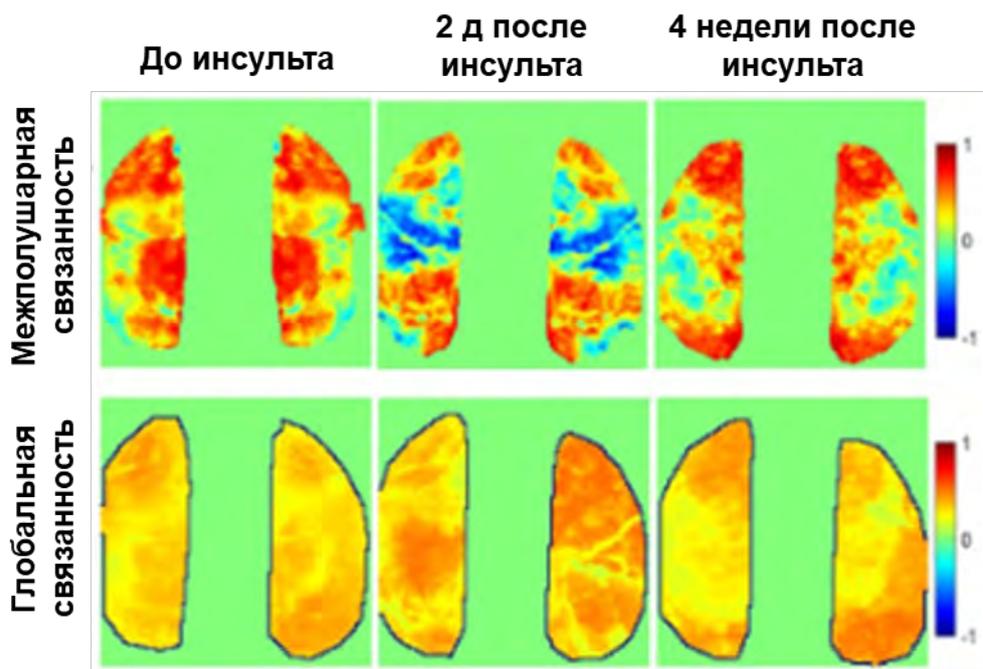
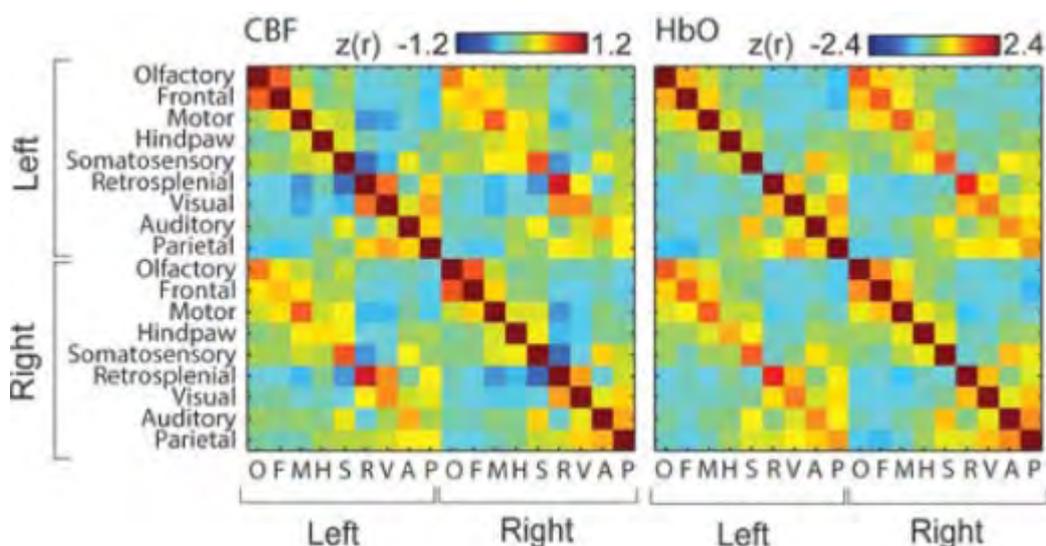


Рисунок 19. Примеры оценки глобальной связанности коры мозга. **А) (а)** Репрезентативные карты, показывающие средний коэффициент корреляции каждого пикселя с каждым другим пикселем на карте для Авертина, кетамин–ксилазина, уретана, хлоралгидрата и изофлурана. Для карт использовались только положительные корреляции. **(б)** Глобальный индекс связности (global connectivity index), который брал среднее значение для всех пикселей на картах из **(а)** для каждого анестетика. **(с)** Доля пикселей ниже порогового значения среднего коэффициента корреляции отображается на графике и аппроксимация кумулятивной кривой гауссовского распределения. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ с поправкой на Бонферрони. Взято без изменений из [Xie et al., 2020]. Сигнал был отфильтрован в диапазоне 0.008-0.09 Гц. **Б)** Карты межполушарной гомотопической функциональной связанности и глобальной связанности, построенные для GCaMP6f сигнала, отфильтрованного в диапазоне 0.008-0.09 Гц до, на 2 сутки и через 4 недели после фототромбоза. Адаптировано из [Sunil et al., 2023].

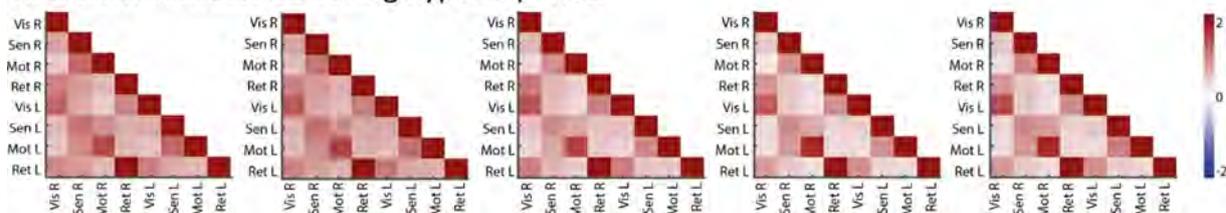
Распространенным подходом при оценке функциональной связанности является построение матриц корреляции (**рисунок 20**). Метод заключается в выборе областей интереса, чаще всего это зоны коры из анатомических атласов, для каждой зоны рассчитывают коэффициенты корреляции Пирсона с другими областями и в определенном порядке располагают в квадратной матрице, матрицы отображают с использованием цветowych карт, на которых интенсивность цвета соответствует значению коэффициента корреляции.

А



Б

а. GCaMP correlation during hypoxic period



б. GCaMP difference in correlation: hypoxic period - normoxic period

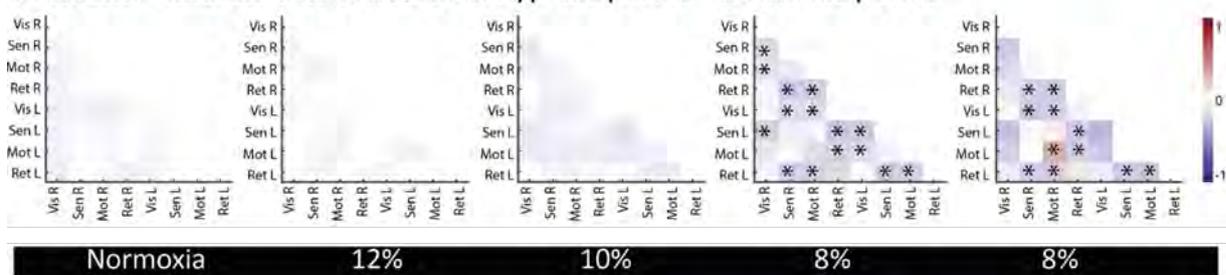


Рисунок 20. Примеры использования матриц корреляции для визуализации функциональной связанности. **А)** Матрицы корреляции, построенные на основе данных об изменении скорости кровотока CBF (зарегистрированных методом лазерной спекл-контрастной визуализации) и данных об изменении концентрации НвО (зарегистрированы методом ШОН). Данные для животных под кетамин-ксилазиновой анестезией. Сигнал был отфильтрован в диапазоне 0.008-0.09 Гц. Области интереса соответствуют зонам из анатомического атласа (Рахinos). Взято без изменений из [Bergonzi et al., 2015]. $z(r)$ – коэффициент корреляции после z -преобразования по Фишеру. **Б)** (а) Корреляционные матрицы, построенные на основе флукутаций флуоресценций GCaMP6s в течение периода гипоксии (с 12,5 по 17,5 минуту) ($n = 7$). (б) Различия в матрицах корреляции во время гипоксии по сравнению с нормоксией (с 2,5 по 7,5 минуту) ($n = 7$). Звездочки обозначают $q < 0,05$ для Benjamini–Hochberg False Discovery Rate—FDR – теста. Протокол подразумевал два повторяющихся периода 8% кислорода. Цветовая шкала представляет коэффициент корреляции после z -преобразования по Фишеру. Взято из без изменений из [Bakker et al., 2023].

1.3. Патофизиология инсульта и его моделирование на животных

Инсульт – это острое нарушение мозгового кровообращения, сопровождающееся инфарктом нервной ткани и персистирующим неврологическим дефицитом. Среди всех причин смертности взрослого населения инсульт занимает второе место, уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям [Feigin et al., 2022]. Наиболее распространенной формой (87%)

является ишемический инсульт, возникающий в результате нарушения нормального кровотока [Saini et al., 2021].

Главной причиной ишемического инсульта является блокировка кровотока, следовательно, недостаточное снабжение ткани кислородом и глюкозой, что в свою очередь приводит к недостатку внутри клеток АТФ, нарушению ионного гомеостаза. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция приводит к активации Ca^{2+} -зависимых протеаз, фосфолипаз, киназ, фосфатаз, нуклеаз с последующим изменением структуры и активности огромного множества белков как в цитозоле, так и в ядре и в органеллах, особенно митохондриях, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [Bading, 2013; Connolly, Prehn, 2015; Hardingham, Bading, 2010; Nicholls, 2009]. Деполяризация и гибель клеток приводит к избыточному выделению в межклеточное пространство глутамата и других возбуждающих медиаторов и развитию эксайтотоксичности [Choi, 2020]. Эти нарушения приводят к таким патофизиологическими процессам, как отек, нейровоспаление, нарушение гематоэнцефалического барьера. [Qin et al., 2022].

Наиболее распространенными в доклинических исследованиях модельными организмами являются грызуны. Это обусловлено не только общеизвестной простотой их содержания и разведения по сравнению с более крупными животными, но, что фундаментально важнее, тем, что более 95% генома мыши схожи с геномом человека, обеспечивая тем самым возможность их использования как модельных организмов [Vandamme, 2015]. Кроме того, доступность большого количества трансгенных линий мышей сделала данных животных ценным объектом фундаментальных исследований [Batti et al., 2013; Dana et al., 2018; Lim et al., 2012; Vanni, Murphy, 2014b; Zhang et al., 2021]

1.3.1. Моделирование инсульта на лабораторных грызунах

Модель LEVINE

Самыми распространёнными моделями повреждения мозга служат модели гипоксии-ишемии на лабораторных грызунах. Первоначально данную модель использовали на взрослых крысах [LEVINE, 1960]. Рассматриваемая модель, в большей степени является моделью энцефалопатий, индуцируемых гипоксией-ишемией, а не артериального инсульта. Основным принципом модели – односторонняя перевязка общей сонной артерии, с последующим (через 1-8 часов) помещением животного в условия средней гипоксии [Vannucci, Vannucci, 1997]. Стоит отметить, что условия проведения процедуры различаются у разных научных групп, однако есть некоторые общепринятые стандарты. Например, в качестве гипоксического воздействия предполагается использование снижения кислорода до 8% на 1-2 часа [Hamdy et al., 2020].

Поведенческие изменения, которые наблюдают после моделирования гипоксии-ишемии данным методом, – нарушения когнитивных функций (обучение и память), моторный дефицит, нарушение сенсорного восприятия [Alexander et al., 2014]. Эти изменения коррелируют с объемом повреждения структур мозга. Повреждается белое вещество, стриатум, гиппокамп и таламус [Rice et al., 1981]. Тяжесть последствий зависит от степени сформированности структур мозга в период индукции повреждения (Alexander et al., 2014). Гипоксия-ишемия сопровождается быстро наступающим, но временным нарушением целостности ГЭБ в зоне ишемии [Ek et al., 2015].

Отмечается, что одним из недостатков модели является низкая воспроизводимость [Hamdy et al., 2020]. Более воспроизводимые результаты дает перевязка не только общей сонной артерии, но и внешней сонной артерии [Edwards et al., 2017], поскольку в этом случае исключается возможность ретроградного движения крови к внутренней сонной артерии, поскольку между позвоночной артерией и ветвями внешней сонной есть анастомозы.

Окклюзия средней мозговой артерии (СМА)

Обратимая окклюзия

Частая причина артериального ишемического инсульта – окклюзия средней мозговой артерии [Roach, 2020]. Классический подход при окклюзии СМА у взрослых животных – это использование нейлонового филамента, диаметр которого соответствует диаметру сосуда, который необходимо заблокировать. Филамент вводят через внешнюю или общую сонную артерию, моделируя временную окклюзию с последующей реперфузией. Такой подход в большей степени соответствует клиническим случаям. Реперфузия после периода ишемии является звеном патогенеза повреждения ткани [Titomanlio et al., 2015]. Преимуществом использования филамента – удаленный доступ к сосуду без необходимости нарушения целостности черепа. Степень повреждения зависит от длительности окклюзии. У животных наблюдают значительные изменения в поведении, сенсомоторный дефицит, нарушения когнитивных функций и локомоции [Hamdy et al., 2020].

Необратимая окклюзия

Первоначально необратимую окклюзию СМА, вызывали электрокоагуляцией [Renolleau et al., 1998]. Для моделирования реперфузии, модель дополняют временным пережатием общей сонной артерии с последующим восстановлением кровотока. При этом удается получить локальное повреждение коры мозга. Однако воспроизводимость результатов очень сильно зависит от морфологии сосудов у животных. Было показано, что линия мышей СВ-17 характеризуется малыми разбросами в морфологии сосудов мозга. Применение электрокоагуляции дистальной части СМА на данной линии мышей, позволяет получить воспроизводимый очаг повреждения [Tsuji et al., 2013]. Однако в литературе отмечается высокий

уровень смертности животных при использовании моделей окклюзии СМА и гипоксии-ишемии, что осложняет проведение хронических исследований [Brima et al., 2013].

Окклюзия СМА при помощи магнитных наночастиц

Существует подход, когда окклюзию индуцируют при помощи магнитных наночастиц, вводимых в поверхностную височную вену мышей возраста P0 и P7 и последующим локальным воздействием микромагнита [Jia et al., 2018]. Авторы методики назвали данный метод аббревиатурой SIMPLE (Stroke Induced with Magnetic Particles). В результате удавалось получить локальный очаг инсульта, где наблюдали снижение плотности нейронов в зоне ишемии, скопление микроглии и гибель клеток.

Авторы оптимизировали дозу вводимых наночастиц, чтобы добиться обратимой окклюзии дистальной части СМА. Поскольку у мышей небольшого возраста кожа и тонкие кости черепа достаточно прозрачны, можно без дополнительных инвазивных манипуляций определить расположение поверхностных сосудов. Метод довольно новый, из имеющихся литературных данных пока нельзя сделать вывод о степени воспроизводимости размера очага.

Фототромбоз

Ещё в 1980-х годах группа исследователей [Watson et al., 1985] предложила модель воспроизводимого фокального тромбоза у взрослых мышей, индуцируемого фотохимически. Животному внутривенно вводили фотохимический краситель Бенгальский розовый. После распределения красителя в кровотоке пиальные сосуды в определенной области коры освещают светом нужной длины волны. Череп оставался интактным, поскольку кости черепа достаточно прозрачны, чтобы пропускать интенсивный свет. При действии света на молекулы красителя образуется синглетный кислород и происходит перекисное окисление липидов на мембранах эндотелиоцитов, в результате которого происходит активация эндотелия и запуск процессов первичного гемостаза и формированию тромба [Watson et al., 1985]. Изменяя параметры освещения (длительность освещения и позиционирование) и краситель, генерирующий активные формы кислорода, можно получать разные по объему и локализации повреждения [Узденский, 2010]. Таким образом, данная модель очень удобна для изучения механизмов нейропластичности коры мозга. Фототромбоз приводит к морфологическим изменениям в зоне ишемии и поведенческим нарушениям, сопоставимым с другими моделями инсульта [Tuor et al., 2016]. При этом данный метод является относительно малоинвазивным и благодаря этому характеризуется высокой степенью выживаемости лабораторных животных [Galkov et al., 2020]. Это позволяет исследовать не только острые, но и отставленные эффекты инсульта.

Другие модели инсульта

Инъекция или аппликация эндотелина¹ – вазоконстриктора. Варьируя объем введения и концентрацию, можно добиться разных по тяжести эффектов. Модель характеризуется медленным процессом реперфузии [Gennaro et al., 2019].

1.3.2. Изучение инсульта методами нейровизуализации

Исследования, выполненные на пациентах с инсультом с использованием функциональной магнитно-резонансной томографии, показывают, что амплитудные и пространственные характеристики активности мозга, регистрируемые данным методом при выполнении различных задач, претерпевают изменения как в ипсилатеральном, так и контралатеральном повреждении полушариях [Crofts et al., 2020; Li et al., 2016].

Метод ШОН, как и фМРТ способен детектировать гемодинамические изменения в коре мозга, однако совместно с этим позволяет регистрировать нейрональную активность напрямую, что можно использовать для исследования взаимодействия нейронов и сосудистого русла. В работе [Sunil et al., 2023] использовали метод ШОН для оценки изменений нейроваскулярного сопряжения, вызванного инсультом. Авторы моделировали инсульт при помощи модифицированной модели фототромбоза, позволяющей тромбировать определенную ветку МСАО (В данном методе получаются большие разбросы, но исследователи считают это плюсом, поскольку это повторяет вариабельность инсульта у людей). Было обнаружено подавление ответа в коре на сенсорный стимул в поврежденном полушарии. В здоровом полушарии ответ изменился слабо. Подавление ответа в поврежденном полушарии частично уменьшалось (до 50% от нормы к 4 неделе после инсульта). Sunil и соавт. показали снижение пространственного совпадения между ответом по кальцию и по окисленному гемоглобину. Было обнаружено увеличение амплитуды гемодинамического сигнала (HbO) в поврежденном полушарии, особенно выраженное в частотном диапазоне около 0.25 Гц, что может быть связано с увеличенной вазомоцией.

При помощи регистрации гемодинамического сигнала коры мозга мышей [Vice et al., 2022] было установлено, что оптогенетическая стимуляция одноименной зоны в здоровом полушарии препятствует процессу восстановления сенсомоторного дефицита и возвращению к норме функциональной связанности мозга и восстановлению области ответа на сенсорную стимуляцию и его амплитуды. Изменения в активности наблюдали не только в зонах около повреждения, но и в других зонах, в частности в гомологичной зоне интактного полушария. Исследование показало, что амплитуда гемодинамического ответа на сенсорную стимуляцию конечности увеличивалась в контралатеральном полушарии, кроме того, такое увеличение коррелировало с тяжестью инсульта и эффективностью восстановления утраченных функций. Такое нарушение активности зон, удалённых от места повреждения, называют диашизис. Он был

показан ранее как в исследованиях инсульта у человека, так и в моделях на животных [Vice et al., 2022]. Инсульт нарушает баланс возбуждения /ингибирования между пространственно разделёнными сетями мозга, что приводит к осложнению восстановления утраченных функций. Однако стоит отметить, что в данной работе анализировали только гемодинамический ответ и на полученные результаты могут влиять изменения в нейроваскулярном сопряжении.

Таким образом, широкопольная оптическая нейровизуализация является перспективным методом для анализа последствий инсульта на функциональную активность коры мозга, поскольку позволяет регистрировать такие параметры, как нейроваскулярное сопряжение, функциональная связанность в покое, локализация функциональных зон в коре мозга. Фотоиндуцированная локальная ишемия является наиболее подходящей моделью для исследования последствий инсульта и механизмов нейропластичности методом ШОН. Преимуществом ШОН является возможность хронического наблюдения параметров активности мозга у одного и того же животного, что позволяет учитывать индивидуальные разбросы, повышая чувствительность статистических методов. Однако, ввиду относительной новизны метода, до сих пор нет четких критериев и параметров для оценки тяжести инсульта по данным ШОН. Разработка таких критериев позволит расширить применение данного метода в нейробиологии и повысит эффективность тестирования терапевтических подходов для лечения инсульта.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Работа была выполнена на мышах 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. Животных содержали в стандартных условиях (температура 22°C, световой день – 12/12 ч) без ограничения доступа к воде и корму. Все опыты 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).

2.2. Хирургические манипуляции с животными

Операцию по истончению черепа и установке краниального окна проводили по протоколу [Кислухина et al., 2023]. Вкратце, животное анестезировали (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)), 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 закрепления головы животного в установке ШОН. Диаметр краниального окна в самой широкой части составлял 10 мм. (рисунок 21).



Рисунок 21. Результат операции по истончению черепа и установке краниального окна.

А) Титановый холдер, ячейка сетки – 1 мм. Б) Изображения головы мыши в процессе операции.

Для установки электродов на заднюю конечность для сенсорной стимуляции удаляли шерсть в области сухожилия на конечностях, используя крем для депиляции. После обработки операционного поля спиртом стерильной иглой (23G) протыкали кожу под Ахилловым сухожилием и при помощи стерильного пинцета продевали в отверстие незамкнутое металлическое колечко диаметром 2 мм. Затем колечко замыкали и место стыка закрепляли полимером. На каждую конечность устанавливали по 2 кольца. После установки место прокола кожи обрабатывали Бетадином (повидон-йод 10%, ЗАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия).

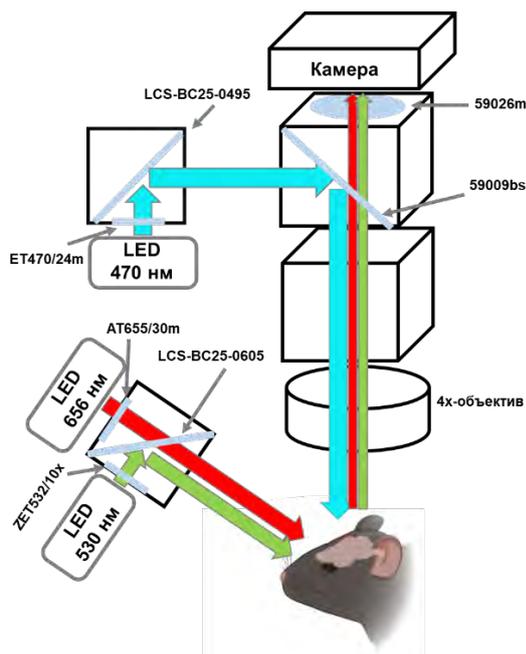
После операции и далее раз в сутки в течении 3ех дней после операции животными подкожно вводили Кетонал (Sandoz. Словения, доза кетопрофена 8.5 мг/кг, объем 150 мкл/30 г мыши, п/к) и антибиотик Марбобел 2 (Белкаролин, Республика Беларусь, доза марбофлоксацина 8 мг/кг, объем 150 мкл/30 г мыши). Животным давали минимум неделю на восстановление и затем постепенно приучали к съемкам в установке ШОН.

Операцию хронического введения полиуретанового катетера во внутреннюю яремную вену проводили под изофлурановой анестезией по стандартной методике [Galkov et al., 2020].

2.3. Широкопольная оптическая нейровизуализация

Используемая нами система широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) включала светодиоды 470 нм BLS-LCS-0470-14-22, 505 нм BLS-LCS-0505-12-22, 530 нм BLS-LCS-0530-03-22, 656 нм BLS-LCS-0656-12-22 (Mightex, США), модули контроля работы светодиодов (BioLED Light Source control modules (BLS-1000-2 - 2шт и BLS-3000-2, Mightex, USA)), комбинированные светоделители LCS-BC25-0495, LCS-BC25-0605 (Mightex, США), 12-ти канальный контроллер работы камеры и светодиодов BLS-IO12-US (Mightex, США). Оптическая часть установки включала полосные светофильтры (#65-142, Edmund Optics, USA; ET470/24m, ET505/20x ZET532/10x, ZET561/10x, AT655/30m, Chroma, USA), светоделители (LCS-BC25-0480, LCS-BC25-0495, LCS-BC25-0515, LCS-BC25-0605, Mightex, USA, 59009bs, Chroma, США) и жидкостные световоды (Thorlabs, США). Сигнал фокусировался при помощи 4х-эпиобъектива (P/N OBJ-MAO-04, Mightex, США) и регистрировался скоростной (до 50Hz) высокочувствительной камерой (CXE-B013-U, Mightex, США). Для обеспечения свободы передвижения бодрствующему животному использовали левитирующую на воздушной подушке платформу (Neurotar, Финляндия). (рисунок 22).

А



Б

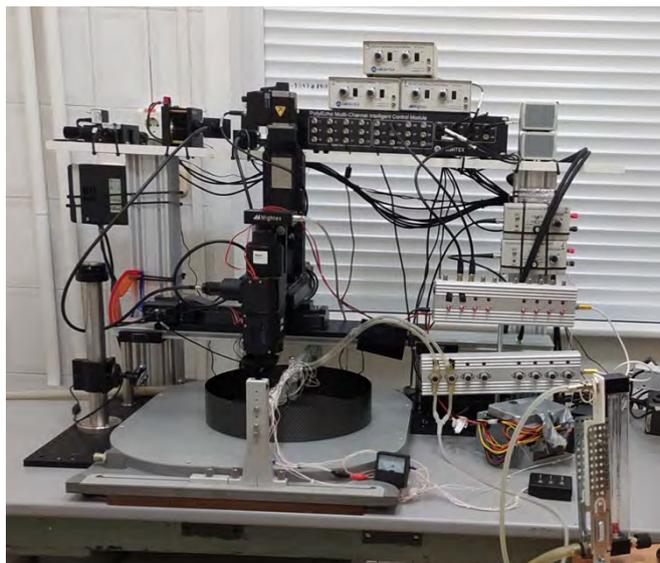


Рисунок 22. Система широкопольной оптической нейровизуализации. **А)** Принципиальная оптическая схема для варианта 3-ех волновой регистрации. **Б)** Изображение установки ШОН, находящейся в Лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ НМИЦ здоровья детей.

Перед началом экспериментов для получения изображений голову мыши закрепляли под объективом микроскопа, фиксируя холдер в специальном креплении.

Для регистрации гемодинамической активности в экспериментах по оценке влияния анестезии на спонтанную гемодинамическую активность коры мозг животного освещали светодиодами 505 нм и 656 нм. Излучение светодиодов направляли к образцу через светофильтры ET505/20x и AT 656/30m, комбинированный светоделитель LCS-BC25-0515 и кастомную систему бокового освещения. Рассеянный свет регистрировали в конфигурации прямого микроскопа, используя светоделитель 59009bs. Мозг освещали поочередно каждой длиной волны, суммарная частота регистрации составила 40Гц, или 20 Гц для каждой длины волны.

В серии экспериментов по исследованию кальциевой активности нейронов и суммарного гемоглобина использовали мышей линии C57BL/6J-Tg флуоресценцию GCaMP6f возбуждали, используя светодиод с длиной волны 470 нм. Излучение светодиода направляли к образцу через светофильтр ET470/24m, комбинированный светоделитель LCS-BC25-0495, световод, широкополосный светофильтр ET470/40x, светоделитель 59009bs и фокусировали на коре головного мозга с помощью 4x-эпиобъектива P/N OBJ-MAO-04. Для регистрации суммарного гемоглобина мозг животного освещали светодиодом 505 нм. Излучение светодиода направляли

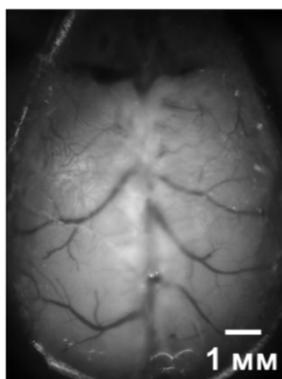
к образцу через светофильтры ET505/20x, комбинированный светоделитель LCS-BC25-0515 и кастомную систему бокового освещения. Испускаемую GCaMP6f флуоресценцию и рассеянный свет регистрировали в конфигурации прямого микроскопа, используя светоделитель 59009bs. Мозг освещали поочередно каждой длиной волны, суммарная частота регистрации составила 40 Гц или 20 Гц для каждой длины волны.

В ещё одной серии экспериментов одновременно с кальциевой регистрацией гемодинамической активности коры мозга животного детектировали относительные изменения концентраций окисленной (HbO), восстановленной (HbR) форм гемоглобина и суммарного гемоглобина (HbT). Последние регистрировали, освещая кору мозга светодиодами 530 нм и 656 нм. Излучение светодиодов направляли к образцу через светофильтры ZET532/10x и AT 656/30m, комбинированные светоделители LCS-BC25-0605 и кастомную систему бокового освещения. Флуоресценцию GCaMP6f детектировали, как описано в прошлом абзаце. Рассеянный свет регистрировали в конфигурации прямого микроскопа, используя светоделитель 59009bs. Частота регистрации кадров составляла 20 Гц для регистрации флуоресценции и по 10 Гц для каждой длины волны для регистрации светорассеяния, диоды включали поочередно. Перевод значений интенсивности рассеянного света в значения концентраций гемоглобина проводили, используя модифицированную для светорассеивающих сред формулу Бугера-Лабберта-Бера [Ma et al., 2016a] (см. 3.1.3)

Максимальное время экспозиции во всех экспериментах составило 5 мсек. Итоговое разрешение изображений - 344x464 пикселей (**рисунок 23**). В первой серии экспериментов использовалась отличная от последующих экспериментов конфигурация холдеров, удлиненная в ростра-каудальном направлении, поэтому изображения ориентированы иначе (**рисунок 23 А, Б**).

А

**«Сырое» изображение
рассеянный свет
505 нм**



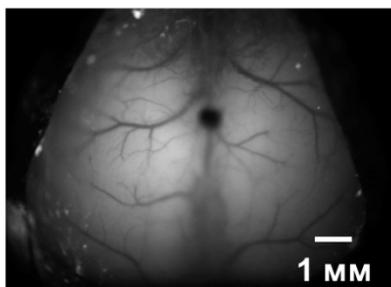
Б

**«Сырое» изображение
рассеянный свет
656 нм**



В

**«Сырое» изображение
флуоресценция GCaMP6f
Ex 470 нм / Em 520 нм**



Г

**«Сырое» изображение
рассеянный свет
530 нм**

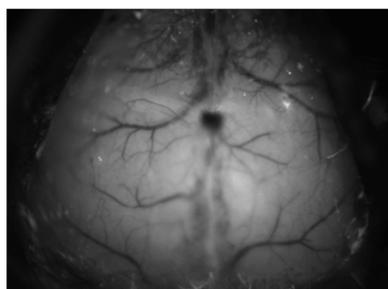


Рисунок 23. Пример изображения коры мозга животного, получаемых в экспериментах ШОН при детекции рассеянного света длиной волны 505 нм (А), 656 нм (Б), флуоресценции сенсора GCaMP6f (В) и при детекции рассеянного света 530 нм (Г). На изображениях панелей А и Б использовались холдеры отличной от остальных экспериментов «яйцевидной» формы. Темное пятно примерно в центре изображения – обозначенная черным лаком брегма – точка пересечения венечного и сагиттального швов на черепе.

2.4. Стимуляция задней конечности мыши

Для оценки ответа, вызванного в коре сенсорным воздействием, проводили стимуляцию задней лапы животного слабым электрическим стимулом. Для воспроизводимой сенсорной стимуляции задних конечностей бодрствующего животного использовался метод доставки слабого электрического стимула к задним конечностям через заранее вживленные под кожу электроды и прикрепляемые во время эксперимента к ним клипсы (**рисунок 24**). Система крепления предусматривает дополнительное крепление проводов к хвосту мыши через гибкий переходник, чтобы минимизировать механическое воздействие на лапу в области крепления электродов. Стимул подавался через стимулятор Bio-stim2 (НПФ «Биотехнологии», Россия), управляемые через TTL-вход контроллером (PolyEcho Intelligent Control Module, Mightex, США) и программой PolyScan (Mightex, США).

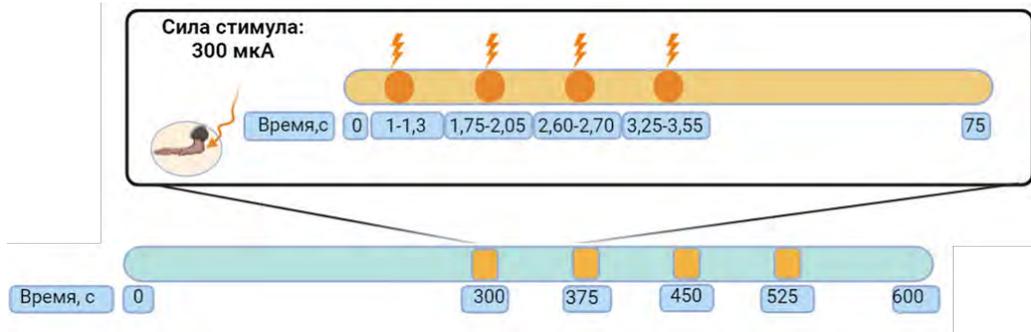
А

Имплантированные кольца -
крепления для электродов

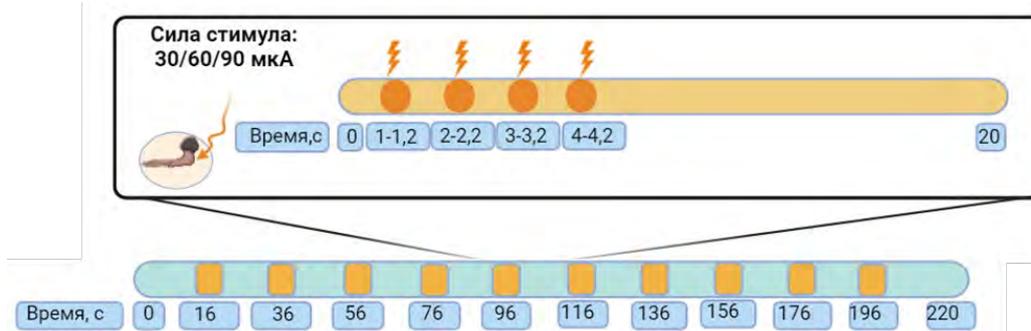


Съемные электроды-серфины

Б



В



Г

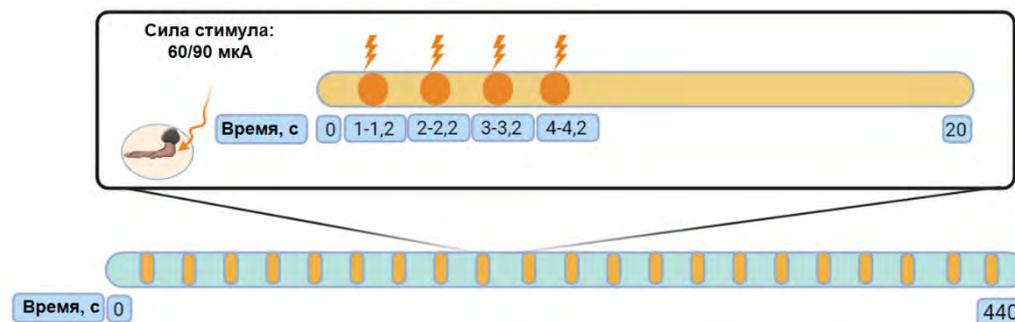


Рисунок 24. Стимуляции задних конечностей бодрствующего животного. **А)** Система для стимуляции задних конечностей бодрствующего животного. **Б)** Протокол стимуляции в экспериментах по оценке влияния анестезии на активность мозга. **В)** Протокол стимуляции в экспериментах по оценке влияния анестезии на активность мозга с 2-ух волновой системой ШОН. **Г)** Протокол стимуляции в экспериментах по оценке влияния анестезии на активность мозга с 3-ех волновой системой ШОН.

В экспериментах по оценке влияния анестезии на активность мозга проводили стимуляцию задней конечности у бодрствующего животного и у животных под изофлураном в течении 600с силой стимула 300мкА 10-ю пачками из 4-х стимулов, длительность короткого стимула 300мс, частота 1,17Гц.

В экспериментах по моделированию ишемии для оценки вызванного ответа в коре на сенсорный стимул на лапу животного подавали электрический стимул силой 30, 60 или 90мкА пачками по 4 стимула длительностью 200мс, частотой 1 Гц, количество пачек за 1 запись составляло 10 штук с интервалом 16 с, длительность одной записи 220сек. В эксперименте с 3-ех волновой системой ШОН использовали тот же протокол, но увеличенный по длительности в 2 раза (21 стимул вместо 10).

2.5. Модель 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). 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 $\phi = 1.5$ мм; AP = -1; ML = -2) через 5 минут после введения соответствующей дозы БР. В эксперименте с использованием 2-х волновой системы ШОН для регистрации флуоресценции и GCaMP6f использовали менее стабильный лазер, чем можно объяснить бóльший разброс в размере очага.

2.6. Магнитно-резонансная томография (МРТ)

Оценку размера повреждения головного мозга у мышей, вызванного фотоиндуцированной ишемией, у всех экспериментальных групп осуществляли с помощью МРТ через 24 часа после фототромбоза (совместно с М.В. Гуляевым, Центр магнитной томографии и спектроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова). Измерение объема поражения мозга проводили у животных под изофлурановым наркозом, размещенных на термopоддерживающeм столике томографа для мелких лабораторных животных BRUKER BioSpec 70/30 USR (Германия) с индукцией магнитного поля 7 Т, на основе T2-взвешенных изображений. Область сканирования 16 срезов толщиной 0,4 мм составила 18*18 мм², матрица сканирования – 180*180. Общее время сканирования для каждого животного не превышало 30 мин. Область пенумбры детектировали в режиме с увеличенным до 100мс TE (время появления эхо-сигнала).

Изображения серий фронтальных срезов мозга анализировали в программе ImageJ (Национальный институт здоровья, США).

2.7. Оценка сенсомоторного дефицита с помощью теста решётка

Для оценки сенсомоторного дефицита у животных в посттравматический период использовали тест «Решётка» [Brooks, Dunnett, 2009; Galkov et al., 2020]. Животное помещали на установленную на высоте 50 см решётку с диаметром ячеек 1 см. Далее с помощью видеорегистратора в течение 5 мин фиксировали два параметра: число случаев свободного проскальзывания лап мыши в ячейки – n (т.н. моторные ошибки), а также число шагов, сделанных задней ипсилатеральной конечностью (показатель общей двигательной активности животного) – $n_{\text{общ}}$. Результаты представляли или в виде нормированного на 100 шагов животного количества моторных ошибок ($n/n_{\text{общ}}*100$), или в виде разности соответствующих показателей до и после фотоиндукции ишемии:

$$(n_{\text{после}}/n_{\text{общ}} - n_{\text{до}}/n_{\text{общ}})*100.$$

В исследовании с моделированием двух тяжестей инсульта анализ теста «Решётка» проводили с использованием алгоритма DeepLabCut [Mathis et al., 2018], предварительно обученного распознавать положения конечности мыши. Рассчитывали общее число ошибок, деленное на скорость передвижения животного.

2.8. Гистологические исследования

Для оценки размера очага поражения, вызванного фототромбозом, использовали классический способ окрашивания срезов мозга по Ниссля. На 21-й день после индукции фототромбоза проводили эвтаназию мышей методом ингаляции хлороформа. Далее осуществляли транскардиальную перфузию мыши фосфатно-солевым буфером (PBS) для удаления крови. Затем проводили транскардиальную перфузию мыши 10% раствором формалина для префиксации тонких структур головного мозга. После выделения образцы мозга фиксировали в 10% формалине с $\text{pH} = 7.4$ (Биовитрум, Россия) в течение не менее 2 суток. Срезы толщиной 35 мкм получали с помощью вибратора Leica vt1200s (Leica, Германия). Для окрашивания по Ниссля плавающие срезы мозга наносили на покрытые желатином и квасцами (Sigma-Aldrich®, Германия) предметные стекла и высушивали при комнатной температуре. Через сутки проводили окрашивание крезилловым фиолетовым (Servicebio, Китай). Окрашенные срезы последовательно инкубировали, используя батарею спиртов до ксилола и заключали под покровные стекла, используя в качестве гидрофобной среды для заключения Канадский бальзам (Panreac, Испания). Окрашенные по Ниссля срезы фотографировали на микроскопе Nikon Ti2 на объективах 20x и 40x.. Оценку размера очага проводили в программе ImageJ.

2.9. Воздействия и манипуляции с животными в ходе исследования

В серии экспериментов по оценке влияния анестезии на спонтанную гемодинамическую активность коры мозга животного и на корковую активность, вызванную сенсорной стимуляцией, использовали 10 животных линии C57Black/6 (рисунок 25).

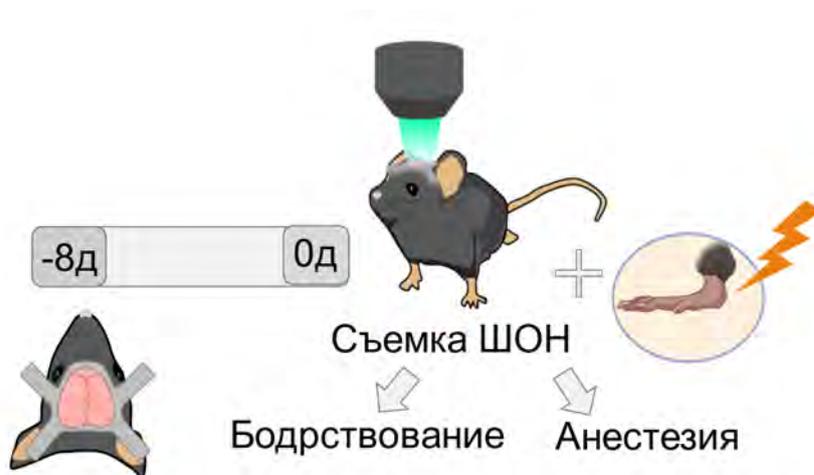


Рисунок 25. Схема эксперимента по анализу гемодинамической активности коры методом ШОН.

На 8-й день после операции по установке краниального окна, животное помещали в установку ШОН и проводили 12-ти минутную запись активности коры мозга бодрствующего животного, из которых первые 6 мин - в спокойном состоянии, последующие 6 мин - на фоне стимуляция задней конечности слабым электрическим током, силой стимула 300мкА, 10 пачек из 4-х стимулов. В качестве анестезии использовали изофлурановый наркоз (4% - 3 мин, далее 1.5% Изофлуран в смеси с чистым кислородом). Температура тела животного поддерживалась на уровне 37⁰С с помощью термоконтроллера с обратной связью. Через 20 мин после индукции наркоза проводили 12-минутную запись активности коры мозга анестезированного животного, из которых первые 6 мин - спокойное состояние, последующие 6 мин - стимуляция задней конечности слабым электрическим током, силой стимула 300мкА. Подавали 4 пачки стимулов, каждая пачка состояла из 6 коротких стимулов длительностью 300мс и частотой 1,17Гц (рисунок 24 Б).

В серии экспериментов по исследованию кальциевой активности нейронов и суммарного гемоглобина использовали мышей линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (Jackson Laboratory). Животным (20 самцов и самок) провели операцию по установке краниального окна (рисунок 26). Через 2 недели после операции животных случайным образом, но с учетом равенства полов, распределили на две группы: «Контроль» и «Инсульт». Мышам из группы «Инсульт» (n = 9) проводили моделирование инсульта методом фотоиндуцированной ишемии

(ФТ). С животными из группы «Контроль» ($n = 9$) проводили те же манипуляции, включая истончение черепа, кроме введения фотосенсибилизатора. Фототромбоз индуцировали бодрствующим животным, закрепленным в установке для ШОН. Регистрацию изображений коры мозга проводили за 2 дня до ФТ, а затем через 3 мин (в течение последующих 7,3 мин) после окончания ФТ. Регистрацию изображений повторяли спустя 1 и 7 суток после ФТ.

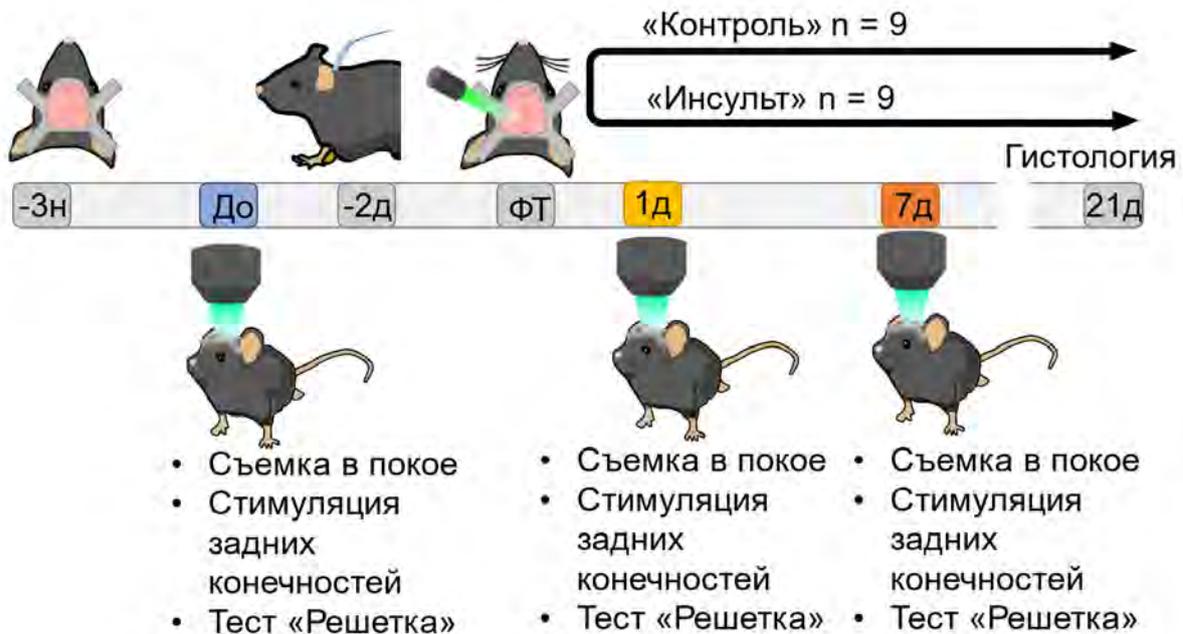


Рисунок 26. Схема эксперимента по изучению влияния инсульта на активность коры мозга по исследованию кальциевой активности нейронов и суммарного гемоглобина с применением 2ух волновой системы ШОН.

Для оценки вызванного ответа в коре на сенсорный стимул, на лапу животного подавали электрический стимул силой 30, 60 или 90мкА пачками по 4 стимула длительностью 200 мс, частотой 1 Гц, количество пачек за 1 запись составляло 10 штук с интервалом 16 с (**рисунок 24 В**) до инсульта, на 1 и 7 сутки после инсульта. Стимулировали всеми 3-мя силами стимула левую и правую лапу поочередно. На 21 сутки после фототромбоза животных эвтаназировали, проводили анализ размера повреждения при помощи гистологической окраски срезов по Нисслию.

В следующей серии экспериментов также использовали мышей линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (Jackson Laboratory), но в отличие от описанной выше серии, у животных (16 самцов) индуцировали инсульт разной степени тяжести, варьируя дозу фотосенсибилизатора (бенгальский розовый, БР) 20мг/кг (группа БР20) и 10мг/кг (группа БР10). Активность мозга регистрировали методом ШОН (470, 530 и 656нм) до ФТ и на первые сутки, в покое и при сенсорной стимуляции (параметры аналогичны описанным выше экспериментам)

задних конечностей бодрствующей мыши. Объем повреждения через сутки после ФТ оценивали МРТ на основе T2-взвешенных изображений (**рисунок 27**).



Рисунок 27. Схема эксперимента по изучению влияния тяжести инсульта на активность коры мозга с применением 3ex волновой системы ШОН.

Для оценки вызванного ответа в коре на сенсорный стимул на лапу животного подавали слабый электрический стимул (силой 30, 60 или 90мкА) пачками по 4 стимула длительностью 200мс, частотой 1Гц, количество пачек за 1 запись составляло 21 штуку с интервалом 16с (**рисунок 24 Г**).

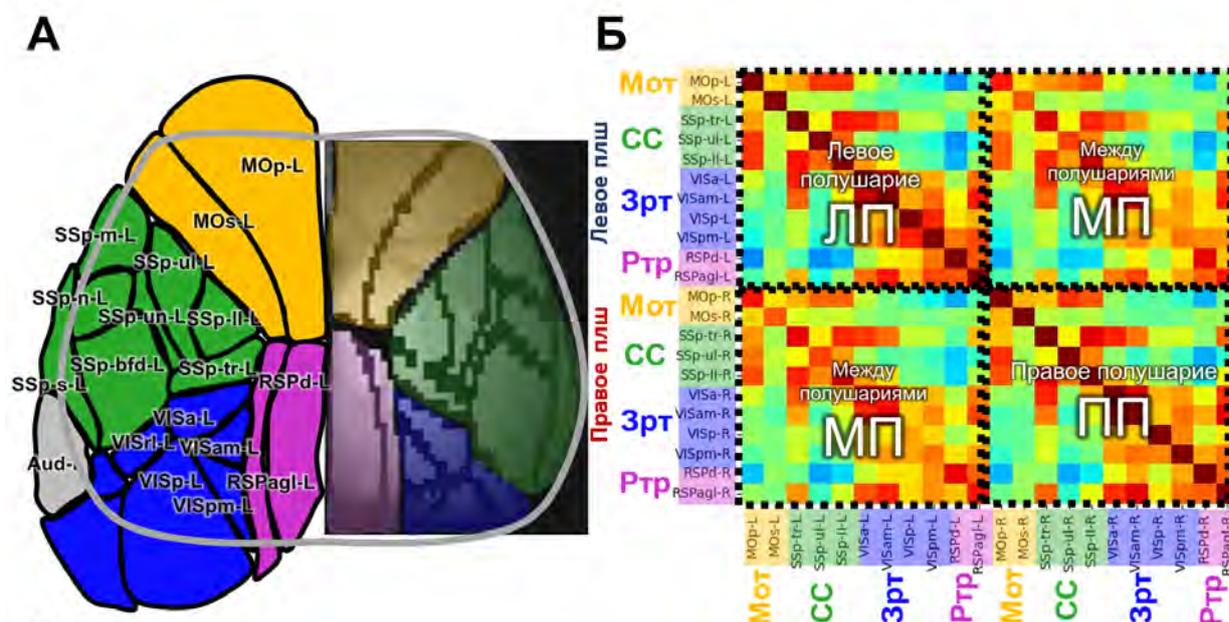
2.10. Статистическая обработка результатов и анализ изображений ШОН

Статистический анализ результатов 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, gm-ANOVA, критерий Краскела — Уоллиса, парный или непарный t-test, тест Манна-Уттини.

Алгоритм анализа сигналов ШОН был специально разработан в ходе выполнения работы и подробно описан в главе «Результаты и обсуждения».

Для построения матриц корреляции в спокойном состоянии использовали зоны коры, определенные по атласу (The Allen mouse brain atlas) [Wang et al., 2020] (**рисунок 27 А**). Использовали следующие зоны: MOp-L, MOs-L, SSp-tr-L, SSp-ul-L, SSp-II-L, SSp-m-L, SSp-n-L, SSp-bfd-L, SSp-un-L, VISa-L, VISam-L, VISp-L, VISrl-L, VISpm-L, RSPd-L, RSPagl-L, MOp-R, MOs-R, SSp-tr-R, SSp-ul-R, SSp-II-R, SSp-m-R, SSp-n-R, SSp-bfd-R, SSp-un-R, VISa-R, VISam-R,

VISp-R, VISrl-R, VISpm-R, RSPd-R, RSPagl-R. В таком порядке зоны располагали по осям матрицы и высчитывали коэффициент корреляции Пирсона между активностью пересекающихся по расположению в матрице зон (рисунок 28 Б).



MOp – первичная моторная
 MOs – вторичная моторная
 SSp-tr – чувствительность тела
 SSp-ul – чувствительность верхних конечностей
 SSp-il – чувствительность задних конечностей
 SSp-m – чувствительность области рта
 SSp-n – чувствительность области шеи
 SSp-bfd – чувствительность вибрисс
 SSp-n – чувствительность области носа
 SSp-un – чувствительность (область неизвестна)
 SSs – чувствительность (вторичная)

VISa – передняя зрительная
 VISam – переднемедиальная зрительная
 VISpl – заднелатеральная зрительная
 VISp – первичная зрительная
 VISpm – заднемедиальная зрительная
 VISrl – ростралатеральная зрительная
 RSPd – ретроспленальная (дорзальная часть)
 RSPagl – ретроспленальная (агранулярная латеральная)
 AUD – слуховая

Рисунок 28. Анализ функциональной связанности. А) Расположение зон коры больших полушарий мыши по атласу (The Allen mouse brain atlas) в сопоставлении с реальным изображением ШОН. Адаптировано из [Wang et al., 2024]. Б) Пример расположение зон в матрице корреляции. Мот – моторные области, СС – области соматосенсорной коры, Зрт – области зрительной коры, Ртр – ретроспленальная кора. В) Расшифровка аббревиатур названий зон.

Перед оценкой корреляций или нейроваскулярного сопряжения к данным применяли частотную фильтрацию, применяли фильтры Баттерворта из Python библиотеки `scipy`

(`scipy.signal.butter()`). Диапазоны фильтрации указаны при представлении данных. Также из данных удаляли участки с активной локомоцией.

Анализ спектральной мощности сигналов проводили с использованием метода Уэлча (`scipy.signal.welch()`). Спектрограммы строили с использованием функции `scipy.signal.spectrogram()`.

Перед усреднением между мышами коэффициенты корреляции преобразовывали при помощи z-трансформации по Фишеру, затем уже усреднённые z-значения переводили обратно в r. Для статистического анализа различий между функциональной связанностью использовали усреднение коэффициентов внутри одного полушария - коэффициент внутрислошарной связанности, а также усредненный коэффициент для корреляции зон разных полушарий – коэффициент межполушарной связанности. Для проверки статистических гипотез и усреднений использовали преобразованные коэффициенты корреляции ($z(r)$).

Взаимную корреляцию кальциевого и гемодинамического сигнала рассчитывали по 15 сек участкам со сдвигом в 5 сек в обе стороны.

Карты гомотопической корреляции представляют собой усредненный коэффициент корреляции Пирсона между пикселями симметричными относительно сагиттального шва. Для построения карт глобальной связанности для сигнала каждого пикселя считали коэффициент корреляции Пирсона активности данного пикселя со всеми другими, затем суммировали число случаев, когда корреляция статистически значимо была выше 0.7.

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.

2.11. Протокол экспериментов с исследованием кальциевых ответов клеток *in vitro*

Приготовление нейроглиальных культур

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]. Нейрональная специфичность синтеза флуоресцентного белкового сенсора GCaMP6f обеспечивалась нейрон-специфичным промотором Thy-1; один из родителей был гемизиготен, второй дикого типа. Вкратце, мышей анестезировали, декапитировали, кору выделяли и отделяли от мозговых оболочек. Извлеченные ткани промывали раствором Хенкса, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} , измельчали скальпелем, инкубировали в растворе папаина (12 мин,

37°C) и диссоциировали в свежей MEM. Однородную суспензию дважды центрифугировали (200 g, 5 мин, 4°C). Осадок ресуспендировали до концентрации 10⁶ клеток/мл в нейробазальной среде (NBM, Gibco, США) с добавлением саплимента B-27 и пенициллина/стрептомицина. Аликвоты клеточной суспензии (250 мкл) переносили в лунки 35 мм чашек Петри, дном которых служили покровные стекла, прикрепленные к лункам с внешней стороны (MatTeck, США). Клетки хранили в CO₂-инкубаторе при 37°C, в атмосфере 95% воздуха, 5 % CO₂ и относительной влажности 100%. Через 2-3 дня в среду добавляли цитозинарабинозид (Ara C, 5 мкМ) для предотвращения пролиферации глиальных клеток. Клетки снабжали питательными веществами, заменяя 1/3 среды на свежую, через каждые 3-4 суток. Культуры использовали в экспериментах через 14-16 дней после посева (14-16 days in vitro, DIV).

Все использованные реактивы производства Sigma-Aldrich® (Германия), если не указано иное.

Флуоресцентно-микроскопические измерения

Флуоресцентно-микроскопические измерения выполнены, как описано в [Сурин et al., 2014; Шарипов et al., 2018]. Использовали систему анализа изображений на основе инвертированного микроскопа Nikon Ti2 Eclipse (Япония), оснащенного объективами 20x/NA=0.75 и 40x/NA=1.30 Oil. Возбуждающее излучение создавалось светодиодными устройствами pE-340fura и pE-300ultra (CoolLED, Англия). Излучаемый и проходящий свет шёл через эмиссионные фильтры, встроенные в колесо перед sCMOS камерой Prime BSI Express (Teledyne Photometrics, США). Вся система управлялась через программу Nikon NIS-Elements (Япония).

Генотипирования новорожденных не проводили, объединяя клетки коры мозга 4-х мышат. По этой причине количество нейронов, синтезировавших GCaMP6f и имевших зеленую флуоресценцию (возбуждение 485 нм, регистрация 525 нм), было различным в культурах, приготовленных из разных пометов (4 серии по 2 эксперимента в каждой; 20 мышат от 4 самок, родивших в разные дни). Доля культивируемых нейронов, экспрессировавших GCaMP6f колебалась в поле наблюдения от 2 до 20%.

Эндогенная флуоресценция клеток, обусловленная NADH, а также флуоресценция синтетических флуоресцентных Ca²⁺ индикаторов Fura-2 и Fura-FF, белкового Ca²⁺ сенсора GCaMP6f, pH-чувствительного индикатора BCECF имеют хорошо разделенные спектры возбуждения и испускания флуоресценции. Благодаря этому мы смогли выполнить одновременные измерения сразу двух или трех из перечисленных выше параметров в одних и тех же клетках.

Ацетоксиметилловые эфиры Fura-2, Fura-FF и BCECF приобретены у ThermoFisher (США). Нагрузку клеток ацетоксиметилловыми эфирами указанных Ca^{2+} - и рН-индикаторов проводили как описано ранее [Сурин et al., 2014; Шарипов et al., 2018].

Относительные измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ выполнены с помощью синтетического флуоресцентного индикатора Fura-FF (возбуждение 340 и 380 нм, регистрация 525 нм) и эндогенного Ca^{2+} -сенсора GCaMP6f (возбуждение 485 нм, регистрация 525 нм. Значения Ca^{2+} в покоящихся нейронах приняты за 0; максимальные сигналы Fura-FF и GCaMP6f, принятые за 1, достигнуты добавлением Ca^{2+} -ионофора иономицина (Iono, 2 мкМ, при $[\text{Ca}^{2+}]$ в буфере 5 мМ). В используемой модели глутаматной эксайтотоксичности концентрация Glu составляла 10 мкМ (10 мкМ глицина, безмагниевый буфер); удаление Glu и добавление протонофора FCCP (1 мкМ) проводили в бескальциевом буфере (2 мМ Mg^{2+}). 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. Каждый вид экспериментов повторяли не менее, чем на 3-ех независимых посадках.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Разработка алгоритма для анализа данных ШОН

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, существующие в открытом доступе скрипты и пакеты сложно назвать универсальным. Для анализа данных, получаемых на установке ШОН, нами был создан собственный программный пакет на языке Python, этапы разработки которого подробнее описаны далее.

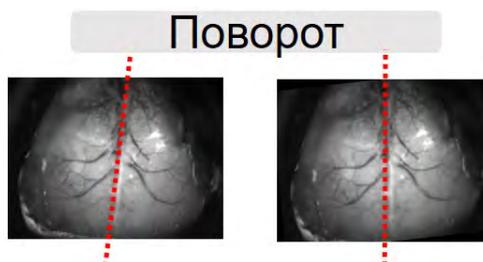
3.1.1. Разработка алгоритма для выравнивания изображений ШОН

Исходные данные ШОН - последовательности изображений дорзальной поверхности черепа животных. Опыт, накопленный нами при проведении исследований, показал, что на ориентацию анатомически значимых точек черепа относительно камеры влияют такие факторы, как погрешность в точности установки краниального окна во время операции, качество закрепления животного под установкой, а также небольшие сдвиги при движении животных при съемке в бодрствующем состоянии. Поэтому первым этапом анализа изображений является выравнивание изображений для последующего сравнения между повторными записями одного и того же животного, а также между разными мышами.

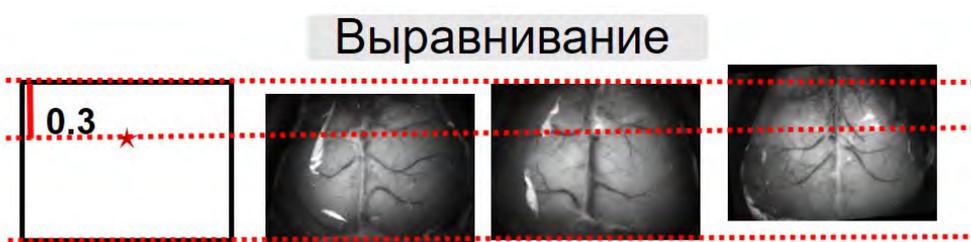
Для решения данной задачи нами был разработан алгоритм, в котором для одного изображения из каждой записи пользователю необходимо вручную обозначить 3 анатомически важные точки на изображении черепа: пересечение сагиттального шва на черепе с верхним и нижним краем изображения, а также точку пересечения сагиттального и венечного шва, имеющую название брегма. Программа высчитывает угол отклонения оси от вертикальной и заносит значения в базу данных, далее при помощи функции «rotate» из библиотеки Python «imutils» программа переворачивает все изображения эксперимента. Кроме того, программный код высчитывает количество пикселей, необходимых для сдвига изображения по вертикали и по

горизонтали таким образом, чтобы точка брегмы оказалась в центре по горизонтали и на одинаковом у всех мышей заданном расстоянии по вертикали (например, 1/3 от верхней границы) (рисунок 29).

А



Б



В



Рисунок 29. Трансформация изображений при первичной обработке данных ШОН. **А)** Поворот. **Б)** Выравнивание. **В)** Сжатие.

Также в программном коде для ускорения процесса обсчета данных производилось сжатие (binning) изображений в 4 раза. Сжатие значительно (в 4^2 раз) ускоряет работу алгоритмов, при этом позволяет точно детектировать положение локального ответа в коре на стимуляцию. Кроме того, такой подход позволяет сгладить небольшие сдвиги в положении черепа относительно камеры во время движения бодрствующих животных.

3.1.2. Разработка алгоритма для минимизации шумов

Следующим этапом анализа данных ШОН является преобразование значений интенсивности пикселей в полезный сигнал. ШОН позволяет регистрировать относительные изменения параметров, поскольку калибровка сигнала в живом интактном мозге затруднена. Поэтому интенсивность каждого пикселя (S) мы делили на базовый уровень интенсивности для

данного пикселя (S_0), который определяли, как среднее значение интенсивности пикселя за время всей записи. В итоге получали 3-мерную (3D- матрицу) матрицу значений S/S_0 .

Для того, чтобы избежать деление на значения S_0 близкие к «0» и, соответственно, появления «шумных пикселей» при делении на маленькое значение интенсивности пикселей в фоне, мы заранее для каждой мыши определяли маску, которая содержала только пиксели, совпадающие с положением коры мозга на изображении. Нами были протестированы несколько вариантов алгоритмов создания такой маски, среди которых выделение по пороговому значению, высчитываемому по формуле на основе сигнала S/S_0 , либо «сырого» сигнала S . Однако наиболее оптимальным и точным способом оказался метод рисования маски вручную, частично оптимизированный с помощью программного кода, позволяющего отмечать границы коры мозга точками и аппроксимирующего сглаженную кривую на основе построенных точек (**рисунок 30**).

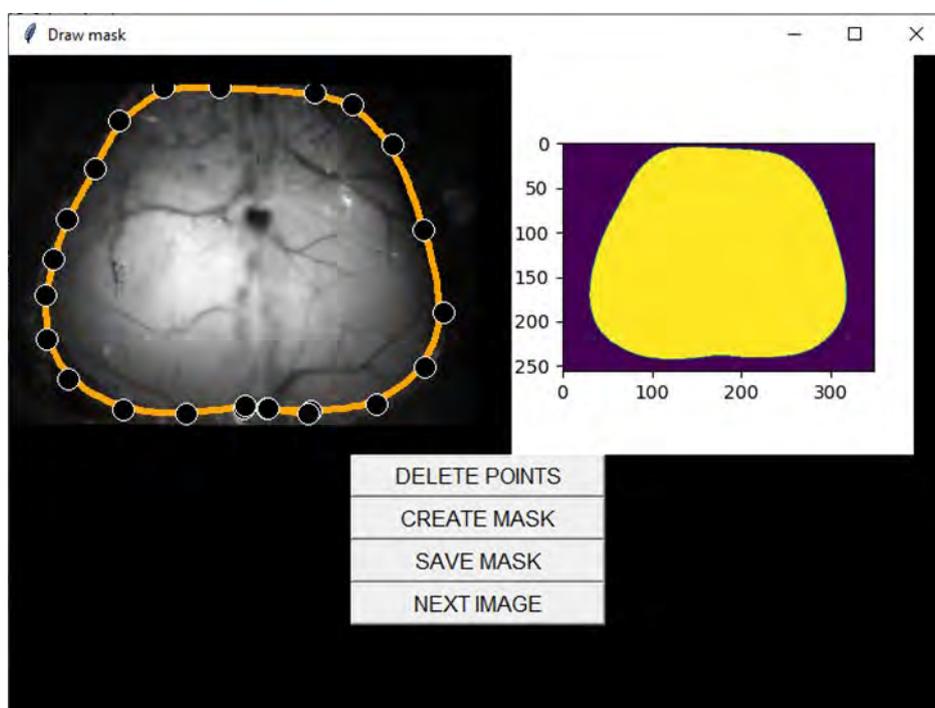


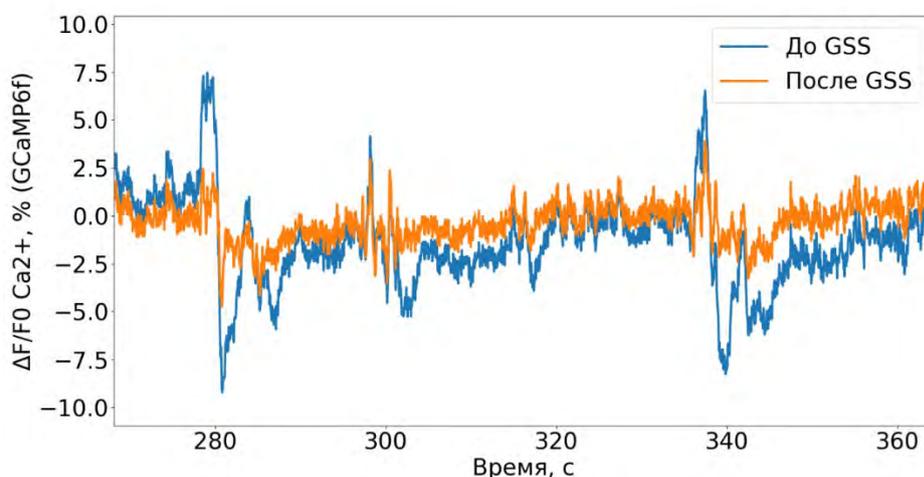
Рисунок 30. Графический интерфейс программного кода для автоматизации ручного определения границ маски.

Для минимизации шумов, возникающих в результате возможных флуктуаций в уровне освещения объекта исследования, а также для контрастирования локальных изменений активности зон коры мы вычитали из каждого пикселя усреднённый и сглаженный сигнал по всему мозгу для данного кадра, в литературе по анализу фМРТ такой сигнал называют глобальным сигналом (global signal). Вычитание глобального сигнала из сигнала каждого пикселя мы обозначили как global signal subtraction (GSS) (**рисунок 31 А**).

При анализе функциональной связанности в покое перед анализом данных применяют процедуру регрессии глобального сигнала (global signal regression, GSR)[Brier, Culver, 2023;

Murphy, Fox, 2017]. Стоит отметить, что необходимость GSR – спорный вопрос среди исследователей фМРТ. GSR может повысить специфичность положительных корреляций, улучшить соответствие анатомическим связям и помочь устранить отличные от нейрональных источники флуктуаций сигнала, такие как дыхание и движение, однако также процедура может модифицировать реальный нейронный сигнал и усилить отрицательные корреляции [Murphy, Fox, 2017; Ушаков et al., 2021]. Мы также реализовали процедуру GSR, но только для данных активности мозга в покое и оценки функциональной связанности и нейроваскулярного сопряжения по спонтанному сигналу, для возможности сопоставления с имеющимися литературными данными по ШОН, где часто используется процедура GSR [Brier, Culver, 2023; Nakon et al., 2018; Sunil et al., 2023] (рисунок 31 Б).

А



Б

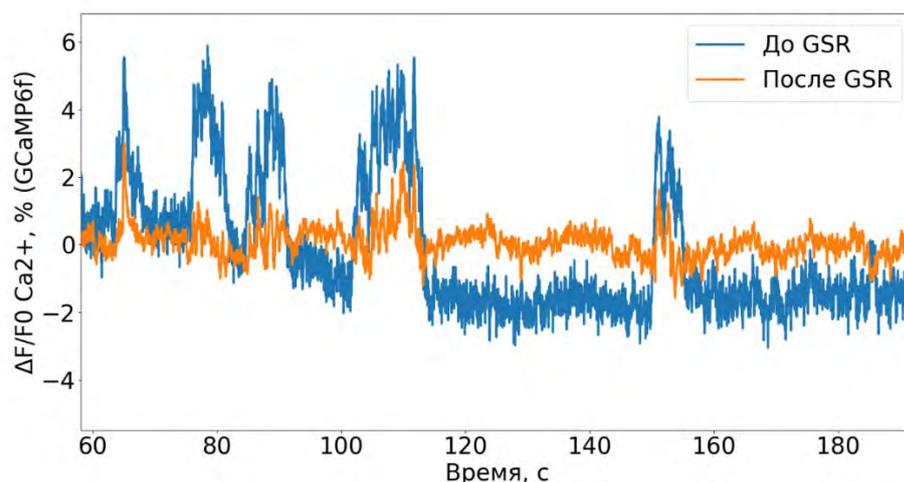


Рисунок 31. Сигнал с области соматосенсорной коры до (синяя линия) и после (оранжевая линия) процедуры вычитания глобального сигнала (GSS) (А) или регрессии глобального сигнала (GSR) (Б).

Дополнительно для минимизации шумов изображения, которые возникают в результате вибраций установки ШОН, неровностей покрытия краниального окна, бликов, программа осуществляла 2D Гауссово сглаживание изображений. (рисунок 32).

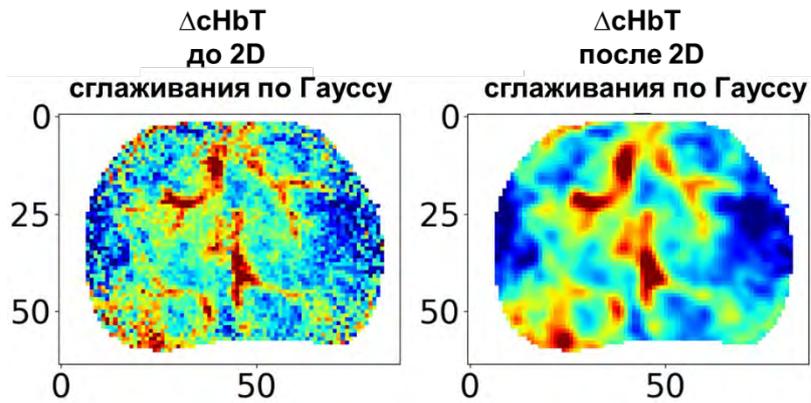


Рисунок 32. Результат применения 2D сглаживания по Гауссу к изображениям сигнала $\Delta cHbT$.

3.1.3. Подбор оптимальных алгоритмов для перевода значений интенсивности в полезный сигнал.

Перевод изменения интенсивности пикселей в изменения концентраций гемоглобина производили по модифицированной формуле Бугера-Ламберта-Бэра (рисунок 33 А), как показано в статье [Ma et al., 2016a].

А

$$\frac{I(t, \lambda)}{I(t_0, \lambda)} = e^{-\Delta\mu_a(t, \lambda)X(\lambda)}$$

Б

```
def Convert_to_dchb (I_I0_505_wo_gs, I_I0_656_wo_gs, lambda_1, lambda_2, dir_coeff_abs, dir_est_path):

    coeff_abs = pd.read_csv(dir_coeff_abs, sep = ' ')# считываю файл,
    #где указаны коэффициенты из статьи (Ma et al, 2016)
    #Считываю нужные коэффициенты
    epsHb0_505 = coeff_abs.loc[coeff_abs['Wave']== lambda_1]['Hb0'].values[0]
    epsHbR_505 = coeff_abs.loc[coeff_abs['Wave']== lambda_1]['HbR'].values[0]

    epsHb0_656 = coeff_abs.loc[coeff_abs['Wave']== lambda_2]['Hb0'].values[0]
    epsHbR_656 = coeff_abs.loc[coeff_abs['Wave']== lambda_2]['HbR'].values[0]

    est_path = pd.read_csv(dir_est_path)# считывние файла, где указаны коэффициенты из статьи (Ma et al, 2016)
    X505 = X_pathlength (lambda_1, est_path)
    X656 = X_pathlength (lambda_2, est_path)

    #Вычисление dchBR и dсНв0
    dabscoeff_505 = -(1/X505)*np.log(I_I0_505_wo_gs+ np.finfo (np.float32).eps)
    dabscoeff_656 = -(1/X656)*np.log(I_I0_656_wo_gs+ np.finfo (np.float32).eps)

    dchBR = (epsHb0_505*dabscoeff_656 - epsHb0_656*dabscoeff_505)/(epsHb0_505*epsHbR_656 - epsHb0_656*epsHbR_505)
    dchB0 = (epsHbR_505*dabscoeff_656 - epsHbR_656*dabscoeff_505)/(epsHbR_505*epsHb0_656 - epsHbR_656*epsHb0_505)
    dсНвТ = dchBR + dchB0
    return dchB0, dchBR, dсНвТ
```

Рисунок 33. Перевод значений интенсивности сигнала в изменения концентраций гемоглобина. А) Модифицированный закон Бугера-Ламберта-Бэра. $\Delta\mu_a$ - коэффициент абсорбции, X - поправка на длину среднего пути фотона ($X_{505} = 0.73$, $X_{530} = 0.37$, $X_{656} = 4.46$), I - интенсивность рассеянного света на длинах волн 505/530 и 656 нм, $\Delta\mu_a$ – коэффициент абсорбции для данной длины волны. Взято из [Ma и др., 2016b].

Б) Функция для перевода значений интенсивности рассеянного света двух длин волн в относительные изменения концентрации гемоглобина разных форм из программы для анализа данных ШОН

Кальциевую активность нейронов регистрировали по изменению флуоресценции белкового сенсора, который специфично экспрессировали нейроны коры мозга трансгенных мышей. Наиболее распространенными на данный момент сенсорами являются сенсоры семейства GCaMP на основе зеленого флуоресцентного белка GFP. Используемый в данной работе белок GCaMP6f в связанной с Ca^{2+} форме имеет максимум возбуждения на длине волны 496нм и максимум испускания на длине волны 513нм. При этом окисленная и восстановленная формы гемоглобина достаточно хорошо поглощают свет в данной области спектра, поэтому изменение притока крови к областям мозга при их активации вносит погрешность в измерения $[Ca^{2+}]$ и требует коррекции.

В ходе работы по разработке алгоритма для коррекции были опробованы три варианта удаления артефактов в измерениях гемодинамики:

- 1) анализ главных и независимых компонент активности и выделение компонент, соответствующих морфологически сосудистой сети;
- 2) двухволновой метод коррекции с использованием данных об изменении концентраций разных форм гемоглобина;
- 3) сравнение сигналов методом наименьших квадратов и вычисление остатка (least-squares template-matching).

Примеры результата применения анализа главных и независимых компонент с использованием JadeR продемонстрированы на **рисунке 34**. Морфология выделяемых компонент очень сильно варьировала как от записи к записи, так и между разными мышами. Достаточно сложно разработать алгоритм для детекции всех компонент, связанных с гемодинамической активностью, а выбор таких компонент ручным способом вносит в анализ субъективность [West et al., 2022].

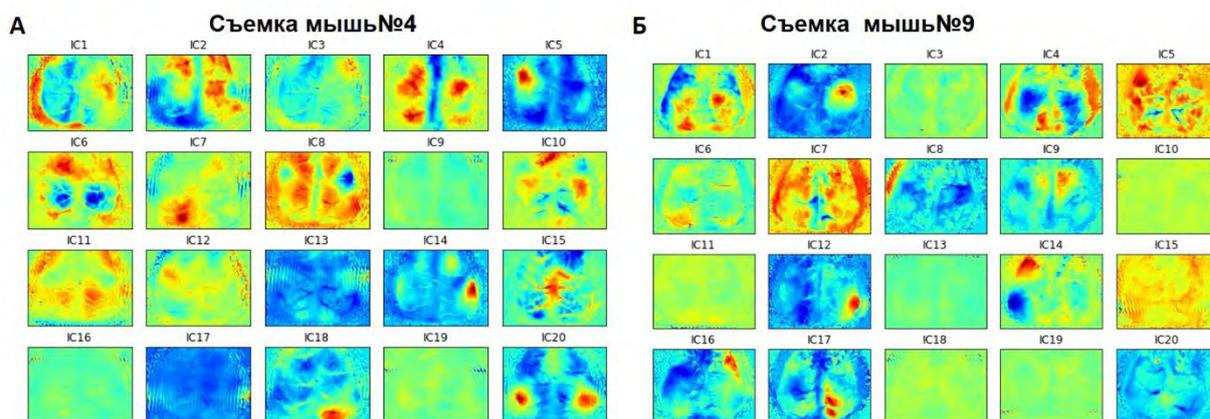


Рисунок 34. Пример применения анализа главных и независимых компонент кальциевой активности для разных животных (А, Б). IC# - номер независимой компоненты (independent component) по убыванию вклада в разброс значений.

Другим подходом, используемым для коррекции флуоресценции на гемодинамику в области ШОН, является двухволновой метод коррекции с использованием данных об изменении концентраций разных форм гемоглобина, предложенный Ма и соавт. [Ma et al., 2016a]. Коррекция осуществляется по формуле, представленной на **рисунке 35**.

$$\frac{F(t)}{F(t_0)} = e^{-[\Delta\mu_a(t, \lambda_{Ex})X(\lambda_{Ex}) + \Delta\mu_a(t, \lambda_{Em})X(\lambda_{Em})]} \cdot \frac{c_f(t)}{c_f(t_0)}$$

Рисунок 35. Формула для двухволновой коррекции артефакта гемодинамики в данных флуоресценции. F – нескорректированная флуоресценция, c_f – скорректированная флуоресценция, $\Delta\mu_a$ – коэффициент абсорбции для данной длины волны, $X(\lambda_{Ex})$ – длина пути фотонов для длины волны возбуждения флуорофора, $X(\lambda_{Em})$ – длина пути фотонов для длины волны эмиссии флуорофора. Взято с модификациями из [Ma et al., 2016a]. Подсвечены коэффициенты, которые требуют оценки.

Использование данных об изменении концентраций разных форм гемоглобина, зарегистрированных одновременно с кальциевой активностью, требует точной оценки рассеивающих свойств черепа и краниального окна конкретного животного (значений $X(\lambda_{Ex})$ и $X(\lambda_{Em})$ из формулы на **рисунке 35**). Для этого проводят дополнительные физические измерения, например, методом Spatial frequency domain imaging [Sunil et al., 2023]. На **рисунке 36** изображен усредненный сигнал с области соматосенсорной коры при подаче сенсорного стимула на заднюю конечность бодрствующего животного. Можно заметить, что без коррекции приток крови к рассматриваемой области (фиолетовая кривая) вызывает резкое падение флуоресцентного

сигнала сенсора кальция GCaMP6f (черная кривая) несмотря на продолжающуюся стимуляцию. Видно, что применение коэффициентов, предложенных в статье [Ma et al., 2016a] не позволяет скорректировать флуоресцентный сигнал, несмотря на похожие методические приемы подготовки краниального окна и регистрации сигнала (**рисунок 36 А, зелёная кривая**). Подбор коэффициента с целью минимизировать влияние артефакта позволяет убрать влияние поглощения гемоглобином флуоресценции, но данный подход чувствителен к параметрам эксперимента и также характеризуется субъективностью (**рисунок 36 Б, зелёная кривая**).

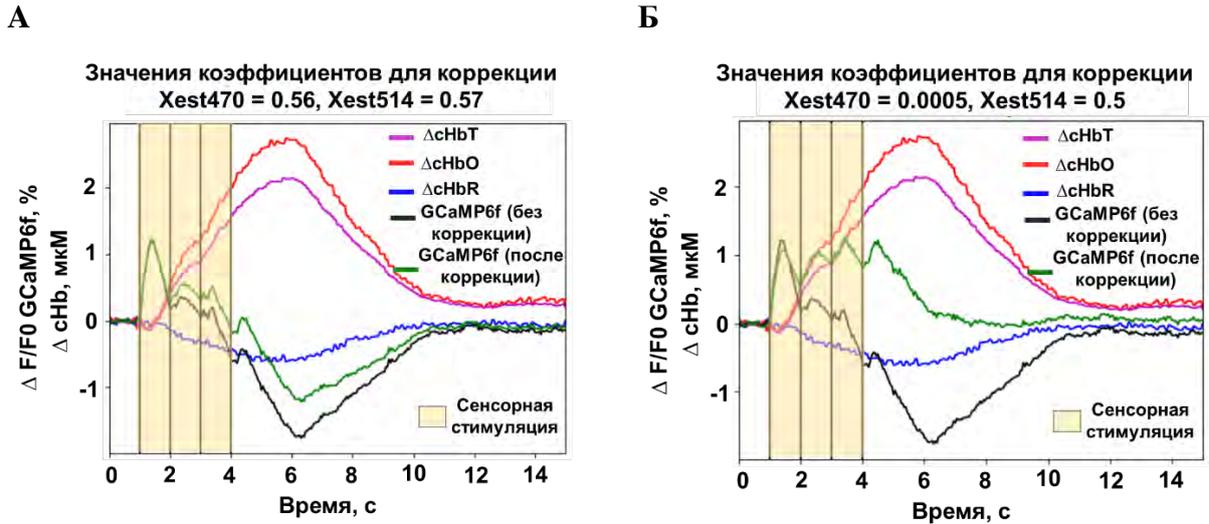


Рисунок 36. Применение двухволновой коррекции артефакта гемодинамики в данных флуоресценции для коррекции кривых ответа на сенсорную стимуляцию конечности. Изменения флуоресценции кальциевого сенсора GCaMP6f без применения коррекции и с коррекцией, концентраций окси- (ΔcHbO), дезоксигемоглобина (ΔcHbR) и суммарного гемоглобина (ΔcHbT) в области чувствительности задних конечностей в коре при их контралатеральной стимуляции (момент стимула отмечен вертикальной черной линией, длительность каждого стимула 200мс. **А**) - коррекция с использованием коэффициентов $X(\lambda)$ из литературных данных $X_{\text{est}}(\lambda_{\text{Ex}}) = 0.56 \text{ mm}^{-1}$ и $X_{\text{est}}(\lambda_{\text{Em}}) = 0.57 \text{ mm}^{-1}$ [Ma et al., 2016a], **Б**) - коррекция с использованием эмпирически-подобранных коэффициентов. Представлены усредненные данные по 8 мышам, 42 стимула для каждой. Бодрствующие животные, сила стимула 90 мкА.

Ещё один подход для коррекции — это регрессия гемодинамического сигнала из данных изменение интенсивности флуоресценции сенсора. В условиях, когда технически невозможно точно оценить длину пути фотонов и рассеивающие свойства образца, данный подход является наиболее объективным. Пример коррекции с использованием данного алгоритма представлен на **рисунке 37**.



Рисунок 37. Результат коррекции флуоресценции, при помощи регрессии гемодинамического сигнала. Зеленый - скорректированный кальциевый сигнал, красный – изменения суммарного гемоглобина ($\Delta cHbT$), черный - нескорректированный кальциевый сигнал. Усреднённый ответ с области соматосенсорной коры, ответственной за чувствительность задних конечностей при контралатеральной стимуляции конечности. Представлены усредненные данные по 16 мышам, 42 стимула для каждой. Бодрствующие животные, сила стимула 90 мкА.

3.1.4. Подбор оптимального подхода для автоматической детекции вызванного ответа в коре мозга на сенсорную стимуляцию

Для детекции ответа в коре на стимул и его описания были протестированы четыре подхода:

1. Определение вручную центра ответа на усредненном между повторными стимулами изображении.
2. Автоматическое распознавание координат центра ответа на стимул.
3. Выделение области по пороговому значению, определенному по модифицированной формуле из статьи [Sunil et al., 2023].
4. Выделение области по пороговому значению, накладываемому на суммированный сигнал во время действия стимула.

Алгоритм автоматического распознавания координат центра ответа на стимул включает выделение области полушария, контралатеральной стимулируемой конечности, где находится область чувствительности задних конечностей, определенная анатомически по атласу мозга мыши. Далее применяли сглаживание изображения, накладывали бинарную маску на основе

порогового значения, определяемого по формуле: пороговое значение = $1.08 * I(\text{mean})$, где $I(\text{mean})$ - средняя активность выделенной области за время всей записи. После этого применяли дополнительный алгоритм «размытия» краев маски (`cv2.dilate()`) и в результате создавали маски, центр которых считали центром ответа на стимул (**рисунок 38**).

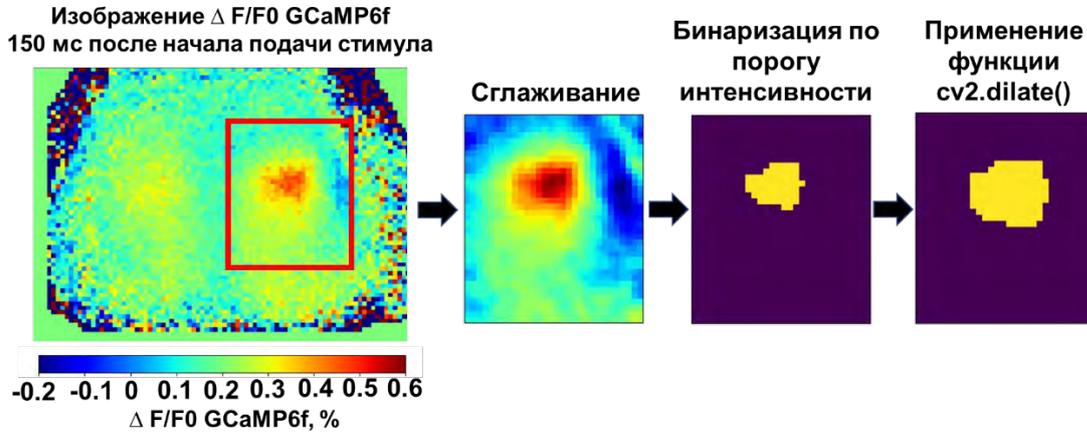
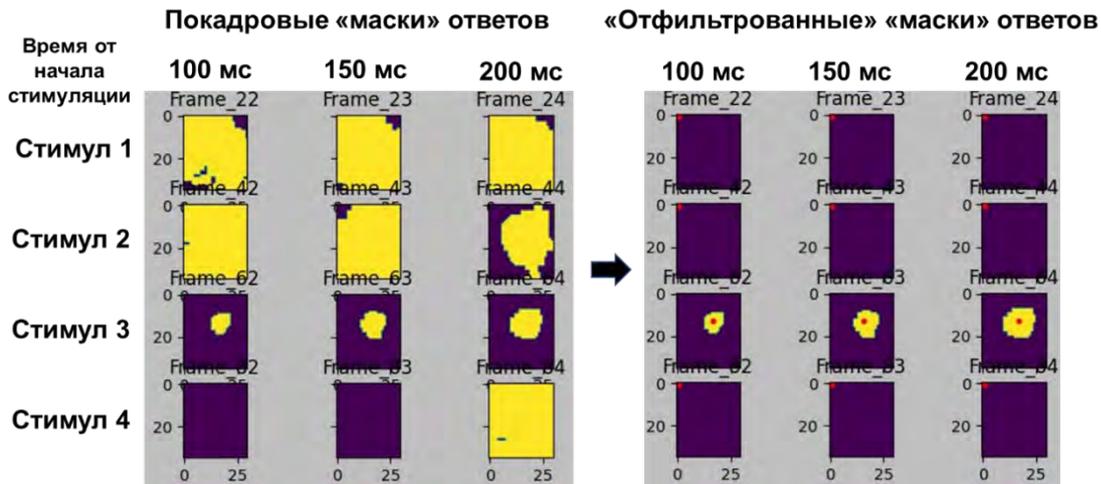


Рисунок 38. Схема работы алгоритма для автоматической детекции стимула. Подробности см. в тексте.

Для более точного определения центра области ответа выбранные маски дополнительно фильтровали по параметру округлости и локальности (**рисунок 39**). Использовали следующие подобранные пороговые значения: минимальная площадь = 2% от выделенной области, максимальная площадь = 25% от выделенной области, минимальная циркулярность = 0.6, минимальная выпуклость = 0.2, минимальное отношение инерции = 0.01. По литературным и эмпирическим данным локализация области ответа на один и тот-же сенсорный стимул не изменяется в норме [Cramer et al., 2019; Sunil et al., 2023]. Поэтому данные о расположении центра усредняли, и таким образом для каждой мыши определяли усредненный между повторными предъявлениями стимула центр области чувствительности задних конечностей.

Координаты, выделенные автоматически, совпадали с минимальным разбросом (<4 пикселя) с координатами, определенными вручную. Данный алгоритм подходит для определения локализации ответа в норме, однако не способен точно детектировать локализацию ответа в коре при повреждении соматосенсорной зоны. Инсульт нарушает локальность ответа в поврежденных областях и предположения об округлой форме ответа после повреждения неверны.

А



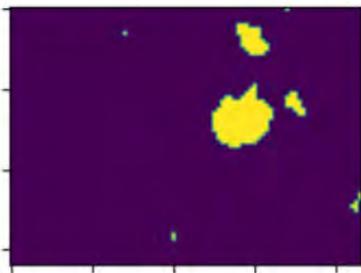
Б



Рисунок 39. Определение координат центра области ответа на стимул. **А)** Пример масок, наложенных на 3 кадра с 100 мс по 200 мс после подачи стимула на заднюю конечность животного для пачки стимулов из 4 штук с частотой 1 Гц, длительностью 1 мс (см. методы). Frame_# - номер кадра относительно выбранного отрезка эксперимента. Красной точкой обозначен центр области, определенный с помощью функции `cv2.moments()`. На кадрах, не прошедших «фильтрацию», красная точка помещена в левый верхний угол области и не учитывалась при усреднении координат центра. **Б)** Параметры, использованные для «фильтрации» подходящих для определения центра области чувствительности ответов.

В связи с этим мы протестировали и модифицировали протокол выделения области стимула из статьи [Sunil et al., 2023]. Вкратце, в статье вычисляли среднюю активность по каждому полушарию, затем определяли максимальную амплитуду усредненного по полушарию сигнала, как 99%-перцентиль значений сигнала во время подачи сенсорного стимула. Областью ответа считали все пиксели, яркость которых превышала 75% от максимальной амплитуды. Недостатком такого подхода оказалось то, что для разного типа поведенческих реакций требовался отдельный подбор значения порогового процента. (**рисунок 40**).

А



Б

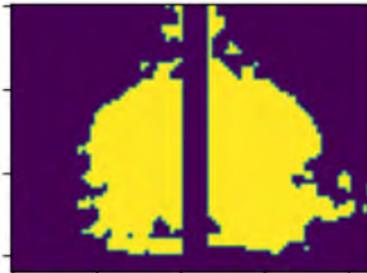


Рисунок 40. «Маска» ответа в коре на сенсорную стимуляцию конечности при спокойной поведенческой реакции животного (А) и при беге (Б), определенная по методу из статьи [Sunil et al., 2023].

Для решения данной проблемы для построения области ответа на стимуляцию в коре не учитывали ответы на стимул, при которых животное было неподвижным. Помимо грубого разделения на яркую и спокойную реакцию (бежит – не бежит), с помощью производной были определены стимулы с разным паттерном ответа. Иногда животное могло незаметно для наблюдателя дернуть конечностью, что приводило к более яркому ответу на подстимул в пачке стимулов (один отрезок стимуляции состоял из 4-х стимулов длительностью 200 мс и частотой 1 Гц, более подробно паттерн стимуляции см. в методах). Далее маски строили отдельно для разных видов ответа, используя специфичные для типа ответа пороговые параметры, и затем суммировали для получения итоговой маски (**рисунок 41**).

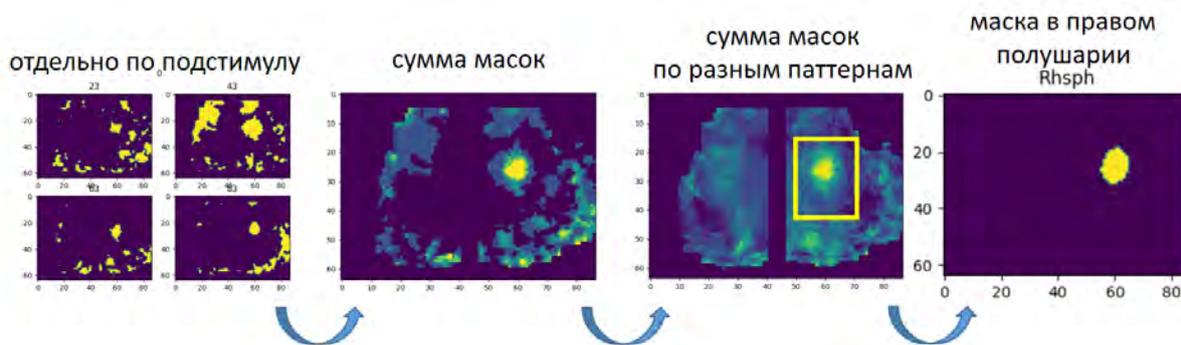
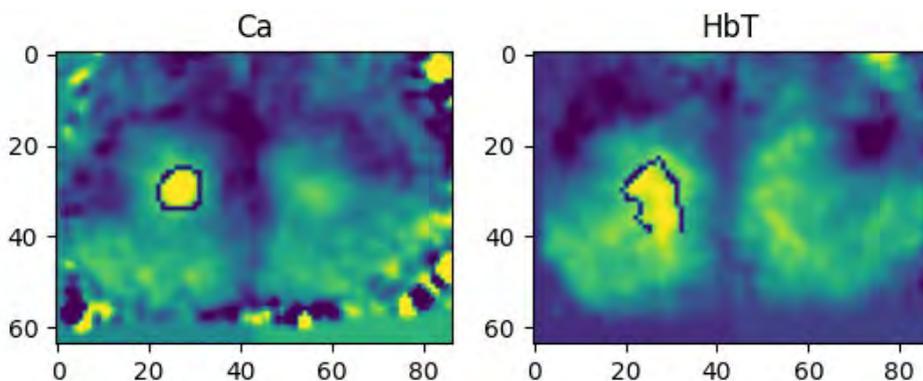


Рисунок 41. Схема определения маски ответа на стимул с применением модифицированного метода из статьи [Sunil et al., 2023].

Однако ввиду невозможности применения данного подхода в случае, когда во время сенсорной стимуляции не детектировали поведение животного, был разработан подход для определения области ответа на стимул без учета поведения. Этот подход основан на наложении маски на сигнал, суммированный за время стимуляции. Сложение сигналов позволяет нивелировать спонтанные осцилляции, при этом кумулятивно усиливая сигнал с областей, в которых повышена интенсивность сигнала во время подачи стимула. Пороговое значение для

наложения маски определяли, как 86% от максимального значения суммарного сигнала в соматосенсорной области коры (**рисунок 42**).

А



Б

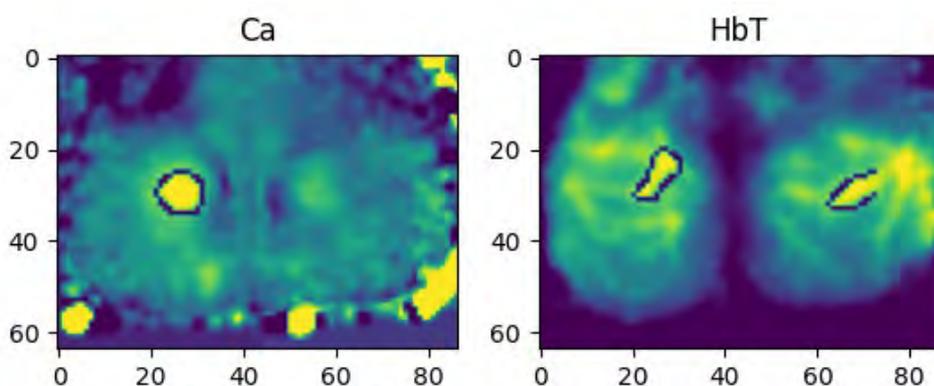


Рисунок 42. Определение области ответа в коре на стимуляцию по пороговому значению, накладываемому на суммированный сигнал во время действия стимула. Пример определения области по кальциевому и гемодинамическому сигналу у одной и той же репрезентативной мыши при стимуляции правой задней конечности силой 60 и 90 мкА (суммированные данные) в условии бодрствования (**А**) и под действием изофлурановой анестезии (**Б**).

Данный подход позволяет определять область вызванного ответа в коре как по кальциевому, так и по гемодинамическому сигналу, а также в разных физиологических состояниях (бодрствование или анестезия) (**рисунок 42**). Именно такой подход использован в дальнейшем при анализе описанных в работе результатов.

Для регистрации ответа на сенсорную стимуляцию в норме можно использовать анатомически определенные по атласу мозга мыши соответствующие зоны первичной чувствительной коры. Однако из-за разного угла крепления холдера к черепу, кора мозга расположена у мышей под определенным углом, что искажает прямое наложение координат атласа на изображение ШОН (**рисунок 43**)

Проблема – разный угол наклона головы

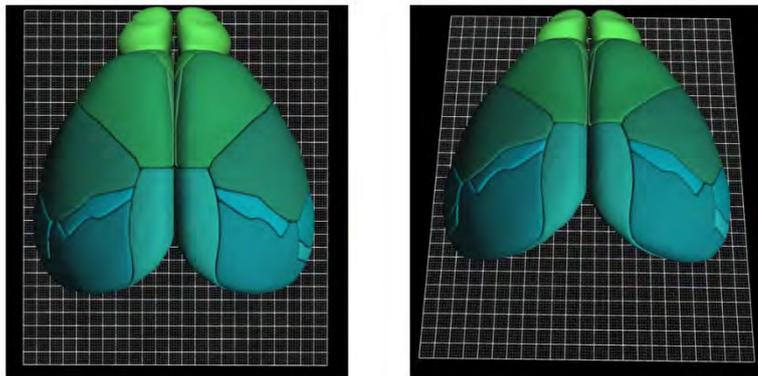


Рисунок 43. Разный угол наклона головы относительно камеры приводит к искажению анатомической карты зон коры мозга. Изображения взяты из <https://atlas.brain-map.org>.

Для решения данной проблемы нами был модифицирован алгоритм индивидуального наложения анатомических зон на изображение коры мозга за счет аффинной трансформации по трем точкам, две из которых анатомические - брегма и лямбда, а третья - это центр области зоны, отвечающей за чувствительность задних конечностей, определенный по регистрации ответа в коре методом ШОН [Xiao et al., 2021] (**рисунок 44**).

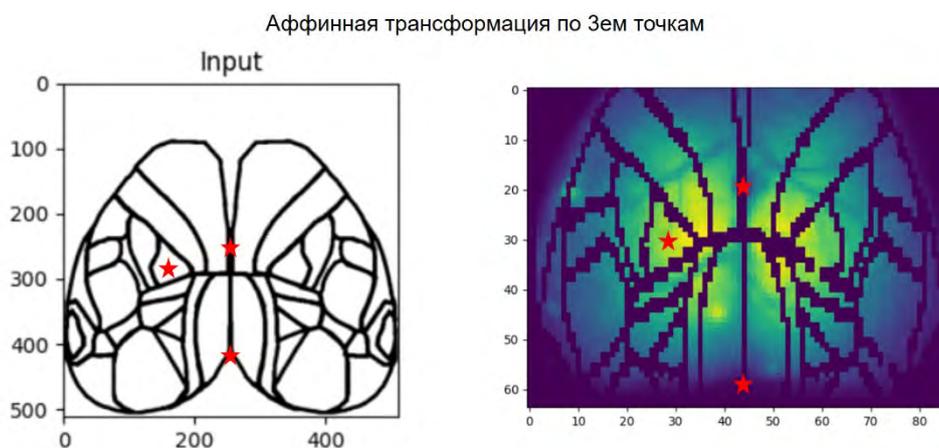


Рисунок 44. Аффинная трансформация атласа по 3-ем точкам. Слева - исходный атлас [Xiao et al., 2021], справа - трансформированный атлас, наложенный на изображение коры мозга, полученное методом ШОН.

Определенные данным методом зоны коры мозга далее использовали в работе для оценки функциональной связанности зон коры мозга.

3.1.5. Стандартизация протокола анализа данных ШОН

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» (рисунок 45).



Рисунок 45. Схема основных этапов работы «Программы для автоматизации выделения физиологически значимых сигналов из данных широкопольной оптической нейровизуализации».

Далее описаны основные этапы работы программы.

1. Выравнивание изображений включает поворот изображения таким образом, чтобы сагиттальный шов располагался строго вертикально, а также смещение изображения таким образом, чтобы брегма оказалась в определенной точке изображения (для большинства наших изображений оптимальным оказалось положение $(0.5x, 0.3y)$). Функция "Create_transformation_info" позволяет создать таблицу, в которой для каждого эксперимента представлена информация о том, на какой угол необходимо повернуть изображения и на сколько пикселей необходимо сместить кадры по вертикали и горизонтали для выравнивания между мышами. Для одной съемки используются одни и те же значения для всех кадров, без учета возможных смещений во время записей, поскольку правильное закрепление мыши в установке позволяет минимизировать сильные смещения. Незначительные смещения в дальнейшем нивелируются при увеличении бинига и пространственном сглаживании. Функция "Create_transformation_info" демонстрирует кадры из каждой съемки заранее заданного номера,

предлагая пользователю вручную (установив курсор в нужную область изображения) определить анатомические точки (точку пересечения сагиттального шва с верхним и нижним краем изображения, брегму). Код сохраняет трансформированные изображения, чтобы можно было проверить качество выравнивания. Также функция делает проверку на возможную ошибку в протоколе (в случае, если выведенное изображение некорректно).

2. Трансформация изображений осуществляется посредством выполнения функции "prgrayFromimages", использующей информацию из таблицы, созданной на шаге 1. Кроме трансформации данная функция также позволяет сжать изображение в заданное количество раз (задается % от исходного изображения). Мы используем $\text{scalingfactor} = 25\%$, сжимая исходные изображения размером 348x256 до размера 87x64). Данная степень сжатия позволяет нам значительно (кратно квадрату степени сжатия) повысить скорость дальнейшего анализа изображений без значимой потери качества. Функция "prgrayFromimages" переводит изображения в формат numpy.array и сохраняет их в формате hdf5 для дальнейшей работы.

3. Преобразование сырого сигнала в полезный осуществляется при выполнении функции "imgs_conversion". Далее описана последовательность преобразований, которые применяются к изображениям в данной функции.

а. «Сырой» сигнал преобразовывали в относительные изменение по отношению к фону (dS/S_0) с помощью функции "f_f0_470_fc" для флуоресцентного сигнала или "I_I0_fc" для отраженного света. S_0 - средняя активность пикселя за все время записи. Во избежание ошибки при делении на ноль, к S_0 прибавляется малая константа. Если частота регистрации отраженного света была меньше, чем частота регистрации флуоресценции, то в функции прописано дублирование значений сигнала отраженного света.

б. Программа накладывает маску на полушария мозга. Маска создается при помощи функции "draw_mask", которая позволяет пользователю обвести точками контур коры мозга на изображении ШОН и создает по заданным границам маску. Созданная маска сохраняется и в дальнейшем применяется к остальным записям данной мыши. Наложение маски позволяет не учитывать в дальнейшем фоновый сигнал, тем самым убирая малые значения знаменателя, которые дают большие выбросы.

в. Функция вычитает из сигнала каждого пикселя так называемый глобальный сигнал с помощью другой функции "Global_signal_substraction". Последняя функция накладывает маску на сигнал S/S_0 и считает среднее по кадру внутри маски. Полученный сигнал сглаживается с помощью локально-линейной модели lowess (locally weighted scatterplot smoothing) и вычитается из S/S_0 . Удаление глобального сигнала позволяет нивелировать флуктуации, не связанные с локальной активностью коры мозга.

г. Функция "Convert_to_dcHb" переводит сигнал I/O в относительные изменения концентрации гемоглобина, используя функцию из статьи [Ma et al., 2016a].

д. Функция "gaussian_filter_2d" осуществляет гауссово сглаживание каждого кадра с целью дополнительно удаления возможных артефактов из-за смещения картинки.

е. Функция "LSTM_correction_2d", используя линейную регрессионную модель, подбирает для каждого пикселя коэффициент для вычитания влияния гемодинамического сигнала. Данная функция может использовать как простую линейную регрессию, основываясь на данных об отражении света одной длины волны, так и света двух длин волн, что улучшает качество коррекции [Valley et al., 2020].

ё. Итогом работы функции является сохранение сигналов в виде относительных изменений концентрации разных форм гемоглобина, и скорректированные на гемодинамику относительные изменения флуоресценции сенсора.

Для автоматизации процесса анализа изложенные выше функции объединены в программном коде с графическим интерфейсом (рисунок 46).

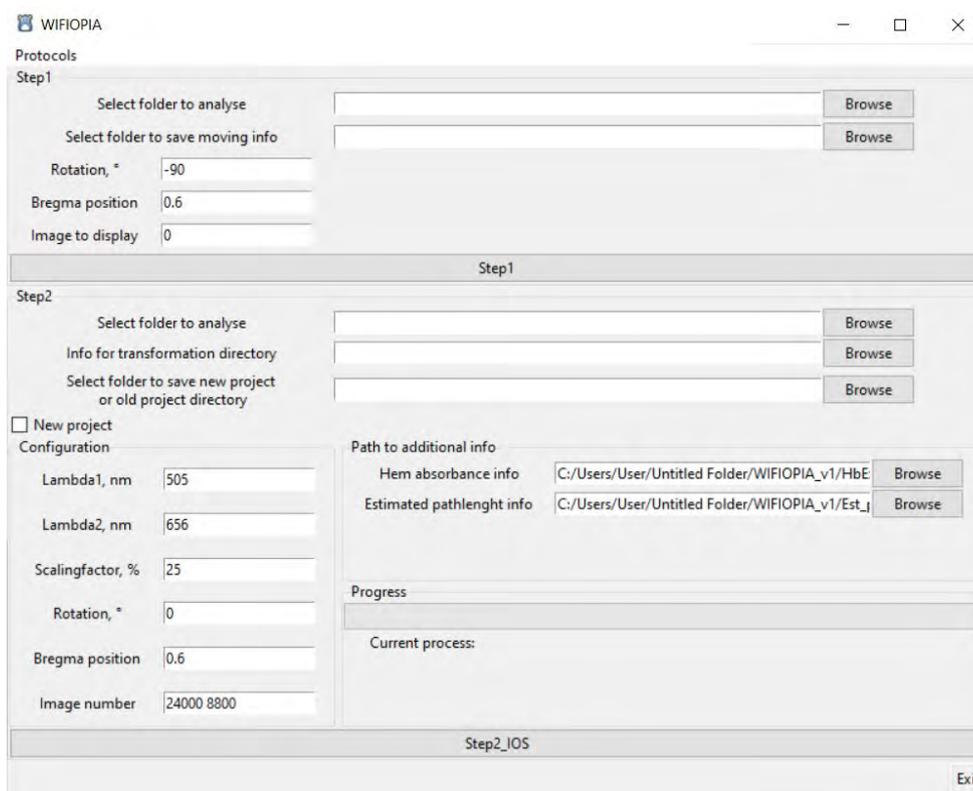


Рисунок 46. Графический интерфейс созданной программы для анализа данных ШОН.

3.2. Гемодинамические изменения в коре больших полушарий в норме

3.2.1. Регистрация вызванного гемодинамического ответа в коре больших полушарий при стимуляции задних конечностей бодрствующих и анестезированных животных

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 спектральных 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 концентрации разных форм гемоглобина. Также мы сравнили вызванные ответы при стимуляции бодрствующих животных и при действии газовой анестезии (изфлюран 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 (**рисунок 24 Б**).

Стимуляция вызывала локальное увеличение притока крови в область первичной сенсорной коры, ответственной за чувствительность задних конечностей (SSp-II), которое продолжалось около 30 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, см 3.1.4.) позволило выявить локальную область активации по сигналу, соответствующему изменениям концентраций окисленной формы гемоглобина (HbO-сигнал) и суммарного гемоглобина (HbT-сигнал) (**рисунок 47**). Локализация ответа на стимул у бодрствующих мышей (**рисунок 47 А, Б**) совпадала между животными и соответствует 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.

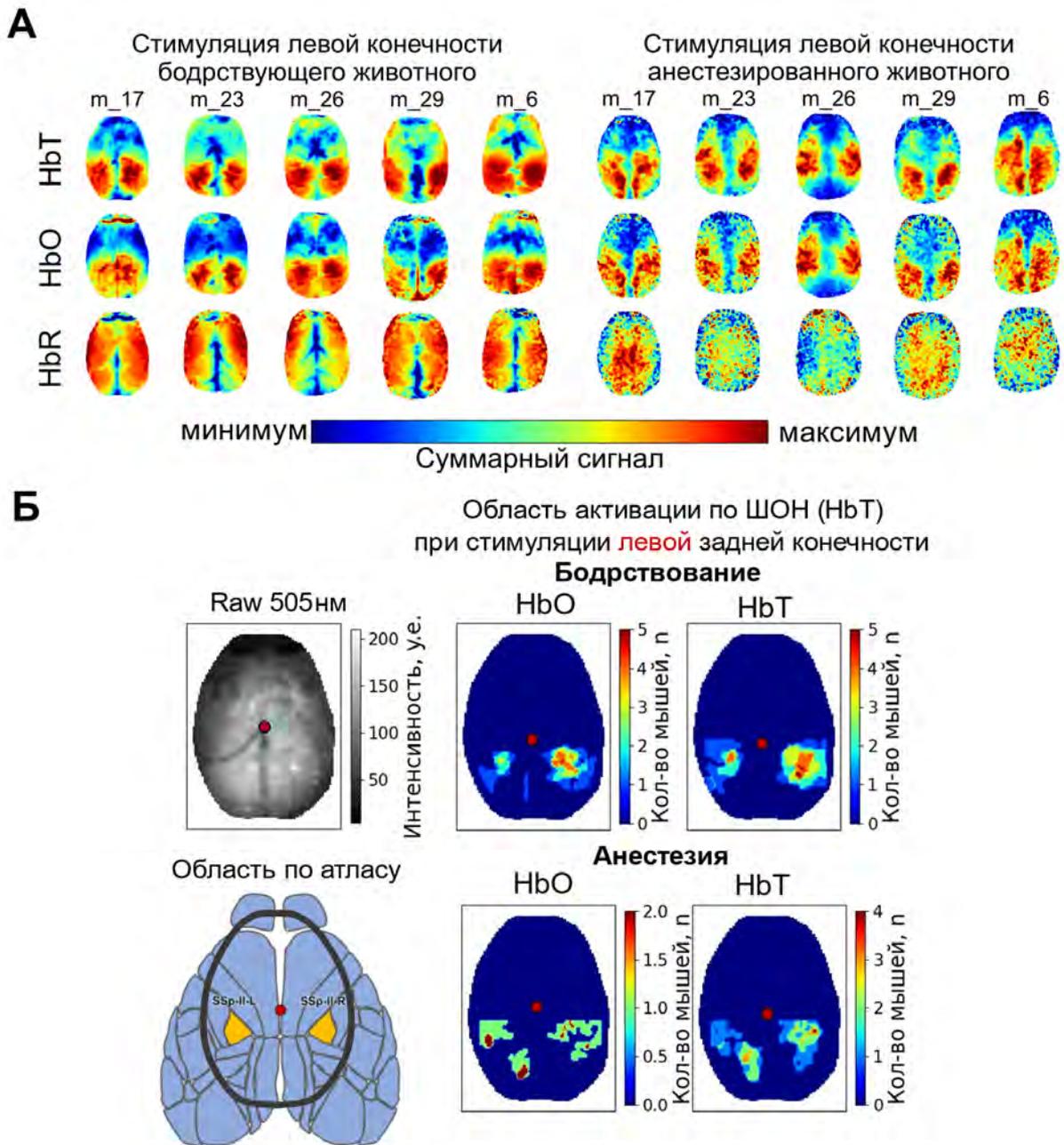


Рисунок 47. Локализация вызванного ответа коры на сенсорную стимуляцию левой конечности. **А)** Репрезентативные изображения, отражающие суммарную яркость в течение 4 сек действия стимула для отдельных мышей по разным сигналам в состоянии бодрствования и под действием изофлурановой анестезии. **Б)** Наложение индивидуальных «масок ответа» разных мышей на одном изображении («температурой» цвета отображено число индивидуальных масок, пересекающихся в данной области). Стимуляция левой задней конечности животного в состоянии бодрствования и под действием изофлурановой анестезии (изфлюран 1.5%, O₂). Подавали 4 пачки стимулов, каждая пачка состояла из 6 коротких стимулов длительностью 300 мс и частотой 1,17 Гц.

Вызванный HbT-ответ в коре на сенсорную стимуляцию задней конечности в условии анестезии был менее локальным (**рисунок 47 А, Б**). Область активации сильнее различалась между мышами, однако также совпадала с областью SSp-II (зона первичной чувствительности задних конечностей).

По сигналам, соответствующим изменениям концентраций окси- и дезоксигемоглобина (HbO и HbR-сигнал), не удалось обнаружить локального изменения, вызванного сенсорной стимуляцией в условии изофлурановой анестезии с использованием подхода накладывания маски на суммарный сигнал.

Усредненные графики относительных изменений концентраций разных форм гемоглобина, зарегистрированных с области чувствительности задних лап (SSp-II) представлены на **рисунке 48**.

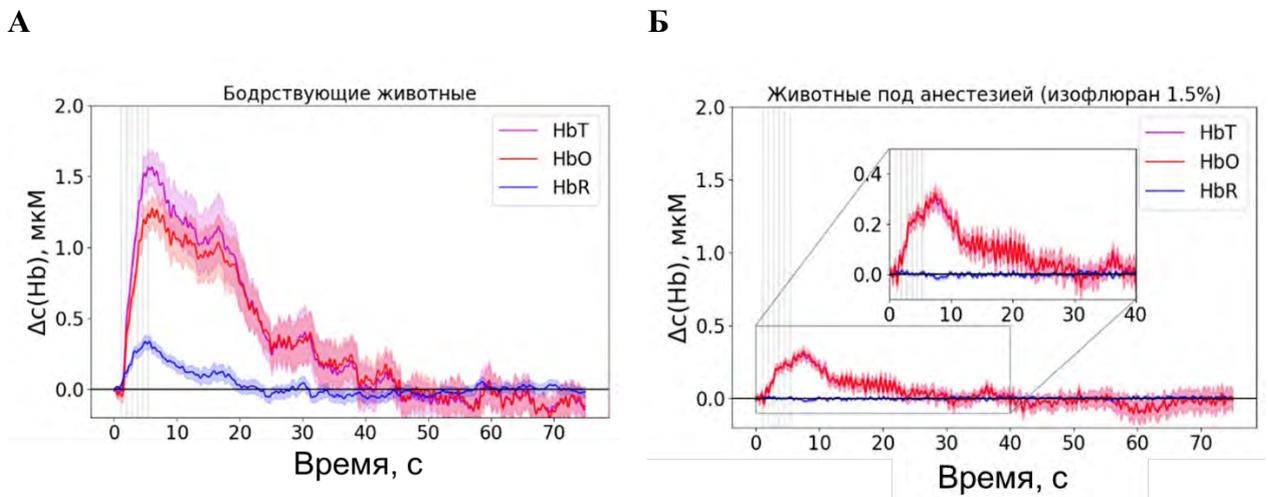
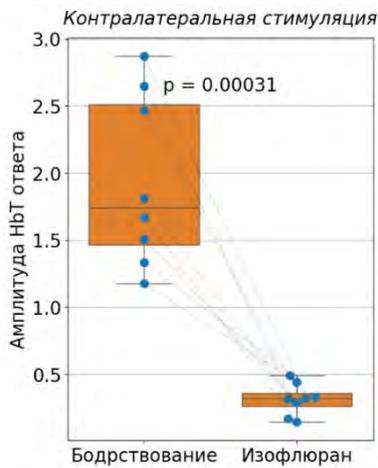
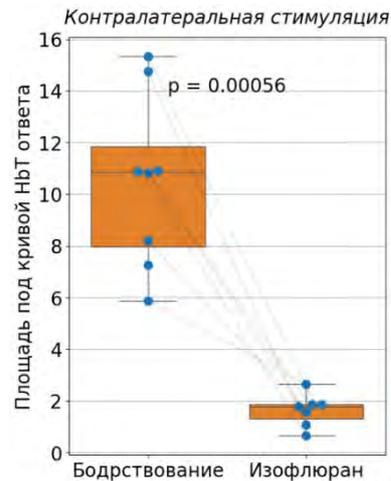
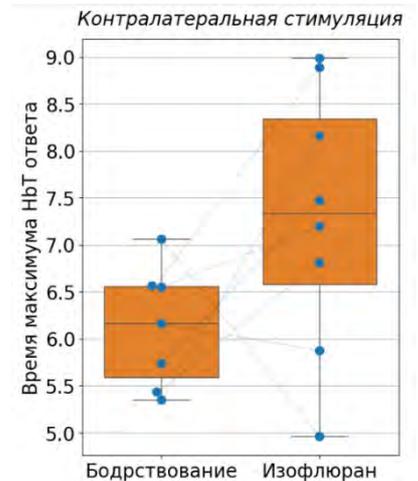
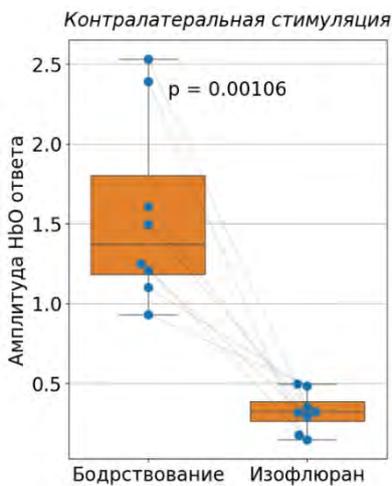
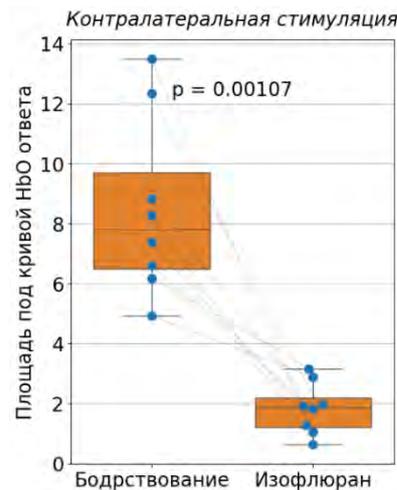
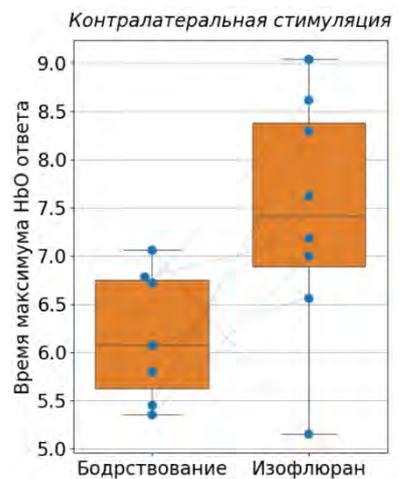


Рисунок 48. Усредненные графики относительных изменений концентраций окисленной (HbO - красная линия), восстановленной (HbR - синяя линия) форм гемоглобина и суммарного гемоглобина (HbT - малиновая линия) при стимуляции задней конечности, контралатеральной регистрируемому полушарию при бодрствовании (**А**) и в условиях изофлурановой анестезии (**Б**). Среднее \pm SEM, $n = 32$ (8 мышей, по 4 усредненных стимула каждой). (Δ Hb - изменения концентрации соответствующей формы гемоглобина)

Была проведена оценка таких параметров, как амплитуда и площадь под кривой ответа, время достижения максимума ответа и изменения этих параметров при изофлурановой анестезии при усреднении значений для каждого животного отдельно (**рисунок 49**). Амплитуда увеличения концентрации суммарного гемоглобина (HbT – ответа) составила 1.73 ± 0.64 мкМ при стимуляции бодрствующих животных и статистически значимо снижалась до 0.31 ± 0.12 мкМ под действием анестезии ($p < 0.001$). Аналогичным образом изменился интегральный показатель ответа - площадь под кривой, снизившись с 10.5 ± 3.35 у.е. до 1.63 ± 0.64 у.е. под действием

анестезии ($p < 0.001$). Среднее время достижения максимума НвТ-ответа составило 6.12 ± 0.64 с (здесь и далее среднее \pm sd) для бодрствующих животных и 7.29 ± 1.41 с для животных под анестезией, статистических различий в этом параметре между состояниями выявлено не было. Похожие изменения параметров ответа под действием анестезии наблюдались и для НвО – сигнала (**рисунок 49 Г, Д, Е**). Амплитуда НвО-ответа составила 1.36 ± 0.59 мкМ при стимуляции бодрствующих животных и статистически значимо снижалась до 0.32 ± 0.13 мкМ под действием анестезии ($p < 0.01$). Площадь под кривой снизилась с 8.50 ± 2.99 у.е. до 1.84 ± 0.87 у.е. под действием анестезии ($p < 0.01$). Среднее время достижения максимума концентрации оксигемоглобина составило 6.17 ± 0.68 с для бодрствующих животных и 7.43 ± 1.25 с для животных под анестезией, статистических различий в этом параметре между состояниями выявлено не было.

А**Б****В****Г****Д****Е**

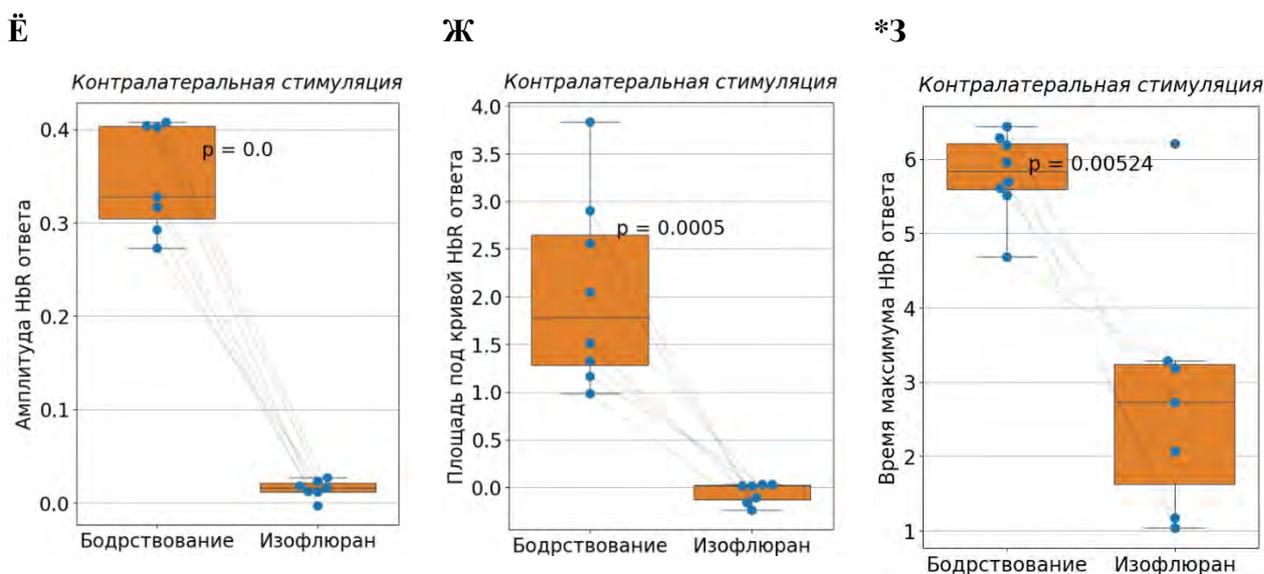


Рисунок 49. Изменения параметров вызванного в коре ответа на стимуляцию контралатеральной задней конечности при действии изофлурановой анестезии. Изменения амплитуды, площади под кривыми ответов и времени достижения максимума для HbT-сигнала (А-В), HbO-сигнала (Г-Е) и HbR-сигнала (Ё-З) соответственно. *Панель 3) требует осторожной интерпретации, поскольку при действии изофлурана четкого ответа по HBR на стимуляцию не наблюдали и за максимум взяты случайные пики. Парный t-тест. N мышей = 8.

По литературным данным сенсорная стимуляция вызывает локальное увеличение скорости кровотока, увеличение оксигенации крови и снижение концентрации восстановленной формы гемоглобина [Ma et al., 2016a]. Однако мы наблюдали у бодрствующих животных подъем концентрации восстановленной формы гемоглобина до значения в среднем 0.35 ± 0.06 мкМ. Данный феномен требует дальнейшего выяснения и осторожной интерпретации. Можно предположить, что такая «нетипичная» реакция связана с локомоцией бодрствующего животного, поскольку в литературе есть данные о том, что моторные движения могут влиять на вызванный гемодинамический ответ в коре на сенсорную стимуляцию вибрисс [Eyre et al., 2022]. Кроме того, ранее было показано, что локомоция сопровождается увеличением диаметра вен и артерий на поверхности коры, что может оказывать влияние на базовый уровень скорости кровотока [Huo et al., 2015]. Мы не обнаружили значимых изменений концентрации дезоксигемоглобина от начального уровня в условии стимуляции под анестезией, среднее значение максимальной концентрации HbR во время стимуляции составило 0.02 ± 0.01 мкМ. Изофлурановая анестезия в зависимости от степени глубины наркоза также способна приводить к увеличению мозгового кровотока и изменению сосудистой и нейрональной активности [Cramer et al., 2019].

Несмотря на то, что площадь маски ответа в ипсилатеральной стороне стимуляции полушария меньше у бодрствующих животных (**рисунок 47 Б**), нам не удалось выявить статистически значимых различий в параметрах вызванного НвТ-ответа между ипсилатеральным и контралатеральным полушарием при стимуляции в бодрствующем состоянии. Стоит отметить, что у индивидуальных животных отличия могут быть большими и причем в противоположных направлениях (**рисунок 50 А**). Это предположительно связано с тем, что активная локомоция, которая приводит к возбуждению большей части коры мозга, маскирует локальные события. Для НвО-ответа в условии анестезии амплитуда в ипсилатеральном полушарии при стимуляции анестезированных животных оказалась значимо ниже (0.32 ± 0.13 мкМ против 0.27 ± 0.09 мкМ, $p < 0,05$), что указывает на то, что в отсутствии локомоции, можно наблюдать асимметрию в силе ответа (**рисунок 50 В**).

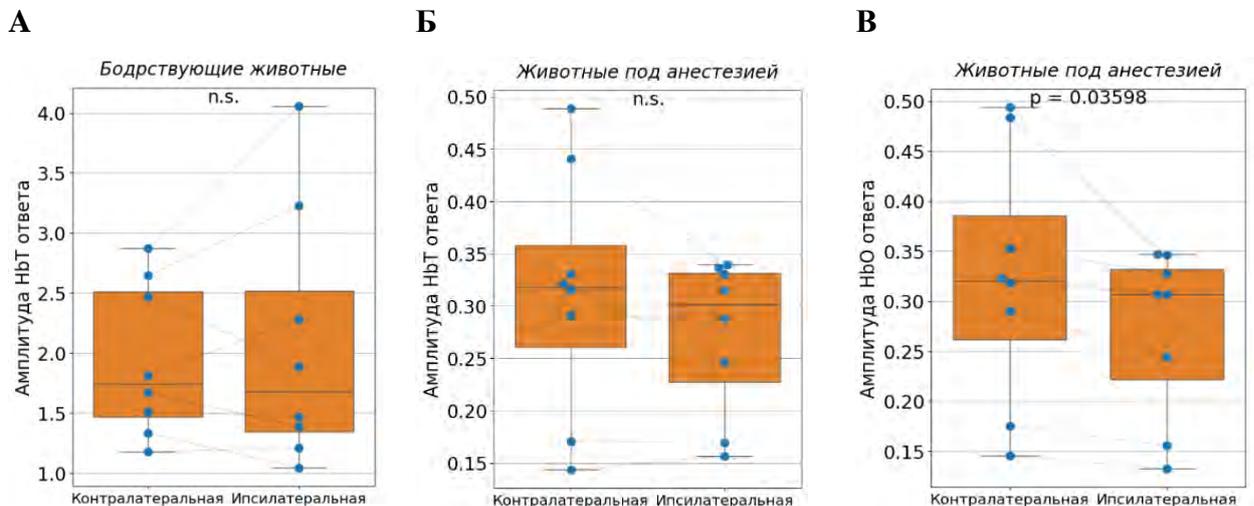


Рисунок 50. Сравнение вызванного ответа в ипсилатеральной и контралатеральной стороне стимуляции зоне чувствительности задних лап по амплитуде НвТ-сигнала бодрствующих животных (**А**) и анестезированных (**Б**), а также по амплитуде НвО-сигнала у анестезированных животных (**В**). Парный t-тест. N мышей = 8.

3.2.2. Частотные характеристики внутреннего сигнала коры мозга при спонтанном свободном поведении

Активность мозга характеризуется наличием спонтанных волн в разных диапазонах частот. В статьях, в которых используют ШОН, наиболее часто рассматривают следующие диапазоны частот при анализе гемодинамической и кальциевой активности:

1. 0.009-0.08 Гц (канонический диапазон для оценки функциональной связанности мозга в состоянии покоя, в частности применяемый при анализе фМРТ данных);
2. 0.08-0.4 Гц (промежуточный диапазон);

3. 0.4-4.0 Гц (дельта диапазон) - медленные осцилляции в диапазоне, присутствующие во время сна и в состоянии анестезии.

В ряде статей показано, что в ультрамедленном (<0.1 Гц) и промежуточном (0.08–0.4 Гц) диапазонах частот гемодинамические сигналы достоверно отражают активность нейронов [Brier et al., 2019; Ma et al., 2016b; Wright et al., 2017].

На **рисунке 51** представлены усредненные спектры мощности гемодинамических сигналов, зарегистрированных с области первичной соматосенсорной коры у бодрствующих животных, при свободном поведении и в условии изофлюрановой анестезии без воздействия дополнительных сенсорных стимулов. Мы обнаружили статистически значимые различия между состоянием анестезии и бодрствования в мощности спектров гемодинамической активности в диапазоне 0.1 – 0.3 Гц, который по литературным данным связан с вазомоторной активностью. Нам не удалось выделить из спектров НвТ и НвО четких пиков, которые можно связать с эффектами сердечных сокращений и дыханием, что может говорить о вариабельности данных параметров как между животными, так и в течение записи. По литературным данным частота сердечных сокращений и дыхания у не анестезированных мышей составляет в среднем 10 и 2.5 Гц соответственно [Xu et al., 2022].

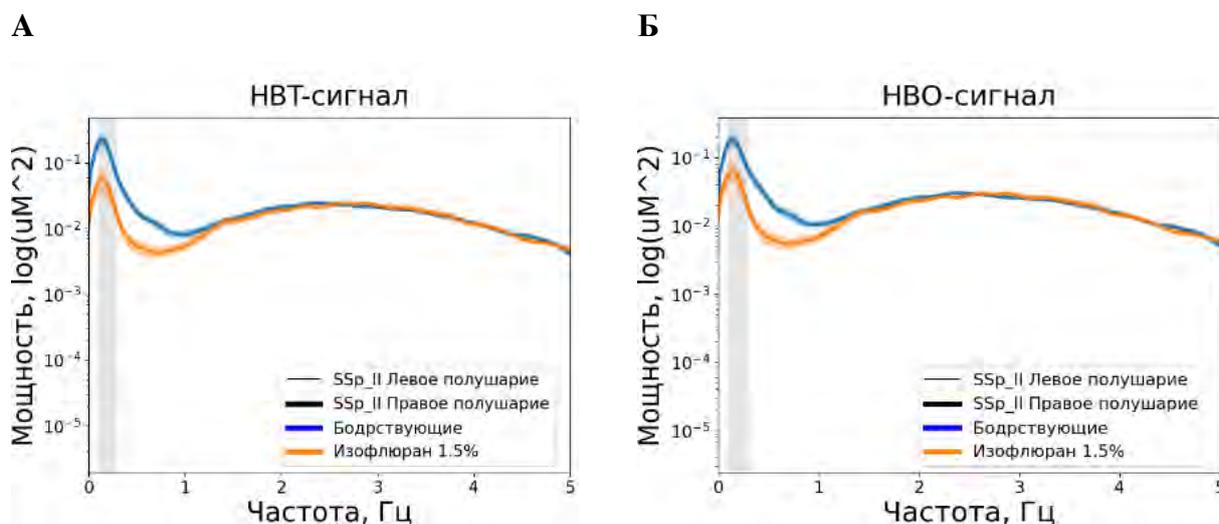


Рисунок 51. Усредненные спектры мощности частот НвТ (А) и НвО (Б) сигналов, зарегистрированных с зоны SSr-II в левом и правом полушарии (тонкая и толстая линия соответственно) при спонтанном поведении бодрствующих животных и в спокойном состоянии под анестезией. Длительность анализируемых сигналов - 300 с. Серым фоном отмечен диапазон от 0.1-0.3 Гц.

Полученные спектры совпадают с недавно опубликованными спектральными характеристиками кальциевой, метаболической и гемодинамической активности, зарегистрированными методом ШОН [Wang et al., 2024]. При анестезии, индуцированной смесью

кетамин и ксилазин, ученые наблюдали колебания концентрации кальция в коре больших полушарий мышей, которые демонстрировали широкий спектральный пик с центром около 1 Гц, характерный для повышенной дельта-активности, примерно в 33 раза больший, чем во время бодрствования. Автофлуоресценция флавопротеинов в условии анестезии так же демонстрировала пик около 1 Гц, что свидетельствует о повышенной метаболической активности, связанной с когерентными нейрональными колебаниями в этом диапазоне. Эти колебания не наблюдались в гемодинамическом сигнале [Wang et al., 2024].

Для более детального анализа временной вариабельности частотных характеристик были построены спектрограммы (рисунок 52). На спектрограммах можно наблюдать высокую вариабельность мощности в течение записи длительностью 300с в дельта-диапазоне частот (0.5-4 Гц). Наиболее мощными являются колебания активности в промежуточном и ультрамедленном диапазоне (<0.4 Гц).

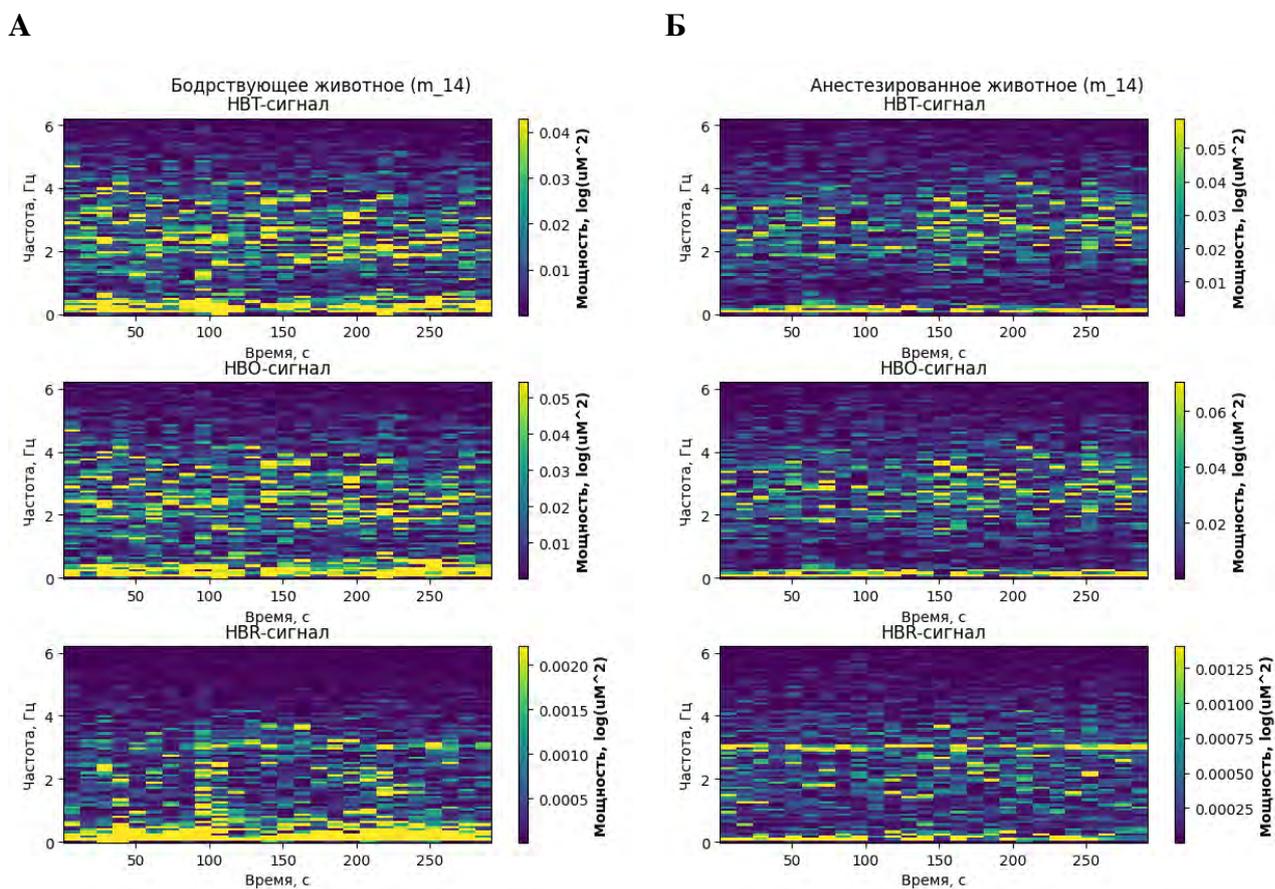


Рисунок 52. Репрезентативные спектрограммы гемодинамических сигналов для одного животного, зарегистрированных с зоны SSp-II в левом и правом полушарии при спонтанном поведении бодрствующих животных и в спокойном состоянии под анестезией. Длительность анализируемых сигналов - 300 с.

При последующем анализе характеристик спонтанной гемодинамической активности мы применяли низкочастотный фильтр с порогом в 1.5 Гц с целью снизить вариабельность данных и убрать влияние ЧСС и дыхания на регистрируемые сигналы.

3.2.3. Анализ функциональной связанности мозга при бодрствовании и в условиях анестезии у мышей

Функциональная связанность - важный параметр, который позволяет оценивать сетевую активность мозга в покое и при выполнении определенных задач. Показано, что спонтанные гемодинамические флуктуации в ткани мозга связаны с возбуждением нейронов и могут отражать нейронную активность [Ma et al., 2016b; Pais-Roldán et al., 2021].

Мы оценили, как изофлурановая анестезия влияет на параметры функциональной связанности, построив карты корреляции НвТ-сигнала между зонами, определенными по анатомическому атласу. На **рисунке 53** можно видеть, что изофлурановая анестезия приводит к увеличению синхронизации активности зон, маскируя функциональные различия активности локальных нейронных сетей.

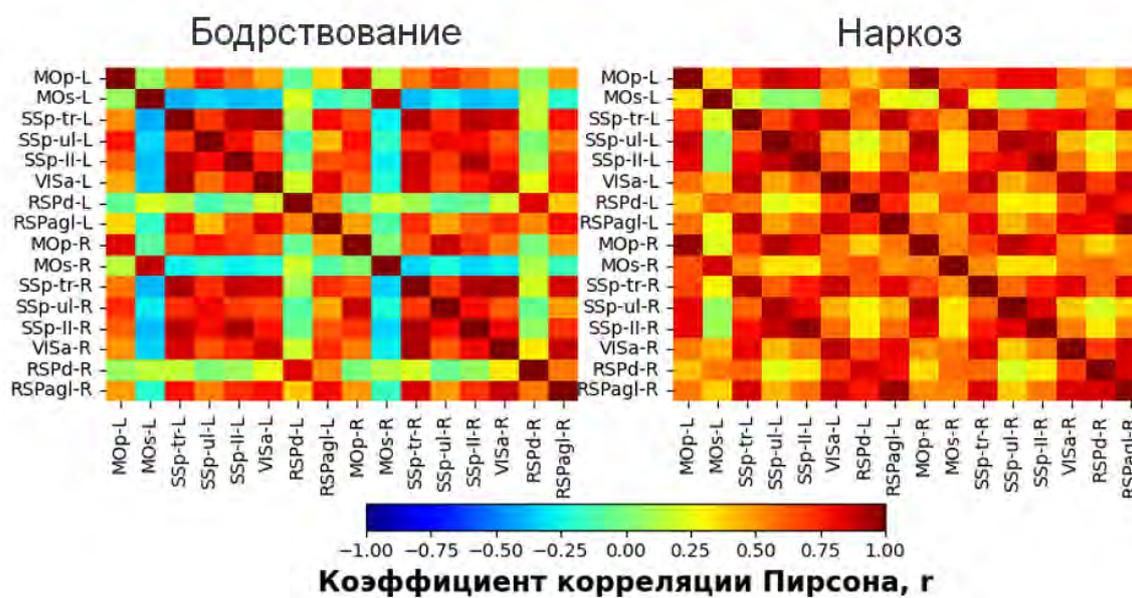


Рисунок 53. Матрицы корреляции НвТ-сигнала между анатомическими зонами коры у бодрствующих мышей в спокойном состоянии и в условии изофлурановой анестезии (1,5%). Усредненные значения для 8 мышей.

У мышей под изофлурановой анестезией статистически значимо увеличена как внутрислошарная, так и межполушарная связанность (**рисунке 54**).

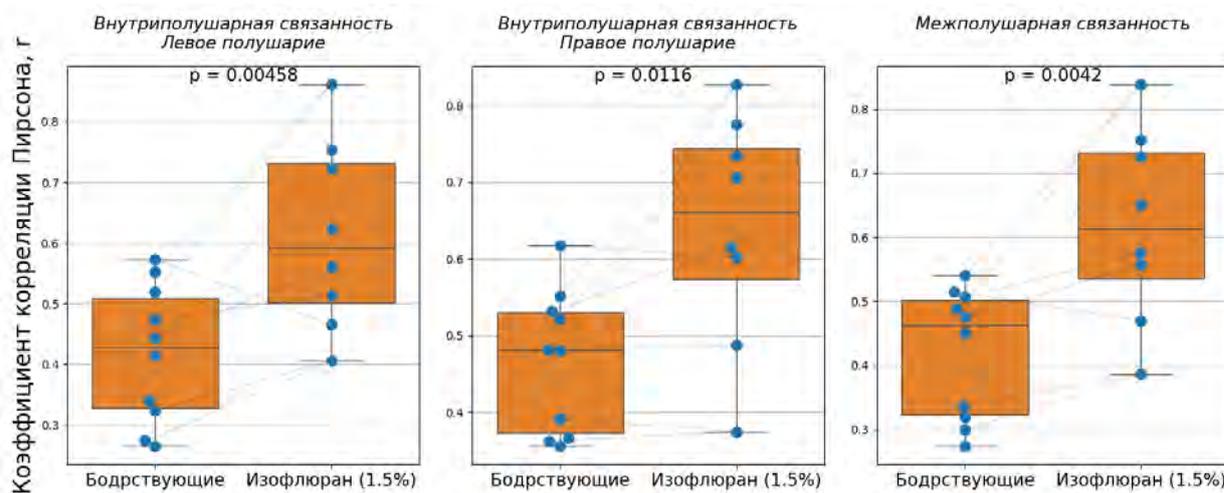


Рисунок 54. Сравнение внутриполушарных и междуполушарных коэффициентов корреляции HbT-сигнала у бодрствующих животных и у животных под изофлурановой анестезией. Парный t-тест. $n = 8$.

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 изофлурановой анестезии вызванный ответ снижен по амплитуде и менее локализован.

Спектральный анализ представленных в сигналах частот показал вариабельность таких физиологических показателей как ЧСС и частота дыхания в течение записей, что говорит о необходимости частотной фильтрации данных и важности учета поведения животного при их изучении в бодрствующем состоянии.

Мы показали, что 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. В дальнейших исследованиях мы сконцентрировались на анализе активности коры мозга бодрствующих животных.

3.3. Одновременная регистрация гемодинамической и кальциевой активности коры мозга мышей в норме

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 в нейроваскулярном сопряжении при различных состояниях.

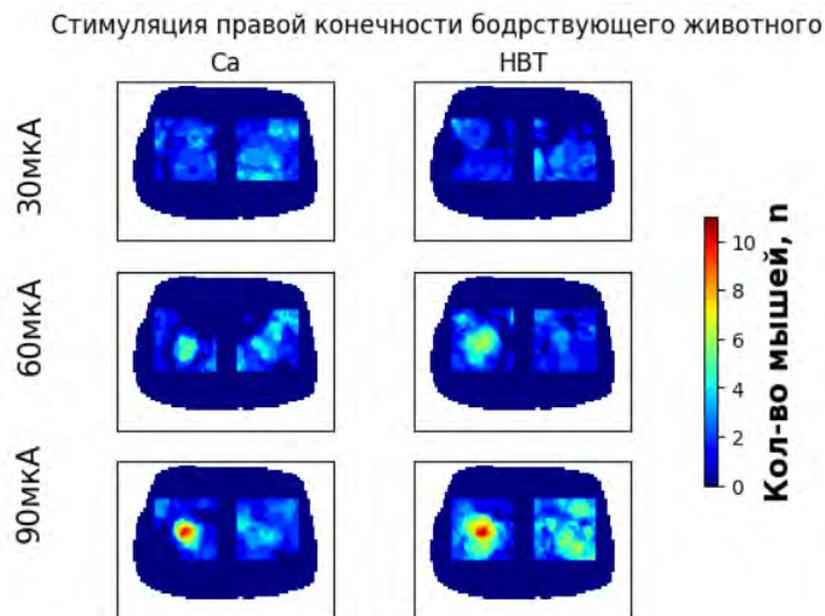
Модификация установки ШОН за счет добавления дополнительных светодиодов и светофильтров в сочетании с возможностями высокоскоростной камеры позволила нам обеспечить одновременную регистрацию интенсивности рассеянного света на длине волны 505 нм и флуоресцентного сигнала GCaMP6f на длине волны 470 нм. Коэффициенты поглощения света длиной волны 505 нм близки у окисленной и восстановленной формы гемоглобина, поэтому рассеянный свет данной длины волны отражает относительные изменения концентраций суммарного гемоглобина в ткани мозга.

3.3.1. Локализация вызванного ответа в коре на стимуляцию задних конечностей у мышей линии Thy1-GCaMP6f

Мы оценили возможность регистрации локального унилатерального вызванного ответа в коре на стимуляцию задней конечности бодрствующего животного. Исходя из полученных ранее данных, мы снизили амплитуду стимула для предотвращения у бодрствующих животных яркой поведенческой реакции, которая маскирует локальный ответ на стимул. Кроме того, вдвое увеличили количество предъявляемых за одну запись стимулов до 10.

На **рисунке 55** видно, что сила стимула величиной 30 мкА недостаточна для регистрации локального ответа, как по Ca, так и по HbT-сигналу. 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 также более выраженная активность в ипсилатеральном полушарии.

А



Б

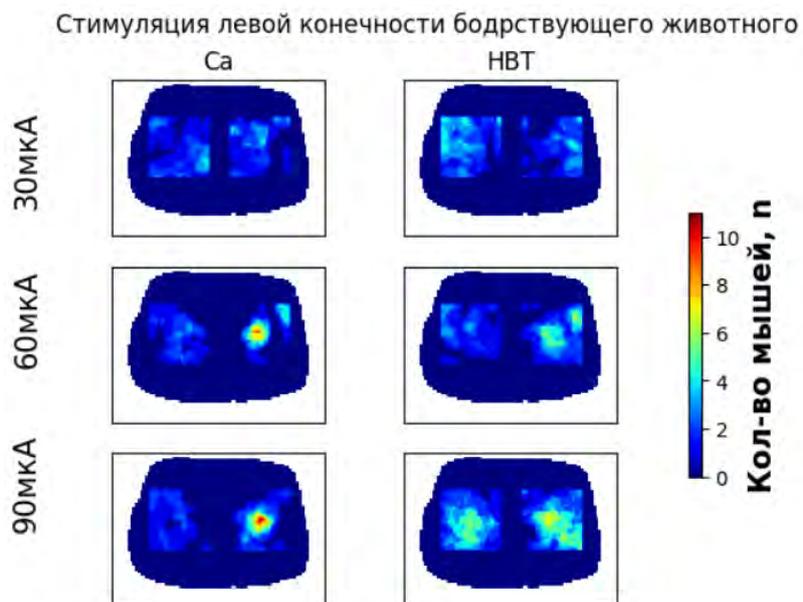


Рисунок 55. Локализация вызванного ответа в коре на стимул разной силы (30, 60, 90 мкА), подаваемый на правую (А) или левую (Б) конечность бодрствующих животных. Маску определяли по суммарному сигналу за время действия стимула, как описано в главе 3.1.4.

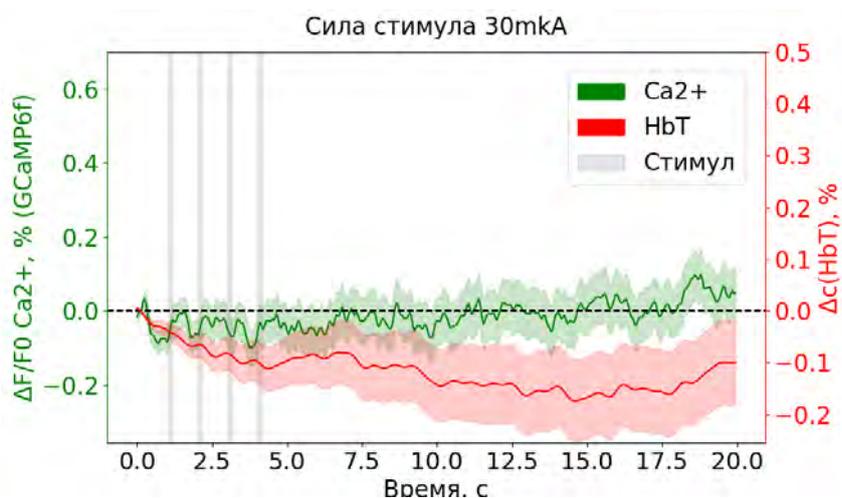
Ввиду индивидуального порога чувствительности мышей и качества закрепления электродов, для дальнейшего анализа было решено использовать маску, полученную при усреднении ответов при стимуляции силой 60 и 90 мкА.

3.3.2. Параметры кальциевого и гемодинамического ответа на сенсорную стимуляцию конечностей в коре больших полушарий у мышей линии Thy1-GCaMP6f

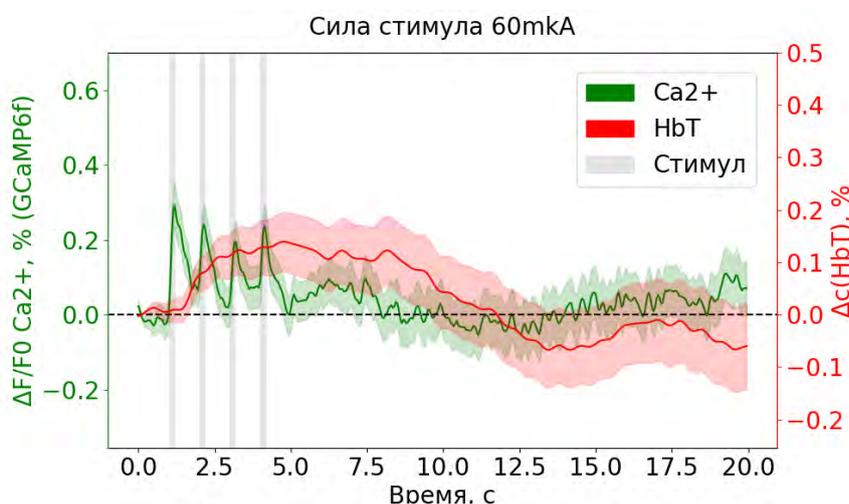
Для оценки функциональной активности коры мозга используют сенсорную стимуляцию. В норме в ответ на сенсорную стимуляцию конечности в советующей зоне первичной сенсорной коры возникает локальное повышение уровня кальция и увеличение притока крови к данной области за счет процессов нейроваскулярного сопряжения [Ma et al., 2016a]. Локальность ответа и амплитуда находятся в тесной взаимосвязи с поведенческой реакцией бодрствующего животного, которая определяется множеством факторов, в том числе и силой стимула [Cramer et al., 2019; Eyre et al., 2022]. В связи с этим мы оценили, как изменяются параметры ответа на стимул в зависимости от его амплитуды и поведенческой реакции животного в норме.

По усредненным графикам без учета поведения можно сделать вывод, что при стимуле 30 мкА ответ наименее заметен, а с увеличением силы стимула от 60 до 90 мкА наблюдается рост амплитуды ответа как по кальциевому сигналу, так и по гемодинамическому (**рисунок 56**).

А



Б



В

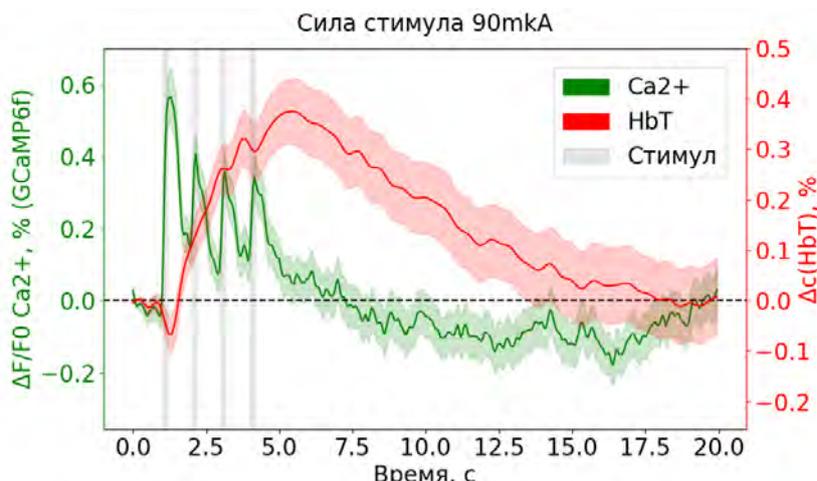
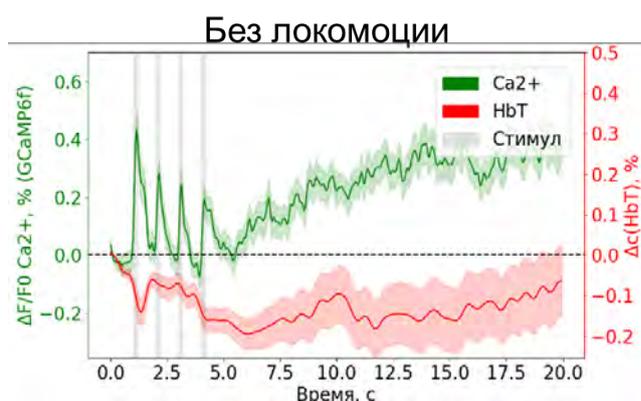


Рисунок 56. Динамика кальциевого и гемодинамического ответов в коре больших полушарий при контралатеральной стимуляции задней конечности слабым электрическим током силой 30 (А), 60 (Б), 90 (В) мкА у мышей линии C57BL/6J-Tg. Среднее \pm SD. Усреднено 160 ответов (по 10 стимулов для каждой из 16 мышей).

При просмотре видеозаписей поведения животного стимулы были классифицированы по наличию и отсутствию локомоции при подаче электрического стимула на конечность. При детальном рассмотрении графиков ответов, усредненных по типу поведенческой реакции животного во время подачи стимула (**рисунок 57**), можно отметить, что прежде всего амплитуда гемодинамического ответа сильно зависит от поведения животного.

А



Б

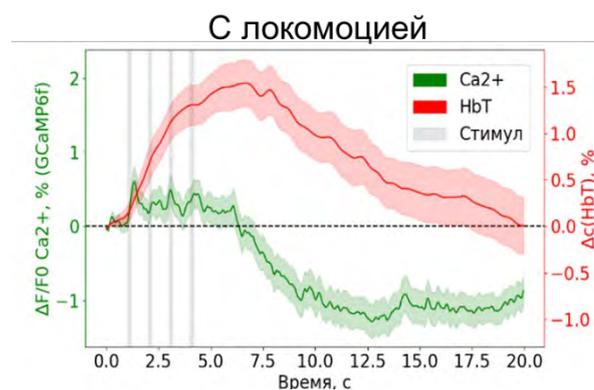
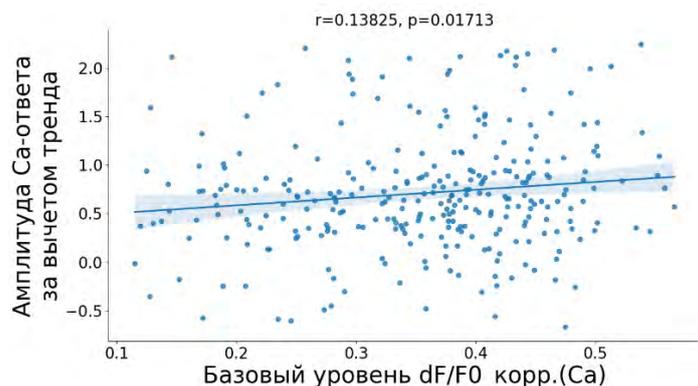


Рисунок 57. Динамика кальциевого и гемодинамического ответов в коре больших полушарий на контралатеральную стимуляцию задней конечности слабым электрическим током силой 90 мкА, не сопровождающихся локомоцией (А) и сопровождающихся локомоцией (Б).

Мы проверили, зависит ли амплитуда Са и НбТ-ответа от базового уровня сигнала, определяемого текущей базовой активностью рассматриваемой зоны коры и поведением животного. Оказалось, что амплитуда вызванного ответа в коре на стимул слабо коррелирует с базовым уровнем активности, что справедливо как для Са-ответа ($r = 0.14$, $p < 0.05$), так и для НбТ-ответа ($r = 0.15$, $p < 0.05$) (**рисунок 58**). Поэтому в дальнейшем мы использовали параметры стимула, определенные по сигналу за вычетом базового уровня («тренда») активности.

А



Б

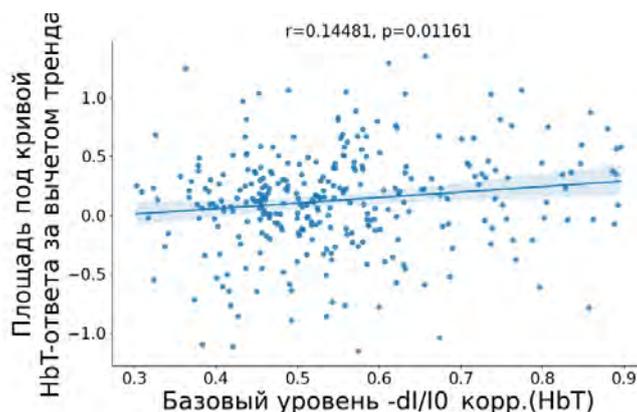
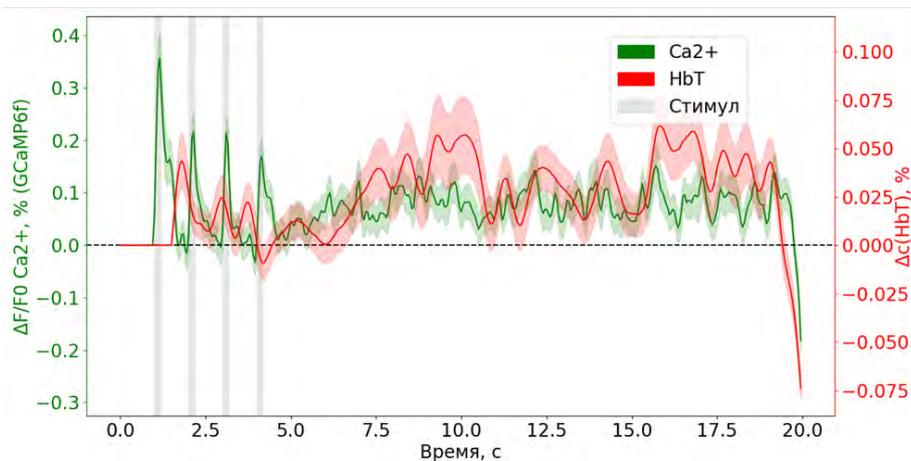


Рисунок 58. Оценка зависимости амплитуды Са-ответа (**А**) и НбТ-ответа (**Б**) от базового уровня относительного изменения сигнала для ответов при силе стимула 90мкА. r - коэффициент корреляции Пирсона.

После вычета базового уровня активности Са- и НбТ-ответы на стимуляцию контралатеральных задних конечностей силой 90мкА, усредненные по типу поведенческой реакции животного, имели гораздо меньшие различия между неподвижными и активно двигающимися животными (**рисунок 59**). Погрешностью метода являются артефакты, появляющиеся в начале и в конце временного отрезка, однако такой подход позволяет получать физиологически-значимую оценку параметров ответа, в меньшей степени зависимую от поведения животного.

А

Без локомоции



Б

С локомоцией

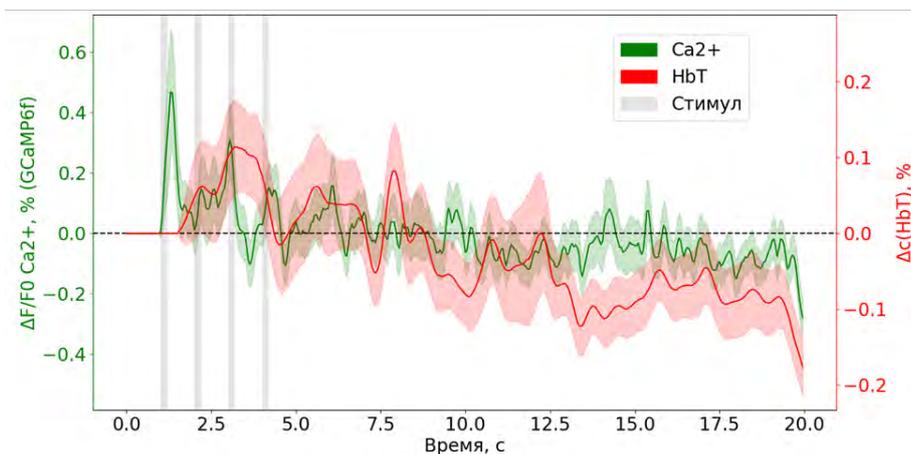


Рисунок 59. Динамика кальциевого и гемодинамического ответов в коре больших полушарий после вычета базовой активности при контралатеральной стимуляции задней конечности слабым электрическим током силой 90 мкА, не сопровождающихся локомоцией (А) и сопровождающихся локомоцией (Б).

Далее мы визуально оценили распределение и разброс по различным параметрам ответа на стимуляцию в зависимости от поведения, используя представление violin-plots (**рисунок 60**).

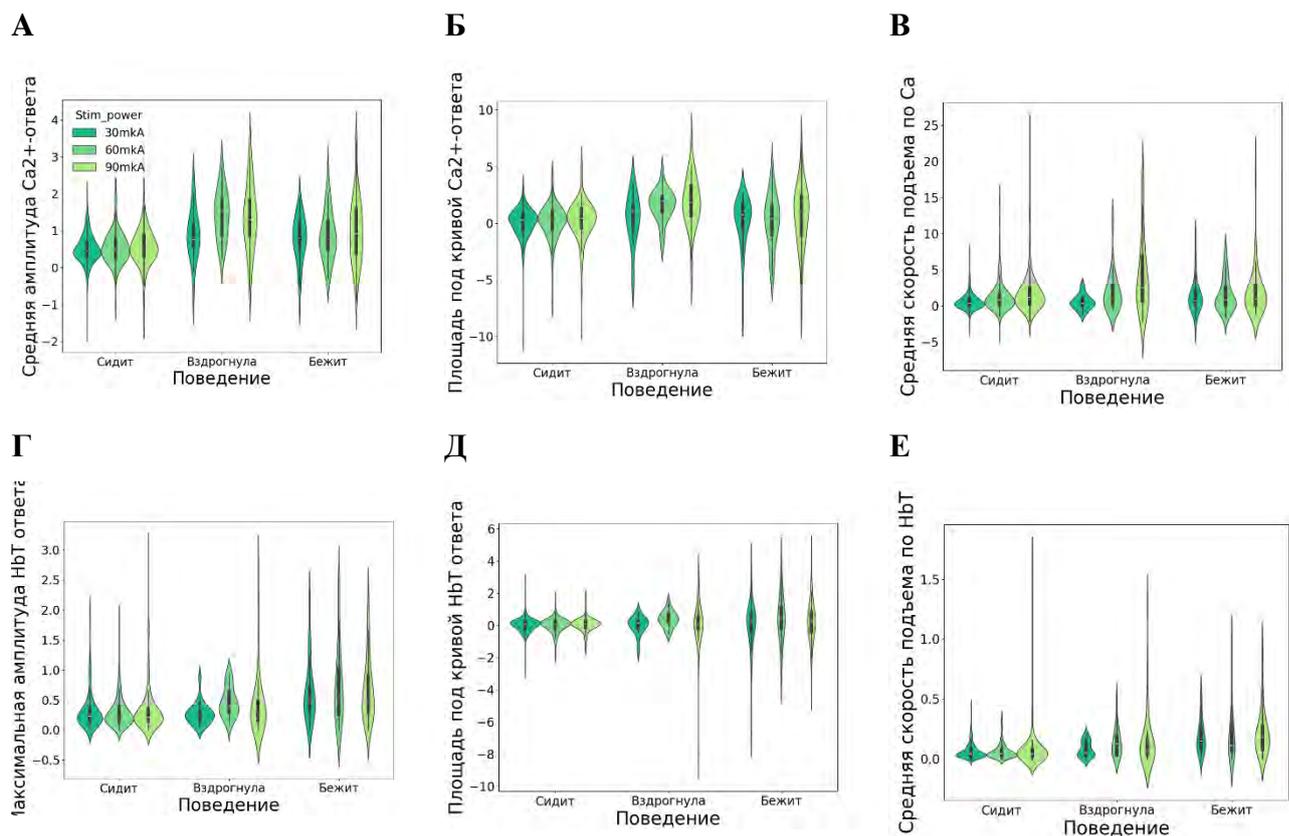


Рисунок 60. Оценка распределения параметров стимула в зависимости от типа поведения мыши и силы приложенного стимула. На графиках представлены Violin-plots. «Сидит» = отсутствие локомоции.

Наименьшей дисперсией в значениях параметров обладали вызванные ответы, которые не сопровождались яркой поведенческой реакцией, поэтому в дальнейшем в работе более подробно рассматриваются именно такие стимулы. Также на диаграммах **рисунка 60** видно, что большинство данных распределено нормально, но встречаются выбросы, которые в последующем удалены после z-нормализации данных.

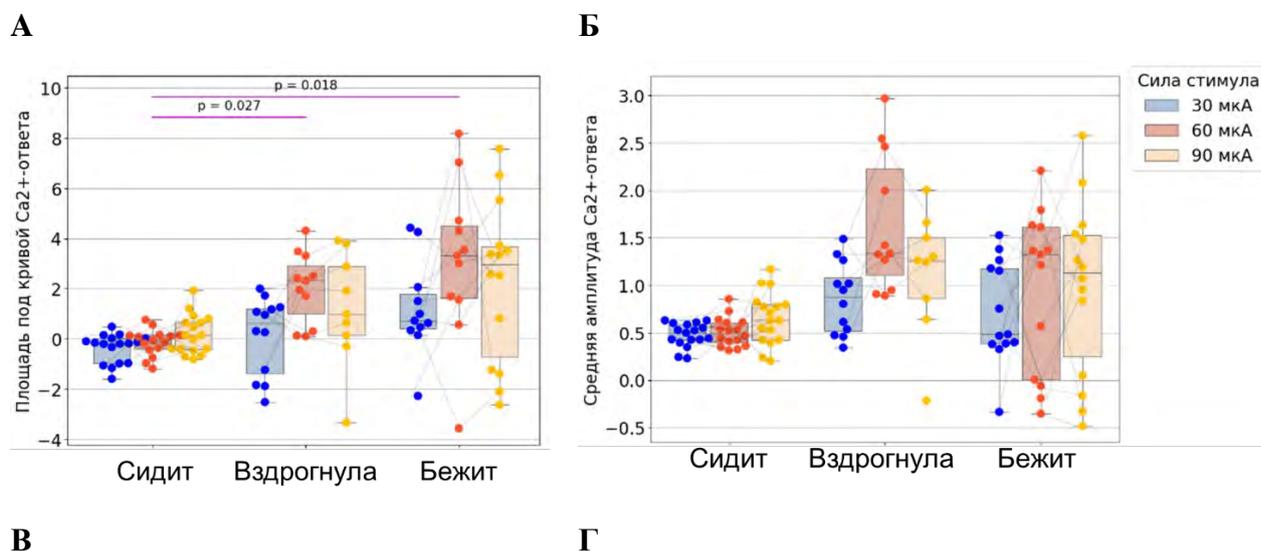
3.3.3. Оценка влияния силы стимула и поведения на ответ в коре на сенсорную стимуляцию конечности индивидуально по мышам линии Thy1-GCaMP6f

Более яркая поведенческая реакция животного соответствует более сильному изменению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} 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 (мышь «сидела») 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 ($p = 0.027$ и $p = 0.018$ соответственно по сравнению с отсутствием поведенческой реакции («мышь сидит»)) (рисунок 61 (А-Б)). Реакция животного классифицировали как «вздрагивание» в случае, когда экспериментатор замечал подергивание частями тела животного без перехода в активную локомоцию.

Аналогичные эффекты наблюдали и при анализе параметров гемодинамического ответа (рисунок 61 (В-Г)). Было выявлено увеличение амплитуды и интегрального показателя относительных изменений концентрации суммарного гемоглобина в ткани, измеренных по регистрации отраженного света длиной волны 505 нм, при усилении поведенческой реакции. Площадь под кривой гемодинамического ответа (приток крови к участку коры) на стимуляцию, при отсутствии выраженной поведенческой реакции (мышь сидела) составила -0.81 ± 0.29 у.е. (появление отрицательных значений связано с осцилляцией сигнала вокруг нулевого значения). При вздрагивании площадь под кривой гемодинамического ответа статистически значимо увеличилась 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. ($p = 0.001$). Аналогичные значения были получены для максимальной амплитуды гемодинамического ответа (0.37 ± 0.11 %, 0.83 ± 0.53 %, 1.84 ± 0.32 % соответственно для поведенческих реакций «Сидит», «Вздрыгнула» и «Бежит» соответственно, $p < 0.05$ при сравнении всех перечисленных поведенческих реакций).

Нам не удалось выявить статистически значимого влияния силы стимула. Это может быть связано с большим разбросом значений. Дисперсии значений для всех рассматриваемых параметров не равны при распределении по группам на основе поведенческой реакции, что неверно для случая распределения значений по группам на основе силы стимула (Тест Бартлетта). То есть вариабельность по признаку «тип поведения» больше, чем по признаку «сила стимула».



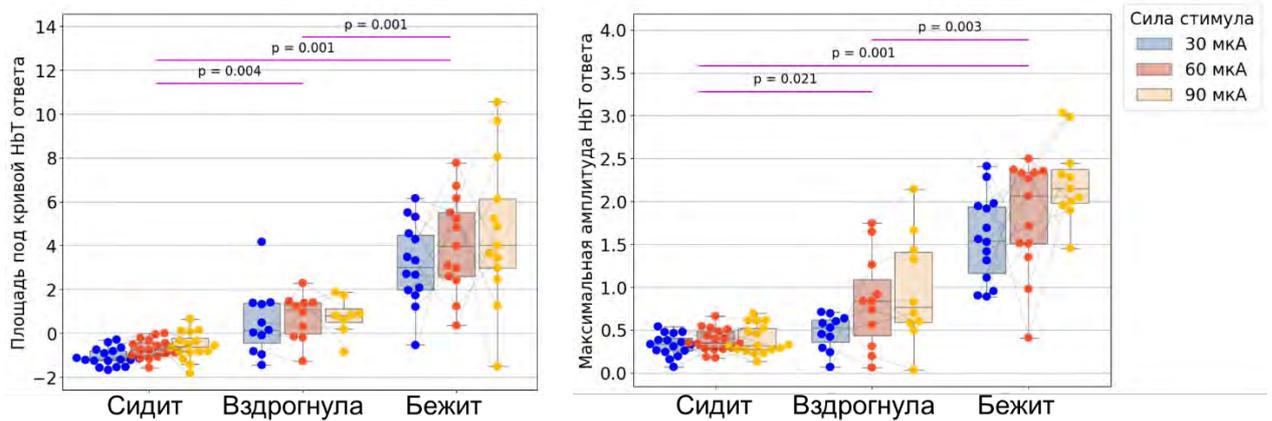


Рисунок 61. Поведение оказывает большее влияние на вызванный в коре ответ, чем вариации силы приложенного стимула (30, 60 и 90 мкА). Площадь под кривой кальциевого ответа (**А**), средняя амплитуда кальциевого ответа (**Б**), площадь под кривой гемодинамического ответа (**В**) и максимальная амплитуда гемодинамического ответа (**Г**) на сенсорную стимуляцию задней конечности в норме при варьировании силы стимула и разной поведенческой реакции у мышей линии Thy1-GCaMP6f. Two-way repeated-measures ANOVA. N мышей = 16.

Таким образом, поведение оказывает более значимое влияние на параметры сенсорного ответа в коре больших полушарий мозга у мышей, чем сила стимула. Более того, даже при субъективной оценке исследователем реакции поведения, как «отсутствие реакции = сидит», нам не удалось наблюдать обнаружить статистически значимых различий в ответе между разными силами стимула. Это может указывать на наличие более тонких поведенческих реакций. 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 et al., 2015; West et al., 2022].

Для использования параметров ответа в коре мозга на сенсорную стимуляцию в бодрствующем состоянии с целью оценки нарушений, вызванных патологическим состоянием животного, необходима разработка количественного подхода к анализу поведения. Таковым может послужить видеотренинг с анализом положения конечностей животного с помощью программ на основе технологий нейронных сетей, например, программы DeepLabCut [Mathis et al., 2018].

3.3.4. Оценка нейроваскулярного сопряжения в норме у мышей

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.

Мы оценили, насколько стабильны показатели нейроваскулярного сопряжения в норме, посредством определения для каждой мыши коэффициента корреляции амплитуды Ca^{2+} - и НвТ-ответов (рисунок 62).

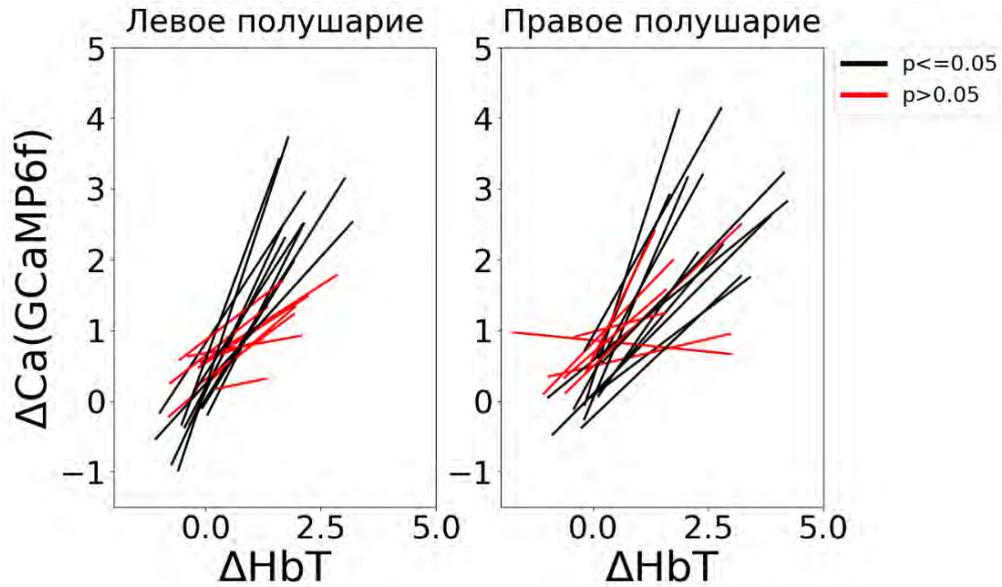


Рисунок 62. Корреляция амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих мышей линии C57BL/6J-Tg ($n = 19$), построенная по всем ответам вне зависимости от силы стимула и поведения; каждая линия представляет одну мышь.

Среднее значение коэффициента корреляции Пирсона в левом и в правом полушарии составили 0.35 ± 0.19 и 0.43 ± 0.21 соответственно или 0.46 ± 0.29 и 0.45 ± 0.28 после z-преобразования Фишера. При этом различий между значением коэффициентов слева и справа в норме не обнаружено (рисунок 63). Несмотря на невысокие значения коэффициентов корреляции, данные значения согласуются с литературными, используемыми при интерпретации данных ШОН и фМРТ [Ma et al., 2016b].

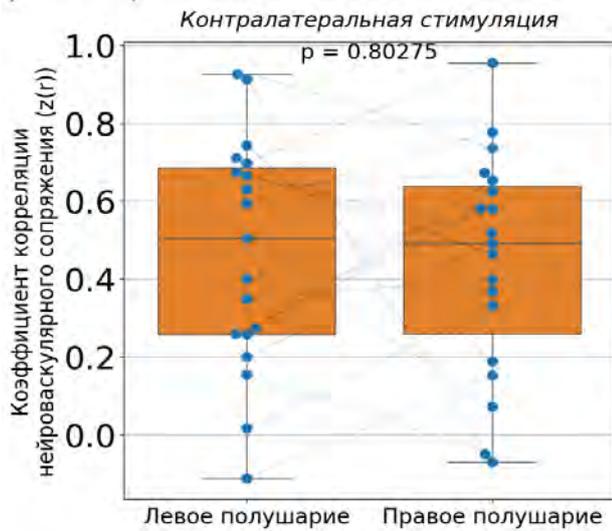


Рисунок 63. Сравнение коэффициентов корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности, в соматосенсорной коре левого и правого полушария у бодрствующих мышей линии Thy1-GCaMP6f. Парный t-тест. N мышей = 16.

Для оценки стабильности параметра мы сравнили как варьирует коэффициент корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа у одних и тех же мышей в течение нескольких дней. (рисунки 64, 65). Вошедшие в анализ животные – это мыши из группы «Контроль» серии экспериментов по исследованию кальциевой активности нейронов и суммарного гемоглобина (см. 2.9). При этом между 1 и 2 днем съемки животным провели операцию под изофлурановым наркозом по установке катетера для дальнейшего участия в эксперименте в качестве контрольной группы.

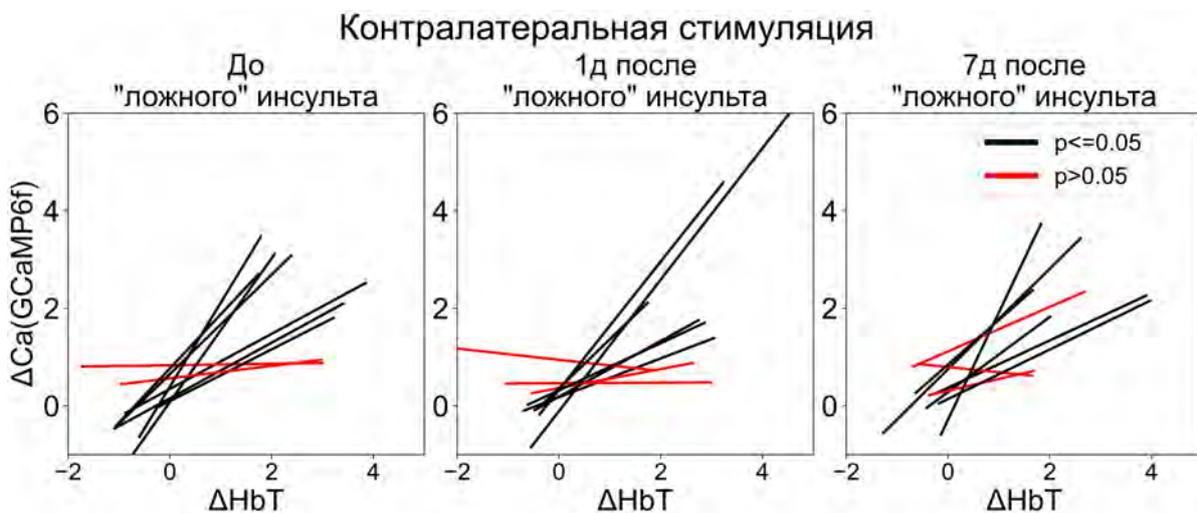


Рисунок 64. Вариабельность по дням в группе «Контроль» корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре, вызванного сенсорной

стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих мышей линии Thy1-GCaMP6f (n мышей = 10) в норме. Линейная регрессия построена по всем ответам вне зависимости от силы стимула и поведения; каждая линия представляет одну мышь.

Средние значения коэффициента корреляции по дням варьировали от 0.29 до 0.40 с максимальным стандартным отклонением 0.22. Статистически значимых различий в значениях по дням выявлено не было (**рисунок 65**).

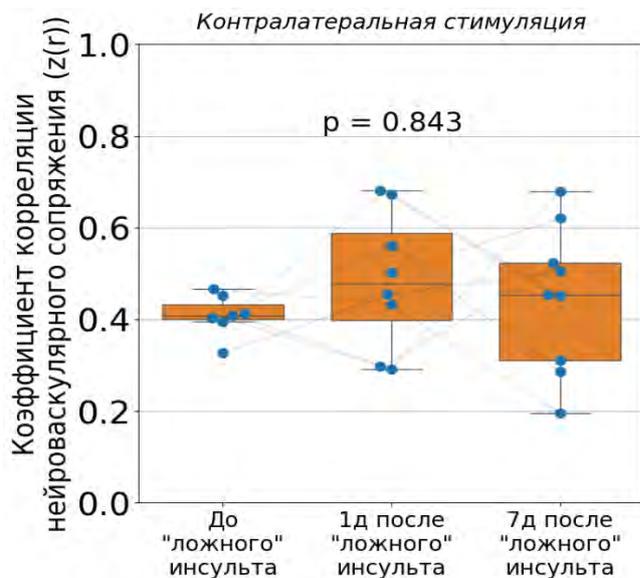


Рисунок 65. Вариабельность по дням корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих мышей линии Thy1-GCaMP6f ($n = 8$) в норме. Корреляции для данных контралатеральной стимуляции без разделения на левое и правое полушария. ANOVA для повторяющихся измерений.

Таким образом 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. Поэтому указанный параметр мы в дальнейшем использовали для оценки методом ШОН последствий моделирования патологий мозга, в частности, фокального инсульта.

3.3.5. Оценка функциональной связанности работы мозга по кальциевой и гемодинамической активности коры в норме у мышей линии Thy1-GCaMP6f

Функциональная связанность является важным параметром фМРТ, который коррелируют с различными неврологическими нарушениями. Поэтому мы оценили, как в норме выглядят матрицы корреляции (см. 2.10.) кальциевой и гемодинамической активности коры мозга при спокойном бодрствовании у мышей линии C57BL/6J-Tg (**рисунок 66**). 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 **рисунке 66**). Заметно снижение корреляции сенсомоторных и ассоциативных областей, вплоть до отрицательных корреляции с ретроспленальной областью коры (зеленые овалы на **рисунке 66**). Активность гомологичных, билатерально симметричных областей разных полушарий, также высоко коррелирует (фиолетовый овал на **рисунке 66**). 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].

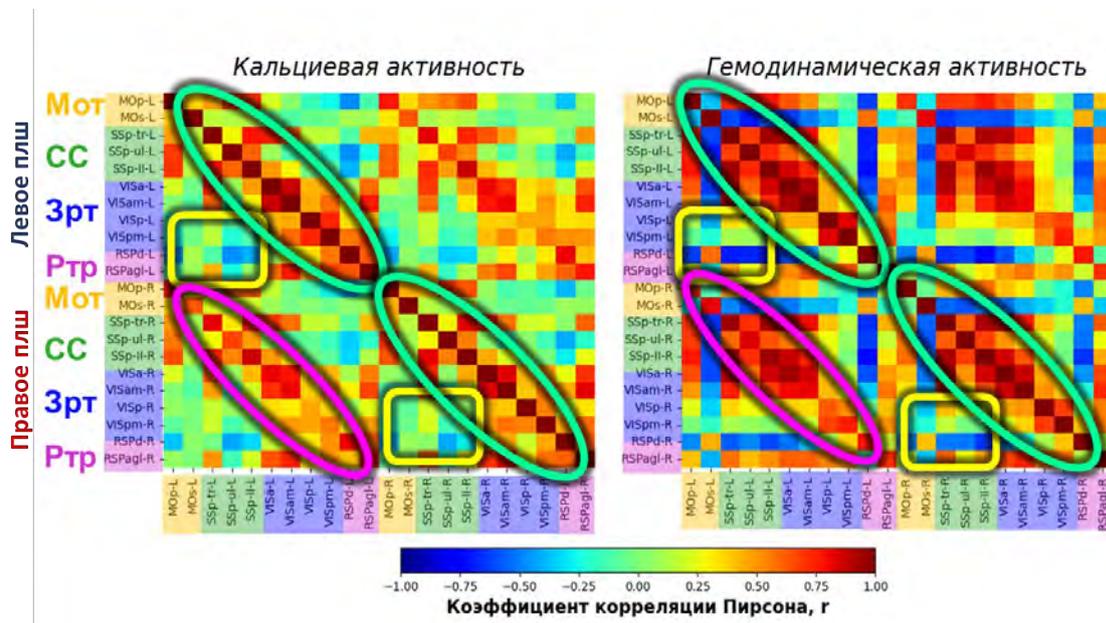


Рисунок 66. Матрицы корреляции Ca^{2+} - и НвТ-сигналов между анатомическими зонами коры у бодрствующих мышей линии C57BL/6J-Tg в спокойном состоянии. Перед анализом применен Low-pass частотный фильтр до 1.5 Гц, в анализ включены только участки без локомоции. N мышей = 19. Мот – моторные области, СС – области соматосенсорной коры, Зрт – области зрительной коры, Ртр – ретроспленальная кора. Для расшифровки названий зон см. 2.10. Выделение областей овалами расшифровано в тексте.

Также мы проверили, насколько стабильны паттерны синхронизированной спонтанной активности во времени у мышей (**рисунок 67**). Установлено, что паттерн функциональной связанности остается стабильным в течение 3-х дней проведенной регистрации

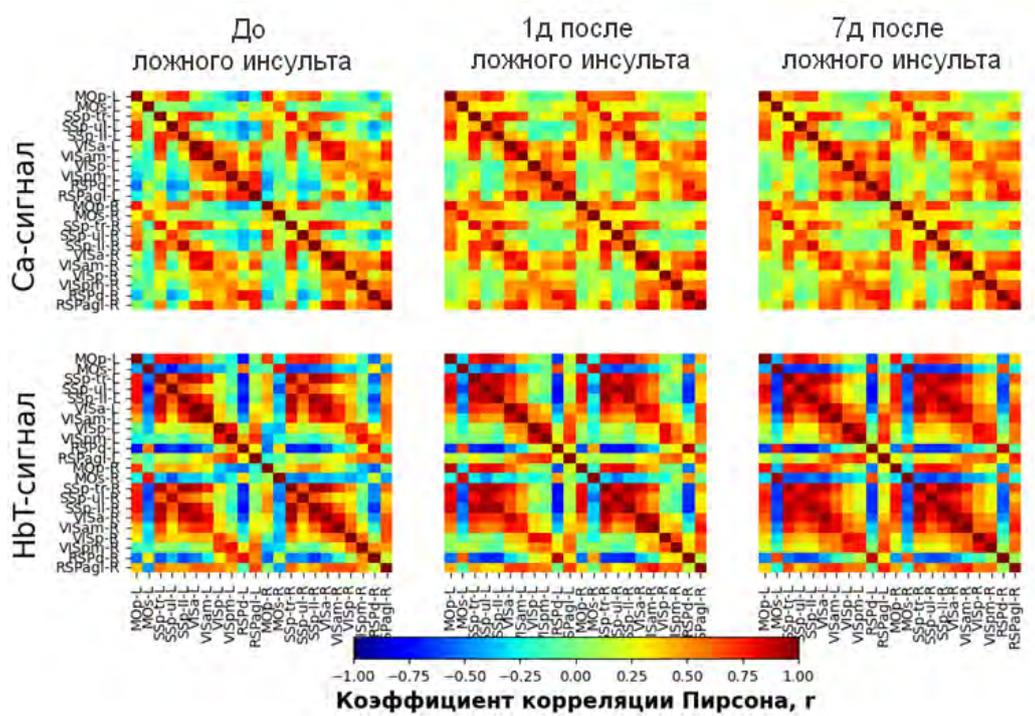


Рисунок 67. Матрицы корреляции Ca^{2+} - и HbT-сигналов между анатомическими зонами коры у бодрствующих мышей линии C57BL/6J-Tg в спокойном состоянии при повторных измерениях, в течение 3-х дней. N мышей =10.

Средние значения коэффициента внутрислошарной корреляции по дням варьировали от 0.25 до 0.30 с максимальным стандартным отклонением 0.11. Средние значения коэффициента межполушарной корреляции по дням варьировали от 0.20 до 0.26 с максимальным стандартным отклонением 0.12. При этом статистически значимых различий в значениях по дням выявлено не было (**рисунок 68**), что указывает на стабильность данного параметра.

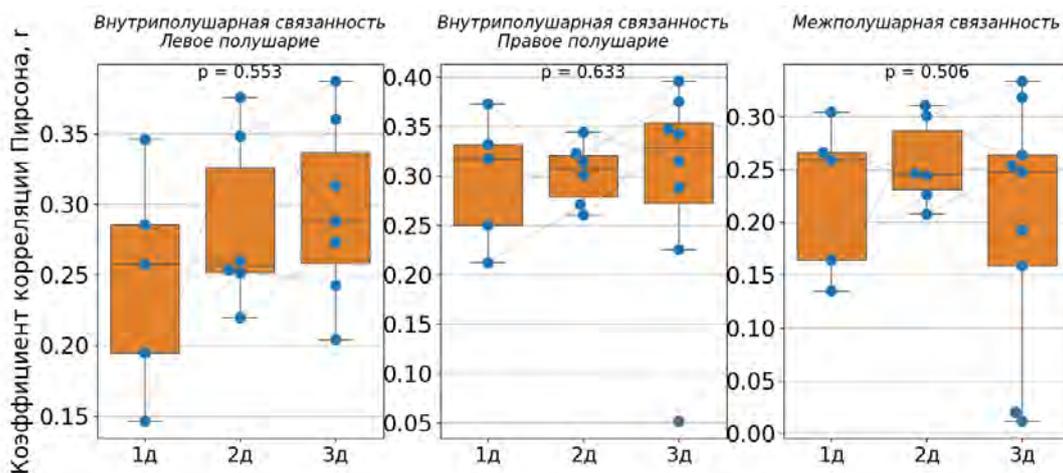


Рисунок 68. Стабильность во времени средних коэффициентов внутрислошарной и межполушарной связанности. (n = 5-9). ANOVA для повторяющихся измерений.

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 внутрислошарной функциональной связанности зон коры мозга.

3.4. Влияние фототромбоза на кальциевую и гемодинамическую активность в остром и подостром периодах у мышей линии Thy1-GCaMP6f

3.4.1. Влияние инсульта на локализацию вызванного ответа в коре на сенсорную стимуляцию 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, рассмотренные в предшествующей главе.

Для начала оценили локализацию области очага инсульта по отношению к областям в коре, отвечавшим наибольшими изменениями кальциевого сигнала при сенсорной стимуляции задних конечностей до индукции инсульта, а также зоне чувствительности задних лап, определенной по анатомическому атласу (**рисунок 69**). Можно отметить, что, несмотря на вариабельность размера и локализации очага, область чувствительности задних лап в большинстве случаев затронута очагом инсульта только частично, либо располагается в непосредственной близости от очага.

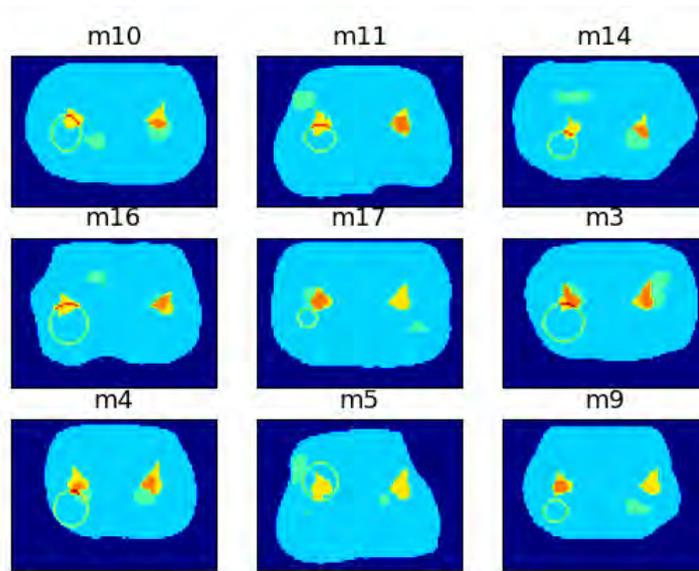


Рисунок 69. Колокализация областей индуцированного фототромбозом ишемического повреждения (Зеленый овал), ответа на сенсорную стимуляцию в норме (Зеленые области) и зоны чувствительности задних конечностей по атласу мозга мыши (SSp-II) (Желтая область). Перекрывающиеся области обозначены оранжевым светом. Над изображениями указаны индивидуальные номера мышей. Диаметр очага определен по области высокой флуоресценции GCaMP6f через 10 минут после индукции фототромбоза.

Инсульт повлиял на локализацию кальциевого и гемодинамического вызванного ответа на сенсорную стимуляцию задних конечностей в поврежденном полушарии мыши (**рисунок 70**). Кальциевый ответ после фототромбоза был зарегистрирован, но область его локализации была смещена к периферии ишемического очага. Значительное влияние инсульт оказал на локальный гемодинамический ответ в левом (поврежденном). На 1 сутки после инсульта исчез четко детектируемый локальный ответ в поврежденном полушарии, однако появился ярко выраженный локальный ответ в соматосенсорной области в интактном полушарии. К 7 дню после инсульта формируется локальная область гемодинамического ответа в поврежденном полушарии, соответствующая области кальциевого ответа в этот день.

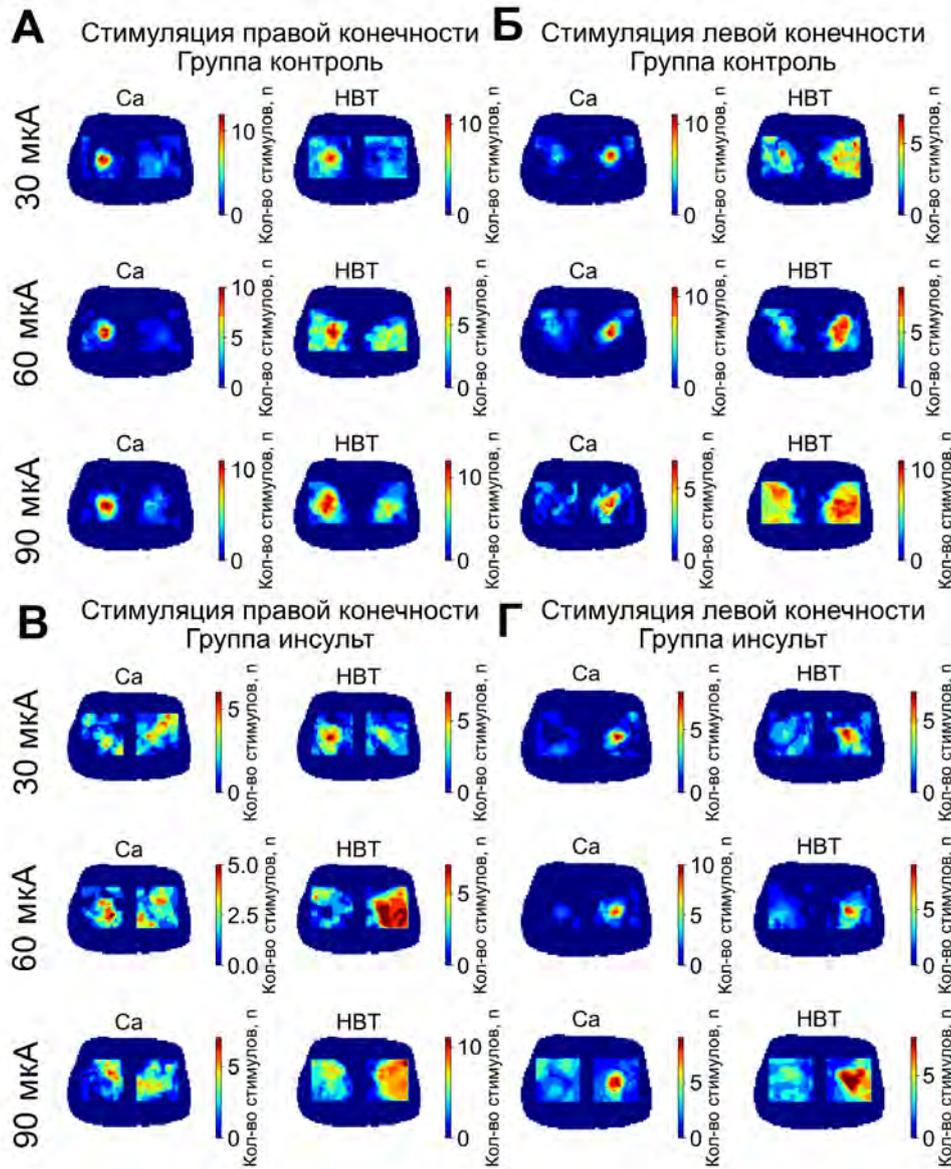


Рисунок 70. Локализация вызванного ответа в коре на стимул, подаваемый на правую или левую конечность бодрствующих животных в группах мышей «контроль» и «инсульт». Усреднены стимулы силой 60 и 90 мкА. Фототромбоз всегда индуцировали в левом полушарии. (см. рисунок 69)

3.4.2. Влияние инсульта на параметры вызванного ответа в коре у мышей линии Thy1-GCaMP6f

Как указано в предыдущей главе, амплитуда кальциевого ответа в группе «Контроль» статистически значимо увеличилась от первого дня эксперимента к последующим ($p = 0.0145$, $p = 0.03$ соответственно), что может быть связано с процедурой катетеризации (катетер вводили в правую яремную вену). Среднее значение амплитуды кальциевого ответа в левом (ложно поврежденном) полушарии в группе «Контроль» составила $0.46 \pm 0.09\%$ до катетеризации, $0.73 \pm 0.13\%$ на первые сутки после ложной индукции инсульта и $0.67 \pm 0.07\%$ на седьмые сутки.

При этом в группе «Инсульт» не наблюдалось статистически значимого повышения амплитуды ответа в коре на стимуляцию контралатеральной конечности. Среднее значение амплитуды кальциевого ответа в левом (повреждённом) полушарии в группе «Инсульт» составила $0.50 \pm 0.08\%$ до катетеризации и индукции фототромбоза, $0.54 \pm 0.08\%$ на первые сутки после инсульта и $0.57 \pm 0.11\%$ на седьмые сутки. Отличия в значении средней амплитуды Са-ответа между группой «Контроль» и «Инсульт» на первые сутки статистически значимы ($p = 0.0011$) (**рисунок 71А**).

Похожие изменения претерпевает интегральный параметр Са-ответа - площадь под кривой, однако из-за больших разбросов статистически значимые различия были получены только между группами на 1 и 7 сутки после инсульта (**рисунок 71Б**).

Помимо амплитуды кальциевого ответа изменяются значения средней скорости роста кальциевого сигнала во время стимуляции, определенные по значению производной сигнала во время стимуляции. Средняя скорость роста кальциевого сигнала при стимуляции в группе «Контроль» статистически значимо увеличилась от первого дня эксперимента к 1 суткам после ложного инсульта ($p = 0.046$) (**рисунок 71В**). Средняя скорость роста кальциевого сигнала в левом (ложно повреждённом) полушарии в группе «Контроль» составила 0.63 ± 0.22 у.е. до катетеризации, 1.32 ± 0.55 у.е. на первые сутки после ложной индукции инсульта и 1.27 ± 0.53 у.е. на седьмые сутки. При этом в группе «Инсульт» не наблюдалось статистически значимого повышения в скорости роста кальциевого сигнала в коре в ответ на стимуляцию контралатеральной конечности. Среднее значение скорости роста кальциевого сигнала в левом (повреждённом) полушарии в группе «Инсульт» составила 0.79 ± 0.27 у.е. до катетеризации и индукции фототромбоза, 0.38 ± 0.20 у.е. на первые сутки после инсульта и 0.61 ± 0.30 у.е. на седьмые сутки. Отличия в значении средней скорости Са-ответа между группой «Контроль» и «Инсульт» на первые сутки и седьмые сутки после инсульта статистически значимы ($p = 0.04$ и $p = 0.0034$ соответственно).

В контралатеральном полушарии не было обнаружено статистически значимых различий в параметрах кальциевого ответа.

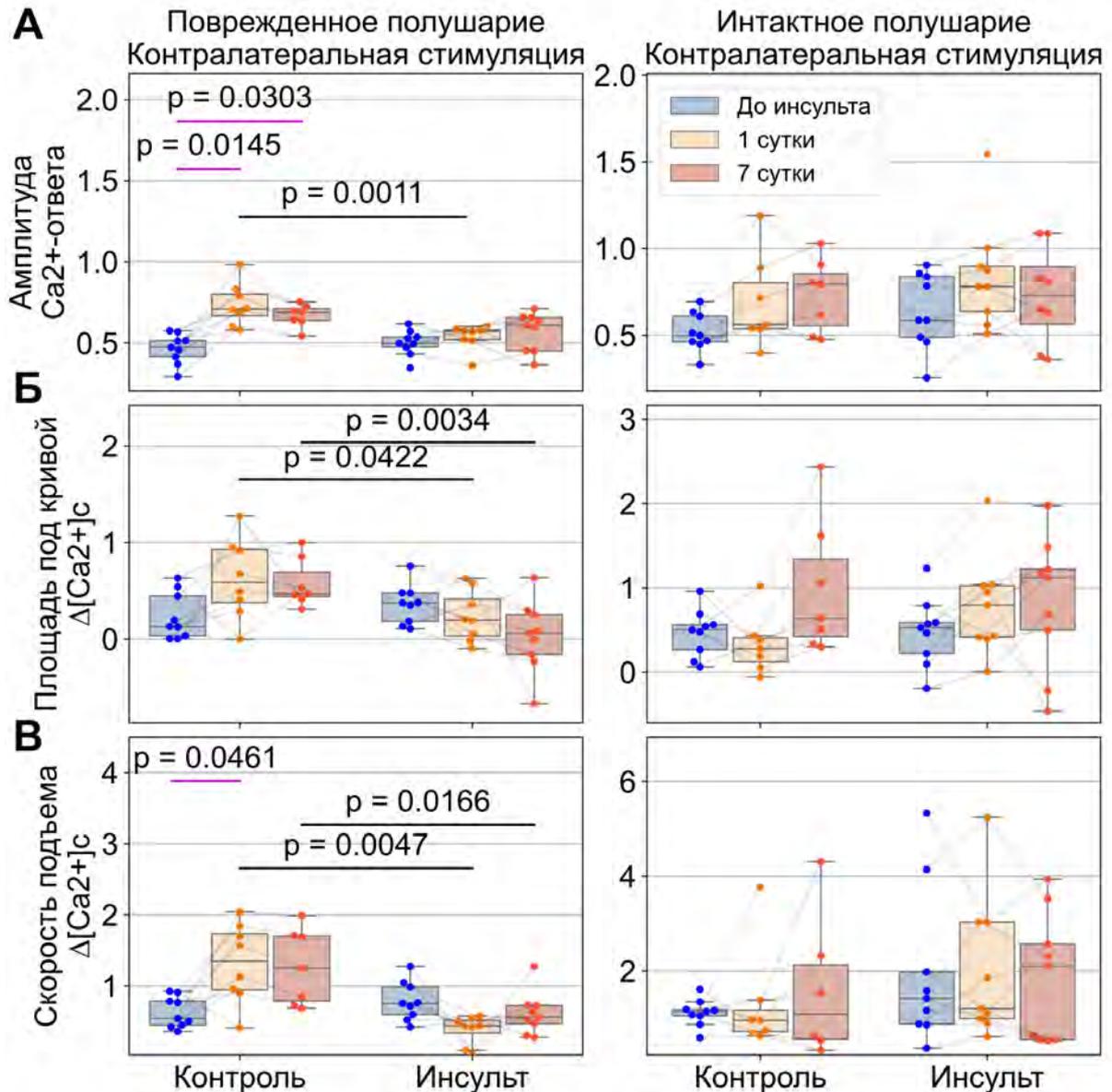


Рисунок 71. Параметры кальциевого ответа в поврежденном и интактном полушарии до и после индукции инсульта у мышей линии C57BL/6J-Tg. Mixed-ANOVA, rm-ANOVA /Friedman with post-hoc (Bonferroni) - розовая линия, Ttest/mwu - черная линия. N до удаления выбросов по правилу 1.5IQR: «контроль» = 9, N «инсульт» = 9

Среди параметров гемодинамического ответа, наиболее показательным оказалась интегральная оценка интенсивности ответа - площадь под кривой НвТ-сигнала (**рисунок 72Б**). Данный параметр статистически значимо ($p = 0.023$) снижен в группе «Инсульт» на первые сутки после индукции фототромбоза (-0.07 ± 0.07 у.е.) по сравнению с группой «Контроль» (0.07 ± 0.07 у.е.). Отрицательные значения объясняются колебательной динамикой сигнала вокруг нулевого значения. В контралатеральном полушарии не было обнаружено статистически значимых различий в параметрах гемодинамического ответа. При этом стоит отметить большие разбросы, что, в частности, может быть связано с вариацией размера очага.

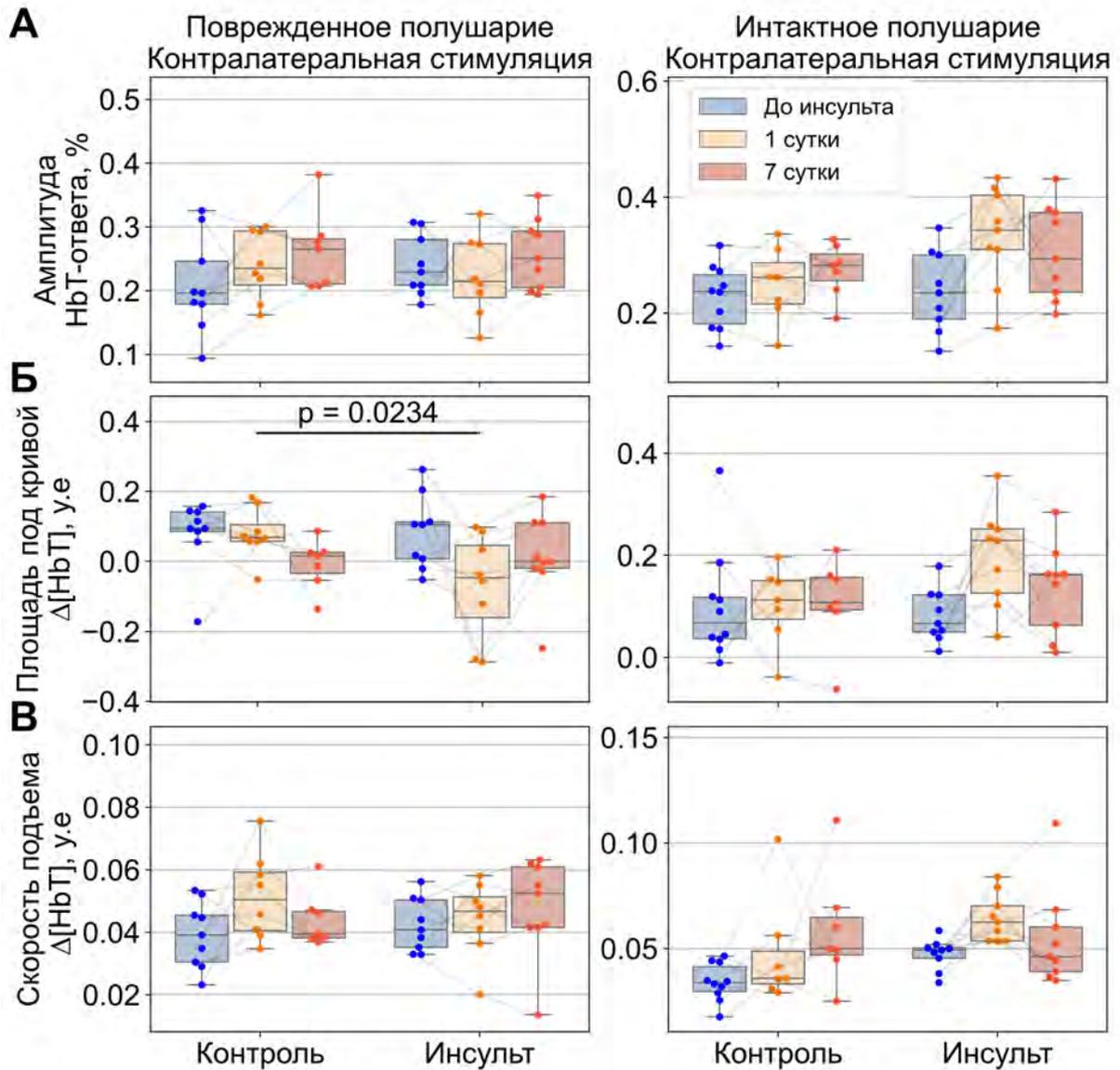


Рисунок 72. Параметры гемодинамического ответа в поврежденном и интактном полушарии до и после индукции инсульта у мышей линии C57BL/6J-Tg. Mixed-ANOVA, rm-ANOVA /Friedman with post-hoc (Bonferroni) - розовая линия, Ttest/mwu - черная линия. N до удаления выбросов по правилу 1.5IQR: «контроль» = 9, N «инсульт» = 9

Таким образом, параметры кальциевого и гемодинамического ответа характеризуются слабой стабильностью в группе «Контроль» и большими разбросами, для использования данных параметров для оценки последствий инсульта необходимо увеличивать статистику как по мышам, так и по повторности измерений ответов на стимул внутри одной записи, так и во времени.

3.4.3. Влияние инсульта на нейроваскулярное сопряжение у мышей линии Thy1-GCaMP6f

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 мышей в группе «Контроль» и «Инсульт» (рисунок 73).

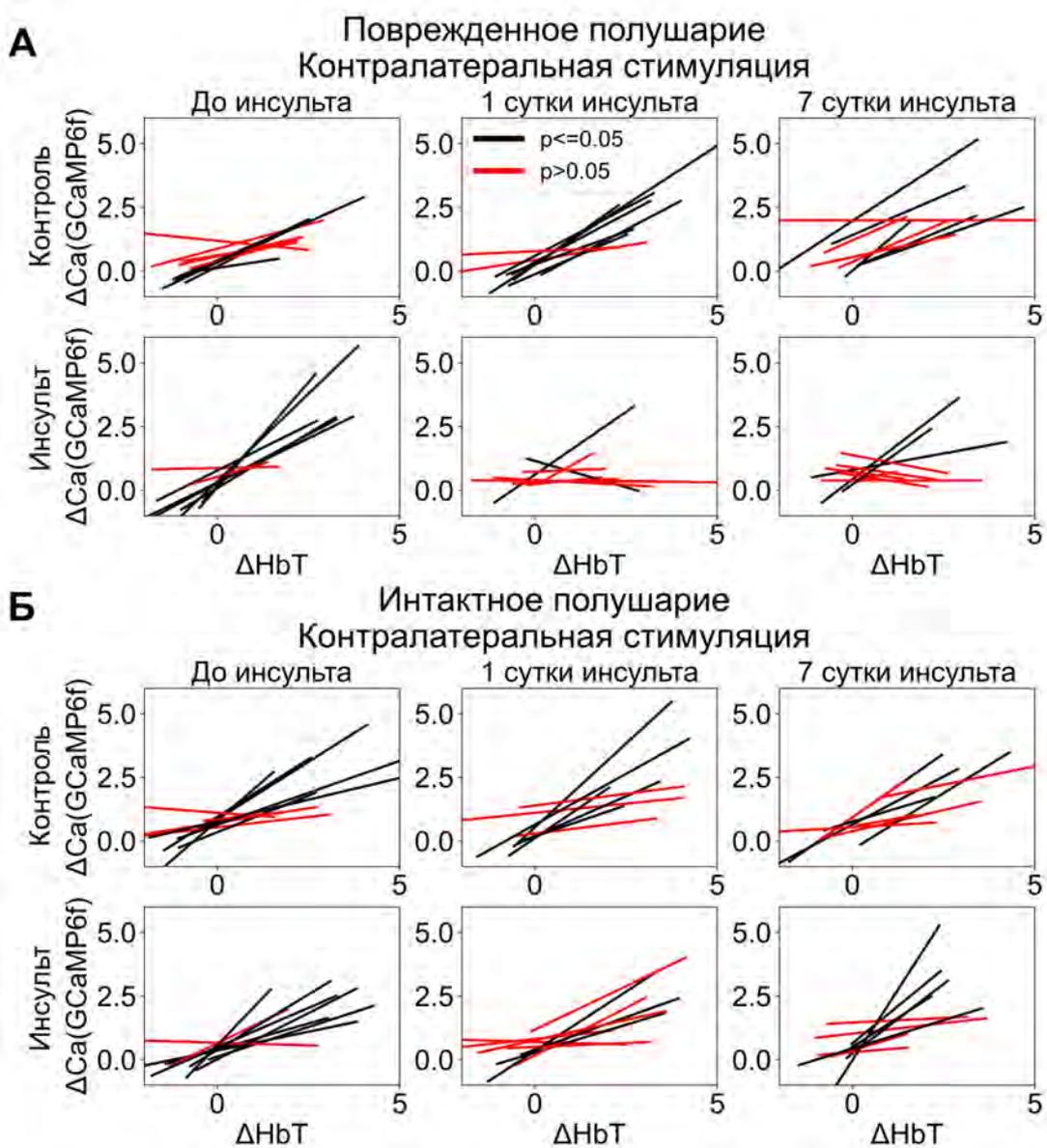


Рисунок 73. Корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре интактного (А) и поврежденного (Б) полушария, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих мышей в группе «Контроль» и «Инсульт». Линейная регрессия построена по всем ответам вне зависимости от силы стимула и поведения; каждая линия представляет одну мышшь.

Установлено, что инсульт вызывает статистически значимое снижение коэффициента корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре на первые и седьмые сутки после индукции фототромбоза по сравнению с группой «Контроль» ($p = 0.0006$ и $p = 0.05$, соответственно) (рисунок 74). Средние значения коэффициента корреляции в

левом полушарии в контроле составили 0.36 ± 0.25 , 0.47 ± 0.22 , 0.38 ± 0.20 до ложного инсульта, на 1 сутки и на 7 сутки после ложного инсульта соответственно. 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 сутки после ложного инсульта соответственно. При этом внутри группы «Инсульт» различия между днем до и 1 сутками статистически значимо ($p=0.032$). 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.

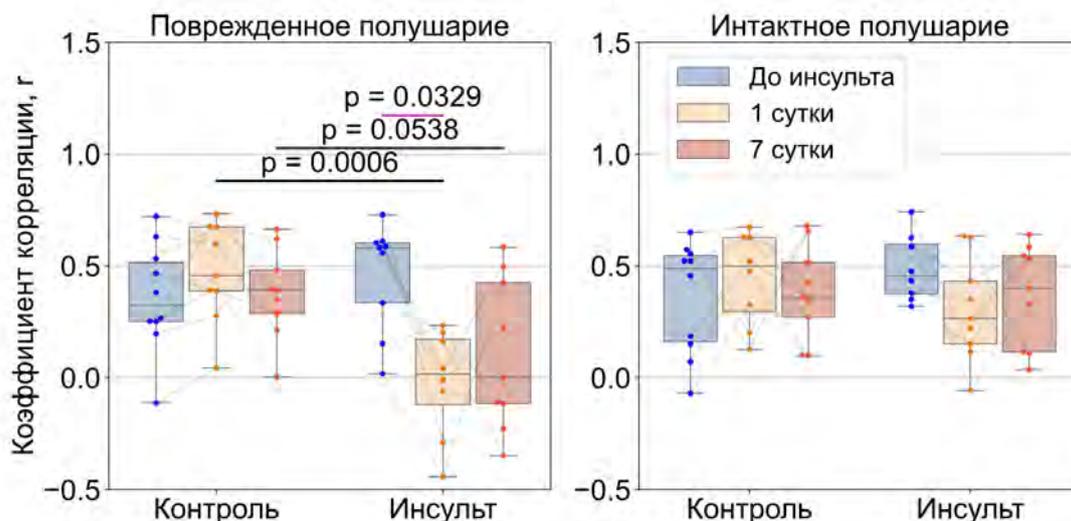


Рисунок 74. Коэффициенты корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих мышей в группе «Контроль» и «Инсульт». Mixed-ANOVA, gm-ANOVA /Friedman with post-hoc (Bonferroni) - розовая линия, Ttest/mwu - черная линия. N до удаления выбросов по правилу $1.5IQR$: «контроль» = 9, «инсульт» = 9.

3.4.4. Влияние инсульта на функциональную связанность зон мозга у мышей линии Thy1-GCaMP6f

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 (**рисунок 75**). При сравнении матриц корреляции после индукции фототромбоза с матрицами здоровых животных можно отметить снижение коэффициентов корреляции между гомологичными, билатерально симметричными областями, разных полушарий особенно заметное на 1 сутки после индукции инсульта (красные овалы на **рисунке 75**). Аналогичные изменения наблюдаются как для матриц, построенных Ca-сигналу (**рисунок 75 А**), так и по и HbT-сигналу (**рисунок 75 Б**).

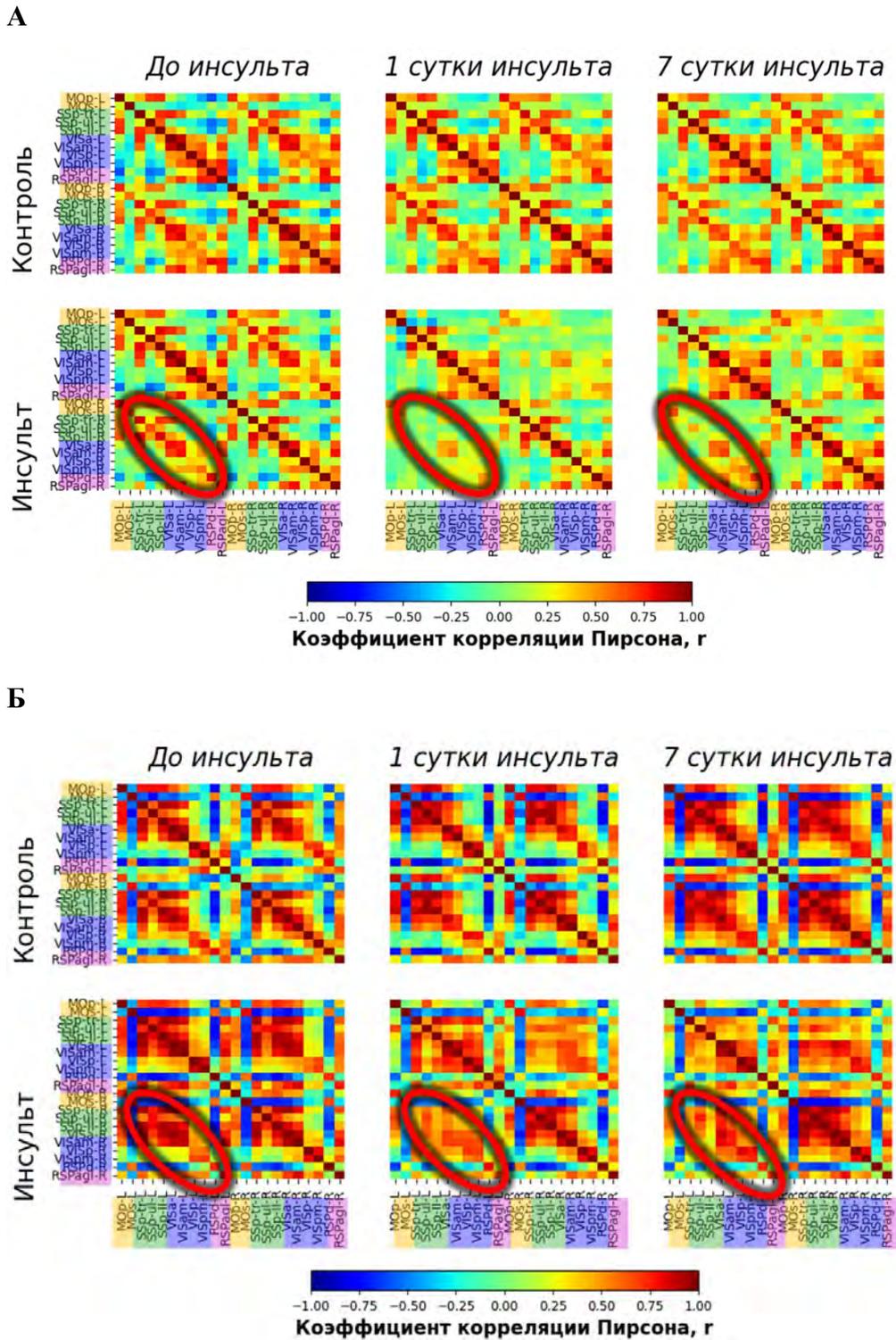


Рисунок 75. Матрицы корреляции Ca^{2+} (А) и HbT-сигналов (Б) между анатомическими зонами коры у бодрствующих мышей в спокойном состоянии до и после фототромбоза в группах «ИнсульТ» и «Контроль».

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» ($p = 0.0066$) (**рисунок 76 А**). 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 . 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 . Среднее значения коэффициента до ложного инсульта в группе «Контроль» составило 0.23 ± 0.07 , на первые сутки инсульта 0.26 ± 0.04 и к 7 дню после инсульта 0.22 ± 0.10 .

По гемодинамическому сигналу не удалось обнаружить статистически значимых различий в коэффициентах корреляции (рисунок 76 Б).

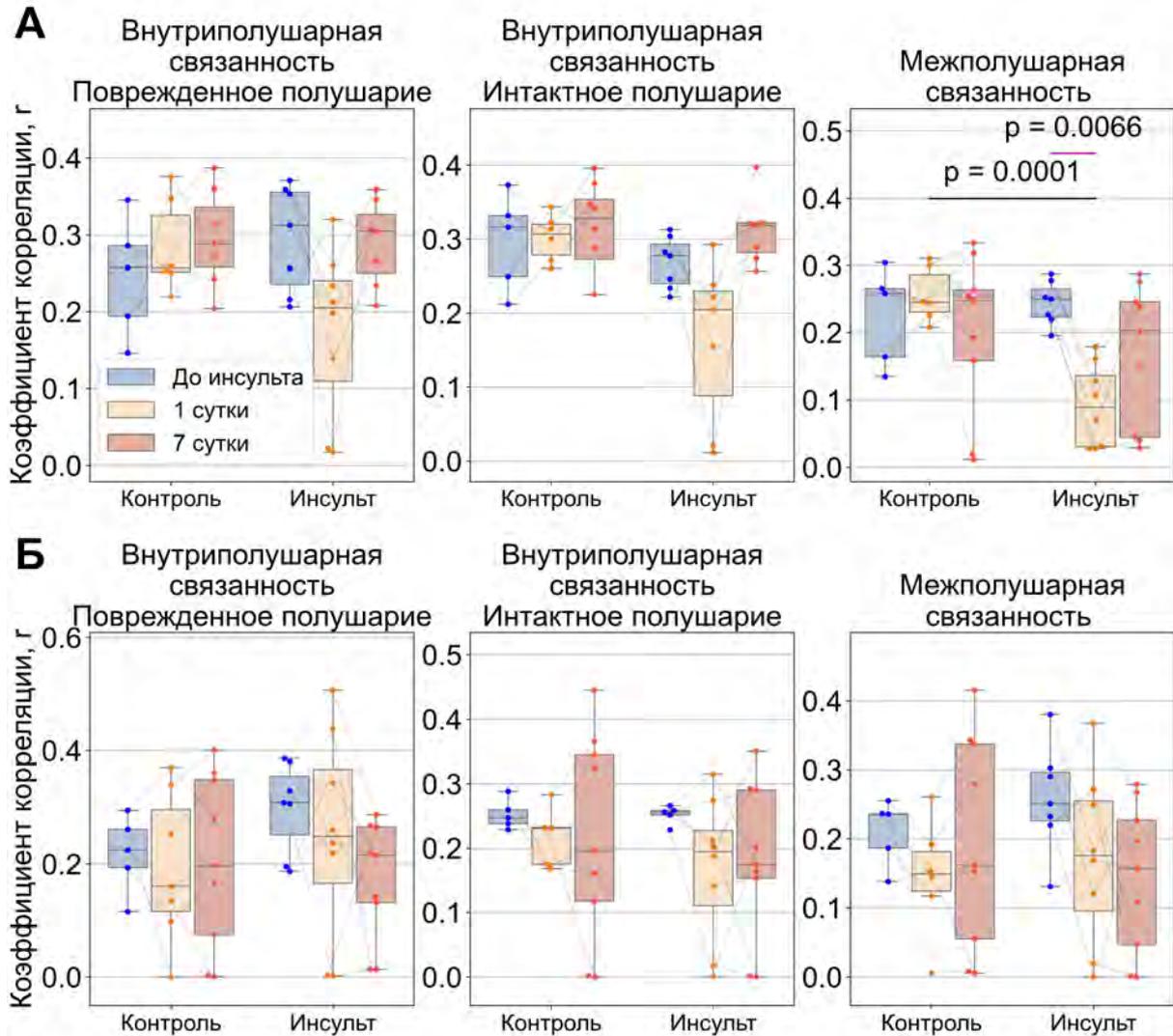


Рисунок 76. Изменения средних коэффициентов внутрислошарной и межполушарной связанности, определенной по Ca^{2+} -сигналу (А) и гемодинамическому сигналу (Б) в острый и подострый период после индукции инсульта. Mixed-ANOVA, rm-ANOVA /Friedman with post-hoc (Bonferroni) - розовая линия, Ttest/mwu - черная линия. N до удаления выбросов по правилу 1.5IQR : «контроль» = 9, «инсульт» = 9

Таким образом, из приведенных результатов видно, что с помощью ШОН можно отследить изменения в локализации вызванного ответа в коре, оценить нарушение

нейроваскулярного сопряжения, а также нарушения в функциональной связанности зон коры мозга.

3.4.5. Валидация регистрации внутриклеточного нейронального кальция в экспериментах на первичных нейроглиальных культурах *in vitro* в модели глутаматной эксайтотоксичности

В зоне поражения и окружающей ее пенумбре зарегистрированы аномально высокие концентрации межклеточного глутамата (Glu) [Malarkey, Parpura, 2008; Mehl et al., 1999]. Glu является не только основной свободной аминокислотой в цитозоле нейронов, но и служит агонистом ионотропных рецепторов, активация которых обеспечивает в нейрональной сети мозга свыше 40% передачи возбуждающих сигналов [Moroz et al., 2021]. Повышенные концентрации межклеточного Glu при инсульте вызывают гиперактивацию ионотропных рецепторов, преимущественно НМДА-типа, приводя к гибели нейронов [Duchen, 2012; Khodorov, 2004; Plotegher et al., 2021]. Исследования на нейроглиальных культурах показали, что Glu вызывает нарушения во внутриклеточных сигнальных путях, дисфункцию митохондрий, образование активных форм кислорода, нарушения работы генома, и другие биохимические аномалии. Ключевую роль в этих нарушениях играет Ca^{2+} , проникающий в нейроны в избыточном количестве по гиперактивированным Glu-управляемым каналам и влияющий на все упомянутые выше внутриклеточные процессы. На культурах из мозга показано, что первоначальный умеренный подъем внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) сменяется вторичным подъемом $[Ca^{2+}]_i$, названным отсроченной кальциевой дисрегуляцией (ОКД). Подъем $[Ca^{2+}]_i$ при ОКД способен достигать на продолжительное время (минуты) уровня сотен микромолей/литр [Khodorov, 2004].

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.

Мы оценили, как нейроны, выделенные из мышей, экспрессирующих GCaMP6f сенсор, отвечают на воздействие глутамата, в модели глутаматной эксайтотоксичности [Bakaeva et al., 2022; Duchen, 2012; Khodorov, 2004]. На **рисунке 77** продемонстрирована динамика изменения внутриклеточного Ca^{2+} , оцененная одновременно с помощью синтетического рейшиометрического флуоресцентного индикатора Fura 2 и при регистрации флуоресценции белкового сенсора GCaMP6f. Fura-2 является высоко аффинным индикатором и имеет константу диссоциации комплекса с Ca^{2+} $K_d=224$ нМ [Grynkiewicz et al., 1985], что соответствует аффинности комплексов GCaMP-белков с Ca^{2+} ($K_d = 100-400$ нМ) [Chen et al., 2013a]. 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 использованный в данной работе Fura-2, 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 et al., 2023]. Можно видеть (**рисунок 77**), что кальциевый белковый сенсор в первые секунды после начала действия глутамата увеличивает свою флуоресценцию, однако потом следует небольшое снижение и плато. Такого снижения мы не наблюдали в сигнале, зарегистрированном с помощью синтетического реишиометрического Ca^{2+} -индикатора Fura-2.

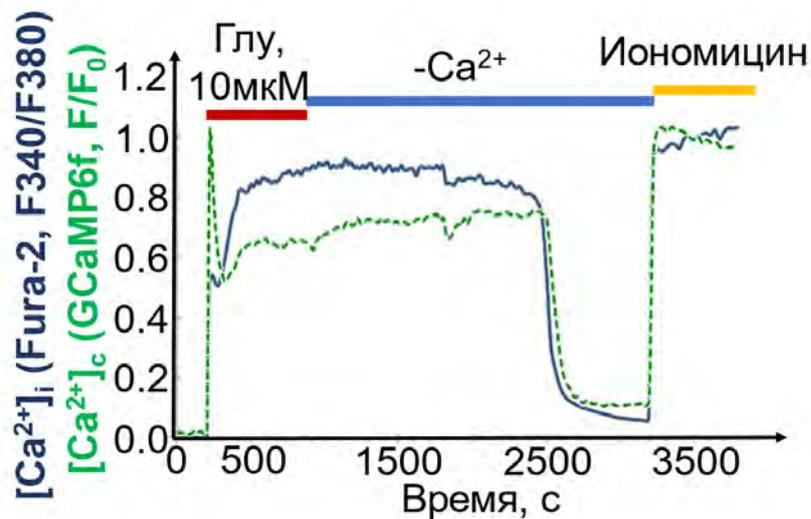


Рисунок 77. Изменения средней по клетке внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), в цитозоле ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) в нейронах первичной нейроглиальной культуры из кортекса мозга мыши. Возраст культуры 13 дней. Приведены графики для репрезентативного нейрона в котором за время действия глутамата (Glu, 10 мкМ) развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД). Нейрон экспрессирует GCaMP6f и одновременно нагружен синтетическим кальциевым индикатором Fura-2.

Уменьшение свечения типично для всех флуоресцентных сенсоров на основе GFP при падении pH ниже определенного порога, характерного для каждого сенсора [Chudakov et al., 2010]. Тушение, наблюдаемое нами в экспериментах *in vitro* (**рисунок 77**) происходит из-за закисления среды цитозоля нейронов при глутаматной эксайтотоксичности (**рисунок 78**) [Сурин et al., 2022]. Экспрессия флуоресцентного белкового pH-сенсора YFP в цитозоле культивируемых нейронов позволила показать, что при нейротоксическом действии глутамата в концентрации 20 мкМ pH цитозоля (pH_c) в культивируемых нейронах гиппокампа опускается ниже 6 [Surin et al., 2014]. Измерения закисления внутриклеточной среды в области очага инсульта *in vivo* в модели с блокадой средней мозговой артерии (MCAO - Middle cerebral artery occlusion) продемонстрировали снижение pH в среднем, на 0.55 единиц pH, до значения 6.7 ± 0.15 [Khranova

et al., 2023]. В переишемической области в используемой нами модели фототромбоза, менее суровой модели инсульта, чем МСАО, мы ожидаем меньшую выраженность ацидоза. При этом, как показали наши измерения, даже при значительном закислении внутриклеточной среды ($pH > 6$) при развитии отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД) тушение происходит не полностью (рисунок 77).

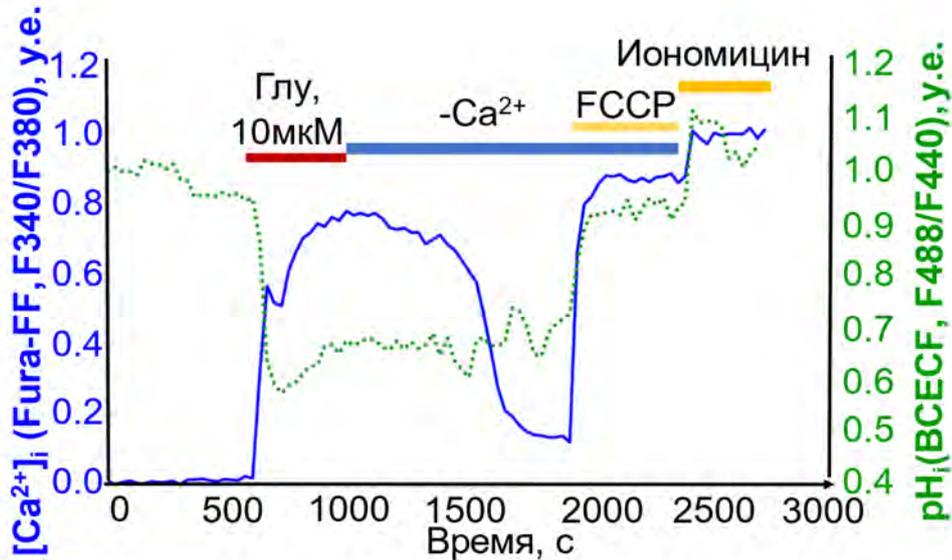


Рисунок 78. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и внутриклеточного pH (pH_i) в первичной нейроглиальной культуре из мозга мыши. Показаны $[Ca^{2+}]_i$ и pH_i сигналы представительной клетки, развилась ОКД через 2 мин после добавления Glu. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ (синяя сплошная линия) представлены левой шкалой ординат, изменения pH_i (зеленая точечная линия) – правой шкалой. Возраст культуры 14 дней.

Таким образом, мы показали, что сигнал GCaMP6f позволяет оценивать изменения $[Ca^{2+}]_c$ в переишемической области. Однако данный феномен стоит учитывать при интерпретации результатов с использованием GCaMP6f сенсора в областях с возможным значительным уменьшением внутриклеточного pH.

3.4.6. Определение размера очага повреждения при помощи ШОН у мышей линии Thy1-GCaMP6f

В течение нескольких минут после индукции фототромбоза в области воздействия лазера появляется область, где в клетках наблюдается кальциевая дисрегуляция и, соответственно, высокая интенсивность флуоресценции сенсора GCaMP6f. Таким образом, ШОН позволяет в хроническом эксперименте отслеживать динамику размера области очага повреждения (рисунок 79). Мы показали, что диаметр очага, определённый на 21 сутки после инсульта по анализу гистологических срезов, окрашенных по Нислю, статистически значимо коррелирует с

диаметром, определённым по области высокой флуоресценции кальциевого сенсора, зарегистрированного методом ШОН в первые минуты после индукции фототромбоза ($R^2 = 0.49$, $p = 0.35$).

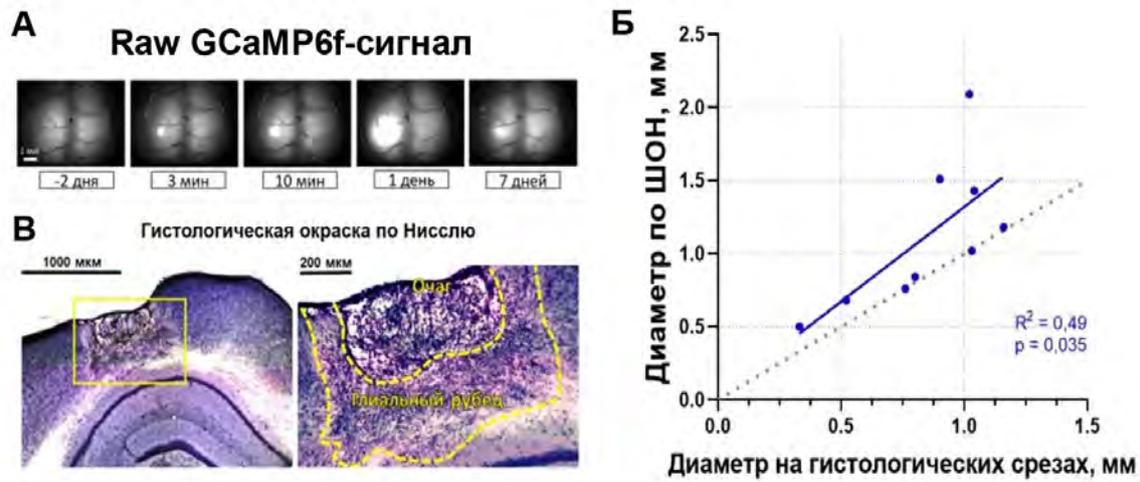


Рисунок 79. Размер ишемического очага в коре мозга мышей линии C57BL/6J-Tg, сформированного в результате фототромбоза. **А)** Сопоставление диаметра области инсульта, определенного по ШОН на 3 и 10 минуте после индукции фототромбоза, с диаметром инсульта, определенного по гистологическим срезам (корреляция Пирсона); **Б)** Репрезентативные флуоресцентные изображения поверхности коры больших полушарий, полученные методом ШОН для одной мыши; изображения представлены без обработки. **В)** Репрезентативное изображение среза мозга, окрашенного по Ниссля. (Опубликовано в [Кислухина et al., 2023]).

Размеры области с высоким уровнем флуоресценции изменяются, как в первые минуты после инсульта за счет вовлечения в кальциевую дисрегуляцию всё большего числа клеток, из-за развивающегося метаболического дефицита вследствие локального прекращения кровотока. Кроме того, на первые сутки после инсульта можно наблюдать значительное увеличение области с высокой флуоресценцией, что связано с развитием обширного отека ткани (**рисунок 80**).

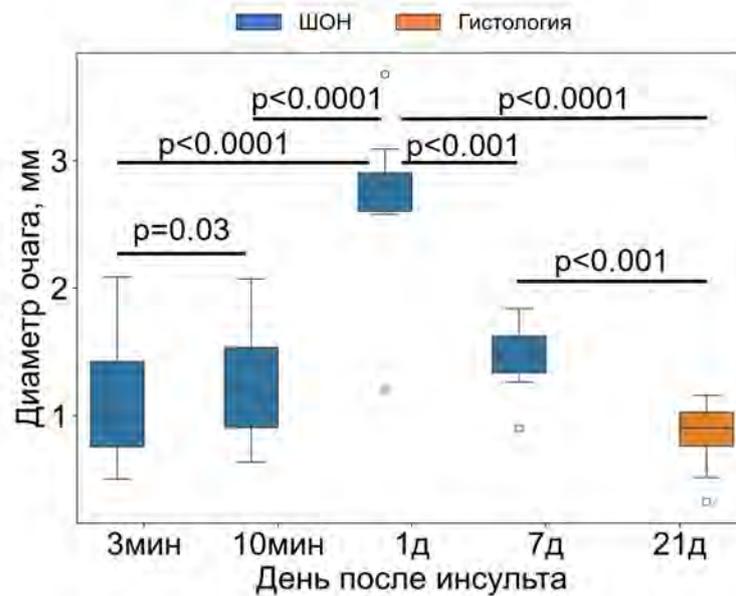


Рисунок 80. Динамика изменения размера ишемического очага, определенного методом ШОН и по гистологическим срезам, окрашенным по Нисслю, у мышей линии C57BL/6J-Tg. Rm-ANOVA с поправкой Бонферрони на множественные сравнения

ШОН позволяет оценить размер очага инсульта, а также оценить степень отека ткани. В дальнейшем мы проверили, как размер очага коррелирует с функциональными параметрами работы коры мозга, рассмотренными ранее.

3.4.7. Корреляция параметров активности мозга, определенных по ШОН, с размером ишемического очага у мышей линии Thy1-GCaMP6f

Мы проанализировали корреляцию всех рассмотренных ранее параметров с размером очага на разных периодах после инсульта. На **рисунке 81** представлены репрезентативные параметры, которые продемонстрировали статистически значимую среднюю или сильную корреляцию ($r > 0.6$) с размером очага инсульта у мышей линии Thy1-GCaMP6f.

Степень нарушения нейроваскулярного сопряжения в поврежденном полушарии на 7 дней имеет тенденцию к отрицательной корреляции с диаметром очага на 7 день после инсульта ($r = 0.6$, $p = 0.085$) (**рисунок 81 А**). Более того, коэффициент корреляции кальциевого и гемодинамического ответа в интактном полушарии на 7 сутки статистически значимо коррелирует с размером очага, определенным по гистологическим срезам на 21 сутки ($r = 0.67$, $p = 0.046$) (**рисунок 81 Б**), что может указывать на вовлечение компенсационных механизмов, а также патологическом растормаживании активности в интактном полушарии. Более низкому коэффициенту межполушарной корреляции на 7 сутки после инсульта соответствуют больший размер очага на 1 сутки после фототромбоза ($r = -0.68$, $p = 0.043$) (**рисунок 81 В**). Увеличение размера очага, наблюдаемое на 1 сутки после инсульта (**рисунок 80**) мы связываем с развитием

отёка ткани в этот период, таким образом степень развития отёка может служить прогностическим параметром для оценки последствий инсульта. Сделанный вывод согласуется с результатами МРТ-исследования отека у пациентов с инсультом [Battey et al., 2014].

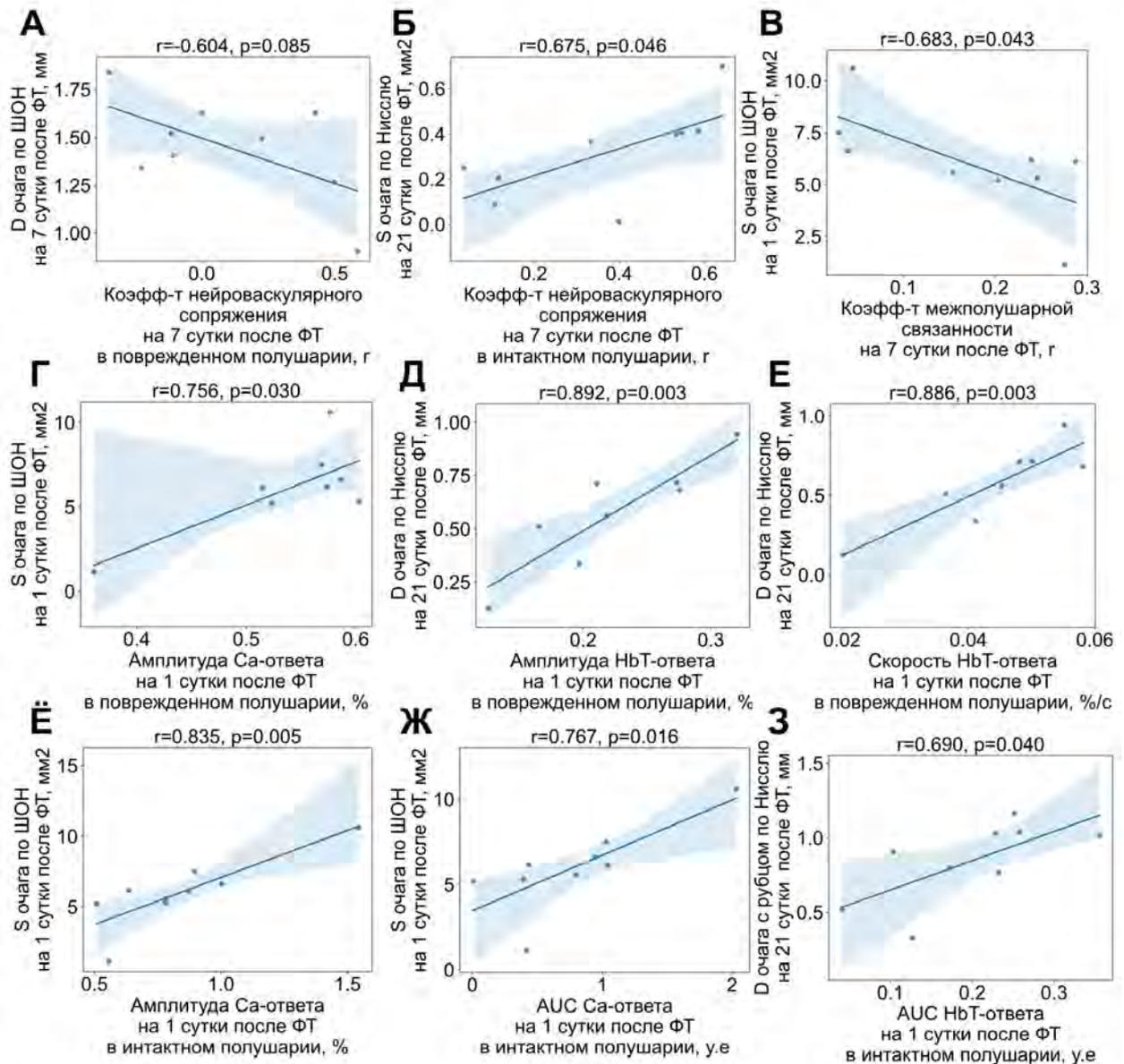


Рисунок 81. Корреляция параметров функционального ответа с оценкой размера очага повреждения. S – площадь, D – диаметр, AUC – площадь под кривой. r- коэффициент корреляции Пирсона. N мышей = 9.

Также мы показали, что различные параметры интенсивности ответа в коре на сенсорную стимуляцию статистически значимо коррелируют с размером очага (**рисунок 81 (Г-З)**). Более интенсивный ответ в коре на стимуляцию на 1 сутки после инсульта, как кальциевый, так и гемодинамический, соответствует большей площади поражения ткани. При этом, данный факт справедлив как для поврежденного, так и для интактного полушария. В основе такого явления, может быть растормаживание, вследствие повреждения коротких внутримушарных связей, так

и межполушарных связей в мозолистом теле за счет их сдавливания в результате развития отека на первые сутки после инсульта [Vice et al., 2022; Murphy, Corbett, 2009; Silasi, Murphy, 2014].

3.4.8. Корреляция параметров активности мозга, определенных по ШОН, со степенью сенсомоторного дефицита

Далее мы также оценили, насколько рассматриваемые нами параметры, коррелируют с проявлениями сенсомоторного дефицита, оцененного по количеству ошибочных постановок лап животного в тесте «Решетка» (рисунок 82).

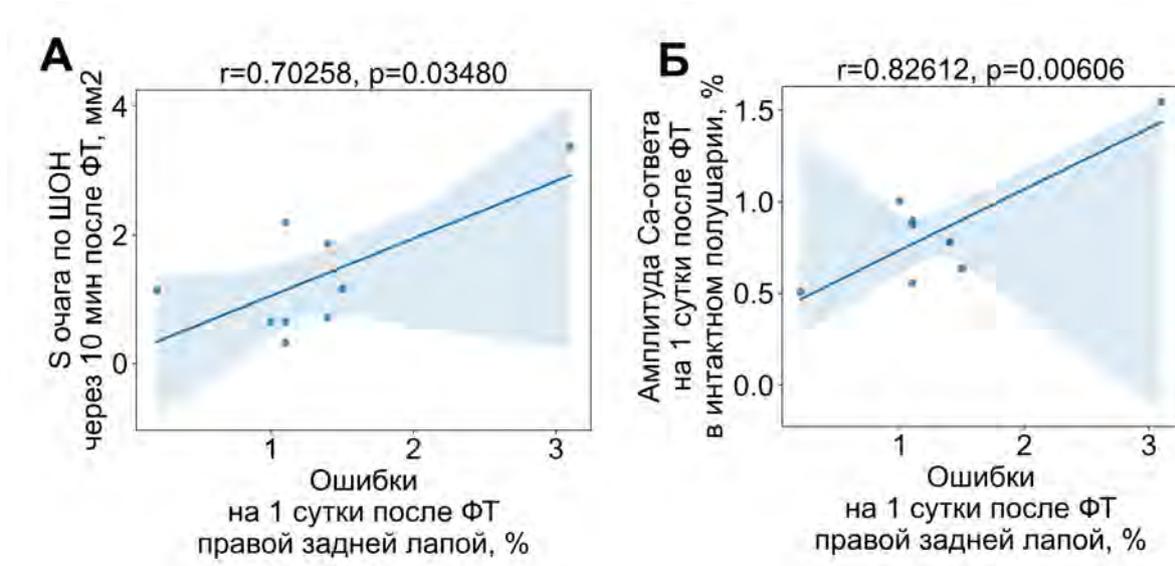


Рисунок 82. Корреляция параметров активности мозга, определенных по ШОН со выраженностью сенсомоторного дефицита у мышей линии C57BL/6J-Tg после фототромбоза. **А)** Корреляция площади очага, мм² определенный по ШОН через 10 мин после инсульта с процентом ошибочных постановок правой лапой в тесте «Решетка» на 1 сутки после инсульта. **Б)** Корреляция процента ошибочных постановок правой лапой в тесте «Решетка» на 1 сутки после инсульта с со средней амплитудой по кальциевому сигналу на первые сутки после фототромбоза в правом (интактном) полушарии при контралатеральной стимуляции.

Процент неправильных постановок правой задней лапы в тесте «Решетка», контралатеральной поврежденному полушарию, коррелирует с размером повреждения в первые минуты после инсульта ($r = 0.71$, $p = 0.035$) (рисунок 82 А).

Мы также обнаружили статистически значимую корреляцию интенсивности вызванного в интактном полушарии ответа по кальциевому сигналу ($r = 0.82$, $p < 0.01$) (рисунок 82 Б) с процентом ошибок правой задней лапой на 1 сутки после инсульта. Это подтверждает обнаруженную ранее закономерность, что более интенсивный ответ в коре на сенсорную

стимуляцию соответствует большей площади повреждения в коре, вызванного фототромбозом у мышей.

Таким образом, оценка размера ишемического очага у мышей с помощью ШОН, совпадает с результатами его анализа классическим гистологическим методом и коррелирует с тяжестью сенсомоторного дефицита. Метод ШОН может быть использован для наблюдения за динамикой повреждений коры мозга у мышей в хронических экспериментах, а также для оценки степени отёка ткани. Согласно нашим собственным экспериментальным данным и литературным источникам, область повышенной флуоресценции сохраняется вплоть до 14 дня после инсульта [Cramer et al., 2019].

Также мы показали, что такие параметры, как коэффициент нейроваскулярного сопряжения в здоровом и поврежденном полушарии, коэффициент межполушарной связанности на 1 сутки после инсульта, а также интенсивность кальциевого и гемодинамического ответа в коре на сенсорную стимуляцию коррелируют с размером повреждения и могут быть использованы в качестве прогностических параметров при оценке тяжести инсульта. Более того, интенсивность ответа в интактном полушарии коррелирует с сенсомоторным дефицитом у мышей. Однако, выявленные нами закономерности изменений у мышей при фототромбозе требуют дополнительных исследований, ввиду возможного влияния выбросов внутри ограниченной выборки на коэффициенты корреляции, а также наличия нелинейных взаимосвязей между параметрами.

3.5. Сопоставление тяжести инсульта и параметров активности мозга, регистрируемых трёхволновой системой ШОН у мышей линии Thy1-GCaMP6f

С целью оценки чувствительности к тяжести инсульта параметров активности коры мозга, регистрируемых ШОН, мы провели исследование, в котором моделировали две степени тяжести инсульта, варьируя дозу, вводимого в кровоток фотосенсибилизатора.

3.5.1. Влияние тяжести инсульта на локализацию вызванного ответа в коре на сенсорную стимуляцию конечности в остром периоде у мышей линии Thy1-GCaMP6f

Сначала мы оценили колокализацию области инсульта с зоной чувствительности задних лап (SSp-II) у животных со средним и тяжелым инсультом (**рисунок 83**). В группе со средним размером очага инсульта зона SSp-II находилась поблизости от очага инсульта, тогда как в группе с обширным инсультом очаг непосредственно затрагивал область чувствительности задних конечностей.

А

Б

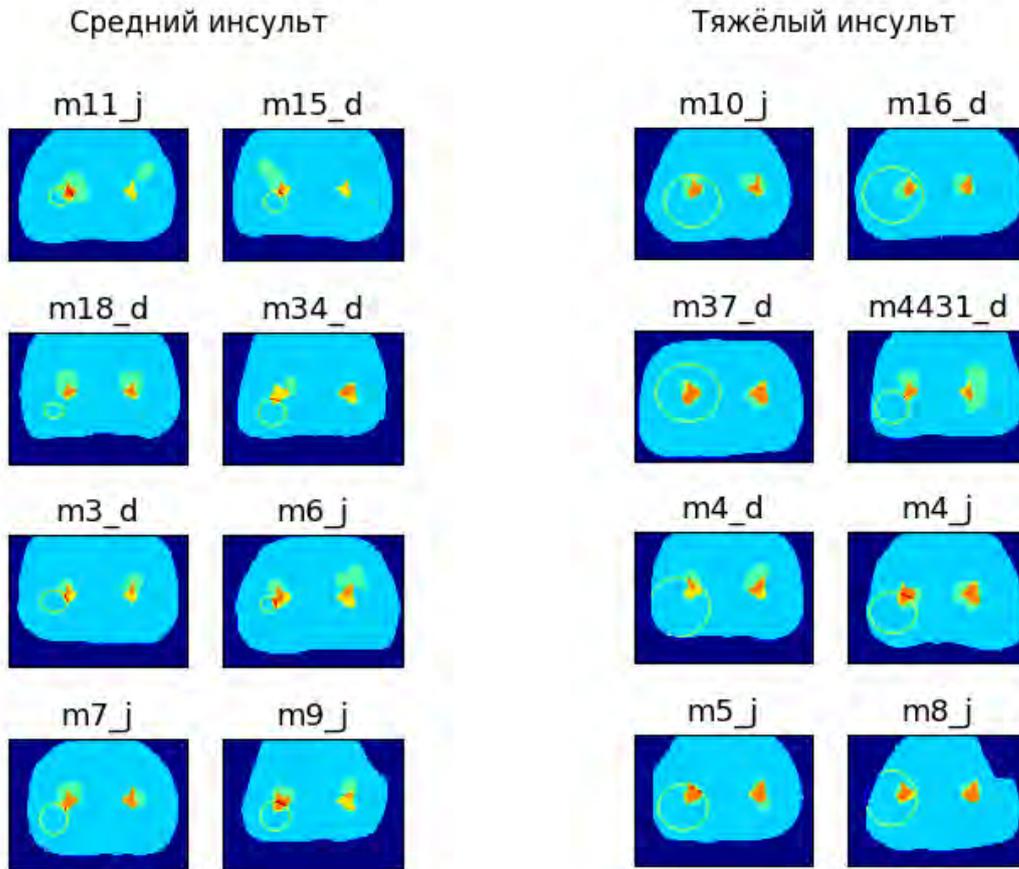


Рисунок 83. Колокализация областей индуцированного фототромбозом ишемического повреждения (Зеленый овал), ответа на сенсорную стимуляцию в норме (Зеленые области) и зоны чувствительности задних конечностей по атласу мозга мыши (SSp-II) (Желтая область). Перекрывающиеся области обозначены оранжевым светом. Над изображениями указаны индивидуальные номера мышей. А) Группа «Средний инсульт». Б) Группа «Тяжелый инсульт». Диаметр очага определен по области высокой флуоресценции GCaMP6f чрез 10 минут после индукции фототромбоза

Фотоиндуцированная ишемия приводила к снижению степени совпадения в локализации ответа по кальциевому и гемодинамическому сигналу между мышцами (**рисунок 84**). Данный эффект был наиболее заметен для группы «Тяжелый инсульт». Как по кальциевому, так и по гемодинамическому сигналу в ипсилатеральной стороне стимуляции полушарии увеличивалась частота активации соматосенсорной зоны. Это наблюдение согласуется с описанным в прошлой главе растормаживанием нейронных сетей.

А

Б

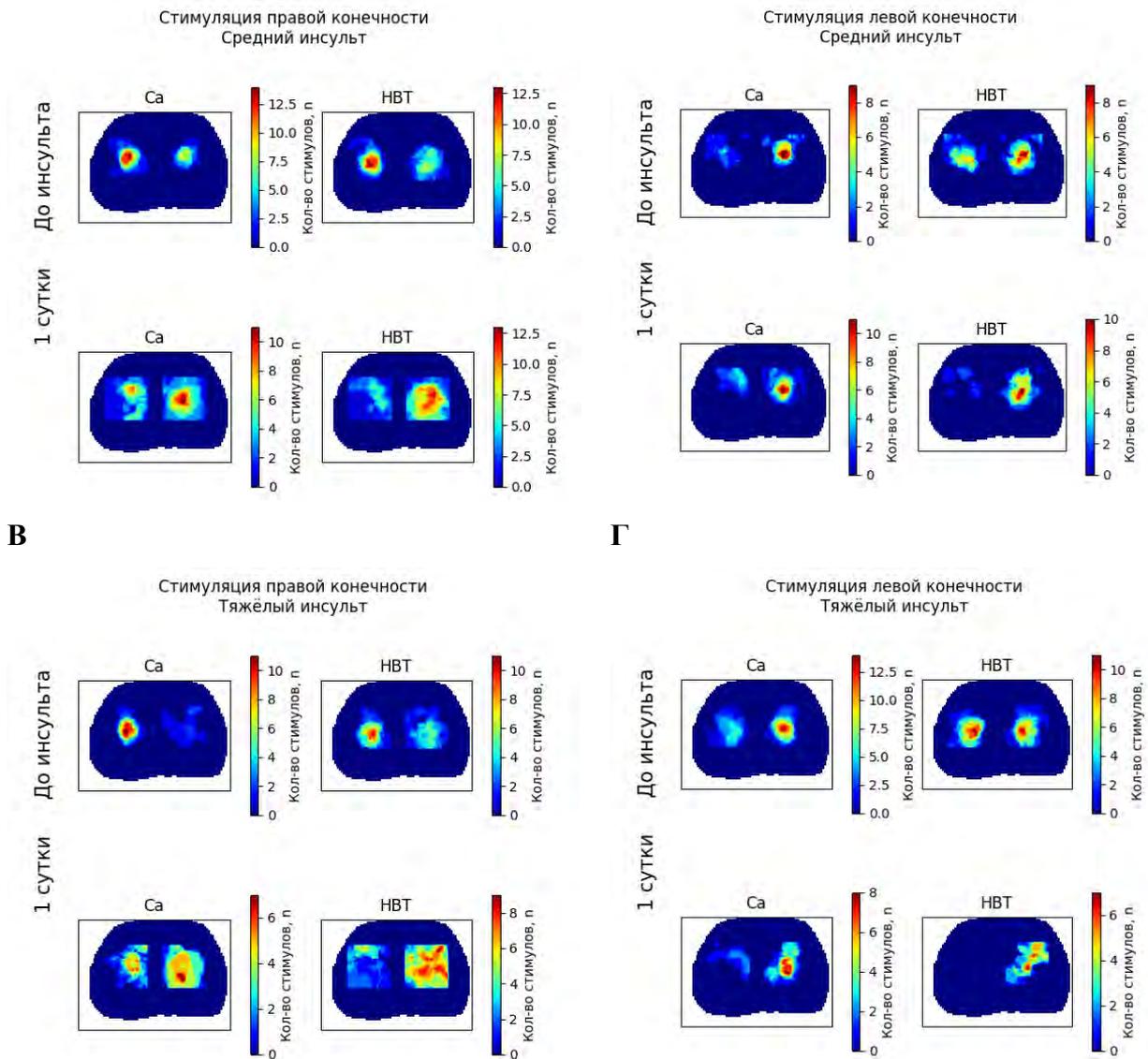


Рисунок 84. Пространственное представление ответа в коре на сенсорную стимуляцию для групп «средний» (А-Б) и «тяжелый» инсульт (В-Г). А-В) Контралатеральная стимуляция поврежденного полушария, Б-Г) контралатеральная стимуляция интактного полушария. Объединены данные для силы стимула 60 и 90 мкА. Фототромбоз во всех экспериментах индуцировали в левом полдшарии.

3.5.2. Влияние инсульта на параметры сенсорного ответа в коре в острый период у мышей линии Thy1-GCaMP6f

В норме в ответ на сенсорную стимуляцию задней конечности бодрствующего животного в соответствующей зоне коры мы наблюдали кальциевый и гемодинамический ответы, динамика которых соответствует описанной [Ma et al., 2016a]. На каждый стимул длительностью 200мс в контралатеральном стороне стимуляции полушарии мы наблюдали увеличение концентрации Ca^{2+} в области соматосенсорной коры, увеличение концентрации окисленного и суммарного гемоглобина (рисунок 85).

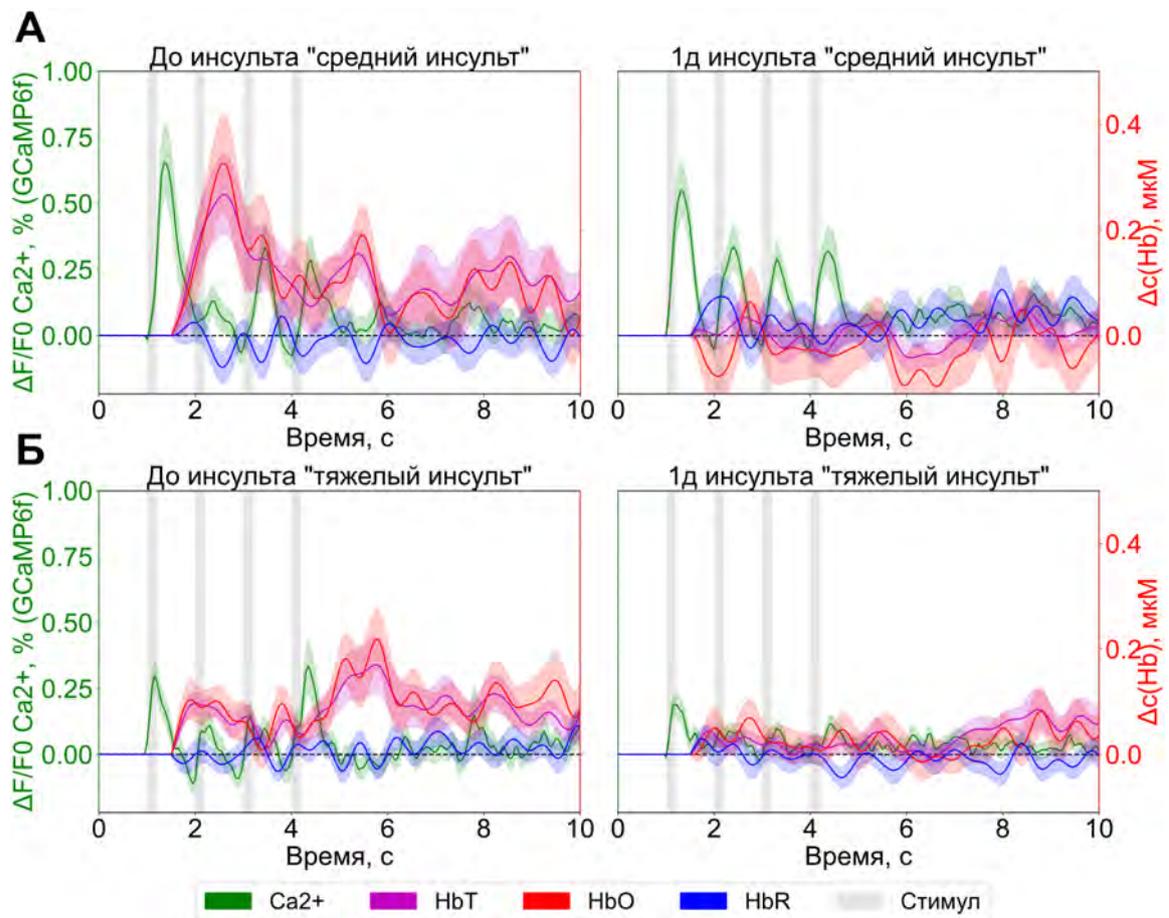


Рисунок 85. Изменения концентрации кальция, окисленной, восстановленной и суммарных форм гемоглобина в сенсомоторной области левого полушария в ответ на стимуляцию правой конечности у мышей линии Thy1-GCaMP6f до и на 1 сутки после инсульта в группе «средний инсульт» (А) и «тяжелый инсульт». Сила стимула 90 мкА. В усреднение взяты только стимулы, при которых отсутствовала локомоция. Произведено вычитание базовой активности мозга. Инсульт индуцировали в левом полушарии. Среднее \pm ст. ош.ср.

По усредненным графикам видно, что инсульт приводит к нарушению гемодинамического ответа как в группе со средней тяжестью инсульта, так и в группе животных с тяжелым инсультом.

С целью обнаружения наиболее чувствительных параметров мы провели анализ влияния тяжести инсульта на среднюю амплитуду кальциевого и гемодинамического сигналов, площади под кривой кальциевого и гемодинамического ответа, а также скорость изменения сигналов. Наиболее чувствительным параметром с точки зрения статистической достоверности различий оказался параметр «Амплитуда ответа» (**рисунок 86**). Нам не удалось обнаружить статистически значимых изменений в амплитуде проанализированных кальциевых ответов в поврежденном полушарии. Интересно, что по стимулу 60 мкА удалось обнаружить растормаживание в

интактном полушарии, инсульт вызывал увеличение ответа в контралатеральном полушарии на стимул силой 60 мкА (от $0.41 \pm 0.2\%$ до инсульта до $0,46 \pm 0.12\%$ на 1 сутки после инсульта, $p=0.0064$ (без учета деления на группы по тяжести инсульта)). Для расчета параметров усредняли только те стимулы, которые не сопровождались локомоцией. Отсутствие статистически значимых различий при более сильном стимуле может быть связано с уменьшением доли ответов без активной поведенческой реакции.

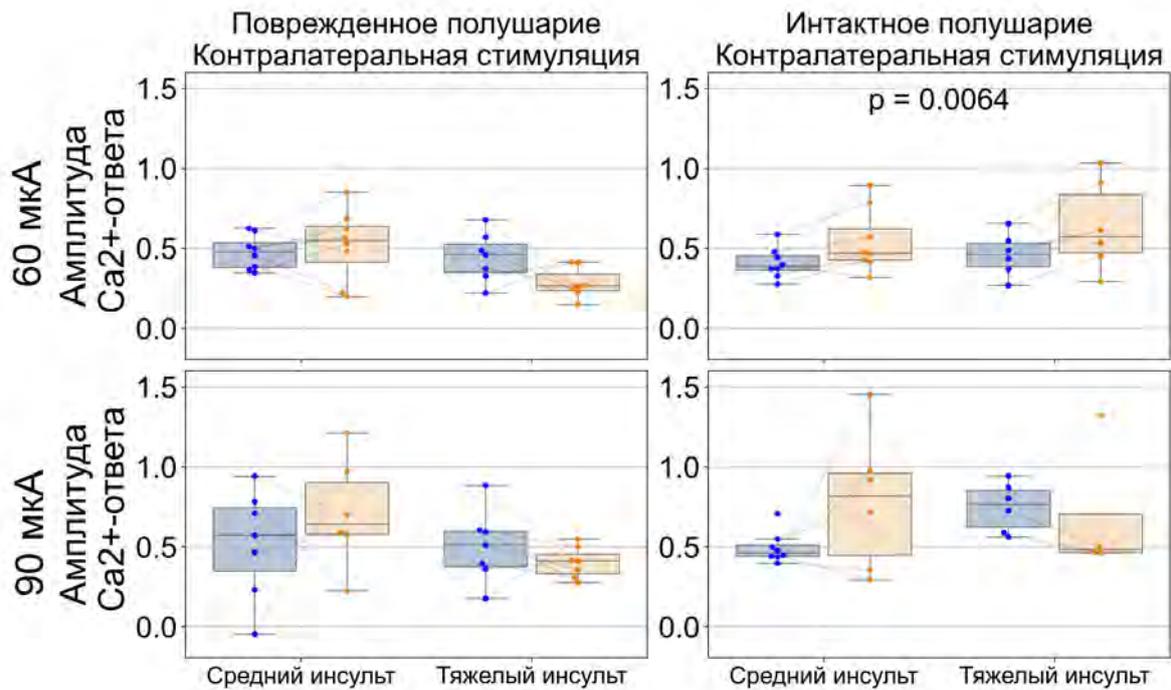


Рисунок 86. Амплитуда кальциевого ответа в коре на контралатеральную стимуляцию задней конечности до и после инсульта у мышей линии Thy1-GCaMP6f. Mixed ANOVA + paired t-Test. N до удаления выбросов по правилу 1.5IQR: «средний» = 8, N «тяжёлый» = 8.

На первые сутки после фототромбоза мы наблюдали снижение гемодинамического ответа в поврежденном полушарии, статистически значимое как для силы стимула 60мкА (от 0.38 ± 0.11 мкМ до 0.25 ± 0.08 мкМ, $p = 0.0014$ без разделения на группы по тяжести инсульта), так и для силы стимула 90 мкА (от 0.40 ± 0.11 мкМ до 0.24 ± 0.05 мкМ, $p = 0.0003$ без разделения на группы по тяжести инсульта) (**рисунок 87**). Также, как и для кальциевого ответа мы обнаружили увеличение ответа в интактном полушарии, статистически значимое в группе «тяжелый инсульт» для стимула силой 60 мкА (от 0.24 ± 0.06 мкМ до 0.43 ± 0.08 мкМ, $p = 0.0079$).

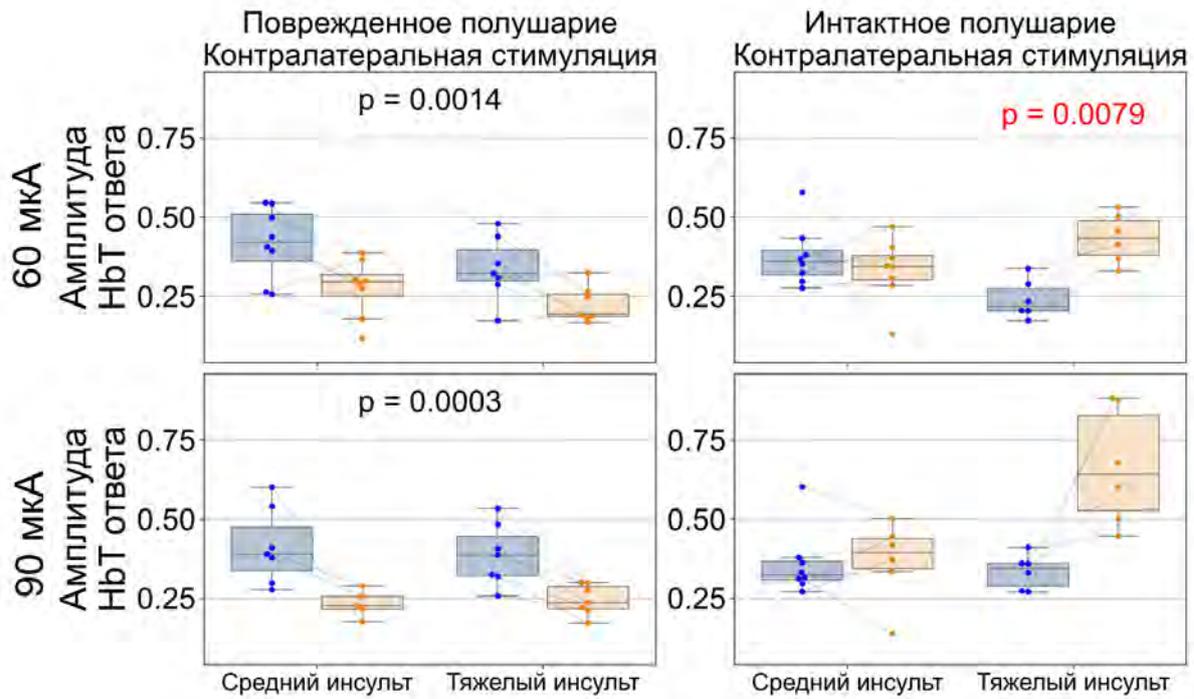


Рисунок 87. Амплитуда НbТ ответа в коре на контралатеральную стимуляцию задней конечности до и после инсульта у мышей линии C57BL/6J-Tg. Mixed ANOVA + paired t-Test. N до удаления выбросов по правилу 1.5IQR: «средний» = 8, N «тяжёлый» = 8. Красным обозначено p при значимом взаимодействии признаков в Mixed ANOVA.

Интерпретация параметров ответов на сенсорную стимуляцию бодрствующего животного требует особой осторожности, поскольку они характеризуются высокой вариабельностью из-за индивидуальных особенностей порога чувствительности у животных, крепления электродов, поведенческих реакций. В частности, на **рисунке 85** можно отметить разницу в амплитуде и «паттерне» усредненного ответа в группе «средний» и «тяжелый инсульт». Полученные нами данные, согласуются с проведенными ранее исследованиями влияния локомоции на параметры ответа на сенсорный стимул и активности коры мозга [Huo et al., 2015; West et al., 2022].

3.5.3. Влияние инсульта на нейроваскулярное сопряжение в коре в острый период

Соотношение кальциевого и гемодинамического ответа на сенсорную стимуляцию в меньшей степени зависит от поведенческой реакции и позволяет производить оценку нейроваскулярного сопряжения [Sunil et al., 2023]. Варьирование силы стимула и разброс поведенческих реакций позволили провести корреляционный анализ амплитуды гемодинамического и кальциевого ответа на сенсорную стимуляцию конечности в норме и на 1 сутки после инсульта (**рисунок 88**).

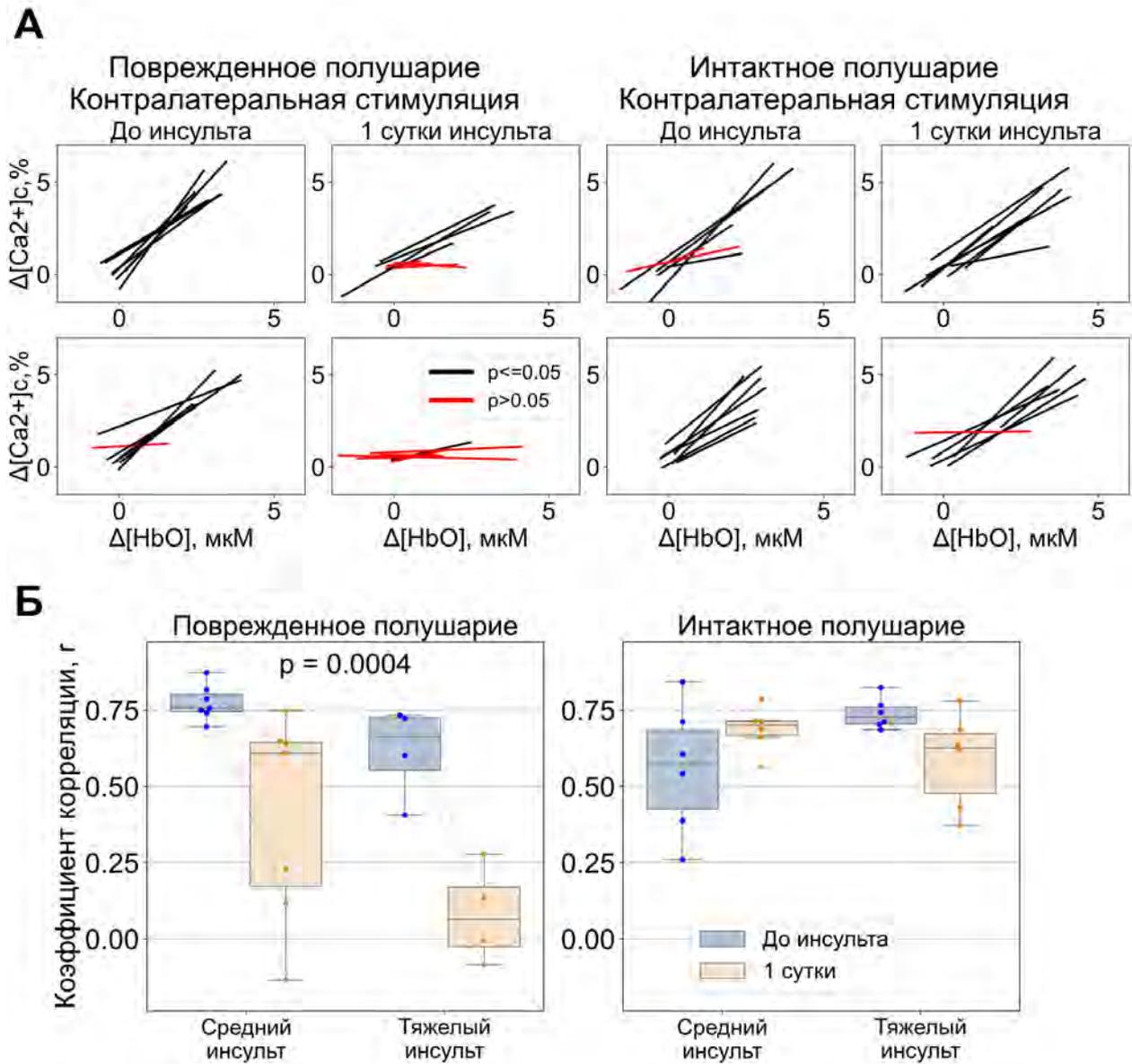


Рисунок 88. Влияние инсульта на нейроваскулярное сопряжение в остром периоде у мышей линии Thy1-GCaMP6f. Корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре, вызванного сенсорной стимуляцией контралатеральной конечности бодрствующих мышей в поврежденном (А) и интактном (Б) полушариях. Линейная регрессия построена по всем ответам вне зависимости от силы стимула и поведения; каждая линия представляет одну мышь. В) Сравнение коэффициентов корреляции амплитуды кальциевого и гемодинамического ответа в соматосенсорной коре. Mixed ANOVA + paired t-Test. N до удаления выбросов по правилу 1.5IQR: «средний» = 8, N «тяжёлый» = 8. Красным обозначено p при значимом взаимодействии признаков в Mixed ANOVA.

Инсульт приводил к снижению коэффициента корреляции между амплитудами изменений концентрации суммарного гемоглобина и кальция 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 ($p=0.0004$).

Дополнительно мы провели анализ взаимной корреляции кальциевого и гемодинамического спонтанного сигнала коры мозга бодрствующих животных в состоянии покоя. Перед проведением анализа данные отфильтровали, оставив полосу частот от 0.02-2 Гц, как указано в статьях [Ma et al., 2016b; Wang et al., 2024].

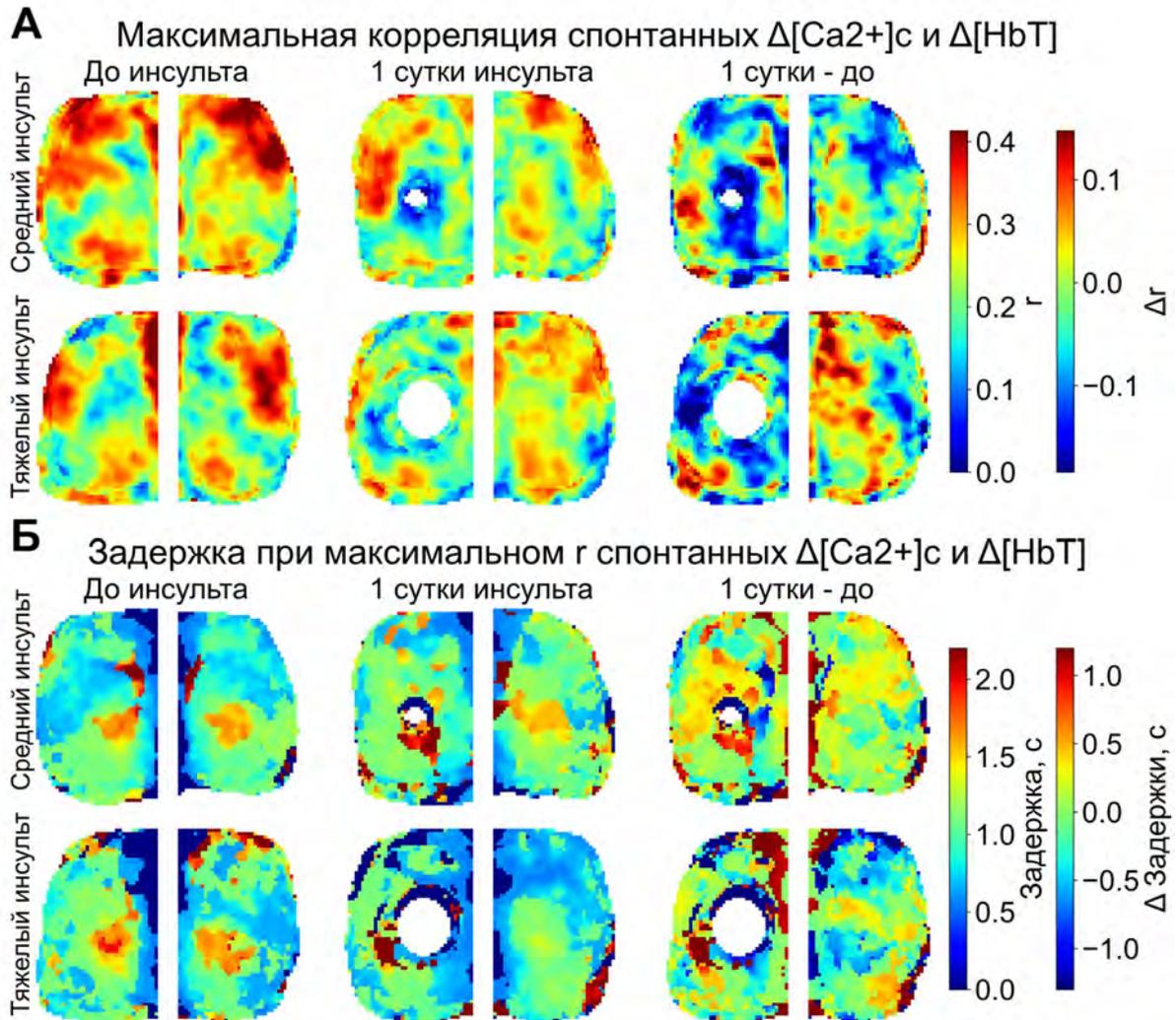


Рисунок 89. Карты параметров взаимной корреляции $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$. А) Максимальная корреляция $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ до инсульта, на 1 сутки и разница между днями. Б) Задержка $\Delta[HbT]$ относительно $\Delta[Ca^{2+}]_c$ в точке максимальной взаимной корреляции. Для получения карт усреднены данные от 7 животных, по 3ем участкам записи длиной 15 с. Очаг инсульта при усреднении не учитывали (белая область в левом полушарии после инсульта)

Среднее значение по всей коре максимума взаимной корреляции в норме составило 0.28 ± 0.08 . Задержка гемодинамического сигнала относительно кальциевого составила 0.87 ± 0.72 с,

что согласуется с литературными данными [Ma et al., 2016b; Wang et al., 2024]. При этом величина максимального коэффициента взаимной корреляции варьировала от области (**рисунок 89**). Так, например, области соматосенсорной коры демонстрировали более низкие значения максимальной взаимной корреляции $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$, чем области моторной коры. Наблюдаемые различия могут быть связаны с тем, что сигналы были зарегистрированы у бодрствующего животного и несмотря на удаление участков записей активности мозга, сопровождавшихся активной локомоцией, нельзя гарантировать отсутствие менее активных поведенческих реакций.

Инсульт приводит к снижению максимальной взаимной корреляции и изменениям в задержке между $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ в областях вблизи очага в поврежденном полушарии. Изменения наблюдаются и в более отдаленных от зоны повреждения областях, в том числе и в интактном полушарии.

Для оценки статистической значимости наблюдаемых изменений мы выделили зоны, соответствующие области пенумбры, определенной по МРТ, в поврежденном и интактном полушарии, а также область, симметричную области очага в интактном полушарии. В выделенных областях мы усреднили результаты анализа взаимной корреляции и оценили изменение величины максимальной корреляции и задержки после инсульта (**рисунок 90**). Инсульт приводил к статистически значимому снижению на 1 сутки значения максимальной корреляции в области пенумбры от 0.24 ± 0.04 до 0.17 ± 0.08 без учета группы по тяжести инсульта ($p = 0.0009$). В группе «средний инсульт» статистически значимо на 1 сутки после инсульта увеличивалась задержка $\Delta[HbT]$ относительно $\Delta[Ca^{2+}]_c$ в области пенумбры в поврежденном полушарии от 0.81 ± 0.19 с до 1.24 ± 0.39 с ($p = 0.046$).

В норме, на картах задержки $\Delta[HbT]$ относительно $\Delta[Ca^{2+}]_c$ можно отметить область, соответствующую париетальной коре (области VISa, VISrl и VISal), которые характеризуются наиболее высокими значениями задержки гемодинамического сигнала (**рисунок 89 Б**), что согласуется с литературными данными [Wang et al., 2024]. Особенности в параметрах нейроваскулярного сопряжения в данных областях связывают с различиями в плотности сосудистой сети, а также с метаболическими процессами [Kannurpatti et al., 2015; Wang et al., 2024]. Показано, что наиболее активно работающие зоны коры в первую очередь используют гликолиз для восполнения энергетических субстратов, как наиболее быстрый процесс, а затем окислительное фосфорилирование [Carroll et al., 2022; Wang et al., 2024].

«Тяжёлый инсульт» вызывал статистически значимое снижение задержки $\Delta[HbT]$ относительно $\Delta[Ca^{2+}]_c$ в области интактного полушария, симметричной области пенумбры (от 1.07 ± 0.06 с до 0.65 ± 0.06 с ($p = 0.002$)). Данная область частично совпадает с париетальной корой, выделявшейся в норме высокими значениями задержки гемодинамического сигнала.

Наблюдаемые изменения могут указывать на нарушения метаболических процессов и их распространение за пределы поврежденного полушария.

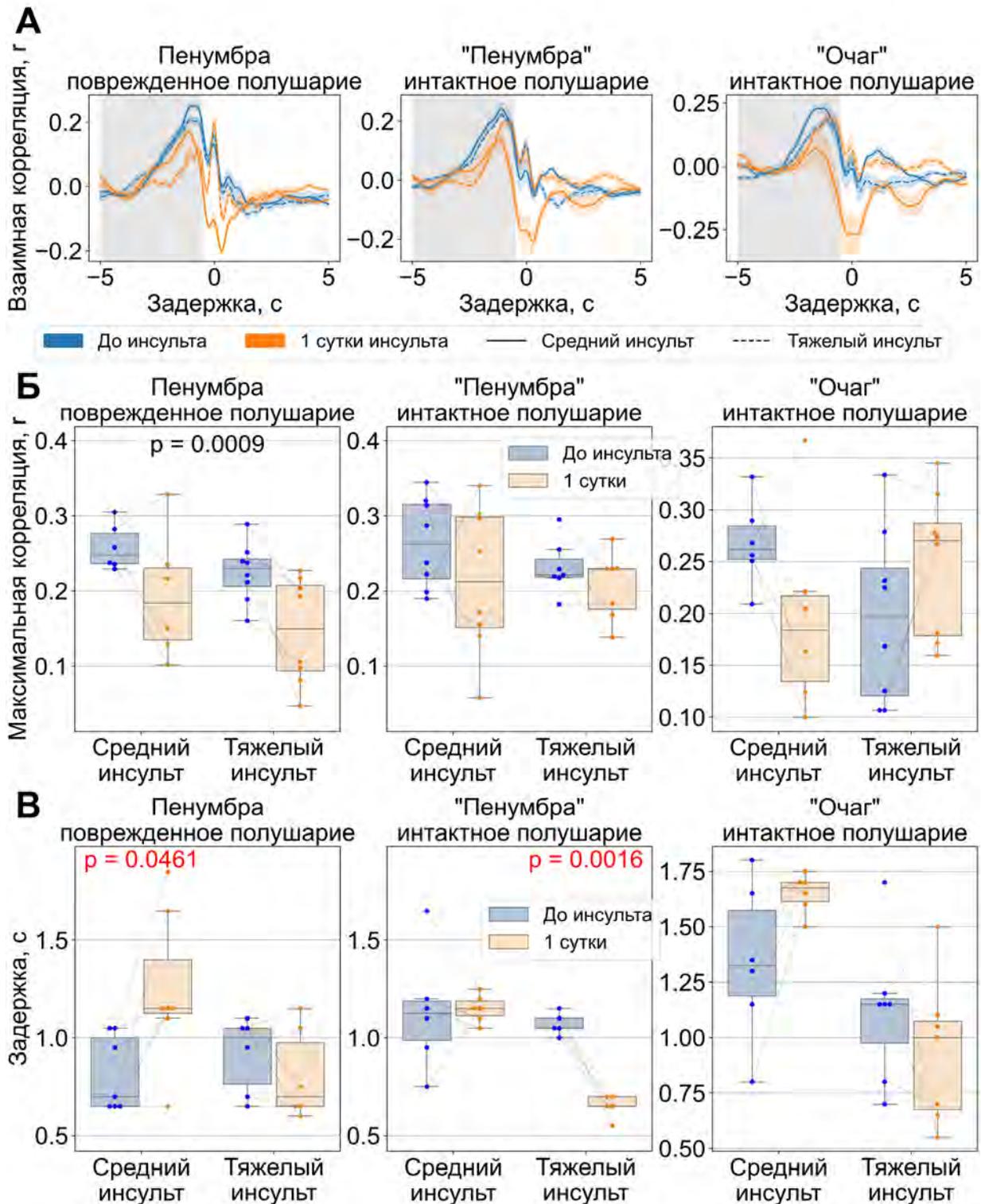


Рисунок 90. Результаты анализа взаимной корреляции $\Delta[\text{HbT}]$ и $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$. А) Изменение вида функции взаимной корреляции $\Delta[\text{HbT}]$ и $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ в области пенумбры поврежденного полушария, областях в интактном полушарии, симметричных пенумбре и очагу повреждения. Среднее по минимум 5 животным. Серой областью обозначен

участок, где определяли максимальную корреляцию **Б**) Влияние степени инсульта на коэффициент максимальной взаимной корреляции. Статистические тесты и усреднение коэффициентов r проводили после z -преобразования Фишера. **В**) Задержка между $\Delta[\text{HbT}]$ и $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$. Mixed-ANOVA, paired-ttest, $n = 5 - 8$ (1.5 IQR -тест). Черным цветом обозначено p -значение без деления на группы по тяжести инсульта, красным – при статистически значимом взаимодействии факторов и делении на группы по тяжести инсульта.

Таким образом, наблюдаемые нарушения параметров нейроваскулярного сопряжения спонтанной активности мозга подтверждают результаты, полученные нами в экспериментах с оценкой нейроваскулярного сопряжения при сенсорной стимуляции.

3.5.4. Влияние инсульта на функциональную связанность зон коры у мышей линии Thy1-GCaMP6f

Был проведен анализ функциональной связанности зон мозга при спокойном бодрствовании животного (5-ти минутные записи спонтанной активности с удаленными участками активной локомоции) до и после инсульта (**рисунок 91**). По матрицам корреляции кальциевого сигнала видно, что паттерн активности коры изменяется на 1 сутки после инсульта, при том более выражены такие изменения при тяжелом инсульте. Снижается сила корреляции гомологичных областей в противоположных полушариях.

Мы изучили возможность применения усредненных коэффициентов корреляции внутри каждого полушария и между полушариями для оценки тяжести инсульта. Тяжелый инсульт вызывал снижение внутрислошарной связанности в поврежденном полушарии, (от 0.4 ± 0.12 до 0.47 ± 0.14 , $p=0.0046$). Инсульт также приводил к увеличению усредненного коэффициента корреляции в интактном полушарии на первые сутки после инсульта (от 0.4 ± 0.07 до 0.51 ± 0.16 , $p=0.0136$ без учета деления на группы по тяжести инсульта). Фотоиндуцированная ишемия приводила к снижению межполушарной корреляции (от 0.41 ± 0.07 до 0.31 ± 0.11 , $p=0.0144$), при этом тяжелый инсульт вызывал более выраженное снижение данного параметра (от 0.41 ± 0.05 до 0.21 ± 0.04 , $p=0.0032$). Такое снижение межполушарной связанности, может указывать на повреждение аксонов в мозолистом теле, в результате развития отека в острейшем периоде инсульта в модели фототромбоза [Uzdensky, 2018]. Нарушение межполушарных связей сопровождается эффектом растормаживания контралатеральных зон [Boddington, Reynolds, 2017]. Растормаживание нейронных контуров в ипсилатеральном поврежденном полушарии наблюдают как в клинике, так и в моделях на животных [Boddington et al., 2020; Volz et al., 2015]. При этом выраженность растормаживания и изменения активности удаленных от очага инсульта областей мозга влияет на процессы нейропластичности при восстановлении [Bice et al., 2022;

Boddington, Reynolds, 2017]. Методы оценки растормаживания полезны для тестирования терапевтических подходов для лечения инсульта.

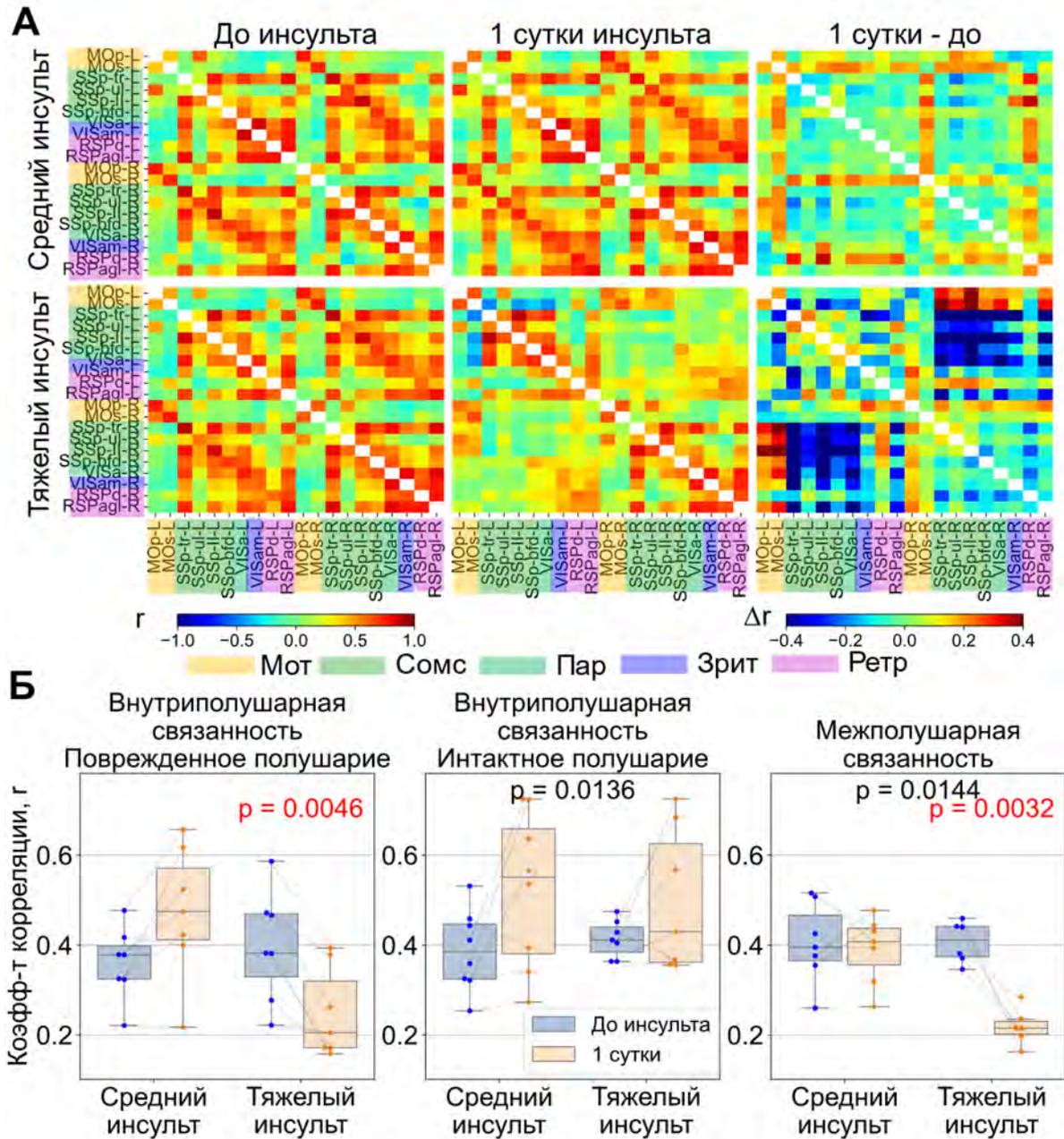


Рисунок 91. Матрицы корреляции Ca^{2+} сигнала между анатомическими зонами коры у бодрствующих мышей в спокойном состоянии до и после фототромбоза в группах «Средний инсульт» и «Тяжелый инсульт» (А). Б) Изменение коэффициентов глобальной связанности зон коры у мышей линии Thy1-GCaMP6f. Mixed ANOVA + paired t-Test. N до удаления выбросов по правилу 1.5IQR: «средний» = 8, N «тяжёлый» = 8. Красным обозначено p при значимом взаимодействии признаков в Mixed ANOVA..

Для оценки региональных различий в параметрах функциональной связанности гомологичных зон полушарий мы построили карты гомотопической корреляции (рисунок 92). В

норме в покое гомологичные (симметричные) зоны полушарий активируются синхронно, что выражается в положительной корреляции сигналов гомологичных зон, как по кальциевому, так и по гемодинамическому сигналу. При этом у бодрствующего животного в спокойном состоянии гомотопическая корреляция по $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ наиболее высока для соматосенсорной (кроме области чувствительности вибрисс), ретроспленальной, вторичной моторной коры. Низкие коэффициенты корреляции в остальных областях можно объяснить невозможностью гарантировать истинно покойное состояние животного, даже при удалении участков записи с активной локомоцией [Xie et al., 2020]. При этом коэффициенты корреляции $\Delta[\text{HbT}]$ гомологичных областей выше, чем кальциевые, но характеризуются высокими разбросами. При построении функциональных карт по $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ мы использовали частотную фильтрацию в общепринятом для ШОН и кальциевого имиджинга диапазоне частот от 0.7 до 3 Гц [Brier et al., 2019]. Гемодинамический сигнал анализировали в каноническом для фМРТ исследований диапазоне частот от 0.009 – 0.08 Гц, а также после применения фильтра низких частот с границей 0.25 Гц. В результате, полученные при анализе $\Delta[\text{HbT}]$ в обоих диапазонах совпадали, поэтому в дальнейшем представлены результаты в основном для диапазона 0.009 – 0.08 Гц.

Инсульт приводит к нарушению синхронности работы гомологичных зон на первые сутки после инсульта не только в областях, непосредственно прилегающих к инсульту, но и в отдалённых участках, что более заметно на усреднённых картах гомотопической корреляции $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ и $\Delta[\text{HbT}]$ в группе «Тяжелый инсульт» (**рисунок 92 А, Б**). На первые сутки после инсульта статистически значимо снизился усредненный коэффициент гомотопической корреляции $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ в области пенумбры, при этом данный параметр чувствителен к тяжести инсульта (p взаимодействия = 0.00987, снижение в группе «тяжелый инсульт» с 0.37 ± 0.09 до 0.06 ± 0.15 , $p = 0.0047$) (**рисунок 92 В**). Также снизился усредненный коэффициент гомотопической корреляции $\Delta[\text{HbT}]$ без учета разделения на группы по тяжести инсульта пенумбры (от 0.61 ± 0.18 до 0.22 ± 0.29 , $p = 0.0004$) (**рисунок 92 В**).

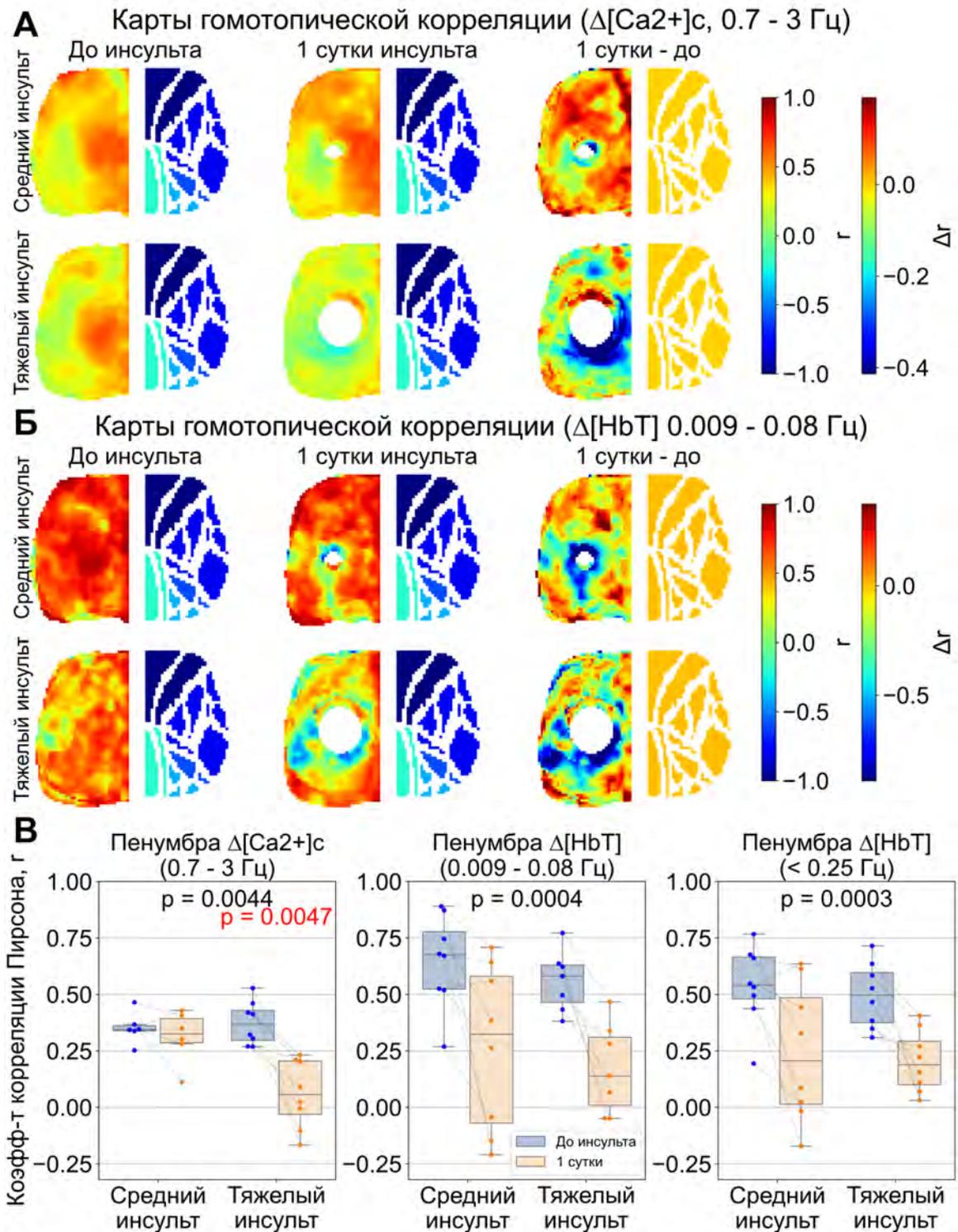


Рисунок 92. Влияние инсульта на корреляцию сигналов гомологичных зон полушарий. Карты гомотопической корреляции $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ (0.7 - 3 Гц) (А) и $\Delta[\text{HbT}]$ (0.009 – 0.08 Гц) (Б) до инсульта и на первые сутки, а также разница 1 сутки – до. Карты симметричны, поэтому продемонстрирована только левая половина. Область очага при расчете не учитывалась (белый участок). Справа представлена схема расположения основных областей коры (5 градации синего цвета, от темного: 1) моторная кора, 2) соматосенсорная, 3) париетальная, 4) зрительная, 5) ретроспленальная). Б) Влияние

степени инсульта на гомотопическую корреляцию в области пенумбры. Статистические тесты и усреднение коэффициентов r проводили после z-преобразования Фишера. Mixed-ANOVA, paired-ttest, $n = 5 - 8$ (1.5 IQR -тест). Черным цветом обозначено p -значение без деления на группы по тяжести инсульта, красным – при статистически-значимом взаимодействии факторов и делении на группы по тяжести инсульта.

Чтобы более детально проанализировать различия не только в области пенумбры, но и в областях, удаленных от очага инсульта, мы сравнили усредненные по основным анатомическим областям коры коэффициенты гомотопической корреляции (**рисунок 93**).

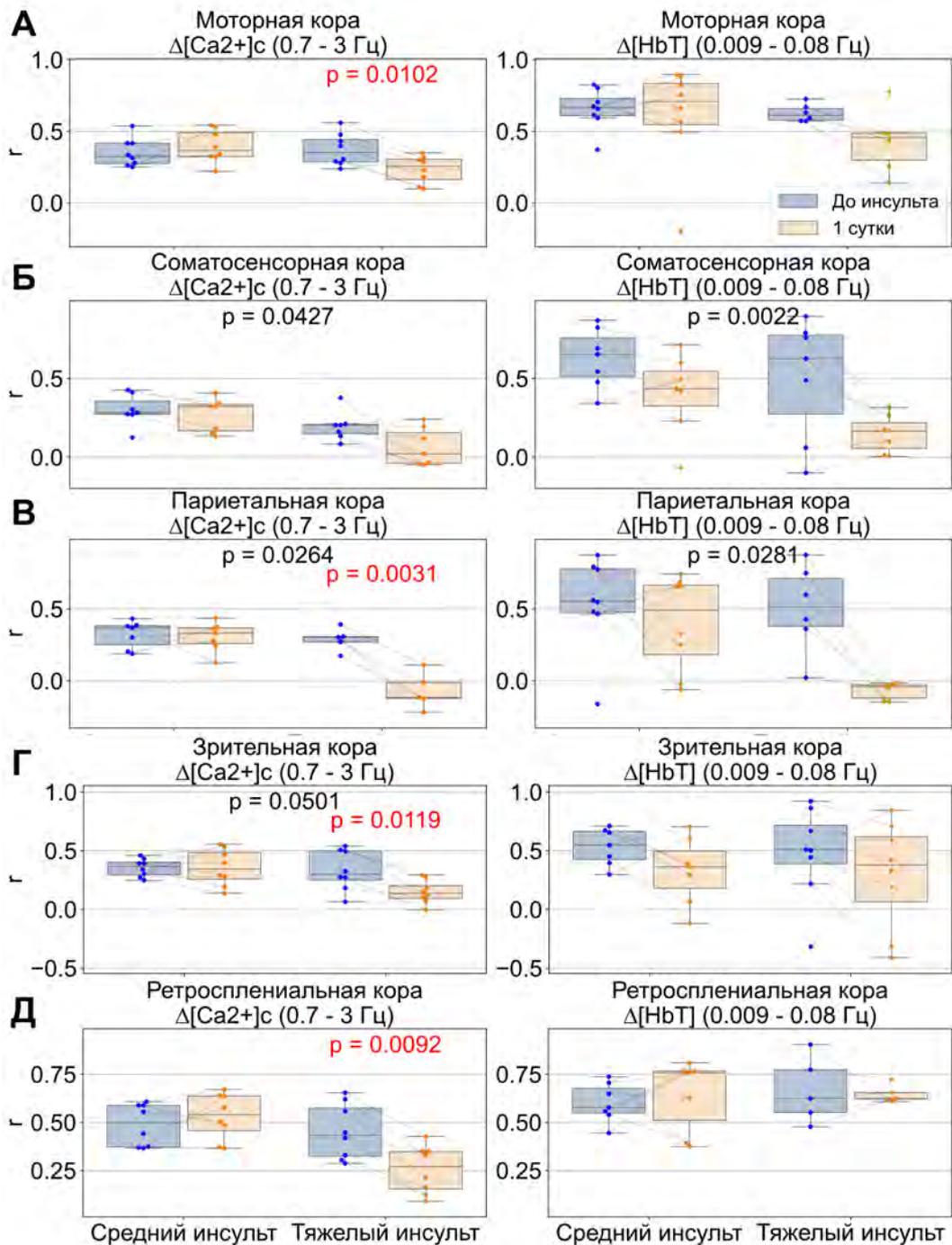


Рисунок 93. Влияние инсульта разной степени тяжести на усредненную гомотопическую корреляцию $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ в основных анатомических зонах. А) Моторная кора. Б) Соматосенсорная кора. В) Parietalная кора. Г) Зрительная кора. Д) Ретроспленальная кора. Статистические тесты и усреднение коэффициентов r проводили после z -преобразования Фишера. Mixed-ANOVA, paired-ttest, $n = 5 - 8$ (1.5 IQR -тест). Черным цветом обозначено p -значение без деления на группы по тяжести инсульта, красным – при статистически-значимом взаимодействии факторов и делении на группы по тяжести инсульта. Области инсульта очага инсульта при расчете значений не учитывались.

Статистически значимое снижение гомотопической связанности наблюдали по кальциевому и гемодинамическому сигналу в области соматосенсорной коры, т.е. в зоне непосредственной локализации инсульта. При усреднении значений корреляции между симметричными пикселями, пиксели в области инсульта не учитывали ни до, ни на 1 сутки после инсульта. Для $\Delta[Ca^{2+}]_c$ значение усредненного по соматосенсорной коре коэффициента гомотопической корреляции снизилось с 0.25 ± 0.11 до 0.17 ± 0.15 ($p = 0.0427$, без деления на группы по тяжести инсульта). Аналогично для $\Delta[HbT]$ рассматриваемый коэффициент снизился с 0.56 ± 0.30 до 0.28 ± 0.23 ($p = 0.0022$) (**рисунок 93 Б**). Для гемодинамического сигнала значимое снижение наблюдали также в париетальной коре (с 0.52 ± 0.30 до 0.20 ± 0.34 ($p = 0.0281$)). По $\Delta[Ca^{2+}]_c$ удалось обнаружить изменения и в большем числе зон. Так на первые сутки после инсульта синхронность работы гомологичных участков нарушилась в моторной (с 0.37 ± 0.11 до 0.23 ± 0.10 , $p = 0.0102$) и ретроспленальной коре (с 0.45 ± 0.14 до 0.25 ± 0.12 , $p = 0.0092$) при тяжелом инсульте. В париетальной и зрительной коре наблюдали статистически значимое снижение параметра гомологичной связанности при тестировании значимости без деления на тяжесть инсульта ($p = 0.0264$ и $p = 0.05$ соответственно), но наиболее числительными параметрами оказались для группы с тяжелым инсультом париетальной (с 0.29 ± 0.08 до -0.07 ± 0.13 , $p = 0.0031$), зрительной (с 0.33 ± 0.17 до 0.15 ± 0.10 , $p = 0.0119$) (**рисунок 93**).

Мы также оценили глобальную связанность различных областей мозга по кальциевому сигналу в норме и на первые сутки после инсульта (**рисунок 94**). Количество связей для каждого пикселя, рассчитывали как сумму коэффициентов корреляций с другими пикселями коры мозга, значение которых превышало 0.7 и было статистически значимым ($p < 0.055$). В норме наибольшее число связей было характерно для соматосенсорной области коры. На первые сутки после инсульта мы наблюдали статистически значимое увеличение количества связей в областях интактного полушария, симметричных очагу повреждения (с 27 ± 7 до 41 ± 16 , $p = 0.0124$, без деления на группы по тяжести инсульта). Это говорит о растормаживании данных зон на первые

сутки после инсульта, которые мы наблюдали и по увеличению амплитуды ответа на сенсорную стимуляцию в интактном полушарии.

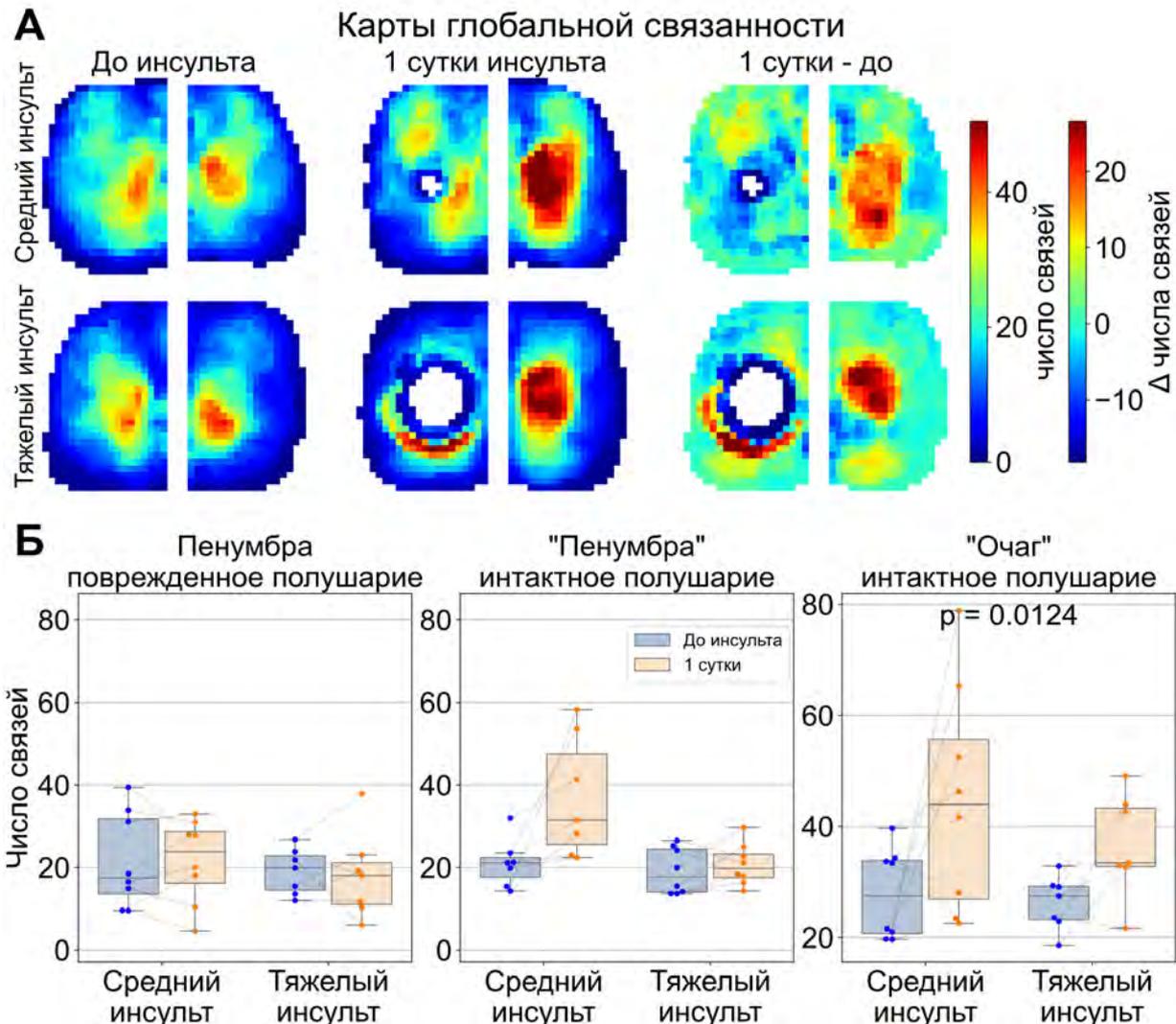


Рисунок 94. Влияние инсульта на глобальную связанность коры больших полушарий. Карты глобальной связанности $\Delta[Ca^{2+}]_c$ (0.7 - 3 Гц) (А) до инсульта и на первые сутки, а также разница 1 сутки – до. Метод определения числа связей см. в тексте. Б) Влияние инсульта на глобальную связанность коры больших полушарий в области пенумбры. Mixed-ANOVA, paired-ttest, $n = 5 - 8$ (1.5 IQR -тест). Черным цветом обозначено р-значение без деления на группы по тяжести инсульта.

Более детальный анализ различий глобальной связанности в основных анатомических зонах показал, что изменения, выражающиеся в статистически значимом увеличении числа связей, затронули моторную (с 12 ± 13 до 14 ± 23 , $p = 0.0237$), соматосенсорную (с 18 ± 5 до 28 ± 8 , $p = 0.0025$), париетальную (с 19 ± 10 до 32 ± 19 , $p = 0.0303$) и зрительную кору (с 18 ± 10 до 27 ± 17 , $p = 0.048$) (**рисунок 95**). Различий в степени изменения числа связей между группами с разной тяжестью инсульта выявлено не было.

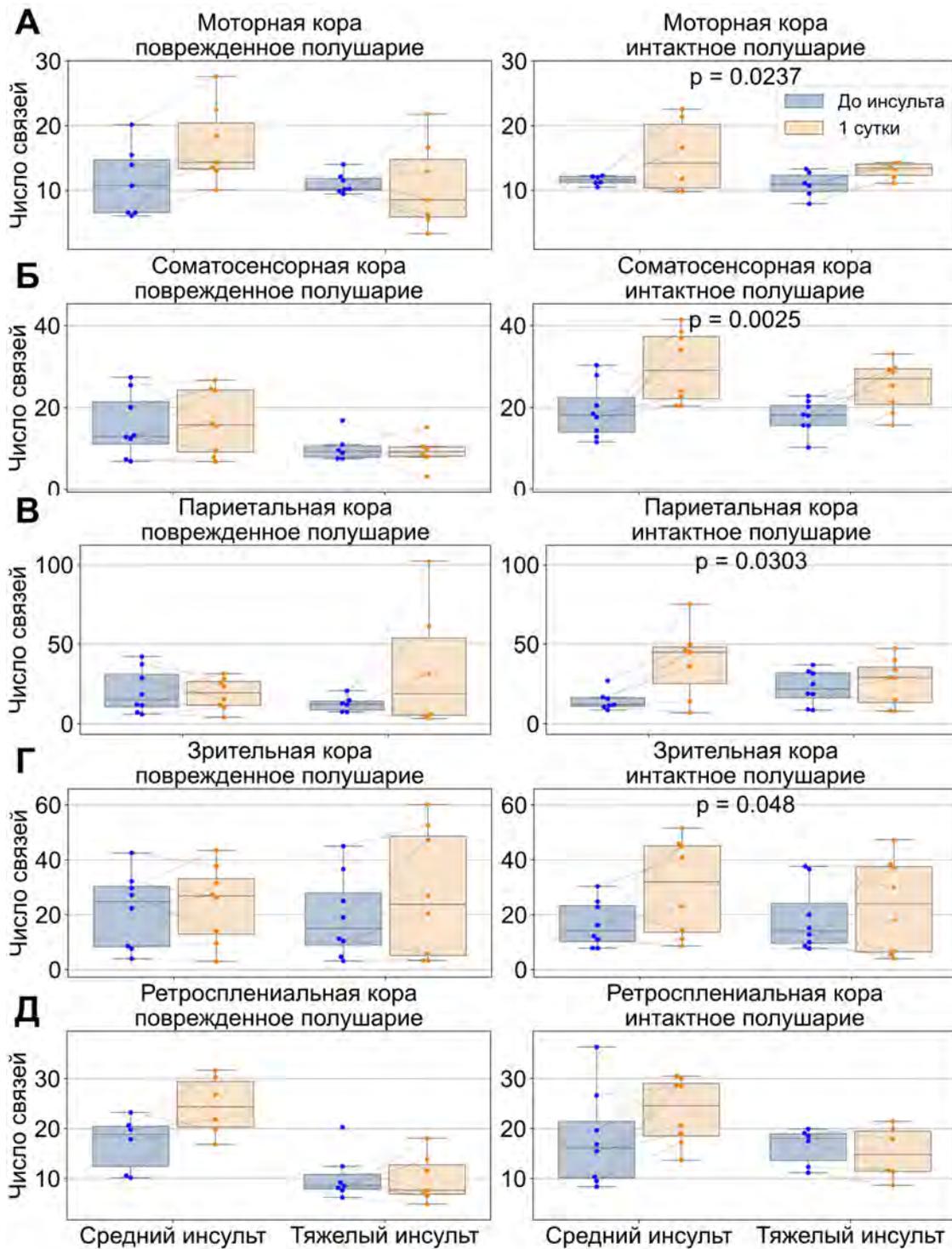


Рисунок 95. Влияние инсульта разной степени тяжести на глобальную связанность $\Delta[Ca^{2+}]_c$ в основных анатомических зонах. А) Моторная кора. Б) Соматосенсорная кора. В) Parietalная кора. Г) Зрительная кора. Д) Ретроспленальная кора. Mixed-ANOVA, paired-t-test, $n = 5 - 8$ (1.5 IQR -тест). Черным цветом обозначено p -значение без деления на группы по тяжести инсульта. Области инсульта очага инсульта при расчете значений не учитывались.

Таким образом мы показали, что результаты исследования функциональной связанности методом ШОН, могут быть использованы для оценки последствий фототромбоза. На первые сутки после инсульта в области пенумбры снижается корреляция $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ и $\Delta[\text{HbT}]$ гомологичных пикселей в области вокруг очага, при этом кальциевый сигнал чувствителен к тяжести инсульта. Оценка гомологичной связанности по $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ позволяет обнаружить различия в отдаленных от очага инсульта областях. Более того, исследование методом ШОН глобальной связанности позволили зарегистрировать изменение в функционировании нейронных сетей в интактном полушарии. Это важно при оценке восстановления функций коры мозга, поскольку показано, что эффективность восстановления нормальной работы утраченных функции зависит от степени изменения работы гомологичных областей в симметричном полушарии [Vice et al., 2022]. Vice и соавт. установила, что оптогенетическая стимуляция одноименной зоны в здоровом полушарии возвращению к норме функциональной связанности мозга. Однако в исследовании Vice и соавт. регистрировали только гемодинамический сигнал, связь которого с нейрональной активностью в остром период инсульта может нарушаться вследствие нарушения процессов нейроваскулярного сопряжения. Мы в свою очередь показали, что методом ШОН можно зарегистрировать увеличение связанности по кальциевому сигналу в областях интактного полушария, симметричных очагу повреждения в остром периоде инсульта.

Мы также продемонстрировали, что несмотря на возможности изучения индивидуальных различий отдельных регионов, даже более простая оценка межполушарной связанности по усредненному коэффициенту внутри матриц корреляции является показательным параметром для оценки последствий инсульта и чувствительна к его тяжести. Данный параметр может быть использован для «грубой» оценки функциональных изменений в коре мозга при тестировании терапевтических подходов.

3.5.5. Особенности оценки размера ишемического очага методами ШОН и МРТ у мышей линии Thy1-GCaMP6f

Мы оценили, насколько точно методом ШОН можно определить размер очага по сравнению с таким традиционно используемым методом, как МРТ (**рисунок 96**).

Диаметр очага на первые сутки после фототромбоза, измеренный по области высокой флуоресценции сенсора GCaMP6f (**рисунок 96Б, слева**), составил 1.09 ± 0.34 мм и 3.16 ± 0.73 мм для группы «средний» и «тяжелый инсульт» соответственно, различия между группами статистически значимы ($p < 0.00001$). Похожие результаты были получены при измерении диаметра очага при помощи МРТ (диаметр очага в группе «средний инсульт» был равен 1.09 ± 0.34 мм, диаметр очага в группе «тяжелый инсульт» составил 2.81 ± 0.8 мм ($p < 0.0001$) (**рисунок 96А**). Диаметр очага, оцененный методом ШОН, высоко коррелировал с диаметром очага,

оцененным методом МРТ ($r = 0.86, p < 0.0001$) (рисунок 96В). Кроме того, площадь очага инсульта, оцененная по изображениям ШОН, коррелировала с относительным числом ошибок в тесте «Решетка» ($r = 0.69, p = 0.014$) (рисунок 96Г), что подтверждает возможность использования данного параметра для оценки тяжести инсульта.

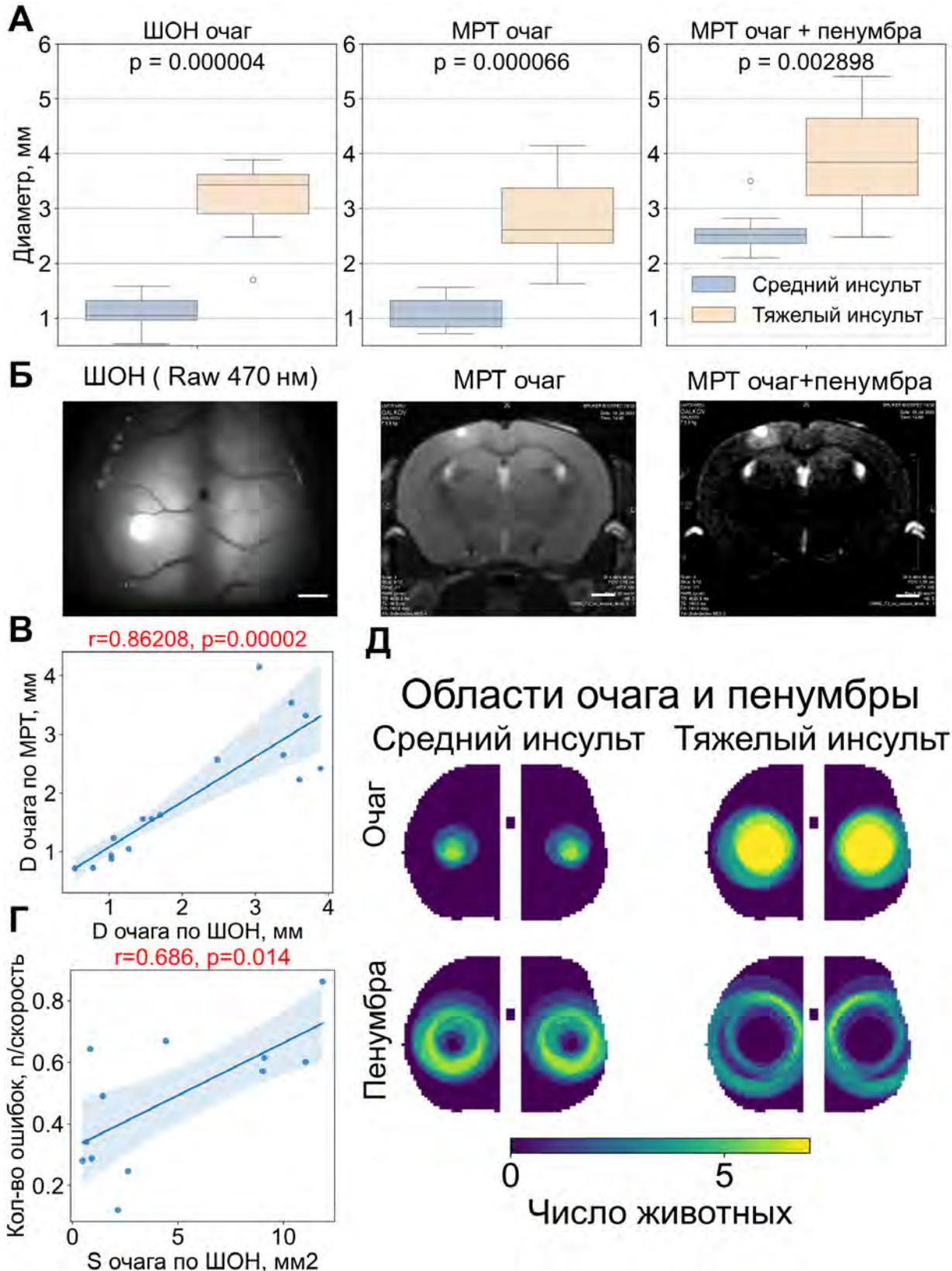


Рисунок 96. Измерение размеров очага инсульта при помощи ШОН и МРТ. **А)** Сравнение диаметров очага, определенных методом ШОН и МРТ. Непарный t-test, $n = 8$. **Б)** Репрезентативное изображение ШОН, которое использовали для оценки размера очага, и репрезентативные МРТ сканы в стандартном T2 режиме и с увеличенным TE для оценки области пенумбры. Масштабная линия равна 1 мм. **В)** Корреляция между диаметром очага, определенным ШОН и диаметром очага, определенным по МРТ. **Г)** Корреляция между площадью очага, определенной по ШОН и относительным количеством ошибок в тесте «Решетка» на 1 сутки после инсульта. **Д)** Определенные по МРТ сканам области пенумбры, суммированные для разных животных.

МРТ сканирование в режиме с увеличенным до 100мс TE (время появления эхо-сигнала) позволило более четко выделить область пенумбры – области вокруг очага инсульта с измененными характеристиками (**рисунок 96Б, справа**). Значения диаметра очага вместе с зоной пенумбры составили 2.59 ± 0.43 мм и 3.93 ± 0.96 мм для групп «средний» и «тяжёлый инсульт» соответственно ($p < 0.01$) (**рисунок 96А, справа**). Оценка области пенумбры методом МРТ позволила рассчитать расположение области пенумбры на изображениях ШОН (**рисунок 96Д**). Данные области были использованы для дифференцированной оценки параметров активности коры мозга в поврежденных и относительно здоровых участках коры мозга.

Таким образом, размер очага, измеренный методом ШОН, является адекватной оценкой размера повреждения. Однако МРТ позволяет дополнительно оценить размер пенумбры и глубину повреждения.

3.5.6. Корреляция параметров активности коры мозга, определенных по ШОН, с размером очага и сенсомоторным дефицитом

Далее мы проверили, какие функциональные параметры, измеренные методом ШОН в исследовании с моделированием двух степеней тяжести инсульта, коррелируют с размером очага.

В данном исследовании оценку нейроваскулярного сопряжения производили как по корреляции амплитуды $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ в соматосенсорной коре в ответ на сенсорную стимуляцию, так и с помощью анализа взаимной корреляции спонтанных $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ у бодрствующих мышей в состоянии покоя. Статистически значимая умеренная отрицательная корреляция был обнаружена между амплитудой Ca^{2+} - и HbT- ответа на сенсорный стимул в поврежденном полушарии и размером очага ($r = -0.535$, $p = 0.049$).

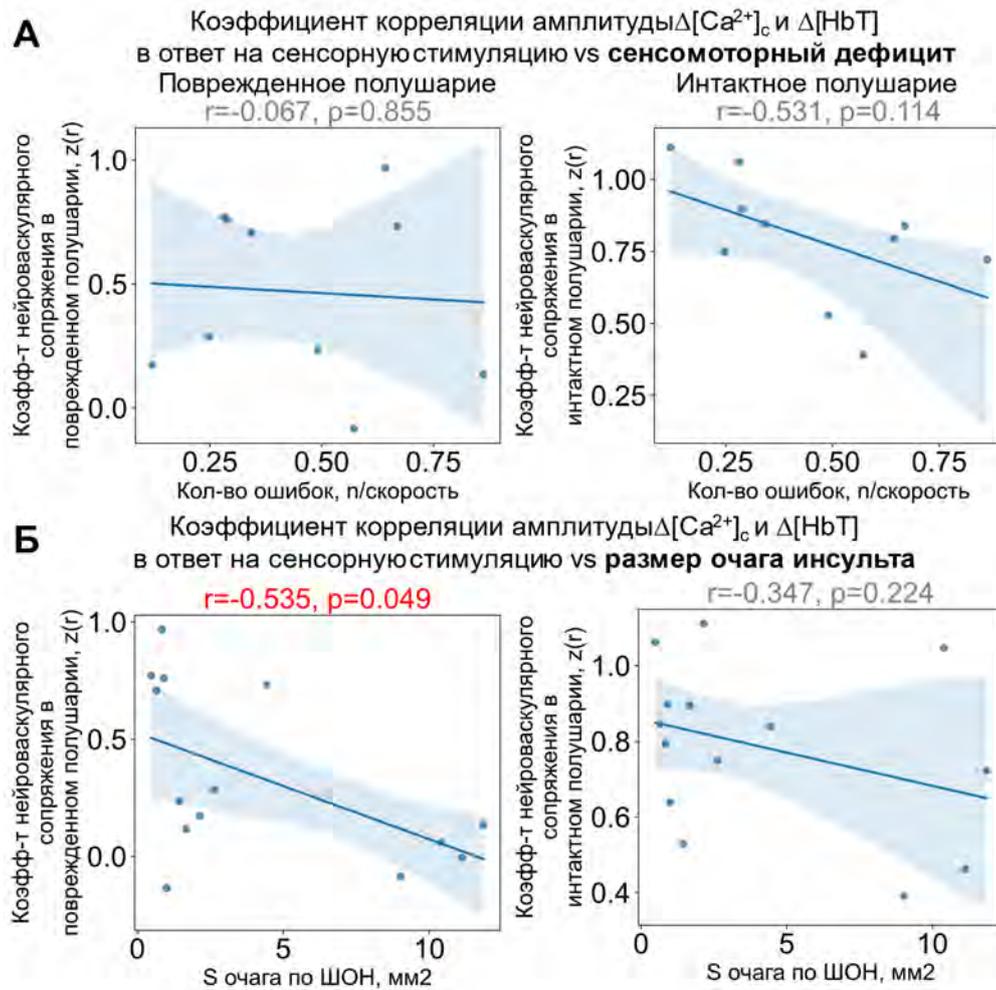


Рисунок 97. Корреляция нейроваскулярного сопряжения, оцененного с помощью сенсорной стимуляцией с тяжестью инсульта. **А)** Корреляция между коэффициентом корреляции амплитуды $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ в соматосенсорной коре в ответ на сенсорную стимуляцию и сенсомоторным дефицитом на первые сутки после инсульта. **Б)** Корреляция между коэффициентом корреляции амплитуды $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ в соматосенсорной коре в ответ на стимул и площадью очага инсульта, измеренного методом ШОН на первые сутки после инсульта.

Не было обнаружено статистически значимых корреляции между тяжестью инсульта, оцененного по степени сенсомоторного дефицита или размеру очага, и параметрами нейроваскулярного сопряжения, оцененными по взаимной корреляции спонтанных $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ (**рисунок 98**). Это может быть связано с большей вариабельностью спонтанной активности коры мозга бодрствующего животного.

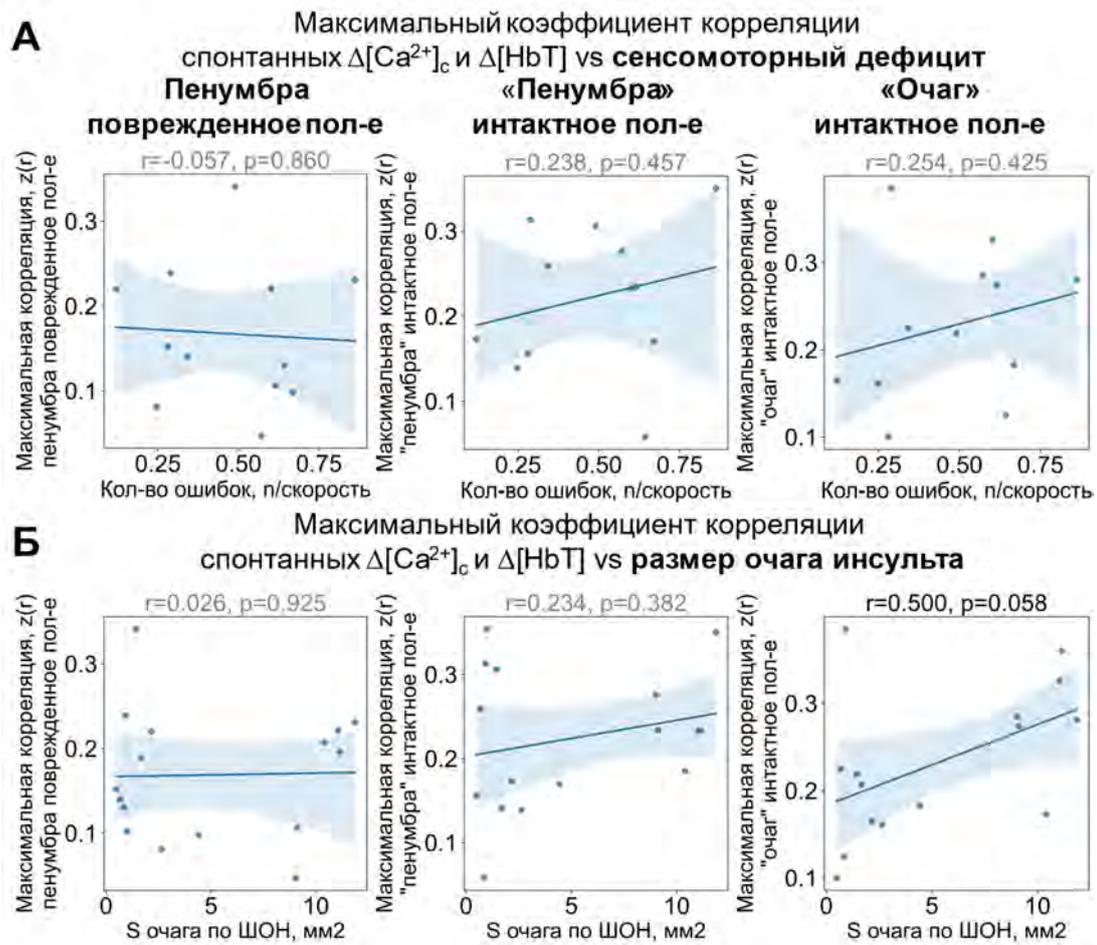


Рисунок 98. Корреляция нейроваскулярного сопряжения, оцененного по спонтанной активности с тяжестью инсульта. **А)** Корреляция максимальной взаимной корреляции $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ с сенсомоторным дефицитом на первые сутки после инсульта. **Б)** Корреляция максимальной взаимной корреляции $\Delta[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta[HbT]$ с площадью очага инсульта, измеренного методом ШОН на первые сутки после инсульта.

Мы также оценили разными методами функциональную связанность областей мозга (**рисунок 99-101**). Мы наблюдали статистически значимую умеренную отрицательную корреляцию между предложенным нами коэффициентом межполушарной связанности и степенью сенсомоторного дефицита, оцененного в тесте «Решетка» ($r = -0.65, p = 0.022$) (**рисунок 99**). Более того, данный параметр высоко отрицательно коррелировал с площадью очага инсульта, измеренной методом ШОН на первые сутки после фототромбоза ($r = -0.77, p = 0.001$). Полученные данные ещё раз подтверждают, что коэффициент межполушарной связанности может быть использован для оценки тяжести инсульта в острейшем периоде фототромбоза.

Аналогичным образом коэффициент внутримушарной связанности в поврежденном полушарии отрицательно коррелировал с относительным количеством ошибочных постановок лап в тесте «Решетка» на уровне тенденции ($r = -0.57, p = 0.065$) и значимо коррелировал с размером очага ($r = -0.60, p = 0.019$). При этом ранее мы показали, что коэффициент

внутриполушарной связанности статистически значимо снижался только в группе с тяжелым инсультом (**рисунок 91Б**), что может указывать на наличие более сложной, чем линейная, связи между данным параметром и тяжестью инсульта.

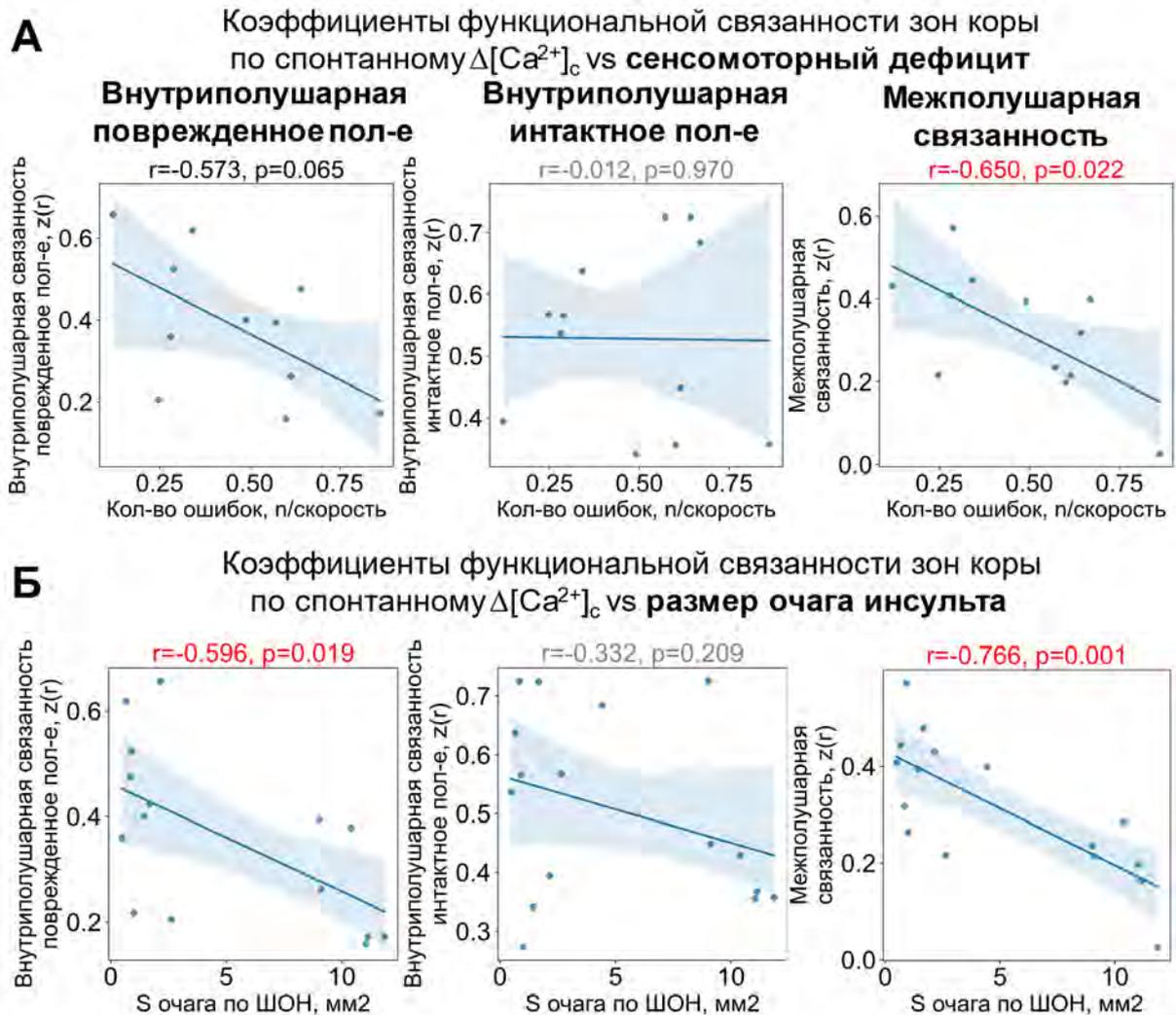


Рисунок 99. Корреляция коэффициентов функциональной связанности с тяжестью инсульта. **А)** Корреляция коэффициентов функциональной связанности, оцененной по $\Delta[Ca^{2+}]_c$, с сенсомоторным дефицитом на первые сутки после инсульта. **Б)** Корреляция коэффициентов функциональной связанности, оцененной по $\Delta[Ca^{2+}]_c$, с площадью очага инсульта, измеренного методом ШОН на первые сутки после инсульта.

Дополнительно мы оценили связанность полушарий, построив карты гомотопической корреляции (корреляции активности симметричных зон полушарий) (**рисунок 92**). Усредненный коэффициент гомотопической корреляции в области пенумбры, рассчитанный по $\Delta[Ca^{2+}]_c$ в диапазоне частот 0.7 – 3 Гц, умеренно коррелировал как со степенью сенсомоторного дефицита, так и с размером очага инсульта в острейшем периоде ($r = -0.636, p = 0.026$ и $r = -0.559, p = 0.024$ соответственно) (**рисунок 100**). При этом не было обнаружено статистически значимых

корреляций между усредненным коэффициентом гомотопической корреляции в области пенумбры, рассчитанным по $\Delta[\text{HbT}]$, и тяжестью инсульта. Данный факт согласуется с продемонстрированными нами нарушениями нейроваскулярного сопряжения в области пенумбры (рисунок 89, 90).

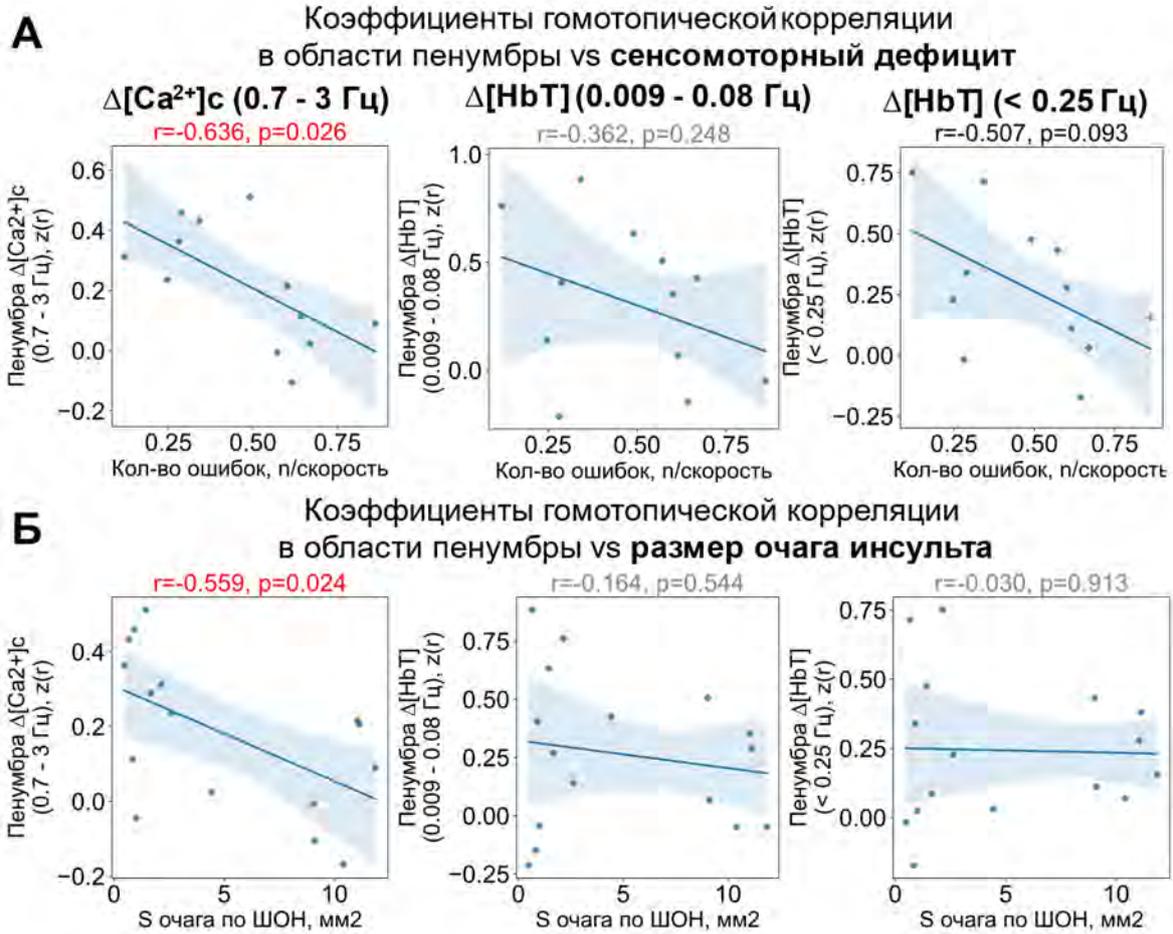


Рисунок 100. Корреляция коэффициентов гомотопической корреляции в области пенумбры с тяжестью инсульта. **А)** Корреляция коэффициентов гомотопической корреляции $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ (0.7 - 3 Гц), $\Delta[\text{HbT}]$ (0.009 – 0.08 Гц) и $\Delta[\text{HbT}]$ (<0.25 Гц) (**Б**) в области пенумбры с сенсомоторным дефицитом на первые сутки после инсульта. **Б)** Корреляция коэффициентов гомотопической корреляции $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ (0.7 - 3 Гц), $\Delta[\text{HbT}]$ (0.009 – 0.08 Гц) и $\Delta[\text{HbT}]$ (<0.25 Гц) (**Б**) в области пенумбры с площадью очага инсульта, измеренного методом ШОН на первые сутки после инсульта.

Таким образом, мы показали, что нарушение нейроваскулярного сопряжения коррелирует с размером очага инсульта. При этом оценка нарушения нейроваскулярного сопряжения по вызванному в коре сенсорному ответу более чувствительна к тяжести инсульта, чем оценка по взаимной корреляции спонтанных изменений кальциевой и гемодинамической активности. Также мы подтвердили, что коэффициент межполушарной связанности, оцененный по спонтанному $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ (0.7 - 3 Гц) может быть использован для оценки тяжести инсульта в

острейшем периоде, поскольку данный параметр коррелирует как с размером очага инсульта, так и с сенсомоторным дефицитом у мышей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами был создан собственный программный код на языке Python для анализа данных, получаемых методом ШОН. 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». В программе реализовано выравнивание изображений коры мозга между животными на основе предварительно размеченных опорных анатомических точек. Для удаления шумов используется удаление темных 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.

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 котором 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 подобрали параметры, 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 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. Инсульт, вызванный фототромбозом, значительно нарушает корреляцию между вызванными стимуляцией изменениями $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ и $\Delta[\text{HbT}]$ в соматосенсорной коре головного мозга на первые сутки после инсульта. Снижение нейроваскулярного сопряжения особенно заметно в острый период инсульта и демонстрирует частичную тенденцию к восстановлению к седьмому дню. Анализ взаимной корреляции кальциевого и гемодинамического спонтанного сигнала коры мозга бодрствующих животных в состоянии покоя также показал снижение максимального коэффициента корреляции между нейрональной и гемодинамической активностью в области пенумбры. Кроме того, была обнаружена значимая корреляция между размером поражения и нарушением нейроваскулярного сопряжения, что подтверждает идею о том, что тяжесть инсульта усугубляет нарушения координации нейрональной и гемодинамической активности.

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. Кроме того, наши результаты свидетельствуют о существенном снижении коэффициентов межполушарной связи в первый день после инсульта, как по сравнению со значениями до инсульта, так и с контрольной группой. Однако к седьмому дню эти коэффициенты возвращаются к норме, что указывает на частичное восстановление межполушарной связанности. Однообразная временная динамика нарушения/восстановления нейроваскулярного сопряжения и функциональной связанности согласуется с предыдущими исследованиями, в которых подчеркивается важная роль нейро-сосудистого взаимодействия для обеспечения нормальной работы сетей мозга [Ma et al., 2016b; Sunil et al., 2023]. В дальнейшем детальное отслеживание изменения параметров методом ШОН позволит определить потенциальные временные рамки для терапевтического вмешательства после инсульта для улучшения реабилитации.

Построение карт гомологичной связанности по $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ позволило нам обнаружить различия в межполушарной связанности не только переишемической области, но и в отдаленных от очага инсульта областях. Более того, исследование методом ШОН глобальной связанности

позволили зарегистрировать изменение в функционировании нейронных сетей в интактном полушарии, выразившееся в увеличение связанности в областях симметричных области поражения. Таким образом, метод ШОН чувствителен к перестройкам работы нейронных сетей и способен детектировать растормаживание тех или иных областей. Это важно, поскольку, качество восстановления зависит от перераспределения функций между сетями, ингибирование областей вокруг повреждения за счет растормаживания симметричных зон в противоположном полушарии может тормозить процессы нейропластичности.

В ходе оценки стабильности и разброса различных параметров функциональной активности коры мозга, регистрируемых методом ШОН, наиболее перспективными оценки последствий инсульта оказались следующие (**рисунок 101**):

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, а также по оценке взаимной корреляции $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ и $\Delta[\text{HbT}]$.
3. Оценка функциональной связанности гомологичных зон и глобальной функциональной связанности зон коры мозга.

Кроме того, 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.

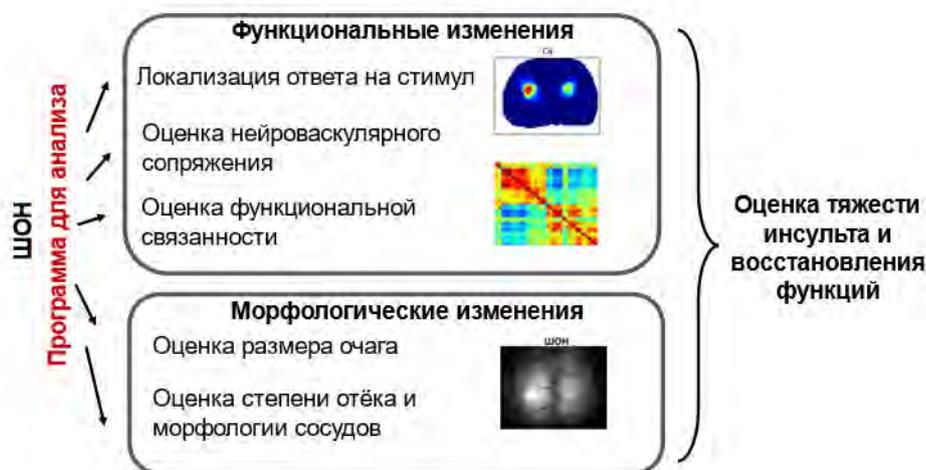


Рисунок 101. Оптический подход для изучения последствий инсульта у лабораторных животных.

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 СОКРАЩЕНИЙ

ШОН - широкопольная оптическая нейровизуализация

HbO - окисленная форма гемоглобина

HbR - восстановленная форма гемоглобина

HbT - суммарный гемоглобин

$[Ca^{2+}]_c$ – цитозольная концентрация кальция

$[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация кальция

GCaMP6f - генетически-кодированный белковый сенсор ионов кальция
 БР - Бенгальский розовый
 ФТ - фотоиндуцированная ишемия (фототромбоз)
 МРТ - магнитно-резонансная томография
 фМРТ - функциональная магнитно-резонансная томография
 ЭЭГ - электроэнцефалограмма
 ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография
 фБИКС / fNIRS - лазерная спектроскопия в ближнем инфракрасном диапазоне
 LDF - лазерная доплеровская флоуриметрия
 PCA - анализ главных компонент
 ICA - анализ независимых компонент
 OISI - метода оптического картирования по внутреннему сигналу
 BOLD-сигнал – сигнал, зависящий 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. Сурину и Л.Р. Горбачевой за ценные советы, руководство исследованием и материально-информационную поддержку. Автор благодарна и.о. заведующей лабораторией 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».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврон А. А., Шарова Е. В., Смирнов А. С., Князев Г. Г., Челябинина М. В., Фадеева Л. М., Абдулаев А. А., Куликов М. А., Жаворонкова Л. А., Болдырева Г. Н. Групповой и индивидуальный фМРТ-анализ основных сетей покоя здоровых испытуемых // Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. 2019. Vol. 69. № 2. P. 150–163.
2. Кислухина Е. Н., Лизунова Н. В., Лисина О. Ю., Шарипов Р. Р., Красильникова И. А., Бакаева З. В., Пинелис В. Г., 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. Vol. 67. № 1. P. 5–20.
3. Кожухов С. А., Салтыков К. А., Бондарь И. В. ОПТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЫ: СПЕКТРАЛЬНЫЕ И АМПЛИТУДНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВАЗОМОТОРНЫХ КОЛЕБАНИЙ // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2022. Vol. 72. № 6. P. 880–895.
4. Лизунова Н. В., Кислухина Е. Н., Сурин А. М. Перинатальный инсульт: модели и

- возможности нейровизуализации // Российский Педиатрический Журнал. 2022. Vol. 25. № 2. P. 128–138.
5. Сурин А. М., Горбачева Л. Р., Савинкова И. Г., Шарипов Р. Р., Пинелис В. . Изменения pH в матриксе митохондрий и цитозоле при индуцированной глутаматом дисрегуляции Ca²⁺-гомеостаза в культивируемых нейронах гиппокампа крысы // Биологические Мембраны. 2022. Vol. 39. № 4. P. 307–318.
 6. Сурин А. М., Горбачева Л. Р., Савинкова И. Г., Шарипов Р. Р., Ходоров Б. И., Пинелис В. Г. Исследование изменений [АТФ] в цитозоле индивидуальных нейронов при развитии глутамат-индуцированной дисрегуляции кальциевого гомеостаза // Биохимия. 2014. Vol. 79. № 2. P. 196–208.
 7. Узденский А. Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии // М.: -2010.-327с. 2010.
 8. Ушаков В. Л., Пойда А. А., Козлов С. О., Орлов В. А., Шараев М. Г. Особенности построения функциональных коннектомов по данным фМРТ // Интеллектуальные системы. Теория и приложения. 2021. Vol. 25. № 4. P. 310–316.
 9. Шарипов Р. Р., Красильникова И. А., Пинелис В. Г., Горбачева Л. Р., Сурин А. М. Исследование механизма сенситизации нейронов к повторному действию глутамата // Биологические мембраны. 2018. Vol. 35. № 5. P. 384–397.
 10. Alexander M., Garbus H., Smith A. L., Rosenkrantz T. S., Fitch R. H. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model // Behav. Brain Res. 2014. Vol. 259. P. 85–96.
 11. Bading H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function // Nat. Rev. Neurosci. 2013. Vol. 14. № 9. P. 593.
 12. Bakaeva Z., Lizunova N., Tarzhanov I., Boyarkin D., Petrichuk S., Pinelis V., Fisenko A., Tuzikov A., Sharipov R., 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 // Front. Mol. Neurosci. 2022. Vol. 14. P. 347.
 13. Bakker M. E., Djerourou I., Belanger S., Lesage F., Vanni M. P. Alteration of functional connectivity despite preserved cerebral oxygenation during acute hypoxia // Sci. Rep. 2023. Vol. 13. № 1. P. 13269.
 14. Bastos A. M., Schoffelen J. M. A tutorial review of functional connectivity analysis methods and their interpretational pitfalls // Front. Syst. Neurosci. 2016. Vol. 9. P. 175.
 15. Battey T. W. K., Karki M., Singhal A. B., Wu O., Sadaghiani S., Campbell B. C. V., Davis S. M., Donnan G. A., Sheth K. N., Kimberly W. T. Brain edema predicts outcome after nonlacunar ischemic stroke // Stroke. 2014. Vol. 45. № 12. P. 3643–3648.
 16. Batti L., Mukhtarov M., Audero E., Ivanov A., Paolicelli osa, Zurborg S., Gross C., Bregestovski P., Heppenstall P. A. Transgenic mouse lines for non-invasive ratiometric monitoring of intracellular chloride // Front. Mol. Neurosci. 2013. Vol. 6. P. 11.
 17. Bazargani N., Attwell D. Astrocyte calcium signaling: the third wave // Nat. Neurosci. 2016. Vol. 19. № 2. P. 182–189.
 18. Bazzigaluppi P., Dufour S., Carlen P. L. Wide field fluorescent imaging of extracellular spatiotemporal potassium dynamics in vivo // Neuroimage. 2015. Vol. 104. P. 110–116.
 19. Bergonzi K. M., Bauer A. Q., Wright P. W., Culver J. P. Mapping functional connectivity using cerebral blood flow in the mouse brain // J. Perinatol. 2015. Vol. 35. № 3. P. 367–370.
 20. Bice A. R., Xiao Q., Kong J., Yan P., Rosenthal Z. P., Kraft A. W., Smith K., Wieloch T., Lee J. M., Culver J. P., Bauer A. Q. Homotopic contralesional excitation suppresses spontaneous circuit repair and global network reconnections following ischemic stroke // Elife. 2022. Vol. 11. P. e68852.
 21. Biswal B., Zerrin Yetkin F., Haughton V. M., Hyde J. S. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar mri // Magn. Reson. Med. 1995. Vol. 34. № 4. P. 537–541.
 22. Boddington L. J., Gray J. P., Schulz J. M., Reynolds J. N. J. Low-intensity contralesional

- electrical theta burst stimulation modulates ipsilesional excitability and enhances stroke recovery // *Exp. Neurol.* 2020. Vol. 323. P. 113071.
23. Boddington L. J., Reynolds J. N. J. Targeting interhemispheric inhibition with neuromodulation to enhance stroke rehabilitation // *Brain Stimul.* 2017. Vol. 10. № 2. P. 214–222.
 24. Bok S., Wang T., Lee C.-J., Jeon S.-U., Kim Y.-E., Kim J., Hong B.-J., Yoon C. J., Kim S., Lee S.-H., Kim H. J., Kim I. H., Kim K. H., Ahn G.-O. In vivo imaging of activated microglia in a mouse model of focal cerebral ischemia by two-photon microscopy // *Biomed. Opt. Express.* 2015. Vol. 6. № 9. P. 3303–3312.
 25. Bonhoeffer T., Grinvald A. Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns // *Nature.* 1991. Vol. 353. № 6343. P. 429–431.
 26. Borovik A., Golubinskaya V., Tarasova O., Aalkjaer C., Nilsson H. Phase resetting of arterial vasomotion by burst stimulation of perivascular nerves // *J. Vasc. Res.* 2005. Vol. 42. № 2. P. 165–173.
 27. Brier L. M., Culver J. P. Open-source statistical and data processing tools for wide-field optical imaging data in mice // *Neurophotonics.* 2023. Vol. 10. № 01. P. 016601–016601.
 28. Brier L. M., Landsness E. C., Snyder A. Z., Wright P. W., Baxter G. A., Bauer A. Q., Lee J.-M., Culver J. P. Separability of calcium slow waves and functional connectivity during wake, sleep, and anesthesia // *Neurophotonics.* 2019. Vol. 6. № 3. P. 035002–035002.
 29. Brima T., Mikulecká A., Otáhal J. Impacts of Perinatal Induced Photothrombotic Stroke on Sensorimotor Performance in Adult Rats // *Physiol. Res.* 2013. Vol. 62. № 1.
 30. Brooks S. P., Dunnett S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. Vol. 10. № 7. P. 519–529.
 31. Brown C. E., Aminoltejari K., Erb H., Winship I. R., Murphy T. H. In Vivo Voltage-Sensitive Dye Imaging in Adult Mice Reveals That Somatosensory Maps Lost to Stroke Are Replaced over Weeks by New Structural and Functional Circuits with Prolonged Modes of Activation within Both the Peri-Infarct Zone and Distant Sites // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. № 6. P. 1719–1734.
 32. Cardoso M. M. B., Sirotin Y. B., Lima B., Glushenkova E., Das A. The neuroimaging signal is a linear sum of neurally distinct stimulus-and task-related components // *Nat. Neurosci.* 2012. Vol. 15. № 9. P. 1298–1306.
 33. Carroll C. M., Stanley M., Raut R. V., Constantino N. J., Irmén R. E., Mitra A., Snipes J. A., Raichle M. E., Holtzman D. M., Gould R. W. Acute hyper-and hypoglycemia uncouples the metabolic cooperation between glucose and lactate to disrupt sleep // *bioRxiv.* 2022. P. 2022–2029.
 34. Chan A. W., Mohajerani M. H., LeDue J. M., Wang Y. T., Murphy T. H. Mesoscale infraslow spontaneous membrane potential fluctuations recapitulate high-frequency activity cortical motifs // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. № 1. P. 7738.
 35. Chan R. W., Leong A. T. L., Ho L. C., Gao P. P., Wong E. C., Dong C. M., Wang X., He J., Chan Y. S., Lim L. W., Wu E. X. Low-frequency hippocampal–cortical activity drives brain-wide resting-state functional MRI connectivity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017. Vol. 114. № 33. P. E6972–E6981.
 36. Chen C., She Z., Tang P., Qin Z., He J., Qu J. Y. Study of neurovascular coupling by using mesoscopic and microscopic imaging // *iScience.* 2021. Vol. 24. № 10.
 37. Chen T.-W., Wardill T. J., Sun Y., Pulver S. R., Renninger S. L., Baohan A., Schreier E. R., Kerr R. A., Orger M. B., Jayaraman V., Looger L. L., Svoboda K., Kim D. S. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity // *Nature.* 2013a. Vol. 499. № 7458. P. 295–300.
 38. Chen Y., Song X., Ye S., Miao L., Zhu Y., Zhang R. G., Ji G. Structural insight into enhanced calcium indicator GCaMP3 and GCaMPJ to promote further improvement // *Protein Cell.* 2013b. Vol. 4. № 4. P. 299–309.
 39. Choi D. W. Excitotoxicity: still hammering the ischemic brain in 2020 // *Front. Neurosci.* 2020. Vol. 14. P. 579953.

40. Chudakov D. M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K. A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues // *Physiol. Rev.* 2010. Vol. 90. № 3. P. 1103–1163.
41. Connolly N. M. C., Prehn J. H. M. The metabolic response to excitotoxicity – lessons from single-cell imaging // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2015. Vol. 47. № 1–2. P. 75–88.
42. Cramer J. V., Gesierich B., Roth S., Dichgans M., Düring M., Liesz A. In vivo widefield calcium imaging of the mouse cortex for analysis of network connectivity in health and brain disease // *Neuroimage.* 2019. Vol. 199. P. 570–584.
43. Crofts A., Kelly M. E., Gibson C. L. Imaging Functional Recovery Following Ischemic Stroke: Clinical and Preclinical fMRI Studies // *J. Neuroimaging.* 2020. Vol. 30. № 1. P. 5–14.
44. Dana H., Chen T.-W., Hu A., Shields B. C., Guo C., Looger L. L., Kim D. S., Svoboda K. Thy1-GCaMP6 Transgenic Mice for Neuronal Population Imaging In Vivo // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. № 9. P. e108697.
45. Dana H., Novak O., Guardado-Montesino M., Fransen J. W., Hu A., Borghuis B. G., Guo C., Kim D. S., Svoboda K. Thy1 transgenic mice expressing the red fluorescent calcium indicator jRGECO1a for neuronal population imaging in vivo // *PLoS One.* 2018. Vol. 13. № 10. P. e0205444.
46. Davis K. M., Ryan J. L., Aaron V. D., Sims J. B. PET and SPECT Imaging of the Brain: History, Technical Considerations, Applications, and Radiotracers // *Semin. Ultrasound, CT MRI.* 2020. Vol. 41. № 6. P. 521–529.
47. Devor A., Sakadžić S., Saisan P. A., Yaseen M. A., Roussakis E., Srinivasan V. J., Vinogradov S. A., Rosen B. R., Buxton R. B., Dale A. M., Boas D. A. «Overshoot» of O₂ is required to maintain baseline tissue oxygenation at locations distal to blood vessels // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. № 38. P. 13676–13681.
48. Díaz-Parra A., Osborn Z., Canals S., Moratal D., Sporns O. Structural and functional, empirical and modeled connectivity in the cerebral cortex of the rat // *Neuroimage.* 2017. Vol. 159. P. 170–184.
49. Drew P. J. Neurovascular coupling: motive unknown // *Trends Neurosci.* 2022. Vol. 45. № 11. P. 809–819.
50. Drew P. J., Mateo C., Turner K. L., Yu X., Kleinfeld D. Ultra-slow Oscillations in fMRI and Resting-State Connectivity: Neuronal and Vascular Contributions and Technical Confounds // *Neuron.* 2020. Vol. 107. № 5. P. 782–804.
51. Duchen M. R. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease // *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 2012. Vol. 464. № 1. P. 111–121.
52. Edwards A. B., Feindel K. W., Cross J. L., Anderton R. S., Clark V. W., Knuckey N. W., Meloni B. P. Modification to the Rice-Vannucci perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy model in the P7 rat improves the reliability of cerebral infarct development after 48 hours // *J. Neurosci. Methods.* 2017. Vol. 288. P. 62–71.
53. Ek C. J., D'angelo B., Baburamani A. A., Lehner C., Leverin A. L., Smith P. L. P., Nilsson H., Svedin P., Hagberg H., Mallard C. Brain barrier properties and cerebral blood flow in neonatal mice exposed to cerebral hypoxia-ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2015. Vol. 35. № 5. P. 818–827.
54. Erofeev A., Antifeev I., Bolshakova A., Bezprozvanny I., Vlasova O. In Vivo Penetrating Microelectrodes for Brain Electrophysiology // *Sensors.* 2022. Vol. 22. № 23. P. 9085.
55. Erofeev A. I., Vinokurov E. K., Vlasova O. L., Bezprozvanny I. B. GCaMP, a Family of Single-Fluorophore Genetically Encoded Calcium Indicators // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2023. Vol. 59. № 4. P. 1195–1214.
56. Eyre B., Shaw K., Sharp P., Boorman L., Lee L., Shabir O., Berwick J., Howarth C. The effects of locomotion on sensory-evoked haemodynamic responses in the cortex of awake mice // *Sci. Rep.* 2022. Vol. 12. № 1. P. 6236.
57. Fedotova A., Brazhe A., Doronin M., Toptunov D., Pryazhnikov E., Khiroug L., Verkhatsky A., Semyanov A. Dissociation Between Neuronal and Astrocytic Calcium Activity in Response to

- Locomotion in Mice // *Function*. 2023. Vol. 4. № 4. P. zqad019.
58. Feigin V. L., Brainin M., Norrving B., Martins S., Sacco R. L., Hacke W., Fisher M., Pandian J., Lindsay P. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022 // *Int. J. Stroke*. 2022. Vol. 17. № 1. P. 18–29.
 59. Ferrari M., Quaresima V. A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application // *Neuroimage*. 2012. Vol. 63. № 2. P. 921–935.
 60. Ferrier J., Tiran E., Deffieux T., Tanter M., Lenkei Z. Functional imaging evidence for task-induced deactivation and disconnection of a major default mode network hub in the mouse brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117. № 26. P. 15270–15280.
 61. Fox M. D., Raichle M. E. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging // *Nat. Rev. Neurosci.* 2007. Vol. 8. № 9. P. 700–711.
 62. Fox M. D., Snyder A. Z., Vincent J. L., Corbetta M., Essen D. C. Van, Raichle M. E. The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102. № 27. P. 9673–9678.
 63. Franklin K. B. J., Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (map)*. , 2007.
 64. Galkov M., Gulyaev M., Kiseleva E., Andreev-Andrievskiy A., Gorbacheva L. Methods for detection of brain injury after photothrombosis-induced ischemia in mice: Characteristics and new aspects of their application // *J. Neurosci. Methods*. 2020. Vol. 329. P. 108457.
 65. Gennaro M., Mattiello A., Pizzorusso T. Rodent models of developmental ischemic stroke for translational research: Strengths and weaknesses // *Neural Plast.* 2019. Vol. 2019. № 1. P. 5089321.
 66. Goltsov A., Anisimova A. V., Zakharkina M., Krupatkin A. I., Sidorov V. V., Sokolovski S. G., Rafailov E. Bifurcation in blood oscillatory rhythms for patients with ischemic stroke: A small scale clinical trial using laser Doppler flowmetry and computational modeling of vasomotion // *Front. Physiol.* 2017. Vol. 8. P. 160.
 67. Gorges M., Roselli F., Müller H. P., Ludolph A. C., Rasche V., Kassubek J. Functional connectivity mapping in the animal model: Principles and applications of resting-state fMRI // *Front. Neurol.* 2017. Vol. 8. P. 200.
 68. Grienberger C., Giovannucci A., Zeiger W., Portera-Cailliau C. Two-photon calcium imaging of neuronal activity // *Nat. Rev. Methods Prim.* 2022 21. 2022. Vol. 2. № 1. P. 1–23.
 69. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. № 6. P. 3440–3450.
 70. Hakon J., Quattromani M. J., Sjölund C., Tomasevic G., Carey L., Lee J.-M., Ruscher K., Wieloch T., Bauer A. Q. Multisensory stimulation improves functional recovery and resting-state functional connectivity in the mouse brain after stroke // *NeuroImage Clin.* 2018. Vol. 17. P. 717–730.
 71. Hamdy N., Eide S., Sun H. S., Feng Z. P. Animal models for neonatal brain injury induced by hypoxic ischemic conditions in rodents // *Exp. Neurol.* 2020. Vol. 334. P. 113457.
 72. Harder D. R., Zhang C., Gebremedhin D. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity // *News Physiol. Sci.* 2002. Vol. 17. № 1. P. 27–31.
 73. Hardingham G. E., Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders // *Nat. Rev. Neurosci.* 2010. Vol. 11. № 10. P. 682.
 74. Hari R., Puce A. *MEG - EEG Primer*. : Oxford University Press, 2023.
 75. Hartmann D. A., Coelho-Santos V., Shih A. Y. Pericyte Control of Blood Flow Across Microvascular Zones in the Central Nervous System // *Annu. Rev. Physiol.* 2022. Vol. 84. P. 331–354.
 76. Haupt D., Vanni M. P., Bolanos F., Mitelut C., LeDue J. M., Murphy T. H. Mesoscale brain explorer, a flexible python-based image analysis and visualization tool // *NeuroPhotonics*. 2017. Vol. 4. № 3. P. 031210.
 77. Heuvel M. P. van den, Hulshoff Pol H. E. Exploring the brain network: A review on resting-state fMRI functional connectivity // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2010. Vol. 20. № 8. P. 519–534.

78. Hillman E. M. C. Coupling Mechanism and Significance of the BOLD Signal: A Status Report // <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014111>. 2014. Vol. 37. P. 161–181.
79. Hong G., Lieber C. M. Novel electrode technologies for neural recordings // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. Vol. 20. № 6. P. 330–345.
80. Hori Y., Schaeffer D. J., Gilbert K. M., Hayrynen L. K., Cléry J. C., Gati J. S., Menon R. S., Everling S. Comparison of resting-state functional connectivity in marmosets with tracer-based cellular connectivity // *Neuroimage*. 2020. Vol. 204. P. 116241.
81. Hosford P. S., Gourine A. V. What is the key mediator of the neurovascular coupling response? // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2019. Vol. 96. P. 174–181.
82. Hu X., Yacoub E. The story of the initial dip in fMRI // *Neuroimage*. 2012. Vol. 62. № 2. P. 1103–1108.
83. Huo B. X., Gao Y. R., Drew P. J. Quantitative separation of arterial and venous cerebral blood volume increases during voluntary locomotion // *Neuroimage*. 2015. Vol. 105. P. 369–379.
84. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease // *Neuron*. 2017. Vol. 96. № 1. P. 17–42.
85. Inoue M. Genetically encoded calcium indicators to probe complex brain circuit dynamics in vivo // *Neurosci. Res.* 2021. Vol. 169. P. 2–8.
86. Jia J. M., Peng C., Wang Y., Zheng J., Ge W. P. Control of occlusion of middle cerebral artery in perinatal and neonatal mice with magnetic force // *Mol. Brain*. 2018. Vol. 11. № 1. P. 1–10.
87. Kannurpatti S. S., Sanganahalli B. G., Herman P., Hyder F. Role of mitochondrial calcium uptake homeostasis in resting state fMRI brain networks // *NMR Biomed.* 2015. Vol. 28. № 11. P. 1579–1588.
88. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004. Vol. 86. № 2. P. 279–351.
89. Khranova Y. V., Kotova D. A., Ivanova A. D., Pochechuev M. S., Kelmanson I. V, Trifonova A. P., Sudoplatov M. A., Katrukha V. A., Sergeeva A. D., Raevskii R. I. Recording changes in biochemical parameters in vivo in the ischemic stroke model // *Genes & Cells*. 2023. Vol. 18. № 4. P. 487–490.
90. Kirton A., Metzler M. J., Craig B. T., Hilderley A., Dunbar M., Giuffre A., Wrightson J., Zewdie E., Carlson H. L. Perinatal stroke: mapping and modulating developmental plasticity // *Nat. Rev. Neurol.* 2021. Vol. 17. № 7. P. 415–432.
91. Knyazev G. G. EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2012. Vol. 36. № 1. P. 677–695.
92. Kondo M., Kobayashi K., Ohkura M., Nakai J., Matsuzaki M. Two-Photon calcium imaging of the medial prefrontal cortex and hippocampus without cortical invasion // *Elife*. 2017. Vol. 6. P. e26839.
93. Kucharz K., Kutuzov N., Zhukov O., Mathiesen Janiurek M., Lauritzen M. Shedding Light on the Blood–Brain Barrier Transport with Two-Photon Microscopy In Vivo // *Pharm. Res.* 2022. Vol. 39. № 7. P. 1457–1468.
94. Kura S., Xie H., Fu B., Ayata C., Boas D. A., Sakadžić S. Intrinsic optical signal imaging of the blood volume changes is sufficient for mapping the resting state functional connectivity in the rodent cortex // *J. Neural Eng.* 2018. Vol. 15. № 3. P. 035003.
95. Lacroix A., Toussay X., Anenberg E., Lecrux C., Ferreirós N., Karagiannis A., Plaisier F., Chausson P., Jarlier F., Burgess S. A., Hillman E. M. C., Tegeder I., Murphy T. H., Hamel E., Cauli B. COX-2-derived prostaglandin E2 produced by pyramidal neurons contributes to neurovascular coupling in the rodent cerebral cortex // *J. Neurosci.* 2015. Vol. 35. № 34. P. 11791–11810.
96. Lake E. M. R., Ge X., Shen X., Herman P., Hyder F., Cardin J. A., Higley M. J., Scheinost D., Papademetris X., Crair M. C., Constable R. T. Simultaneous cortex-wide fluorescence Ca²⁺ imaging and whole-brain fMRI // *Nat. Methods*. 2020. Vol. 17. № 12. P. 1262–1271.
97. Lambers H., Segeroth M., Albers F., Wachsmuth L., Alst T. M. van, Faber C. A cortical rat

- hemodynamic response function for improved detection of BOLD activation under common experimental conditions // *Neuroimage*. 2020. Vol. 208. P. 116446.
98. Lee W. L. A., Michael-Titus A. T., Shah D. K. Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy and the Blood-Brain Barrier in Neonates // *Dev. Neurosci*. 2017. Vol. 39. № 1–4. P. 49–58.
 99. Leithner C., Royl G. The oxygen paradox of neurovascular coupling // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2014. Vol. 34. № 1. P. 19–29.
 100. LEVINE S. Anoxic-Ischemic Encephalopathy in Rats // *Am. J. Pathol*. 1960. Vol. 36. № 1. P. 1.
 101. Lewis C. M., Hoffmann A., Helmchen F. Linking brain activity across scales with simultaneous opto- and electrophysiology // *Neurophotonics*. 2023. Vol. 11. № 3. P. 033403.
 102. Li J., Zhang X. W., Zuo Z. T., Lu J., Meng C. L., Fang H. Y., Xue R., Fan Y., Guan Y. Z., Zhang W. H. Cerebral Functional Reorganization in Ischemic Stroke after Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation: An fMRI Study // *CNS Neurosci. Ther*. 2016. Vol. 22. № 12. P. 952–960.
 103. Lim D. H., Mohajerani M. H., Ledue J., Boyd J., Chen S., Murphy T. H. In vivo Large-Scale Cortical Mapping Using Channelrhodopsin-2 Stimulation in Transgenic Mice Reveals Asymmetric and Reciprocal Relationships between Cortical Areas. // *Front. Neural Circuits*. 2012. Vol. 6. P. 11.
 104. Lindquist M. A., Meng Loh J., Atlas L. Y., Wager T. D. Modeling the hemodynamic response function in fMRI: efficiency, bias and mis-modeling. // *Neuroimage*. 2009. Vol. 45. № 1 Suppl. P. S187–S198.
 105. Logothetis N. K. What we can do and what we cannot do with fMRI // *Nature*. 2008. Vol. 453. № 7197. P. 869–878.
 106. Lourenço C. F., Laranjinha J. Nitric Oxide Pathways in Neurovascular Coupling Under Normal and Stress Conditions in the Brain: Strategies to Rescue Aberrant Coupling and Improve Cerebral Blood Flow // *Front. Physiol*. 2021. Vol. 12. P. 729201.
 107. Ma Y., Shaik M. A., Kim S. H., Kozberg M. G., Thibodeaux D. N., Zhao H. T., Yu H., Hillman E. M. C. Wide-field optical mapping of neural activity and brain haemodynamics: considerations and novel approaches // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci*. 2016a. Vol. 371. № 1705. P. 20150360.
 108. Ma Y., Shaik M. A., Kozberg M. G., Kim S. H., Portes J. P., Timerman D., Hillman E. M. C. Resting-state hemodynamics are spatiotemporally coupled to synchronized and symmetric neural activity in excitatory neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2016b. Vol. 113. № 52. P. E8463–E8471.
 109. Ma Ying. Analysis of resting-state neurovascular coupling and locomotion-associated neural dynamics using wide-field optical mapping | *Semantic Scholar* // 2018.
 110. Malarkey E. B., Parpura V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes // *Neurochem. Int*. 2008. Vol. 52. № 1–2. P. 142–154.
 111. Mateo C., Knutsen P. M., Tsai P. S., Shih A. Y., Kleinfeld D. Entrainment of Arteriolar Vasomotor Fluctuations by Neural Activity Is a Basis of Blood-Oxygenation-Level-Dependent “Resting-State” Connectivity // *Neuron*. 2017. Vol. 96. № 4. P. 936–948.e3.
 112. Mathis A., Mamidanna P., Cury K. M., Abe T., Murthy V. N., Mathis M. W., Bethge M. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning // *Nat. Neurosci*. 2018. Vol. 21. № 9. P. 1281–1289.
 113. Mehl M., Bidmon H. J., Hilbig H., Zilles K., Dringen R., Ullrich V. Ischemia-induced glutamate release in the dentate gyrus. A microdialysis study in the gerbil // *Neurosci. Lett*. 1999. Vol. 271. № 3. P. 191–194.
 114. Miao P., Zhang L., Li M., Zhang Y., Feng S., Wang Q., Thakor N. V. Chronic wide-field imaging of brain hemodynamics in behaving animals. // *Biomed. Opt. Express*. 2017. Vol. 8. № 1. P. 436–445.
 115. Mohajerani M. H., Chan A. W., Mohsenvand M., LeDue J., Liu R., McVea D. A., Boyd J. D., Wang Y. T., Reimers M., Murphy T. H. Spontaneous cortical activity alternates between

- motifs defined by regional axonal projections // *Nat. Neurosci.* 2013. Vol. 16. № 10. P. 1426–1435.
116. Mohajerani M. H., Mcvea D. A., Fingas M., Murphy T. H. Brief Communications Mirrored Bilateral Slow-Wave Cortical Activity within Local Circuits Revealed by Fast Bihemispheric Voltage-Sensitive Dye Imaging in Anesthetized and Awake Mice // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. № 10. P. 3745–3751.
117. Morone K. A., Neimat J. S., Roe A. W., Friedman R. M. Review of functional and clinical relevance of intrinsic signal optical imaging in human brain mapping // *Neurophotonics.* 2017. Vol. 4. № 3. P. 031220–031220.
118. Moroz L. L., Nikitin M. A., Poličar P. G., Kohn A. B., Romanova D. Y. Evolution of glutamatergic signaling and synapses // *Neuropharmacology.* 2021. Vol. 199. P. 108740.
119. Munting L. P., Bonnar O., Kozberg M. G., Auger C. A., Hirschler L., Hou S. S., Greenberg S. M., Bacsikai B. J., Veluw S. J. van. Spontaneous vasomotion propagates along pial arterioles in the awake mouse brain like stimulus-evoked vascular reactivity // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2023. Vol. 43. № 10. P. 1752–1763.
120. Murphy K., Fox M. D. Towards a consensus regarding global signal regression for resting state functional connectivity MRI // *Neuroimage.* 2017. Vol. 154. P. 169–173.
121. Murphy M. C., Chan K. C., Kim S.-G., Vazquez A. L. Macroscale variation in resting-state neuronal activity and connectivity assessed by simultaneous calcium imaging, hemodynamic imaging and electrophysiology // *Neuroimage.* 2018. Vol. 169. P. 352–362.
122. Murphy T. H., Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009 1012. 2009. Vol. 10. № 12. P. 861–872.
123. Musolino S., Schartner E. P., Tsiminis G., Salem A., Monro T. M., Hutchinson M. R., Dewhirst M. W., Viglianti B. L., Lora-Michiels M., Hanson M., Hoopes P. J., Schartner P., Tsiminis G., François A., Kostecky R., Warren-Smith S. C., Nguyen L. V, Heng S., Reynolds T., Klantsataya E., Rowland K. J., Abell A. D., Ebendorff-Heidepriem H., Monro T. M., Zhang -q, Yu X., Xiang Y., Luo M., Wang J., Tan G., Wang Q., Chu P. K., Feng X., Finazzi V., Moore R. C., Frampton K., Petropoulos P., Richardson D. J. Portable optical fiber probe for in vivo brain temperature measurements // *Biomed. Opt. Express*, Vol. 7, Issue 8, pp. 3069-3077. 2016. Vol. 7. № 8. P. 3069–3077.
124. Nazempour R., Zhang B., Ye Z., Yin L., Lv X., Sheng X. Emerging Applications of Optical Fiber-Based Devices for Brain Research // *Adv. Fiber Mater.* 2022. Vol. 4. № 1. P. 1–19.
125. Nedergaard M., Verkhratsky A. Artifact versus reality-How astrocytes contribute to synaptic events // *Glia.* 2012. Vol. 60. № 7. P. 1013–1023.
126. Nicholls D. G. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity // *Biochem. Soc. Trans.* 2009. Vol. 37. № 6. P. 1385–1388.
127. Nizar K., Uhlirva H., Tian P., Saisan P. A., Cheng Q., Reznichenko L., Weldy K. L., Steed T. C., Sridhar V. B., MacDonald C. L., Cui J., Gratiy S. L., Sakadžić S., Boas D. A., Beka T. I., Einevoll G. T., Chen J., Masliah E., Dale A. M., Silva G. A., Devor A. In vivo stimulus-induced vasodilation occurs without IP3 receptor activation and may precede astrocytic calcium increase // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33. № 19. P. 8411–8422.
128. Ogawa S., Tank D. W., Menon R., Ellermann J. M., Kim S. G., Merkle H., Ugurbil K. Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: Functional brain mapping with magnetic resonance imaging // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89. № 13. P. 5951–5955.
129. Osten P., Margrie T. W. Mapping brain circuitry with a light microscope // *Nat. Methods.* 2013. Vol. 10. № 6. P. 515–523.
130. Padawer-Curry J. A., Bowen R. M., Jarang A., Wang X., Lee J. M., Bauer A. Q. Wide-Field Optical Imaging in Mouse Models of Ischemic Stroke // *Methods Mol. Biol.* 2023. Vol. 2616. P. 113–151.
131. Pais-Roldán P., Mateo C., Pan W. J., Acland B., Kleinfeld D., Snyder L. H., Yu X.,

- Keilholz S. Contribution of animal models toward understanding resting state functional connectivity // *Neuroimage*. 2021. Vol. 245. P. 118630.
132. Plotegher N., Filadi R., Pizzo P., Duchen M. R. Excitotoxicity Revisited: Mitochondria on the Verge of a Nervous Breakdown // *Trends Neurosci*. 2021. Vol. 44. № 5. P. 342–351.
 133. Qin C., Yang S., Chu Y. H., Zhang H., Pang X. W., Chen L., Zhou L. Q., Chen M., Tian D. S., Wang W. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions // *Signal Transduct. Target. Ther*. 2022. Vol. 7. № 1. P. 215.
 134. Rangaprakash D., Wu G. R., Marinazzo D., Hu X., Deshpande G. Hemodynamic response function (HRF) variability confounds resting-state fMRI functional connectivity // *Magn. Reson. Med*. 2018. Vol. 80. № 4. P. 1697–1713.
 135. Ren C., Komiyama T. Wide-field calcium imaging of cortex-wide activity in awake, head-fixed mice // *STAR Protoc*. 2021. Vol. 2. № 4. P. 100973.
 136. Renolleau S., Aggoun-Zouaoui D., Ben-Ari Y., Charriaut-Marlangue C. A Model of Transient Unilateral Focal Ischemia With Reperfusion in the P7 Neonatal Rat // *Stroke*. 1998. Vol. 29. № 7. P. 1454–1461.
 137. Rice J. E., Vannucci R. C., Brierley J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat // *Ann. Neurol*. 1981. Vol. 9. № 2. P. 131–141.
 138. Roach G. D. Perinatal Arterial Ischemic Stroke // *Neoreviews*. 2020. Vol. 21. № 11. P. e741–e748.
 139. Royl G., Fächtemeier M., Leithner C., Megow D., Offenhauser N., Steinbrink J., Kohl-Bareis M., Dirnagl U., Lindauer U. Hypothermia effects on neurovascular coupling and cerebral metabolic rate of oxygen // *Neuroimage*. 2008. Vol. 40. № 4. P. 1523–1532.
 140. Saini V., Guada L., Yavagal D. R. Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions // *Neurology*. 2021. Vol. 97. № 20. P. S6–S16.
 141. Saxena S., Kinsella I., Musall S., Kim S. H., Meszaros J., Thibodeaux D. N., Kim C., Cunningham J., Hillman E. M. C. C., Churchland A., Paninski L. Localized semi-nonnegative matrix factorization (LocaNMF) of widefield calcium imaging data // *PLOS Comput. Biol*. 2020. Vol. 16. № 4. P. e1007791.
 142. Scanziani M., Häusser M. Electrophysiology in the age of light // *Nature*. 2009. Vol. 461. № 7266. P. 930–939.
 143. Schaeffer S., Iadecola C. Revisiting the neurovascular unit // *Nat. Neurosci*. 2021. Vol. 24. № 9. P. 1198–1209.
 144. Sejnowski T. J., Churchland P. S., Movshon J. A. Putting big data to good use in neuroscience // *Nat. Neurosci*. 2014. Vol. 17. № 11. P. 1440–1441.
 145. Semyanov A., Henneberger C., Agarwal A. Making sense of astrocytic calcium signals — from acquisition to interpretation // *Nat. Rev. Neurosci*. 2020. Vol. 21. № 10. P. 551–564.
 146. Shamsavarani S., Thibodeaux D. N., Xu W., Kim S. H., Lodgher F., Nwokeabia C., Cambareri M., Yagielski A. J., Zhao H. T., Handwerker D. A., Gonzalez-Castillo J., Bandettini P. A., Hillman E. M. C. Cortex-wide neural dynamics predict behavioral states and provide a neural basis for resting-state dynamic functional connectivity // *Cell Rep*. 2023. Vol. 42. № 6.
 147. Shaik M. A. Evaluating endothelial function during neurovascular coupling in awake behaving mice using advanced imaging technologies // 2019.
 148. Shumkova V., Sitdikova V., Rechapov I., Leukhin A., Minlebaev M. Effects of urethane and isoflurane on the sensory evoked response and local blood flow in the early postnatal rat somatosensory cortex // *Sci. Rep*. 2021. Vol. 11. № 1. P. 9567.
 149. Silasi G., Murphy T. H. Stroke and the Connectome: How Connectivity Guides Therapeutic Intervention // *Neuron*. 2014. Vol. 83. № 6. P. 1354–1368.
 150. Silasi G., Xiao D., Vanni M. P., Chen A. C. N., Murphy T. H. Intact skull chronic windows for mesoscopic wide-field imaging in awake mice // *J. Neurosci. Methods*. 2016. Vol. 267. P. 141–149.
 151. Sirotin Y. B., Hillman E. M. C., Bordier C., Das A. Spatiotemporal precision and hemodynamic mechanism of optical point spreads in alert primates // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

- S. A. 2009. Vol. 106. № 43. P. 18390–18395.
152. Sotskov V. P., Plusnin V. V., Pospelov N. A., Anokhin K. V. The Rapid Formation of CA1 Hippocampal Cognitive Map in Mice Exploring a Novel Environment // *Advances in Intelligent Systems and Computing.* , 2021. P. 452–457.
 153. Sunil S., Jiang J., Shah S., Kura S., Kilic K., Erdener S. E., Ayata C., Devor A., Boas D. A. Neurovascular coupling is preserved in chronic stroke recovery after targeted photothrombosis // *NeuroImage Clin.* 2023. Vol. 38. P. 103377.
 154. Surin A. M., Gorbacheva L. R., Savinkova I. G., Sharipov R. R., Khodorov B. I., Pinelis V. G. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis // *Biochem.* 2014. Vol. 79. № 2. P. 146–157.
 155. Surin A. M., Sharipov R. R., Krasil'nikova I. A., Boyarkin D. P., Lisina O. Y., Gorbacheva L. R., Avetisyan A. V., Pinelis V. G. Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons // *Biochem.* 2017. Vol. 82. № 6. P. 737–749.
 156. Tai Y. F., Piccini P. Applications of positron emission tomography (PET) in neurology // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2004. Vol. 75. № 5. P. 669–676.
 157. Takahashi M., Urushihata T., Takuwa H., Sakata K., Takado Y., Shimizu E., Suhara T., Higuchi M., Ito H. Imaging of neuronal activity in awake mice by measurements of flavoprotein autofluorescence corrected for cerebral blood flow // *Front. Neurosci.* 2018. Vol. 11. P. 723.
 158. Thompson G. J., Pan W. J., Magnuson M. E., Jaeger D., Keilholz S. D. Quasi-periodic patterns (QPP): Large-scale dynamics in resting state fMRI that correlate with local infraslow electrical activity // *Neuroimage.* 2014. Vol. 84. P. 1018–1031.
 159. Tian L., Hires S. A., Mao T., Huber D., Chiappe M. E., Chalasani S. H., Petreanu L., Akerboom J., McKinney S. A., Schreiter E. R., Bargmann C. I., Jayaraman V., Svoboda K., Looger L. L. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators // *Nat. Methods* 2009 612. 2009. Vol. 6. № 12. P. 875–881.
 160. Tischbirek C., Birkner A., Jia H., Sakmann B., Konnerth A. Deep two-photon brain imaging with a red-shifted fluorometric Ca²⁺ indicator // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. Vol. 112. № 36. P. 11377–11382.
 161. Titomanlio L., Fernández-López D., Manganozzi L., Moretti R., Vexler Z. S., Gressens P. Pathophysiology and Neuroprotection of Global and Focal Perinatal Brain Injury: Lessons From Animal Models // *Pediatr. Neurol.* 2015. Vol. 52. № 6. P. 566–584.
 162. Tsuji M., Ohshima M., Taguchi A., Kasahara Y., Ikeda T., Matsuyama T. A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: Comparison with a hypoxia-ischemia model // *Exp. Neurol.* 2013. Vol. 247. P. 218–225.
 163. Tuor U. I., Qiao M., Sule M., Morgunov M., Foniok T. Magnetic resonance imaging of ischemic injury produced by varying severities of photothrombosis differs in neonatal and adult brain // *NMR Biomed.* 2016. Vol. 29. № 12. P. 1700–1708.
 164. Uzdensky A. B. Photothrombotic Stroke as a Model of Ischemic Stroke // *Transl. Stroke Res.* 2018. Vol. 9. № 5. P. 437–451.
 165. Valley M. T., Moore M. G., Zhuang J., Mesa N., Castelli D., Sullivan D., Reimers M., Waters J. Separation of hemodynamic signals from GCaMP fluorescence measured with wide-field imaging // *J. Neurophysiol.* 2020. Vol. 123. № 1. P. 356–366.
 166. Vandamme T. F. Rodent models for human diseases // *Eur. J. Pharmacol.* 2015. Vol. 759. P. 84–89.
 167. Vanni M. P., Chan A. W., Balbi M., Silasi G., Murphy T. H. Mesoscale Mapping of Mouse Cortex Reveals Frequency-Dependent Cycling between Distinct Macroscale Functional Modules // 2017. Vol. 37. № 31. P. 7513–7533.
 168. Vanni M. P., Murphy T. H. Mesoscale Transcranial Spontaneous Activity Mapping in GCaMP3 Transgenic Mice Reveals Extensive Reciprocal Connections between Areas of Somatomotor Cortex // *J. Neurosci.* 2014a. Vol. 34. № 48. P. 15931–15946.

169. Vanni M. P., Murphy T. H. Mesoscale Transcranial Spontaneous Activity Mapping in GCaMP3 Transgenic Mice Reveals Extensive Reciprocal Connections between Areas of Somatomotor Cortex // *J. Neurosci.* 2014b. Vol. 34. № 48. P. 15931–15946.
170. Vannucci R. C., Vannucci S. J. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997. Vol. 835. P. 234–249.
171. Vazquez A. L., Fukuda M., Kim S. G. Inhibitory Neuron Activity Contributions to Hemodynamic Responses and Metabolic Load Examined Using an Inhibitory Optogenetic Mouse Model // *Cereb. Cortex.* 2018. Vol. 28. № 11. P. 4105–4119.
172. Veluw S. J. van, Hou S. S., Calvo-Rodriguez M., Arbel-Ornath M., Snyder A. C., Frosch M. P., Greenberg S. M., Bacskai B. J. Vasomotion as a Driving Force for Paravascular Clearance in the Awake Mouse Brain // *Neuron.* 2020. Vol. 105. № 3. P. 549–561.
173. Vo T. T., Im G. H., Han K., Suh M., Drew P. J., Kim S. G. Parvalbumin interneuron activity drives fast inhibition-induced vasoconstriction followed by slow substance P-mediated vasodilation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2023. Vol. 120. № 118. P. e2220777120.
174. Volz L. J., Sarfeld A. S., Diekhoff S., Rehme A. K., Pool E. M., Eickhoff S. B., Fink G. R., Grefkes C. Motor cortex excitability and connectivity in chronic stroke: a multimodal model of functional reorganization // *Brain Struct. Funct.* 2015. Vol. 220. № 2. P. 1093–1107.
175. Wang Q., Ding S. L., Li Y., Royall J., Feng D., Lesnar P., Graddis N., Naeemi M., Facer B., Ho A., Dolbeare T., Blanchard B., Dee N., Wakeman W., Hirokawa K. E., Szafer A., Sunkin S. M., Oh S. W., Bernard A., Phillips J. W., Hawrylycz M., Koch C., Zeng H., Harris J. A., Ng L. The Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework: A 3D Reference Atlas // *Cell.* 2020. Vol. 181. № 4. P. 936–953.
176. Wang X., Leong A. T. L., Chan R. W., Liu Y., Wu E. X. Thalamic low frequency activity facilitates resting-state cortical interhemispheric MRI functional connectivity // *Neuroimage.* 2019. Vol. 201. P. 115985.
177. Wang X., Padawer-Curry J. A., Bice A. R., Kim B., Rosenthal Z. P., Lee J.-M., Goyal M. S., Macauley S. L., Bauer A. Q. Spatiotemporal relationships between neuronal, metabolic, and hemodynamic signals in the awake and anesthetized mouse brain // *Cell Rep.* 2024. Vol. 43. № 9.
178. Watson B. D., Dietrich W. D., Busto R., Wachtel M. S., Ginsberg M. D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis // *Ann. Neurol.* 1985. Vol. 17. № 5. P. 497–504.
179. West S. L., Aronson J. D., Popa L. S., Feller K. D., Carter R. E., Chiesl W. M., Gerhart M. L., Shekhar A. C., Ghanbari L., Kodandaramaiah S. B., Ebner T. J. Wide-Field Calcium Imaging of Dynamic Cortical Networks during Locomotion // *Cereb. Cortex.* 2022. Vol. 32. № 12. P. 2668–2687.
180. White B. R., Bauer A. Q., Snyder A. Z., Schlaggar B. L., Lee J.-M., Culver J. P. Imaging of Functional Connectivity in the Mouse Brain // *PLoS One.* 2011. Vol. 6. № 1. P. e16322.
181. Winship I. R., Murphy T. H. In Vivo Calcium Imaging Reveals Functional Rewiring of Single Somatosensory Neurons after Stroke // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28. № 26. P. 6592–6606.
182. Wit C. De, Griffith T. M. Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2010. Vol. 459. № 6. P. 897–914.
183. Wright P. W., Brier L. M., Bauer A. Q., Baxter G. A., Kraft A. W., Reisman M. D., Bice A. R., Snyder A. Z., Lee J.-M., Culver J. P. Functional connectivity structure of cortical calcium dynamics in anesthetized and awake mice // *PLoS One.* 2017. Vol. 12. № 10. P. e0185759.
184. Xiao D., Forys B. J., Vanni M. P., Murphy T. H. MesoNet allows automated scaling and segmentation of mouse mesoscale cortical maps using machine learning // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12. № 1. P. 1–13.
185. Xie H., Chung D. Y., Kura S., Sugimoto K., Aykan S. A., Wu Y., Sakadžić S., Yaseen M. A., Boas D. A., Ayata C. Differential effects of anesthetics on resting state functional connectivity in the mouse // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2020. Vol. 40. № 4. P. 875–884.

186. Xie Y., Chan A. W., McGirr A., Xue S., Xiao D., Zeng H., Murphy T. H. Resolution of High-Frequency Mesoscale Intracortical Maps Using the Genetically Encoded Glutamate Sensor iGluSnFR // *J. Neurosci.* 2016. Vol. 36. № 4. P. 1261–1272.
187. Xu N., LaGrow T. J., Anumba N., Lee A., Zhang X., Yousefi B., Bassil Y., Clavijo G. P., Khalilzad Sharghi V., Maltbie E., Meyer-Baese L., Nezafati M., Pan W. J., Keilholz S. Functional Connectivity of the Brain Across Rodents and Humans // *Front. Neurosci.* 2022. Vol. 16. P. 816331.
188. Yatsyk L. M., Karkashadze G. A., Altunin V. V., Povalyaeva I. A., Prudnikov P. A., Vishneva E. A., Kaytukova E. V., Efendieva K. E., Namazova-Baranova L. S. Functional Near-Infrared Spectroscopy as Promising Method for Studying Cognitive Functions in Children // *Curr. Pediatr.* 2023. Vol. 21. № 6. P. 479–486.
189. Zhang S. Y., Jeffers M. S., Lagace D. C., Kirton A., Silasi G. Developmental and Interventional Plasticity of Motor Maps after Perinatal Stroke // *J. Neurosci.* 2021. Vol. 41. № 28. P. 6157–6172.
190. Zhang Y., Rózsa M., Liang Y., Bushey D., Wei Z., Zheng J., Reep D., Broussard G. J., Tsang A., Tsegaye G., Narayan S., Obara C. J., Lim J. X., Patel R., Zhang R., Ahrens M. B., Turner G. C., Wang S. S. H., Korff W. L., Schreier E. R., Svoboda K., Hasseman J. P., Kolb I., Looger L. L. Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations // *Nature.* 2023. Vol. 615. № 7954. P. 884–891.