Optical imaging combined with targeted electrical recordings,

microstimulation, or tracer injections

Amos Arieli a,b,\*, Amiram Grinvald a,b

a Department of Neurobiology, The Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel

b The Grodetsky Center for Higher Brain Functions, The Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel

Received 5 November 2001; received in revised form 30 January 2002; accepted 1 February 2002

В статье рассматривается протокол проведения эксперимента и разработанные авторами устройства для сочетания метода оптического картирования с микроэлектродной стимуляцией в острых и хронических экспериментах на кошках и обезьянах. Также возможно использование целевых инъекций трассеров. Разработанная авторами конструкция позволяет проводить хронические эксперименты в течение длительного времени с минимальным давлением на черепную коробку и риском проникновения инфекций.

В нейробиологии фундаментальным вопросом остается связь морфологии и свойств ответа отдельного нейрона с общей функциональной архитектурой корковых колонн. Более чем 40 лет для изучения коры головного мозга используют записи электрической активности с микроэлектродов. В этих опытах может быть сохранена целостность твердой оболочки коры, в результате мозг животного может быть сохранен нетронутым несколько лет.

Оптическая томография может использоваться как комплементарный метод для изучения коры головного мозга на уровне клеточных популяций. Метод давно применяется самостоятельно для изучения принципов лежащих в основе развития коры, организации и функции нейронных популяций, а также для обработки сенсорной информации в естественных условиях. Во многих случаях, применение оптического картирования требует удаления твердой оболочки. Авторы разработали прозрачный состав на основе силикона, способный частично заменить твердую оболочку и сохранить целостность коры головного мозга, а также обеспечить стабильность оптических карт на срок более года. Эта разработка позволила также объединить оптическую томографию с классическим методом, таким как применение микроэлектродов. Эта интеграция и рассматривается в данной статье. Комбинированный подход позволил авторам изучить взаимосвязь морфологии аксонов и дендритных разветвлений одного нейрона в функциональной архитектуре коры, показать, что динамика сети ограничена кортикальной функциональной архитектурой, исследовать динамику ответа сети на стимул, определить влияние последовательности спайков одного нейрона на динамическую активность нейронных популяций на большой площади коры. Все эти вопросы также могут быть теперь рассмотрены и на животных в сознательном состоянии. Авторы отмечают, что разработанная конструкция также может быть использована для записей без получения оптических изображений, например, изменить подход к классическим электрофизиологическим методам, так как возможно введение электроа при полном визуальном контроле. Основной упор в статье на описание «окна» и микроманипулятора.

2. Материалы и методы

Основные принципы

1. «Окно»

При обеспечении доступа для визуализации поверхности коры встают две фундаментальные проблемы: движение поверхности мозга из-за дыхания и сердцебиентя, и опасность проникновения инфекций. Для устранения этих проблем черепное отверстие «запечатывают». Для использования микроэлектрода под визуальным контролем, элетрод должне быть вставлен под прозрачное окно таким образом, чтобы имелась возможность его передвижения. Для хронического эксперимента требуются полная герметизация, отверстие может быть заполнено цереброспинальной жидкостью, фосфатным буфером, физ.раствором, силиконовым маслом или агаром без пузырьков воздуха, так как они будут мешать визуализации. Уплотнение среды частично решает проблему пульсации мозга путем минимизации движения коры. Должна быть сохранена возможность заполнения «окна» полностью даже если камера не горизонтальна. При открытии шахты следует избегать больших изменений давления среды на поверхность. Внутренняя часть камеры должна быть абсолютно гладкой (иначе появляется дополнительные сложности при очистки и опасность инфицирования) и легко и герметично запечатываться прозрачном колпаком. Материал камеры должен быть инертным и биосовместимым. Предложенная конструкция крышки основана на простом механическом принципе4стекло прижимают уплотняющим кольцом, тонувшем в поверхности камеры. Заполняют до конца отверстие через небольшую щель.

1. Микроманипулятор.

Для интеграции методов требовался микроманипулятор, отвечающим следующим требованиям: электрод не должен закрывать обзор коры, обеспечивать легкий доступ к большой области мозга, возможность проникновения электрода под разными углами, герметизация черепной коробки, отсутствием интерференции с оптическим устройством.

Были разработаны три основные конструктивные особенности: поверхность, через которую проникает электрод является сменной крышкой из стекла или плексигласа, чуть больше чем крышка камеры; электрод, помещенный в направляющий канал, проникает через резиновую прокладку; микродиск сдвинут. Скользящая крышка позволяет закрыть прозрачной поверхность почти полностью верх установки. Заполнив камеру жидкостью, крышку ставят в закрытое положение. Один оборот головкой, которая крепит камеру, прижимает крышку напротив оптического окна до полной герметизации. Такое положение поднимает манипулятор на 2 мм (от чего???)Жесткая фиксация микроманипулятора только к камере минимизирует перемещение манипулятора относительно головки, тем самым повышая стабильность записи. При этом остается возможность перемещения электрода под различными углами в точно выбранном месте.

1. «скользящее окно»

Камера представляет собой цилиндр, высотой 8,5 мм, изготовленный из нержавеющей стали или титана. Нижняя часть камеры имеет коническую форму. Углубления на внешней поверхности обеспечивают боле надежное сцепление с зубным цементом. Верхняя часть камеры имеет уплотнительное кольцо, поверхностная канавка обеспечивает трассу для скольжения. Колпачок также имеет уплотнительное кольцо. Во время движения двигающаяся часть крышки выступает над шахтой, сохраняя запечатанным черепное отверстие. Скользящая крышка представляет собой прямоугольник со стеклом или плексигласом толщиной 2 мм, которое остается зафиксированным во время движения самой крышки. Повороте резьбового кольца, закрепленная в верхней поверхности колпачка в верхней части стекла, обеспечивает полную герметичность, так как уплотнительное кольцо сдавливается со всех сторон.

При записи оптического сигнала зрительной коры кошки авторы используют одно окно с обоих полушарий; при исследовании коры обезьян –два.

1. Ход операции и установки

Камера крепится к очищенной поверхности черепа с помощью зубного цемента. Верхний слой акрила должен быть гладким для контакта с кожей. Во время полимеризации следует избегать тепла, поэтому авторы рекомендуют покрывать цемент марлей, смоченной физиологическим раствором. В острых экспериментах краниотомия выполняется до установки шахт. Трепанационное отверстие может иметь подведенную трубку (из иглы 18G), которая позволит вводить дополнительные вещества, например красители. В случае отека головного мозга через трепанационное отверстие возможно снизить давление.

Для хронических экспериментов на обезьянах сначала имплантируют камеру с держателями. Для поддержки и стабилизации цементной пробки, дополнительно вкручивают два титановых винта. Трепанация проводится через несколько месяцев, когда установленная камера поджила, и обезьяна полностью обучена. Иссекают твердую мозговую оболочку и ставят на её место заменитель. Окно из стекла вне записи закрывают металлическим колпачком. Для МРТ исследований металл камеры заменяли на титановый. У обезьян трепанационные отверстия располагаются как можно ближе друг к другу. Для предотвращения загрязнения авторы разработали металлический колпачок с внутренней резьбой: он ввинчивается до трепанационного отверстия, позволяя асептически обработать шахту. Для использования микродиска использовался адаптер с резьбой в камеру. Микродиск прикреплялся к верхней поверхности адаптера.

Результаты.

Разработанная конструкция для комбинирования оптических и электрофизиологических записей была использована для ряда экспериментов в лаборатории авторов. Целью этих работ было записать нейроны областей V1 и V2и связать электрическую активность отдельного нейрона с функциональной анатомией и динамикой, полученными с помощью оптической томографии.

Место проникновения микроэлектрода определено точно по заранее снятым функциональным картам. Позиционный микродиск был использован для направления электрода в функциональные домены, определенных в ходе записи оптических карт. (внутренними сигналами или красителями).

Целенаправленная электрическая запись позволяет решить множество вопросов. Например, для подтверждения колонкообразной организации, полученной в ходе оптической записи. Записи от отдельных электродов были достигнуты при установлении электрода для вертикального проникновения. Использование красителей позволило исследовать динамику численности и одиночной деятельности нейрона.

1. Подтверждение дирекциональной карты в области 18 зрительной коры кошки.

Ранее проведенные исследования показали, что организации нейронов в дирекциональные колонки в зависимости от глубины отличаются от классического описания кортикальных колонок. В 17 и 18 полях предпочитаемые направления в вертикальном направлении минимум один раз было установлено вспять наз или внутри зернистого слоя. Ориентационные предпочтения в этом же направлении не меняется. В свете этих работ было предположено, что функциональная организация дирекциональной селективности может отличаться от классической столбчатой организации. В свете этих докладов, авторами был проведен ряд исследований для изучения групп нейронов в области 18 вдоль вертикальной оси. В ходе этого исследования было показано, что в 18 поле зрительной коры кошки нейроны сгруппированы в соответствии с предпочитаемым направлением.

Дирекциональные карты были построены на основе движения верх-вниз и влево-вправо, вместе с общей поверхностью коры. Места проникновения электрода наложены на картах близко к центрам патчей дирекциональной селективности.

В каждом столбце предпочитаемая ориентация была преимущественно постоянна и показана значительная корреляция с данными, полученными методом оптического картирования. В столбцах, в которых предпочитаемая ориентация была направлена косо, были расположены в серых зонах на ориентационных картах. Т.О., их предпочитаемая ориентация согласуется с детектируемым оптическим изображением. Проведенные эксперименты также опровергли предположение, что предпочитаемые ориентации в ходе электрической записи могут быть связаны с треками, которые не были ортогональны к коре головного мозга.

1. Изучение пространственной частоты доменов зрительной коры кошки.

В ходе экспериментов было выявлено два типа доменов: с предпочтением высокой и низкой пространственной частоты. Исследование проводилось с использованием цитохромоксидазы. Глубина записи 1000 мкм. Полученные данные визуальной томографии и электрофизиологических записей практически совпадали, и подтвердили столбчатую структуру коры.

1. Связь спонтанной активности нейрона с архитектурой коры. В этой серии экспериментов авторы изучали ориентационные колонки в режиме реального времени с временным разрешением 1 мси пространственным разрешением в несколько микрон, одновременно с измерением локального потенциала поля (области?). Выбранный нейрон имел высокий уровень спонтанной активности, четкую ориентационную настройку и надежный ответ на двигающиеся решетки. Была замечена зависимость спонтанной активности от пространственной текущей активности нейронов большой области коры. Для определения характера состояния коры в момент максимальной активности отдельного нейрона были построены усредненные карты, наблюдаемые в момент максимальной активности нейрона, выделен активирующий стимул. Данные совпадали с ориентационными картами. Было замечено, что пространственные паттерны активности нейронов были одинаковы и при спонтанной активности нейрона, и при его стимуляции. Исследователи могли предсказать спонтанную активность отдельных неронов, рассматривая общую картину активности коры.
2. Локальные инъекции

Авторы отмечают, что оптическая визуализация позволяет непосредственно наблюдать эффект введения трансмиссеров в кору, а также определения конечной точки их доставки.

Кроме того, интеграция этих двух методов позволяет проводить морфологические ииследования и соотнести разветвление аксонов и дендритов отдельных клеток с функциональной организацией изучаемой области. В качестве примера авторы приводят данные исследования доминирующих колонок в области V1 зрительной коры обезьян при

монокулярной стимуляции. Нацеливание пипеткой проводилось по сосудистой карте. Были выявлены нейроны с доминирующим глазом и прослежены пути их соединения с отдельными областями в той же области.