

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПТИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ ПО ВНУТРЕННЕМУ СИГНАЛУ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ФУНКЦИИ ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2011 г. И. В. Бондарь*, канд. биол. наук; Е. Е. Минакова**, студентка;
Р. С. Иванов*, канд. биол. наук

* Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

** Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва

E-mail: bondar@ihna.ru

Оптическое картирование по внутреннему сигналу является уникальным методом изучения мозга, позволяющим с высоким пространственным разрешением исследовать функциональную анатомию коры головного мозга. Современные модификации этого метода позволяют сократить время получения отдельных функциональных карт, что открывает новые перспективы использования данного подхода в нейрофизиологических экспериментах. Показана принципиальная возможность использования оптического картирования по внутреннему сигналу для объективного тестирования зрительной функции: при изменении контраста зрительного стимула наблюдались изменения как в амплитуде метаболического отклика в коре, так и в структуре функциональных карт.

Ключевые слова: оптическое картирование коры головного мозга, внутренний сигнал, функциональные карты мозга, ориентационные колонки, ретинопия, контрастная чувствительность зрительной системы.

Коды OCIS: 330.1800, 330.7310.

Поступила в редакцию 01.02.2011.

Введение

Зрительная система разных видов млекопитающих обнаруживает высокую степень специализации, которая позволяет надежно детектировать объекты в разнообразных условиях естественного освещения. Изучение особенностей сравнительной физиологии зрительной коры головного мозга (далее в тексте зрительная кора или просто кора) млекопитающих позволяет определить, за счет каких функциональных механизмов обеспечивается тонкая настройка зрительного анализатора [1]. Классические исследования свойств нейронов проводят с помощью регистрации внеклеточных потенциалов отдельных нервных клеток. Однако такой подход является довольно трудоемким и длительным по времени, поскольку требует накопления данных на большой популяции клеток. Новые исследовательские технологии позволяют быстро и эффективно регистрировать активность больших популяций нейронов и выявлять особенности работы зрительной коры [2, 3]. Одним из таких мето-

дов является оптическое картирование по внутреннему сигналу, в основе которого лежит использование разницы в оптических свойствах окисленной и восстановленной форм гемоглобина [4].

Можно выделить три основных физиологических явления, которые влияют на оптические свойства активной ткани мозга:

- увеличение объема крови в ограниченном участке коры,
- изменение количественных соотношений окисленных и восстановленных форм биологических молекул (например гемоглобина),
- изменение рассеивающей способности нервной ткани, связанное с реполяризацией мембран клеток в процессе генерации потенциала действия.

Как правило, для проведения оптического картирования по внутреннему сигналу используется тот факт, что спектры поглощения окисленной и восстановленной форм гемоглобина различны, и, значит, по степени поглощения света определенной длины волны можно судить о содержании определенного вещества

в тканях мозга. В частности, при активации локальной популяции нейронов происходит накопление дезоксигемоглобина в ограниченном объеме нервной ткани, что ведет к увеличению поглощения света этим участком коры. На усредненных картах коры ее активированные функциональные модули выглядят более темными.

Основной целью данного исследования было определение параметров зрительной стимуляции, способных оптимально активировать функциональные модули коры. В экспериментах на крысах использовали движущиеся полосы, которые позволяли выявлять ретинопическую организацию первичной зрительной области коры. Изменение контраста зрительного стимула позволило выявить пороговые значения, запускающие нейронные реакции. В экспериментах на анестезированных кошках в качестве стимула использовали решетки, составленные из чередующихся темных и светлых полосок. Изменяя ориентацию и контрастность таких решеток, можно было выявить закономерности активации популяций нейронов в первичной зрительной коре.

Методика

Эксперименты проводили на анестезированных животных (крысах и кошках). Наркоз инициировали внутривенной инъекцией уретана (крыса) или инъекцией кетамина (кошка). Глубину наркоза и физиологическое состояние животного оценивали с помощью электрокардиограммы и контроля за содержанием углекислого газа в выдыхаемом воздухе. На первом этапе хирургического вмешательства обеспечивали оптический доступ к коре: рассекали кожу над черепом, удаляли мягкие ткани с поверхности кости. Регистрация оптического сигнала, как правило, возможна через проникаемую для красного света истонченную кость черепа (крыса), но в некоторых случаях проводили краниотомию (кошка). Регистрации данных предшествовало снятие зеленого образа: получение сосудистой карты мозга. Затем мы выбирали оптимальные области интереса (ОИ) и фокусировали камеру под поверхностными сосудами. Кору мозга освещали красным светом с длиной волны 630 нм, позволяющим оптимально различать дезоксигемоглобин и оксигемоглобин. Интенсивность освещения устанавливали по верхней границе диапазона чувствительности камеры.

В настоящий момент известны два методических подхода к организации экспериментов по оптическому картированию коры. В первом случае для осуществления зрительной стимуляции и накопления экспериментальных данных используют так называемый блоковый дизайн. При таком подходе предъявление инициации цикла стимуляции и записи данных синхронизируют с дыхательным и сердечным циклами животного, что позволяет избежать проявления глобальных артефактов, связанных с указанными физиологическими циклами. В зависимости от типа стимуляции на фазовых картах зрительной коры можно выделять функциональные модули, задействованные в анализе информации не только об ориентации стимула (карты/модули ориентационной чувствительности) или направлении его движения (дирекциональная чувствительность), а также о кодировании положения стимула в поле зрения животного (ретинопия). Однако такой подход не позволяет избежать негативного влияния медленной вазомоторной активности, которое способно в значительной степени ухудшать качество функциональных карт [5]. В качестве альтернативного подхода в настоящее время успешно используют метод непрерывной зрительной стимуляции и регистрации оптического сигнала с поверхности коры [3, 6]. Такой подход позволяет подобрать частоту стимуляции, которая отличается от частот физиологических циклов (дыхательного, сердечного и вазомоторного), способных влиять на качество функциональных карт. Использование анализа Фурье для обработки экспериментальных данных позволяет надежно выделять картирующий сигнал (mapping signal) из совокупности периодических сигналов, вносящих вклад в регистрируемую от определенного объема ткани мозга интенсивность света. Поточечный анализ изображений позволяет строить фазовые и амплитудные функциональные карты коры. В зависимости от типа стимуляции на фазовых картах зрительной коры можно выделять функциональные модули, задействованные в анализе информации не только об ориентации стимула или о направлении его движения, а также о кодировании положения стимула в поле зрения животного. Амплитудные карты отражают силу отклика популяции нейронов в ответ на предъявление стимула.

В нашем случае зрительные стимулы предъявляли на мониторе компьютера, используя

скотопическую монокулярную непрерывную стимуляцию одиночной полоской, движущейся в вертикальном направлении с периодом 20 с. Так можно было выявить особенности ретинопической организации первичной зрительной коры крысы. В экспериментах на кошках в качестве зрительных стимулов использовали ориентационные решетки (ориентацию меняли в диапазоне 0–360°) с периодом вращения 60 с и пространственной частотой 0,2 цикл/град. Такие решетки оптимально активировали поля 17 и 18 зрительной коры кошки. В экспериментах с изменением контраста использовали до семи его значений: 0,8, 1,4, 6,25, 12,5, 25, 50 и 100% от максимального уровня.

Функциональные карты построены в результате накопления до 15–60 предъявлений каждого стимула. Для каждой точки на функциональных картах определяли фазу цикла стимуляции, которая вызывала максимальный отклик. Полученные в результате фазовые карты в случае экспериментов на крысах отражали вовлеченность определенных участков коры в анализ информации о пространственном расположении зрительного стимула (ретинопическая информация). В экспериментах на кошках на фазовых картах четко выявляется рисунок активации ориентационных колонок, поскольку в этом случае фаза цикла стимуляции соответствует изменениям ори-

ентации зрительного стимула. Кроме того, используя разные гармоники спектра Фурье, можно было построить также функциональные карты чувствительности коры к направлению движения. Функциональные карты использовали для дальнейшего анализа, в ходе которого изучали как сохранность пространственной структуры карты, так и усредненные амплитудные характеристики. Дополнительную обработку карт проводили с помощью программ, созданных в среде программирования Matlab.

Результаты

В экспериментах по исследованию ретинопической организации зрительной коры крысы на амплитудных функциональных картах поверхности коры можно выделить участок, содержащий популяционный ответ на зрительный стимул. Однако на фазовой карте сигнал может быть неразличим, так как на таких картах, как правило, могут доминировать глобальные сигналы, которые маскируют эффекты стимуляции. Поэтому мы прибегаем к дополнительной обработке карты пространственно-частотными фильтрами. В итоге карта приобретает представленный на рис. 1 вид с хорошо различимой областью, содержащей постепенное изменение серого

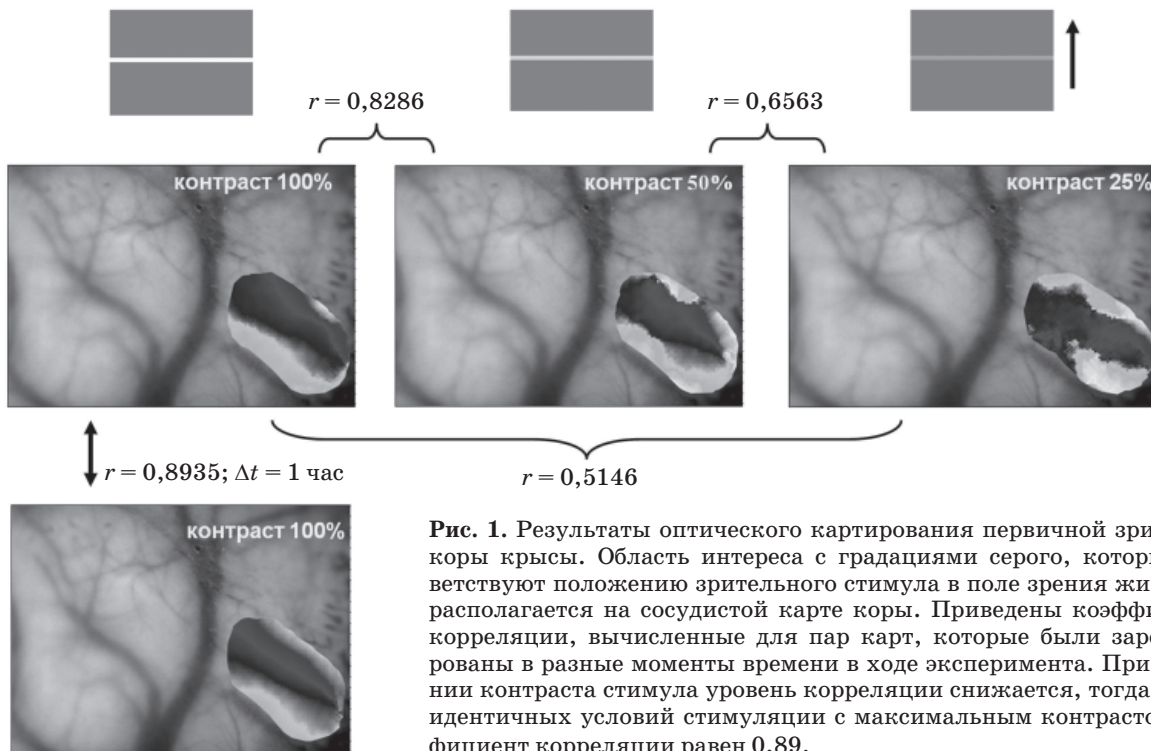


Рис. 1. Результаты оптического картирования первичной зрительной коры крысы. Область интереса с градиациями серого, которые соответствуют положению зрительного стимула в поле зрения животного, располагается на сосудистой карте коры. Приведены коэффициенты корреляции, вычисленные для пар карт, которые были зарегистрированы в разные моменты времени в ходе эксперимента. При изменении контраста стимула уровень корреляции снижается, тогда как для идентичных условий стимуляции с максимальным контрастом коэффициент корреляции равен 0,89.

цвета (от светлого к темному), каждая градация которого соответствует определенному положению зрительного стимула на мониторе. Этот участок коры и является областью интереса, которую мы выделяем и используем в дальнейшем для более детального анализа. При сопоставлении этой области с сосудистой картой коры важно удостовериться в отсутствии артефактов, которые могут быть внесены проходящими в данном месте крупными сосудами.

Сравнение индивидуальных функциональных карт разных животных позволяет выявить сходство и различие в топографии сигнала. Сходство выражается в наличии и принципиальной структуре ответа при идентичной стимуляции и может быть описано количественно (размер области, ширина полос и пр.). Разница, прежде всего, обусловлена различиями в индивидуальном зрительном опыте животных, а следовательно, и в строении индивидуального мозга. Определенный фактор может сыграть и созревание коры, в которой установление связей между зрительными нейронами происходит за короткий промежуток времени у уже зрячего животного.

В то же время для одного животного можно констатировать стабильность расположения и структуры нейронной активности. При регистрации в разные промежутки времени сигнал обнаруживается в одном и том же месте, периодичность изменения цвета совпадает. Данное сходство мы можем оценить количественно, используя коэффициент корреляции. Так, рассчитывая коэффициенты корреляции для областей интереса на функциональных картах одного животного, мы установили, что для построенных в разные промежутки времени карт значения коэффициентов составляют от 0,88 до 0,92. Таким образом, обнаруживается высокая степень сходства между картами, полученными в ходе эксперимента для идентичных условий стимуляции, но в разные моменты времени. Было установлено, что коэффициент корреляции может служить действенным инструментом для определения стабильности регистрации оптического сигнала. Следует отметить, что часто наблюдаемые колебания коэффициента корреляции могут быть связаны с изменениями функционального состояния коры. Поэтому по-прежнему важной задачей остается отработка протокола анестезии, что позволит увеличить достоверность регистрируемых данных.

Стабильность регистрации позволила нам провести пилотную серию экспериментов, направленных на выявление закономерностей в изменении силы реакции первичной зрительной коры крысы в ответ на изменения контрастности зрительного стимула (рис. 1). Так, при уменьшении контраста движущейся по экрану полоски в 2 раза от максимального значения мы фиксируем определенное ухудшение силы ответа ($r = 0,82$). При последующем кратном изменении контрастности сигнал становится практически не различимым среди шума, корреляция в данном случае при сравнении с ответом на стимул с максимальным значением контраста составляет 0,5. В то же время при повторном использовании первоначальных значений контрастности стимула (функциональную карту получили через час после первоначальной) коэффициент корреляции составил 0,89. В перспективе мы планируем получить амплитудные характеристики отклика, что позволит построить закономерности, отражающие влияние контраста на активацию первичной зрительной коры крысы. Однако уже сейчас можно утверждать, что используемый нами методический подход открывает новые перспективы для применения оптического картирования в тестировании характеристик зрительного анализатора.

Пилотные эксперименты по исследованию влияния контраста зрительного стимула на силу реакции нейронных популяций показали перспективность использования оптического картирования по внутреннему сигналу для объективного тестирования работы зрительной коры. Для более детального исследования на 6 кошках была проведена серия экспериментов, в которой анализировали фазовые и амплитудные функциональные карты ориентационной и дирекциональной чувствительности.

На рис. 2 представлены кривые, отражающие закономерности изменения силы отклика в зависимости от контраста зрительного стимула. Данные приведены отдельно для каждого животного. Значения амплитуды оптического сигнала усредняли для двух областей интереса, расположенных в полушариях мозга ипси- либо контралатеральных по отношению к стимулируемому глазу. Используемая нами методика позволяет одновременно получать оптические карты для ориентационной чувствительности (кривые, обозначенные кружками) и дирекциональной чувствительности (кривые, обозначенные треугольниками).

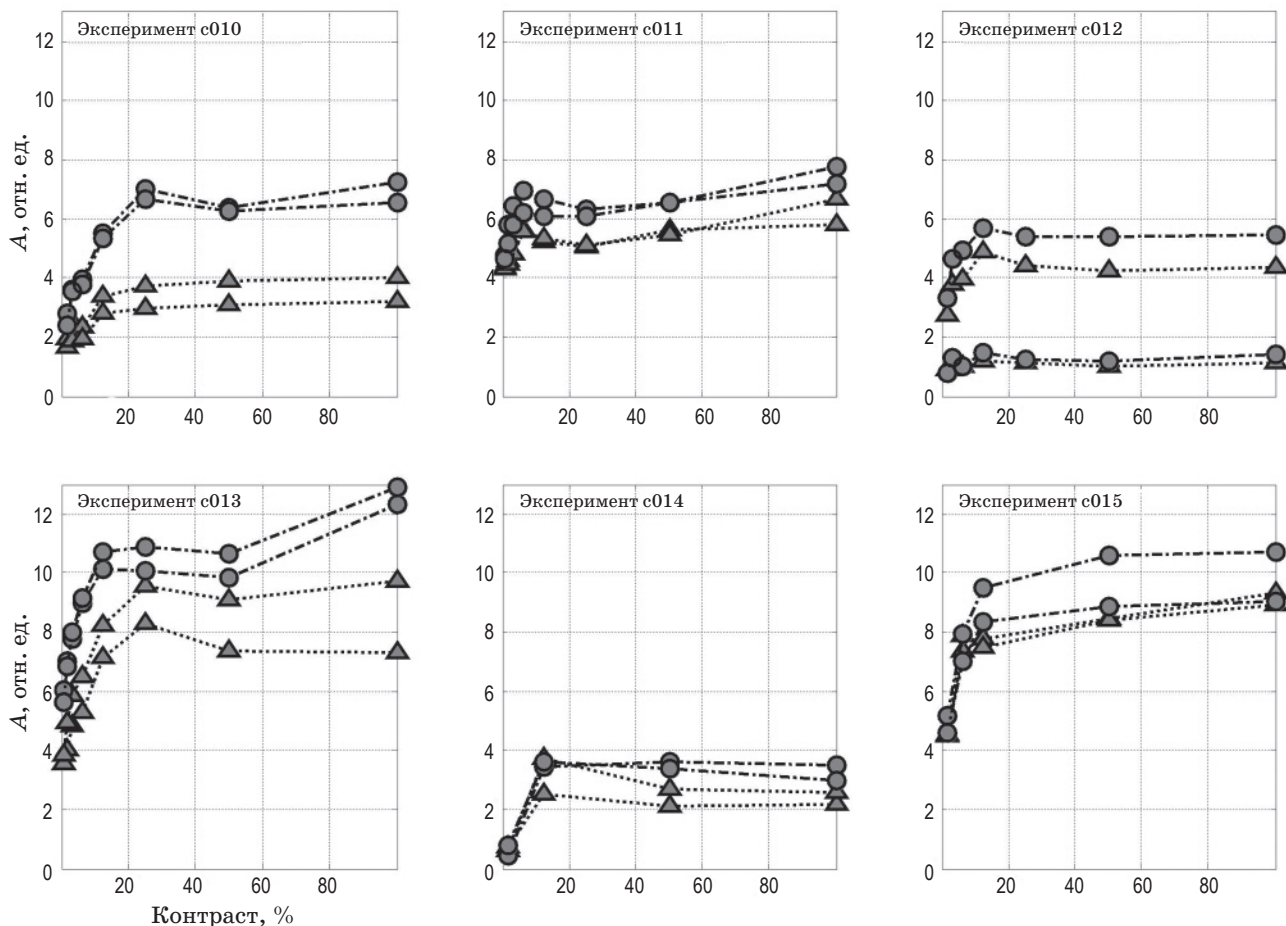


Рис. 2. Индивидуальные графики зависимости силы оптического сигнала (A) от контраста зрительного стимула, представляющего собой решетку с пространственной частотой 0,2 цикл/град. Кривые, обозначенные кружками, соответствуют данным по амплитуде ориентационных карт, а треугольниками – карт, отражающих чувствительность к направлению движения зрительного стимула. Измерения в каждом эксперименте проводили для двух областей интереса: ипси- и контралатеральной по отношению к стимулируемому глазу.

В первую очередь следует отметить, что усредненные кривые для амплитуды оптического сигнала различаются по средним значениям. Так, в экспериментах “с013” и “с015” (см. соответствующие пометки на графиках нижнего ряда рис. 2) наблюдался высокий уровень значений амплитуды, тогда как в эксперименте “с014” значения амплитуды оптического сигнала были минимальными. Сила оптического отклика для контра- и ипсилатерального полушария за редким исключением (эксперимент “с012”) не обнаруживала значительных отличий. Предварительно можно отметить тенденцию, указывающую на то, что амплитуда сигнала, полученная по дирекциональным функциональным картам, снижена по отношению к отклику, наблюдаемому в ориентационных картах. Наиболее ярко эта закономерность может быть прослежена в экс-

перименте “с010”, где амплитуда дирекционального сигнала в два раза снижена по отношению к ориентационному.

Несмотря на индивидуальные различия во всех экспериментах четко прослеживается зависимость оптического отклика от контраста зрительного стимула. Так, для крайних значений контраста (0,8 и 100%) наблюдается в среднем двукратное снижение амплитуды оптического отклика. Для построения усредненных графиков по всем экспериментам данные были нормированы относительно значения амплитуды, вычисленного при усреднении функциональной карты, которая была получена в ответ на предъявление стимула с уровнем контраста 100% в контралатеральном по отношению к стимулируемому глазу полушарии. Усредненные данные приведены на рис. 3. Таким образом, подтверждаются на-

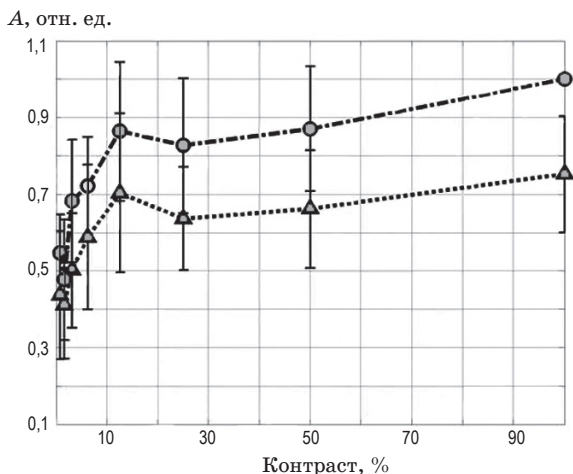


Рис. 3. Нормированные усредненные кривые зависимости силы оптического сигнала (A) от уровня контраста зрительного стимула. Данные 6 экспериментов. Обозначения кривых идентичны таковым на рис. 2.

блюдения, проведенные на отдельных животных: четко прослеживается закономерность изменения силы оптического сигнала в зависимости от контраста зрительного стимула. Однако для более надежного подтверждения наблюдаемых феноменов необходимо провести дополнительные эксперименты, которые позволили бы статистически достоверно описать результаты предварительных экспериментов.

Обсуждение результатов

В ходе экспериментов по оптическому картированию зрительной коры крыс и кошек было показано, что этот методический подход

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Shevelev I.A., Lazareva N.A. Characteristics of the responses of visual cortex neurons with sensitivity to bars or cross-shaped figures in cats // *Neurosci Behav Physiol.* 2007. V. 37. № 4. P. 311–319.
2. Grinvald A. Imaging input and output dynamics of neocortical networks in vivo: exciting times ahead // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 40. P. 14125–14126.
3. Kalatsky V.A., Stryker M.P. New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal // *Neuron.* 2003. V. 38. № 4. P. 529–545.
4. Grinvald A., Frostig R.D., Lieke E., Hildesheim R. Optical imaging of neuronal activity // *Physiol. Rev.* 1988. V. 68. № 4. P. 1285–1366.
5. Mayhew J.E., Askew S., Zheng Y., Porrill J., Westby G.W., Redgrave P., Rector D.M., Harper R.M. Cerebral vasomotion: a 0,1-Hz oscillation in reflected light imaging of neural activity // *Neuroimage.* 1996. V. 4. № 3 Pt 1. P. 183–193.
6. Vanni M.P., Provost J., Casanova C., Lesage F. Bimodal modulation and continuous stimulation in optical imaging to map direction selectivity // *Neuroimage.* 2010. V. 49. № 2. P. 1416–1431.

может быть крайне перспективен для использования в случаях, когда необходимо быстро, объективно и эффективно оценить зрительную функцию экспериментального животного. Оптическое картирование по внутреннему сигналу можно использовать не только в фундаментальных исследованиях. Его применение может внести значительный вклад в развитие прикладной медицинской науки. По данным Всемирной организации здравоохранения предполагается, что если не будут приняты срочные меры, то к 2020 году число незрячих людей в мире может удвоиться. Между тем до 75% всех случаев слепоты у взрослых людей можно предотвратить с помощью профилактики и лечения. В настоящее время для некоторых дегенеративных заболеваний сетчатки созданы экспериментальные модели (на животных), на основе которых возможна разработка методов лечения поражений зрительной системы. При использовании данных моделей важную роль играет регулярное объективное тестирование зрительной функции: остроты зрения, контрастной чувствительности и динамических характеристик зрительного стимула. В настоящее время для этой цели чаще всего применяют поведенческий и электрофизиологический методы тестирования зрительной функции. У них есть определенные достоинства и недостатки. Мы предлагаем использовать метод оптического картирования по внутреннему сигналу, который может ускорить процесс отладки новых терапевтических подходов.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-01441а и Программой ОБН РАН “Интегративные механизмы регуляции функций в организме”.