Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the

methodology and its applications

Angelica Zepeda a, Clorinda Arias a, Frank Sengpiel b*,*∗

a *Departamento de Biolog´ıa Celular y Fisiolog´ıa, Instituto de Investigaciones Biomédicas,*

*Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Mexico*

b *Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Museum Avenue, Cardiff CF10 3US, UK*

Accepted 16 February 2004

Метод оптического картирования по внутреннему сигналу впервые был разработан в 1980е годы. С того времени методика была усовершенствована, арсенал применения значительно расширен.

В статье рассмотрены последние изменения в методологии и анализе данных, а также рассмотрена взаимосвязь регистрируемых сигналов с метаболическими изменениями и электрофизиологической активностью мозга. Проведен обзор того, как метод OIспособствовал нашему пониманию строения функциональной архитектуры зрительной коры, ее развитию и пластичности.

1. Введение

Все применяемые в настоящее время методы визуализации коры головного мозга используют сходные фундаментальные подходы к пониманию организации коры, но имеют значительные различия в своих пространственных и временных характеристиках. Их основными преимуществами можно считать сниженную инвазивность, возможность анализировать большие участки головного мозга в ответ на набор стимулов и возможность длительное время исследовать отдельный субъект.

Методы визуализации в нынешнее время продвинули наше понимание функциональной организации нормального головного мозга и о реорганизации травмированной коры. Эти исследования были проведены с использованием фМРТ, НИРС и оптического картирования. Все эти методы исследования основаны на изменении в оптических и магнитных свойствах нервной ткани, вызванных изменениями оксигенации крови.

До внедрения этих методов для исследования корковой архитектуры применялись методы электрофизиологические и маркировка 2-дезоксиглюкозой. Эти методы значительно более инвазивны, отнимают много времени, маркировка2-дезоксиглюкозой может использоваться же только для одного конкретного стимула, что вдобавок ограничивает их хроническое использование.

Методика OI была разработана Гринвальдом и сотр. и успешно использована для изучения (остро и хронически) принципов, лежащих в основе организации и функциональной архитектуры различных областей коры головного мозга у различных видов (включая человека!), коркового развития и сенсорной обработки информации в естественных условиях. Были получены функциональные карты с высоким разрешением с относительно большой площади. Оптическое картирование –методика, наилучшим образом сочетающая в себе пространственное разрешение и скорость функционального картированя коры млекопитающих.

В статье рассмотрены основные принципы методики и важные экспериментальные аспекты.

1. Методика и основные аспекты

\*Источники внутреннего сигнала

В основе ОIлежит визуализация изменений оптических свойств нервной ткани (отражения свет) вследствие нейрональной активности. Записывается отраженный свет от поверхности коры во время предъявления стимулов объекту. Источниками изменений, регистрируемых камерой, являются три физиологических параметра, которые коррелируют с нейронной активностью:

А) изменение объема крови;

В)соотношение кислород/дезоксигемоглобин (возможен некорректный перевод);

С)рассеивание света

Первые два фактора опираются на усиление метаболической активности нейронов, в частности капилляры локалной области наиболее наполнены дезоксигемоглобином (Vanzetta and Grinvald (1999)-непосредственно оценивали изменение концентрации кислорода в микрокапиллярах)

ОИ использует различие в спектрах поглащения окси и дезоксигемоглобина(600нм и выше)-более активные области можно отличить от менее активных по их меньшему отражению в карсной области спектра. Разницу в изменении отражательной способности между активными и неактивными областями называют «отображение сигнала» - “mapping signal”

Локальный рост дезоксигемоглобина и расширение прилегающих артериол происходит в течение 1-2 с, т.о. существует тесная связь между нейронной активностью и церебральной микроциркуляцией(Villringer и Dirnagl, 1995).

фМРТ: образование сигнала связано с задержкой роста оксигенации крови. Из-за набора артериол в нпосредственной облизости от первоначального места потребления кислорода, пространственное разрешение несколько ограничено и не позволяет визуализировать отдельные функциональны домены в коре. Разновидность метода фМРТ, использующий для построения карт “initial dip” (первоначальный повал?) –высокое разрешение метода- способна визуализировать отдельные кортикальные модули, например ориентационные колонки, и аналогична оптической визуализации, что позволяет предположить что сигнал, задействованный в этих методах, результат одних и тех же физиологических событий.

Третий фактор-рассеивание света, определяет отражательную способность поверхности, впервые был описан в экспериментах Хилл иКейнса (1949). Они показали, что этот параметр имеет относительно жесткую временную и пространственную связь с нейронной активностью. Рассеивание света увеличивается с повышением активности нейронов и может быть обусловлен расширения и сжатия внеклеточного пространства, расширением капилляров или высвобождением трансмиттреа(Cohen, 1973), а также может быть связано с изменением мембранного потенциала (Stepnoski и др., 1991) и глиальных набухания (MacVicar и Hochman, 1991).

Каждый из компонентов, формирующих сигнал, достигают своего максимума через различные промежутки времени и их вклад в формирование сигнала зависит от длины волны, используемой для освещения коры.

Увеличение светорассеяния достигает максимума в течение 2-3 с после начала стимуляции, дезоксигемоглобин- 4-6 с. Наилучшие результаты дает оптическая томография при длине волны 700 нм и выше.

В исследовании Shtoyerman и др. (2000) были рассмотрены индивидуальные вклады

оксигемоглобином и концентрации дезоксигемоглобина в формирование функциональных карт у бодрствующих обезьян и было обнаружено, что отдельные домены лучше выражены в картах построенных на изменении дезоксигемоглобина и что их лучше коррелировать с электрической активносьб(? Не уверена в переводе)

\*Корреляция сигнала с метаболизмом и физиологической активностью.

В этой части обзора рассматривается какие аспекты нейрональной активности и в какой степени вносят вклад в формирование внутреннего сигнала (Attwell and Laughlin (2001))

Авторы подсчитывали затраты АТФ глутаматергической синаптической передачи в коре головного мозга грызунов. В результате было подсчитано, что чуть больше 10% потребляемой энергии идет на сохранение состояния покоя. Был сделан вывод, что примерно половина АТФ требуется в синапсах, половина необходима распространению спайка. В общем был сделан вывод, что процессы, направленные на поддрежания состояния покоя вносят важный вклад в общие метаболические затраты, и следовательно в формирование внутреннего сигнала, на основе которого формируется ОI. Так как приведенные в статье расчеты относятся прежде всего к компоненту оксиметрии, невозможно количественно оценить вклад метаболических процессов в формирование карты ОИ.

Также указано, чтопространственная протяженность внутренних сигналов, запущенных сенсорным стимулом, больше чем площадь коры, где нейроны реагируют на этот раздражитель.

В зрительной коре кошки Das and Gilbert (1995) обнаружили, что оптический отклик на очень узкого стимул (ширина, 0.1◦) распространяется на корковой области в среднем 3,9 мм диаметра, что соответствует 2.25-6◦ визуального пространства.

Bosking и соав., (2002), в исследовании ретинотопической и ориентационной селективности нейронов зрительной коры у землеройки в области V1 на стимул 0,25-10 был получен ответ, соответствующий 4.9◦ визуального пространства, что позволяет предположить различие в площади задействованных областей у различных видов.

Анализ данных.

В статье приведено описание вариантов камер, используемых для эксперимента.

Освещение и фильтры.

Освещение и фильтры имеют решающее значение для получения качественных карт. Для достижения стабильности излучаемого тока используют источники постоянного тока.

Фильтры: зеленый (546нм)- применяют для получения изображения кровеносных сосудов и поверхностного изображения, оранжевый (605нм) – в этом случае в получении сигнала доминирует оксиметрия, красный (630нм)-в получении сигнала доминирует насыщение крови гемоглобином, 700-850нм – преобладает влияние рассеивание света, значение уровня насыщения гемоглобином падает (Blood et al., 1995; Frostig et al., 1990; Narayan et al.,1995). Использование фильтров позволяет записывать различные физиологические процессы.

Выбор времени сбора данных.

При записи ОИ имеется «шум» от дыхательной и сердечно-сосудистой систем. Сосудодвигательная реакция составляет низкую частоту (около 0,1 Гц). Для снижения зашумленности сердцебиением и дыханием желательно синхронизовать с изображением.

Для усреднения шума оптимально усреднять записи от 20 до 100 ответов. В статье рекомендован стимул продолжительностью 3-4 с, сбор данных возможен дольше, т.к. в этом случае в основу карт ложаться первые два компонента внутреннего сигнала (оксиметрия и рассеивание света).

В статье Бонхёффера и Гринвальда (1996) указано, сто для «метаболической релаксации» (восстановления почти до исходного состояния) необходимо минимум 7-8 с. При этом интервал между стимулами не должен быть слишком большим, чтобы собрать максимальное количество изображений.

Получение изображений.

Для каждого стимула изменение отражательной способности сигнала отдельных пикселей записывается во время или сразу после предъявления стимула, затем усредняются по числу повторений. Как правило, поглощение начинает увеличиваться через 0,5с после начала стимула и достигает максимума через 3-4 с.

Основная трудность в записи «шума»: косвенное отношение между нейронной активностью и отраженным сигналом. Большинство стимулов вызывает общее повышение поглощения, т.е. ответ включает в себя и области, где нет нейронной активности на стимул.

Для удаления шума записывают «бланк»: сумма ответов на все стимулы в наборе. Для этого должны быть соблюдены два важных условия: Используемые стимулы должны перекрывать все пространство общего стимула (в наборе ориентационных решеток отдельные ориентации должны охватывать диапазон 180◦ с одинаковым шагом). Во-вторых, сумма ответов на все отдельные стимулы должны быть равномерными по всей области интереса (!!!!).

При использование «ортогональных» стимулов, которые вызывают ответ у непересекающихся популяций нейронов вместо «бланка» делают вычитание или деление (в случае очень небольших различий) ответов на горизонтальный стимул в сочетании с вертикальным или левого глаза по сравнению с правым в случае доминирования.

Возможно дополнительно вычесть «первый кадр», до фактического начала стимуляции. Таким образом удаляются артефакты, возникающие в течении стимуляции (?).

В статье приведены карты , полученные в результате 96 повторений стимула и несколько вариантов обработки, указанных выше.

Альтернативным способом получения карты предпочитаемой ориентации является анализ карты по отдельным пикселям на набор стимулов. Ответ одного пикселя рассматривается как ответ одного нейрона .

Carandini и Sengpiel, 2004 анализируя карты по пикселям для V1 кошки импользовали гиперболическое соотношение и Гауссовское распределение.

\*основной компонент анализа (РСА) и связанные с ним методы.

Главный компонент анализа (РСА) был разработан Sirovich и Эверсон (1992): декорреляция сигналов различного происхождения в линейной смеси сигналов.

Изображение с периодической стимуляцией.

Kalatsky и Stryker, 2003. Этот подход сравним с получением изображения в фМРТ анализ Фурье (изображение раскладывается синусоиды различных частот).

Чачстота выбирает отличной от частоты дыхания и ЧСС. Теоретически, амплитуда ответа одного пикселя в течение долго времени может быть использована для определения силы реакции и предпочтения. Компонент сигнала, частота которого близка к стимулу может загрязнеять результаты, поэтому частота стимуляции должна отличаться от основных гемодинамических компонентов.

Отдельные моменты: даже после удаления медленных колебаний заметно, что фазы ответа представлены не в раной степени , неизвестно время задержки(гемодинамической) между стимулом и внутренним сигналом. Если стимулы в наборе не являются одинаково эффективными ,то соотношение стимул-фаза ответа не может быть простым (линейным), и запаздывание фазы ответа не может быть одинаковым для различных стимулов.

После монокулярной стимуляции V1 у котенка ответ при бинокулярной стимуляции не были точно в противофазе. Дополнительно различие задержки ответа на картах рассмотрена в статье Mrsic-Flogel и др., 2003.! (посмотреть).

1. Применение оптического картирования.

Первые работы с ОИ помогли подробно рассмотреть функциональную архитектуру зрительной коры кошки и обезьяны. В настоящее время изучают двигательную, соматосенсорную, слуховую кору головного мозга и обонятельных луковиц. Проводят оценку коры у бодрствующих животных , изучение пластичности и развитие коры в норме и при патологиях. В последнее время метод также используется для визуализации распространения очагов эпилептических припадков и реорганизации функциональных корковых карт при ишемии. Метод был адаптирован к изображению коры человека интраоперационно.

Исследования в области функциональной архитектуры зрительной коры

Функциональная архитектура зрительной коры активно исследовалась и до появления метода оптического картирования. Применяя электрофизиологические методы Хьюбел и Визел выделили ориентационные колонки и колонки глазодоминантности, наличие которых затем было подтверждено с помощью маркировки 2-дезоксиглюкозы Singer, 1981;. Singer и др, 1981. В работах других исследователей в дальнейшем были описаны кластеры клеток с предпочтительном направлением движения, пространственные столбцы. Оптическое картирование стало инструментом для создания точного расположения и взаимосвязи из вышеупомянутых модулей ((Bartfeld and Grinvald, 1992; Bosking et al., 2002; Hübener et al., 1997;

Kim et al., 1999; Landisman and Ts’o, 2002; Shmuel and Grinvald, 1996; Weliky et al., 1996), что недостижимо при использовании классических методов. OI позволил визуализировать архитектуру ориентационных колонок и доминирования в полях 17 и 18 у ряда видов (кошки, хорьки, макаки, землеройки, сипухи и мартышки), предпочитаемого направления движения, предпочитаемой пространственной частоты, выявить кластеры нейронов по цветовой селективности. Метод был использован для выявления функциональной архитектуры у обезьян в области МТ , для решения взаимоотношений между столбцами в область V2, продемонстрировать распределение этапов обработки у макак в нижневисочной коре.

Объединение оптического картирования с другими методами позволило выявить свойства отдельных нейронов , пролить свет на горизонтальные и боковые нейронные связи.

Исследования функциональной архитектуры соматосенсорной коры.

OI в отношении этой области коры был использован в первую очередь для изучен первичной соматосенсорной коры у крыс и обезьян. Использование оптической визуализации позволило получить функциональную карту одиночных представлений от вибрисс в первичной соматосенсорной коре. Результаты, полученные в результате применения оптического картирования согласуются с функциональными картами, полученными в исследованиях с использованием красителей. Однако, при оптическом картировании сигналы получаются чаще больше, чем при использовании электрофизиологического картирования. Такое расхождение активности возможно из-за особенности проекции от вибрисс к бочонкам. Большая площадь проекции может быть обусловлена распространением активности по горизонтальным связям в слоях 2 и 3. При этом следует учитывать, что в отличии от обработки сигнала в зрительной коре, в соматосенсорной нельзя провести разделение ответа от одного вибрисса. Различие в результатах в зависимости от метода исследования является проблемой. Топографическая карта соматосенсорной коры была получена с использованием электрофизиологических методов. Однако, как и в зрительной коре, электрофизиологические методы не позволяют выявить организацию структур в пределах сенсорной коры.