

БИОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ОЛЬФАКТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2023 г. А.Е. Матухно*, М.В. Петрушан*, Л.В. Лысенко*, **, #, В.Н. Киной*

*Научно-исследовательский технологический центр нейротехнологий Южного федерального университета, пр. Стачки, 194, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

**Физический факультет Южного федерального университета, ул. Зорге, 5, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

#E-mail: lalv@sfedu.ru

Поступила в редакцию 08.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Биосенсорные методы анализа активно совершенствуются и приобретают все большее значение в сферах безопасности, медицины, в частности, мониторинга онкозаболеваний, контроля качества окружающей среды и др. В настоящей работе рассматривается развитие биосенсорной системы на основе технологии использования обонятельной луковицы (ОЛ) животных макросматиков с помощью оптических методов визуализации одорант-специфичных паттернов гломерулярной активности. Сложности автоматической детекции одорологических вызванных паттернов при повторяющейся стимуляции обусловлены процессами адаптации, проявляющимися в обратимом изменении чувствительности нейронных структур обонятельного анализатора. Экспериментально установлены оптимальная длительность стимулов и межстимульных интервалов, позволяющая стабилизировать характер ответной реакции гломерул при повторяющейся стимуляции и визуализировать паттерны гломерулярной активности с постоянной точностью. Полученные результаты расширяют существующий инструментарий, применяемый для разработки биосенсорных систем.

Ключевые слова: биосенсорные системы, мультифотонная микроскопия, обонятельная луковица.

DOI: 10.31857/S0006302923060157, EDN: RMCRFW

Разработка технологии биосенсорных систем связана, прежде всего, с выяснением структурно-функциональной организации обонятельного анализатора животных [1], включая молекулярный уровень мембранных белков [2–5], развитием микроэлектродных [6] и информационных технологий [7]. Как известно, отличительными особенностями обонятельного анализатора животных-макросматиков являются чрезвычайно высокая чувствительность, широкий (практически неограниченный) спектр распознаваемых запахов и способность распознавать последние в реальном масштабе времени. Сфера применения биосенсорных систем, обладающих такими свойствами и лишенных ограничений, свойственных живым организмам (необходимость обучения распознаванию целевых веществ, зависимость эффективности распознавания от состояния животного и ряда других факторов), потенциально чрезвычайно широка и включает решение акту-

альных проблем в области безопасности, качества жизни человека и ряде других.

Одно из перспективных направлений развития технологии биосенсорных систем связано с визуализацией кальциевых сигналов нейрональной активности на доступной (дорсальной) поверхности обонятельной луковицы (ОЛ) животных-макросматиков (в частности, грызунов – мышей и крыс) нейрооптическими средствами (минископ, лазерная сканирующая микроскопия).

Эпителий носовой полости млекопитающих содержит большое количество) обонятельных сенсорных нейронов (ОСН), в частности, у мышей их более 2 млн [8]. Основная функция ОСН состоит в выделении, кодировании и передаче информации о качестве, интенсивности и продолжительности действия специфических для них одорантов в обонятельную луковицу, которая является первичным звеном обработки сенсорной информации в центральной нервной системе. Известно, что каждый ОСН экспрессирует только один тип гена, связанного с определенным типом мембранных G-связанных рецептор-

Сокращения: ОЛ – обонятельная луковица, ОСН – обонятельные сенсорные нейроны, ФК – функциональная карта, РИ – регионы интереса).

ных белков (рецепторов), способных взаимодействовать с лигандами (химическими соединениями) со сходными химическими свойствами и молекулярной структурой [9–11]. Известно также, что, в частности, в геноме мышей содержится более 1000 генов этого семейства [12, 13]. Предполагается, что сложные запахи (включающие множество одорантов) кодируются комбинациями ОСН, чувствительных к разным одорантам. Увеличение концентрации молекул одорантов приводит к возрастанию числа активируемых сенсорных нейронов.

Аксональные проекции ОСН, экспрессирующих гены одного типа, конвергируют в локальных областях (гломерулах), расположенных на поверхности обоих ОЛ [14–16]. Гломерулы представляют собой сферические (диаметром 50–300 мкм), морфологически и функционально обособленные модули, в которых аксоны ОСН контактируют с дендритами митральных и пучковых клеток, передающих информацию о запахах в вышележащие отделы мозга, а также дендритами интернейронов, формирующих внутри- и межгломерулярные тормозные связи [17].

Различными методами функционального картирования ОЛ показано, что одоранты с различными молекулярными свойствами вызывают распределенные, но повторяющиеся пространственно-временные паттерны гломерулярных ответов [14, 18–23]. Гломерулы, активирующиеся одорантами со сходными молекулярными свойствами, пространственно группируются в пределах так называемых кластеров [24–30]. Количество гломерул, активируемых одорантами со сходной топологией, зависит от их концентрации [19, 31–34]. При этом, информация о качестве одоранта содержится не только в пространственной локализации, но и во временной динамике гломерулярной активации [35–37].

Немаловажное значение в формировании пространственно-временных функциональных карт гломерулярной активности при длительной или повторяющейся стимуляции имеют процессы адаптации, проявляющейся в обратимом изменении чувствительности нейронных структур обонятельного анализатора. Показано, что механизмы краткосрочной адаптации (секунды, минуты) связаны с процессами, протекающими на уровне ОСН [37–39], а также нейронных сетей ОЛ [40] с вовлечением высших отделов ЦНС, в частности, кортикофугальных влияний пириформной коры [41–44]. Механизмы долговременной адаптации (десять минут, часы) связаны, по-видимому, со сложными морфологическими перестройками синаптических связей на уровне нейронных сетей ОЛ [40, 45], что важно для восприятия высоко значимой запаховой (ольфакторной) информации. Вследствие указанных причин повторная

ольфакторная стимуляция животного даже относительно простыми по своим физико-химическим свойствам одорантами (мономолекулярными соединениями) приводит к существенной вариативности функциональных карт гломерулярной активности ОЛ [46, 47, 48], которая, как правило, ограничена областью соответствующих одорант-специфичных кластеров. Наряду с этим, вариативность паттернов гломерулярной активности связана с физиологическими причинами (флуктуации рН крови, концентраций O_2 и CO_2 в крови), а также попаданием различного количества молекул одоранта в носовую полость вследствие неравномерного дыхания животного. Вследствие указанных причин создание биосенсорных систем на основе оптических методов визуализации нейрональной активности доступной поверхности ОЛ предполагает разработку средств распознавания одорант-специфичных паттернов функционально активных гломерул (функциональных карт), регистрируемых в виде потока соответствующих изображений. Эффективность работы таких биосенсорных систем будет определяться воспроизводимостью функциональных карт при многократном предъявлении идентичных по своим физико-химическим свойствам одорантов. Однако в научной литературе отсутствуют сведения о динамических характеристиках реакций гломерул при повторяющейся стимуляции с учетом всех приведенных выше факторов, а также рекомендации по стабилизации функциональных карт гломерулярной активности, режимах активации сложной многослойной нейронной сети ОЛ с учетом механизмов синаптической пластичности.

Целью данной работы являлось определение параметров ольфакторной стимуляции животных для стабильной регистрации воспроизводимых одорант-специфичных функциональных карт с помощью методов лазерной сканирующей микроскопии.

Анализ полученных экспериментальных данных позволил установить оптимальные параметры длительности стимулов и межстимульных интервалов при повторяющемся ольфакторном воздействии.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Эксперименты проводили на шести взрослых (в возрасте 5.5–8 месяцев, массой 300–500 г) самцов domesticированных серых крыс (*Rattus norvegicus*), приобретенных в лаборатории эволюционной генетики ИГиГ СО РАН (Новосибирск). Выбор этих животных определялся тем, что их морфофункциональные особенности обонятельной системы, согласно имеющимся данным, наименее деформированы в ре-

зультате искусственного отбора. Крыс содержали в условиях 12/12-часового цикла «свет/темнота» в отдельных клетках при постоянной температуре ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) и влажности. Животные имели свободный доступ к пище (полнораационный экструдированный комбикорм) и очищенной воде.

Наркоз и хирургические процедуры. Детальное описание хирургических процедур приведено в работе [49]. Для анестезии использовали (внутримышечно) смесь ксилазина гидрохлорида (10–15 мг/кг, препарат Ксилазин) и тилетамина с золазепамом (10 мг/кг, препарат Золетил 100). При снижении глубины наркоза допускали дополнительное введение до 25% первоначальной дозы Золетила 100. Для снижения внутричерепного давления вводили внутривенно маннитол (1 г/кг). Для локальной анестезии подкожно вводили 0.1 мл лидокаина. Животные под наркозом свободно дышали. Во время операции температура тела поддерживалась в пределах $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. После краниотомии, а затем и дуратомии в ОЛ болюсно с помощью микропипетки вводили раствор чувствительного к кальцию красителя Cal-590 AM (AAT Bioquest, США) в концентрации 1 мМ. Краниальное окно заполняли 1.5%-м агарозным гелем. Трепанационное отверстие закрывали с помощью покровного стекла толщиной 0.17 мм (Gerhard Menzel, Германия), закрепляя его стоматологическим светоотверждаемым полимером. Для фиксации животного под объективом во время визуализации на его голове был закреплен держатель в виде прямоугольной стальной пластины.

Оборудование для визуализации кальциевых сигналов и стимуляции животного одорантами. Принципиальная схема экспериментальной установки для визуализации кальциевых сигналов на поверхности ОЛ животных приведена на рис. 1а. Регистрацию флуоресценции кальций-чувствительного красителя на уровне гломерулярного слоя ОЛ (50–200 мкм от уровня поверхности) проводили в мультифотонном режиме с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного 10-кратным объективом (W Plan-Apochromat 10 $\times$ /0.5 DIC D-0.17 VIS-IR M27 75 мм). Краситель Cal-590 AM возбуждали с помощью фемтосекундного лазера Chameleon Discovery (Coherent, США) на длине волны 1040 нм. Кальциевые сигналы регистрировали с помощью NDD-детектора на основе арсенида фосфида галлия в диапазоне 575–610 нм. Временные серии изображений были получены с частотой 4.2057 кадра в секунду и пространственным разрешением 256×256 пикселей. Каждый пиксель соответствовал размеру 4.74×4.74 мкм на проецируемой поверхности ОЛ. Ротральная и каудальная области ОЛ сканировали отдельно (рис. 1б). Полученные изображения впоследствии программно «сшивали».

Животных под объективом микроскопа перемещали с помощью моторизованного предметного стола ZDeck HZ101PM (Prior Scientific, Великобритания). Настройку микроскопа LSM 880 и моторизованного предметного стола осуществляли с помощью интегрированного программного обеспечения Zen Black 2.3 (Carl Zeiss, Германия). Для исследования стимул-зависимой кальциевой активности гломерул, расположенных на дорсальной поверхности ОЛ животных, микроскоп LSM 880 был синхронизирован с системой предъявления одорантов через специальное триггерное устройство (рис. 1а). Таким образом, была реализована возможность получения временных серий изображений с точной привязкой начала и конца каждого стимула к конкретным кадрам формируемого в процессе сканирования видеопотока. Оригинальная система предъявления одорантов включала емкости и электромагнитные клапаны (Burkert, Германия), управляемые программным обеспечением. Для ольфакторной стимуляции использовали насыщенные пары метилбензоата ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOCH}_3$). Газо-воздушные смеси одоранта приготавливали, используя очищенный угольным фильтром воздух. Скорость потока газовой смеси во время стимуляции составляла ≈ 1 л/мин.

Обработка и анализ временных серий изображений, получаемых в ходе визуализации кальциевых сигналов. Общая стратегия обработки данных для анализа стимул-зависимой активности нейронных структур ОЛ может быть представлена следующим образом:

- 1) компенсация движения сканируемых поверхностей, вызванного дыханием и сердцебиением;
- 2) формирование функциональной карты (ФК) гломерулярной активации, вызванной ольфакторной стимуляцией, посредством вычисления разности текущей и фоновой интенсивности флуоресценции;
- 3) «сшивание» ротральной и каудальной частей ФК для соответствующих областей сканирования в единое изображение;
- 4) детектирование активных гломерул и определение их морфофункциональных характеристик.

Рассмотрим эти этапы более детально.

Этап 1. Поскольку размеры области сканирования достаточно малы, принимается, что движение сканируемых областей является однородным, т.е. движение всех точек можно представить как движение целого.

В процессе стабилизации сначала вычисляется изображение усредненной флуоресценции по всем кадрам временной серии. Из этого изображения усредненной интенсив-

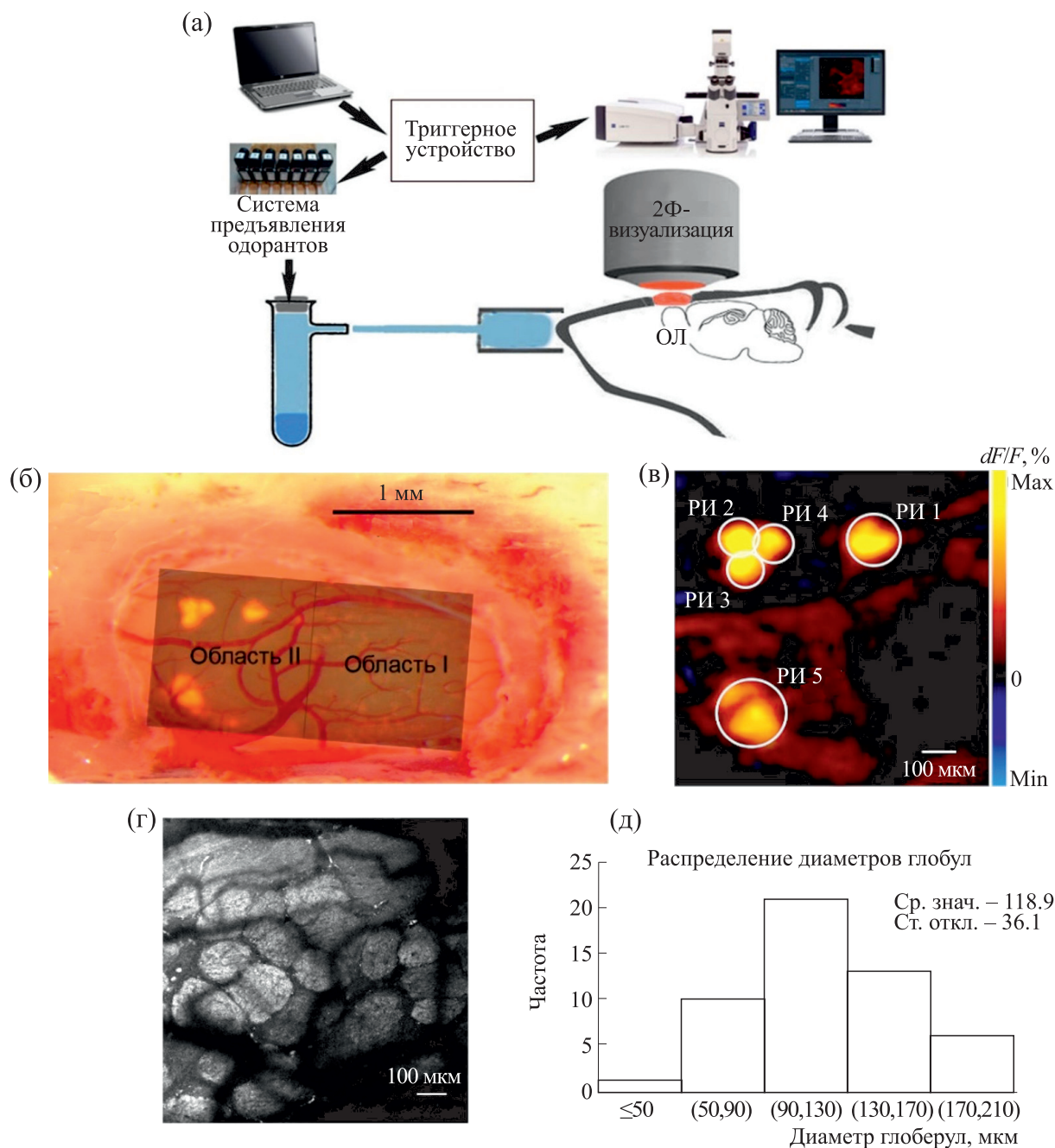


Рис. 1. Принципиальная схема экспериментальной системы двухфотонной (2Ф) визуализации сигналов кальций-чувствительного флуоресцентного красителя на дорсальной поверхности (ОЛ) крыс. (а) — Схема экспериментального оборудования с синхронизацией системы подачи одорантов и лазерного сканирующего микроскопа. (б) — Оптически прозрачное краниальное окно над дорсальной поверхностью ОЛ с двумя областями сканирования (область I и область II, шкала 1 мм); (в) — функциональная карта (ФК) стимул-зависимой кальциевой активности ОЛ животных (соответствует области II). dF/F — шкала цветового кодирования, отражающая отклонение интенсивности флуоресценции от фона (0). На ФК белыми окружностями выделены регионы интереса (РИ), внутри которых площадь активности соответствует реальным размерам гломерул у данного вида животных (шкала 100 мкм). (г) — Гломерулярное поле ОЛ серых крыс, полученное с помощью интраназального окрашивания флуоресцентным красителем. (д) — Гистограмма распределения диаметров гломерул. Среднее значение диаметров (ср. знач.) — 118.9 мкм, стандартное отклонение (ст. откл.) — 36.1.

ности за эталон берется изображение несколько меньшего размера (246×246 пикселей) относительно первоначальных кадров (256×256). Далее осуществляется поиск максимально соответствующих эталонному фрагментов в каждом изображении временной серии. Максимальное соответствие определяется методом скользящего окна с минимизацией евклидова расстояния между разверткой интенсивностей изображения усредненной интенсивности флуоресценции и разверткой интенсивностей каждого изображения временной серии в рамках окна обработки. Найденные соответствия задают последовательность координат, которые определяют характер относительного движения изображений временной серии (1).

$$\{x_s, y_s\} = \underset{i,j}{\operatorname{argmin}} \sqrt{\sum_{x,y \in X} |f(x,y) - g(x+i, y+j)|^2}, \quad (1)$$

где $\{x_s, y_s\}$ – координаты верхнего левого угла оптимального (согласно критерию 1) положения скользящего окна, $f(x,y)$ – функция интенсивности среднего изображения; $g(x,y)$ – функция интенсивности окна размером 246×246 пикселей одного кадра временной серии, X – прямоугольная область скользящего окна.

Последовательность координат $\{x_s, y_s\}$ для серии кадров определяет траекторию однородного движения изображения. Выбор размера скользящего окна для поиска соответствующих фрагментов последовательных кадров обусловлен ожидаемой интенсивностью движения наблюдаемого объекта. В частности, окно размером 246×246 пикселей имеет 10×10 положений внутри оригинального изображения размером 256×256 пикселей. Этот диапазон возможных положений соответствует ожидаемой интенсивности интегрального движения изображений в рамках последовательной серии, не превышающей ± 5 пикселей.

В процессе стабилизации происходит переход к новой «стабилизированной» временной серии изображений меньшего размера (246×246), вырезанных из изображений оригинальной временной серии (256×256) в положениях максимального соответствия в рамках выбранной метрики.

Процедура стабилизации повторяется дважды. На второй итерации в качестве среднего изображения используется среднее стабилизированное (при первой итерации) изображение. В результате формируются дважды стабилизированные

временные серии изображений, отражающие интенсивность флуоресценции кальций-чувствительного красителя. Двойная стабилизация используется для повышения эффективности устранения межкадровых пространственных смещений, обусловленных движением мозга, вызванным дыханием и изменением кровенаполнения сосудов. В частности, точность устранения движения определяется тем, насколько функция интенсивности среднего изображения (формула (1)) отражает структуру наблюдаемого фрагмента ОЛ. Например, в случае интенсивного движения наблюдаемой области ОЛ усредненное изображение будет размытым. В результате поиска соответствий фрагментов кадров временной серии с таким размытым усредненным изображением, траектория однородного движения изображения может быть вычислена неточно, ввиду разного уровня резкости (размытости) кадров временной серии и усредненного изображения. При втором проходе процедуры стабилизации в качестве среднего изображения выбирается изображение, усредненное по серии стабилизированных (на первом проходе) кадров временной серии. Ввиду частичной компенсации движения при первом проходе стабилизации, резкость усредненного изображения на стабилизированной временной серии увеличивается (уменьшается размытость), соответственно, ожидается более высокая точность определения траектории однородного движения изображения на втором проходе процедуры стабилизации.

Этап 2. На этапе вычисления ФК, связанных со стимул зависимыми кальциевыми сигналами, на стабилизированном временном ряду изображений флуоресценции условно выделяли предстимульные, стимульные и постстимульные периоды. В рамках всего предстимульного периода (длительность периода составляла ≈ 3 с во всех случаях) формируется новое фоновое усредненное изображение ($Baseline(x,y)$). Для стимульного и постстимульного периодов формируется новый массив усредненных изображений, где усредняются дважды стабилизированные изображения за секундные или двухсекундные отрезки (в зависимости от режима стимуляции). Затем для каждого усредненного изображения в стимульный и постстимульный период рассчитывается дифференциальная разность текущей интенсивности флуоресценции (dF/F) от фонового согласно уравнению (2):

$$dF / F = \frac{Act(x,y) - Baseline(x,y)}{Baseline(x,y) + Bias} \times 100, \quad (2)$$

где $Act(x,y)$ – развертка интенсивности пикселей изображения, полученного усреднением кадров заданного стимульного периода; $Baseline(x,y)$ – развертка интенсивности пикселей фонового

изображения; *Bias* — смещение для подавления высоких значений относительной активности при околонулевом уровне фоновой активности (устанавливали равным 5).

Таким образом, сформированные ФК характеризуют пространственное распределение среднего отклонения интенсивности флуоресценции от фона в пределах окна наблюдения.

Для визуализации пространственного отклонения интенсивности флуоресценции от фона ФК представлена в виде соразмерных (246×246) изображений с цветовой кодировкой, учитывающей шкалу интенсивности флуоресценции для всей временной серии по результатам сравнения усредненных изображений секундных или двухсекундных отрезков. Цветовой код отражает отклонение активности от фона — теплые цвета (от черного до красного и желтого) кодируют увеличение флуоресценции, а холодные (от черного до синего) — снижение (рис. 1в).

Этап 3. ФК нейрооптических откликов для разных областей сканирования «сшиваются» в общие карты. Области сканирования имеют частичное пересечение. Поскольку размеры сканируемых областей фиксированные, то при сшивании ФК учитываются координаты центров областей сканирования, согласно двумерным координатам моторизированного предметного стола.

Этап 4. Для детектирования основных функциональных единиц ОЛ — гломерул, активирующихся при ольфакторной стимуляции, были определены их размеры и количество на дорсальной поверхности ОЛ серых крыс. Определение пространственных параметров гломерул осуществляли с помощью интраназальной инъекции декстрановой формы красителя Oregon Green 488 (как описано в работе [31]). Пример изображений ретроградного флуоресцентного окрашивания гломерул показан на рис. 1г.

Измерение окрашенных гломерул ($n = 51$) с наиболее четкими очертаниями (количество животных — 4) показало, что 1) они имеют почти круглую форму и 2) их средний диаметр составляет 118.9 мкм (рис. 1д, стандартное отклонение — 36.1 мкм). Учитывая диаметр гломерул и размеры трепанационного окна (примерно 3.0×1.5 мм, что, согласно сделанным оценкам, составляет около 50–60% площади дорсальной поверхности ОЛ) следовало ожидать, что в пределах наблюдаемой области сканирования могут находиться до 150 гломерул, что составляет около 3.57–6.08% от их общего количества (около 2400–4200 на каждой доле ОЛ у крыс [50, 51]).

Определение оптимальных параметров ольфакторной стимуляции осуществляли по стимул-зависимому изменению кальциевой активности (флуоресценции) для каждой идентифицированной активной гломерулы. Для этого на предварительно сформированных функциональных кар-

тах выделяли регионы активности с относительной однородностью ответной реакции и по площади сопоставимые с размерами реальных гломерул. Детектированные гломерулы обозначали соответствующими регионами интереса (РИ) (например, рис. 1в). Далее для каждой детектированной гломерулы в границах соответствующих РИ на дважды стабилизированных временных сериях кальциевого сигнала рассчитывали стимул-зависимое изменение кальциевой активности как разность текущей интенсивности флуоресценции от фонового уровня (dF/F) согласно уравнению (1). В этом случае за текущую интенсивность флуоресценции принимали среднее значение яркости всех пикселей, попадающих в границы выделенных РИ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как указывалось выше, целью настоящего исследования являлось определение таких значений длительности межстимульных интервалов и стимулов, которые обеспечивают формирование специфической для одорантов и стабильной (от стимула к стимулу) пространственной структуры (паттернов) гломерулярной активности на функциональных картах.

Каждый эксперимент включал 2 этапа. На первом этапе вариабельность межстимульных интервалов сочеталась с постоянной длительностью стимулов. На втором, напротив, вариабельность длительности стимулов сочеталась с постоянным межстимульным интервалом.

Для определения оптимальных параметров ольфакторной стимуляции использовали как сформированные ФК стимул-зависимой гломерулярной активации, так и ответные реакции индивидуальных гломерул, согласно установленным РИ.

Оптимальная длительность межстимульных интервалов. Для определения оптимальной длительности межстимульных интервалов в сериях, включающих пятикратное предъявление стимулов фиксированной длительности (3 с), межстимульный интервал от серии к серии задавался равным 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 и 50 с.

В результате проведенных экспериментов с использованием указанного выше протокола стимуляции была зафиксирована существенная трансформация паттернов гломерулярной активности в зависимости от длительности межстимульного интервала. Индивидуальные гломерулярные ответные реакции практически у каждого животного имели различия амплитудных (интенсивность флуоресценции) и временных параметров. Сам по себе этот факт не является новым и описан, например, в работе [52].

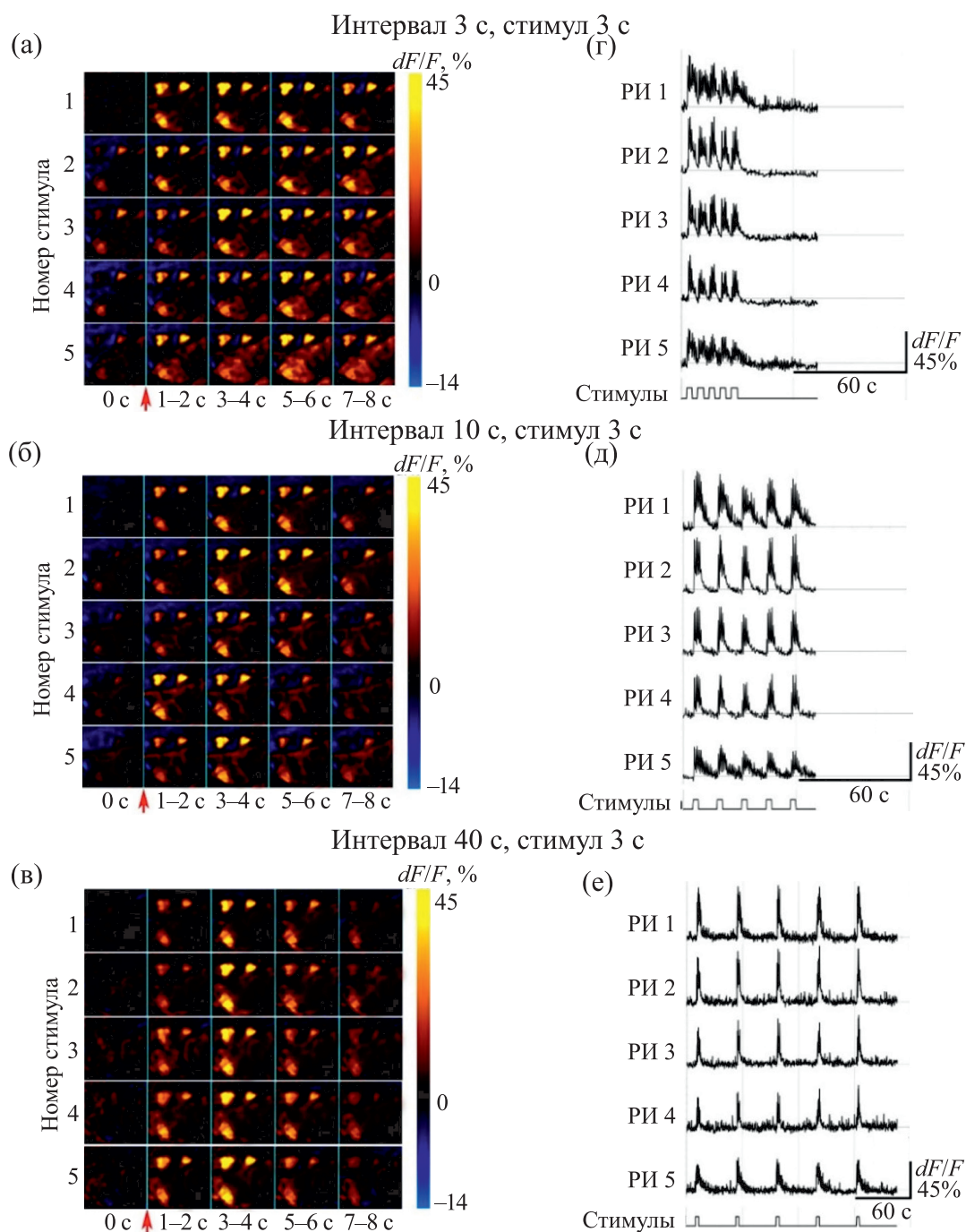


Рис. 2. Пространственно-временные паттерны гломерулярной активности ОЛ крыс, вызванные ольфакторной стимуляцией (насыщенные пары метилбензоата) с варибельным межстимульным интервалом и постоянной длительностью стимулов. (а)–(в) – Усредненные функциональные карты, полученные при повторной стимуляции (порядковый номер стимула обозначен слева цифрами): (а) – межстимульный интервал 3 с при длительности стимулов 3 с, (б) – межстимульный интервал 10 с при длительности стимулов 3 с, (в) – межстимульный интервал 40 с при длительности стимулов 3 с. (г)–(е) – Ответная реакция детектированных по морфофункциональным признакам гломерул (выделенных как соответствующие РИ на рис. 1в), полученная в условиях пятикратной стимуляции: (г) – межстимульный интервал 3 с при длительности стимулов 3 с, (д) – межстимульный интервал 10 с при длительности стимулов 3 с, (е) – межстимульный интервал 40 с при длительности стимулов 3 с. dF/F – дифференциальная разность интенсивности флуоресценции (уравнение (2)).

Для наглядности изложения полученных результатов на рис. 2 представлены ФК и индивидуальные гломерулярные ответные реакции, полученные на областях сканируемой поверхности мозга, приведенных на рис. 1б и 1в, где по морфо-функциональным признакам детектированы 5 гломерул, которые выделены соответствующими РИ. На рис. 2а–в ФК сгруппированы по столбам согласно порядковому номеру ольфакторного стимула (номер слева) и в колонки согласно периоду времени до и после стимуляции (обозначение секунд снизу). Для каждого РИ представлены ответные реакции в соответствии с режимом стимуляции (рис. 2г–е).

На рис. 2а можно видеть, что при длительности межстимульных интервалов 3 с только перед первым из 5 стимулов (красная стрелка снизу) нет фоновой гломерулярной активности в предстимульный период. Перед каждым последующим стимулом в предстимульный период заметна существенная гломерулярная активность, что свидетельствует о недостаточности времени для восстановления уровня интенсивности флуоресценции до фонового состояния, соответствующего минимальному уровню активности гломерул в отсутствие специфических для них одорантов во вдыхаемом животным воздухе. Анализ активности индивидуальных детектированных гломерул, выделенных соответствующими РИ (рис. 2г), свидетельствовал о наличии волнообразного изменения интенсивности флуоресценции без восстановления до фонового уровня в межстимульный период. Кроме того, наблюдается снижение амплитуды ответной реакции гломерул с каждым последующим стимулом, что, по-видимому, связано с эффектом привыкания. Последнее согласуется со сведениями, приводимыми другими авторами [36].

При длительности межстимульного интервала 10 с (рис. 2б,д) интенсивность флуоресценции в предстимульный период заметно меньше, но у двух (РИ1 и РИ5) из пяти детектированных гломерул полностью не восстанавливается до состояния покоя.

При увеличении длительности межстимульного интервала до 40 с гломерулярной активности в предстимульный период не наблюдается. Восстановление интенсивности флуоресценции до базового (предстимульного) уровня происходит для всех детектированных гломерул (рис. 2в,е).

Описанную выше динамику наблюдали у 28 детектированных гломерул у 6 животных (рис. 3а–в). На указанных изображениях серыми линиями обозначены стимул-зависимые реакции индивидуальных детектированных гломерул, черной — усредненная ответная активность. Следует отметить существенную амплитудную вари-

бельность (интенсивность флуоресценции) индивидуальных гломерулярных ответов.

С целью определения оптимальной длительности межстимульного интервала для формирования стабильных (хорошо выраженных и с постоянной амплитудой) ответных реакций гломерул на фоне повторяющейся стимуляции рассчитывали отношение сигнал/фон (K_M), согласно уравнению (3):

$$K_M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\frac{1}{k} \sum_{j=1}^k I_{ij}^{\text{сигнал}}}{\frac{1}{k} \sum_{j=1}^k I_{ij}^{\text{фон}} + \text{Bias}}, \quad (3)$$

где $I^{\text{сигнал}}$ — средняя интенсивность флуоресценции в границах каждого РИ (с центром окружности x, y и диаметром d) в стимульный период, $I^{\text{фон}}$ — средняя интенсивность флуоресценции для каждого РИ в предстимульный период, n — количество наблюдаемых РИ (28 у 6 животных), k — количество стимулов (5) в серии ольфакторной стимуляции. Предстимульные и стимульные периоды для расчетов $I^{\text{фон}}$ и $I^{\text{сигнал}}$ всегда были равны интервалу времени ≈ 3 с. Bias — смещение значений относительной активности при около-нулевом уровне фоновой активности (устанавливали равным 1).

Как следует из рис. 3г, максимальное (оптимальное) значение межстимульных интервалов составляет 40 с.

Оптимальная длительность стимулов. На втором этапе в сериях с пятикратным предъявлением стимулов длительностью 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 20 с межстимульный интервал был фиксированный и составлял 40 с.

Изменение длительности стимулов оказало существенное влияние на формирование паттернов гломерулярной активности, что отражается на представленных ФК (рис. 4а–в). При длительности стимулов 1 с (рис. 4а) в предстимульный период (слева от красной стрелки внизу) гломерулярной активности нет для каждого стимула в серии (обозначены соответствующим номером слева). Ответные реакции РИ, представленные на рис. 4г, подтверждают этот факт. В этом случае дифференциация пространственных паттернов гломерулярной активности в предстимульный и стимульные периоды может быть успешно выполнена.

При увеличении длительности стимулов до 13 с в предстимульный период регистрируется активность некоторых детектированных гломерул, появляются окрашенные пятна (темно оранжевый цвет) на ФК слева от красной стрелки (рис. 4б). Пространственное положение регионов активности на ФК в предстимульный период соответствует РИ1 и РИ5, представленным на

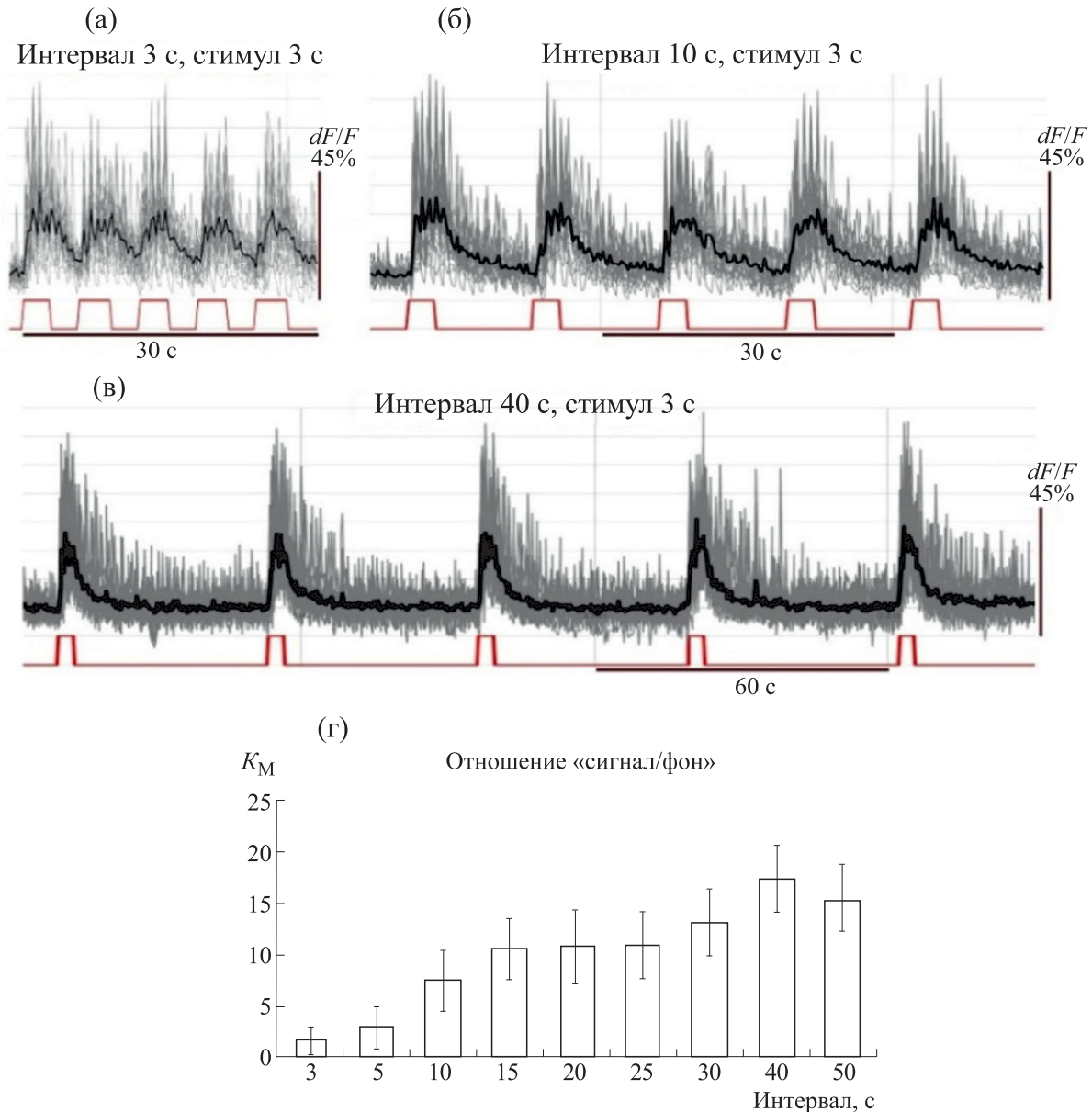


Рис. 3. Стимул-зависимая ответная реакция 28 гломерул, детектированных у шести животных экспериментальной группы. (а) — Динамика кальциевых сигналов детектированных гломерул, полученная при межстимульном интервале 3 с при длительности стимулов 3 с; (б) — межстимульный интервал 10 с при длительности стимулов 3 с; (в) — межстимульный интервал 40 с при длительности стимулов 3 с. Серые линии — индивидуальные гломерулы, черная кривая соответствует усреднению по всем гломерулам. Кальциевые сигналы для всех детектированных гломерул нормированы (dF/F) согласно уравнению (2). (г) — Зависимость ответной реакции гломерул от длительности межстимульных интервалов, представленная в виде отношения сигнал/фон (K_M), согласно уравнению (3).

рис. 4д. График активности для РИ1 свидетельствует о том, что интенсивность флуоресценции не возвращается к фоновому уровню перед каждым последующим стимулом. Для РИ5 следует отметить появление значительных флуктуаций интенсивности флуоресценции в предстимульные периоды, связанных, в частности, с дыханием. При этом наблюдается снижение амплитуды регистрируемого сигнала от стимула к стимулу (эффект привыкания), что заметно на ФК, вы-

строенных в колонку после красной стрелки (рис. 4б), как смещение яркости соответствующего региона активности (по шкале цветового кодирования справа) от ярко желтого до оранжевого цвета.

Увеличение длительности стимулов до 20 с приводит к значительным преобразованиям паттернов гломерулярной активности (рис. 4в). Для некоторых РИ гломерулярная активность обнаруживается в предстимульный период. Важно от-

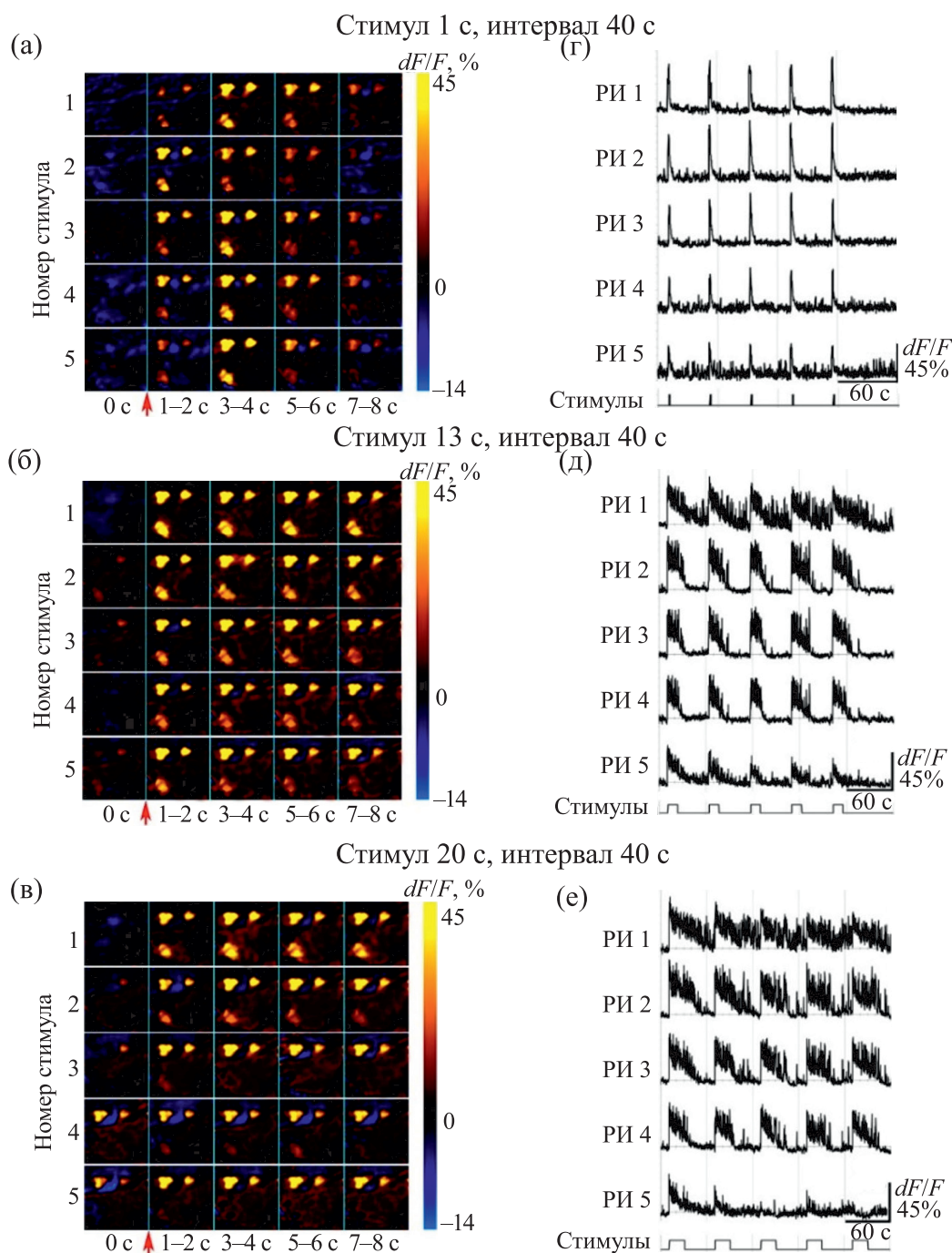


Рис. 4. Пространственно-временные паттерны гломерулярной активности ОЛ крыс, вызванные ольфакторной стимуляцией (насыщенные пары метилбензоата) с вариабельной длительностью стимулов и постоянным межстимульным интервалом. (а)–(в) – Усредненные функциональные карты, полученные при повторной стимуляции (порядковый номер стимула обозначен слева цифрами): (а) – длительность стимулов 1 с при межстимульном интервале 40 с, (б) – длительность стимулов 13 с при межстимульном интервале 40 с; (в) – длительность стимулов 20 с при межстимульном интервале 40 с. (г)–(е) – Ответная реакция детектированных по морфофункциональным признакам гломерул (выделенных как соответствующие РИ на рис. 1в), полученная в условиях пятикратной стимуляции: (г) – длительность стимулов 1 с при межстимульном интервале 40 с, (д) – длительность стимулов 13 с при межстимульном интервале 40 с, (е) – длительность стимулов 20 с при межстимульном интервале 40 с. dF/F – дифференциальная разность интенсивности флуоресценции (уравнение (2)).

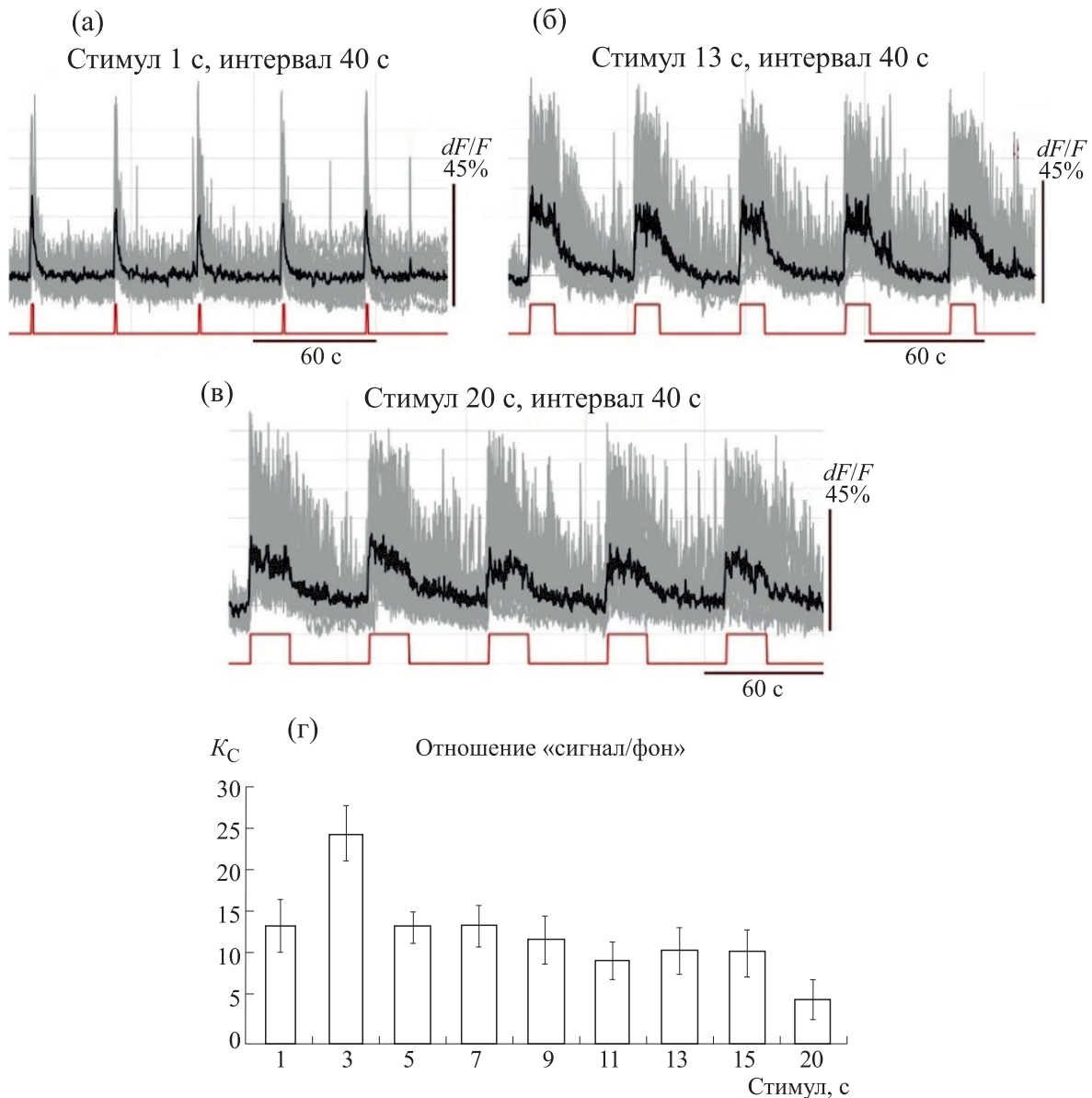


Рис. 5. Стимул-зависимая ответная реакция 28 детектированных гломерул. (а) — Динамика кальциевых сигналов детектированных гломерул, полученная при длительности стимулов 1 с и межстимульном интервале 40 с; (б) — длительность стимулов 13 с и межстимульный интервал 40 с; (в) — длительность стимулов 20 с и межстимульный интервал 40 с. Серые линии — индивидуальные гломерулы, черная кривая соответствует усреднению по всем гломерулам. Кальциевые сигналы для всех детектированных гломерул нормированы (dF/F) согласно уравнению (2). (г) — Зависимость ответной реакции гломерул от длительности стимулов, представленная в виде отношения сигнал/фон (K_C), по аналогии с уравнением (3).

метить, что для детектированной гломерулы, обозначенной РИ5, наблюдается эффект привыкания в стимульный период, который выражается в снижении амплитуды ответной реакции вплоть до полного ее отсутствия во время предъявления последнего пятого стимула (рис. 4е).

Ответная реакция 28 детектированных гломерул представлена на рис. 5а–в (серые линии — стимул-зависимые реакции индивидуальных гломерул, черная линия — усреднение). Как следует

из рисунка, наблюдается существенная вариабельность амплитуды (интенсивность флуоресценции) индивидуальных гломерулярных ответов. При длительности стимулов 20 с (рис. 5в) активность гломерул не восстанавливается до фоновое состояние в течение всего межстимульного интервала (40 с).

Для определения оптимальной длительности стимулов рассчитывали отношение сигнал/фон (K_C), по аналогии с уравнением (3). Отличие за-

ключалось в определении длительности стимульных периодов для расчетов $I_{\text{сигнал}}$, которую приравнивали к длительности стимулов. Длительность предстимульных периодов для расчетов $I_{\text{фон}}$ всегда была равна ≈ 3 с.

На рис. 5г представлена зависимость K_C от длительности стимулов для 28 идентифицированных гломерул. Как следует из рисунка, оптимальная длительность стимула, при которой отношение сигнал/фон принимает максимальное значение, составляет 3 с.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Как следует из приведенных выше результатов, визуализация постсинаптических реакций гломерул, вызванных предъявлением одоранта, обнаружила зависимость вызванных стимулом паттернов гломерулярной активности от длительности стимулов и межстимульных интервалов. Топология гломерулярных ответов в пределах области сканирования на соответствующих ФК, полученных при варьировании этих двух параметров, зависела от свойств индивидуальных гломерул. Например, при длительности межстимульного интервала 10 с восстановление ответной реакции (интенсивности флуоресценции) до предстимульного (фоновое) уровня наблюдалось не у всех детектированных гломерул (рис. 3б и 3д). Длительная стимуляция (20 с) приводила к инактивации ряда гломерул во время повторного предъявления одоранта (рис. 4в и 4е). Доля гломерул, активирующихся в ответ на повторяющиеся стимулы, оставалась стабильной при длительности межстимульного интервала не менее 30 с и длительности стимулов, не превышающей 3 с.

Полученные нами результаты согласуются с данными, приводимыми и другими авторами [52], указывающими на индивидуальную вариабельность временных параметров гломерулярных ответов, которые играют важную роль в процессах идентификации одорантов на уровне ОЛ.

Таким образом, для формирования одорант-специфичных функциональных карт гломерулярной активности необходимо учитывать индивидуальные свойства гломерул, попадающих в поле наблюдения. Рассчитанные в настоящей работе критерии отношения сигнал/фон для разных режимов стимуляции с переменным межстимульным интервалом (K_M) и переменной длительностью стимулов (K_C), на наш взгляд, позволяют выявить параметры стимуляции, которые обеспечат получение относительно стабильных (воспроизводимых от стимула к стимулу) функциональных карт, отражающих пространственную топологию паттернов гломерулярной активности на дорсальной части ОЛ исследуемых животных. Согласно критерию сиг-

нал/фон, для получения отчетливой и устойчивой ответной реакции гломерул в условиях периодической ольфакторной стимуляции длительность межстимульного интервала должна составлять около 40 с, длительность стимула — около 3 с. С другой стороны, нам удалось подтвердить гипотезу о том, что, подобрав режим стимуляции, можно стабилизировать характер ответной реакции гломерул при повторяющейся стимуляции, а функциональные карты воспроизводить с постоянной точностью.

Важно отметить, что приведенные временные параметры стимуляции определены для насыщенных паров метилбензоата, который является достаточно летучим веществом (давление насыщенных паров 0.38 мм рт. ст. при 25°C). Для низких концентраций летучих веществ ответная реакция гломерул по всей площади ОЛ будет отличаться, поскольку известно, что количество активируемых гломерул [20, 31, 33], а также амплитуда ответной реакции индивидуальных гломерул [19, 34] зависят от концентрации одорантов. Для низких концентраций летучих соединений оптимальные параметры ольфакторной стимуляции необходимо определять дополнительно.

Разработка биосенсоров — обширное направление исследований, включающее множество различных стратегий и методов, зависящих не только от анализируемого вещества, но и от условий эксплуатации биосенсора и предполагаемой точности измерений. Биосенсорные системы, считывающие информацию с использованием микроэлектродов и микроэлектродных матриц непосредственно из обонятельной системы млекопитающих, широко используются для задач распознавания летучих соединений [1, 53–56]. Несмотря на данные о высокой эффективности таких систем, следует отметить, что микроэлектродный метод чувствителен к иммунным реакциям и движениям электродов, что затрудняет получение нейронных сигналов в течение длительного периода времени [57–59]. Методы оптической визуализации лучше подходят для записи активности нейронов, дающих проекции в определенные области [60]. Хотя у кальциевой визуализации есть недостаток, заключающийся в более низком временном разрешении, чем у микроэлектродного метода, оптическая визуализация менее чувствительна к электрическим шумам и артефактам окружающей среды, что, дополнительно к чрезвычайно высокой чувствительности и специфичности к широкому спектру одорантов, дает возможность получать более стабильный сигнал в течение длительного времени. Особые свойства такого типа биосенсоров обусловлены технической возможностью анализа флуоресцентной кальций-зависимой активности больших по площади областей мозга. Это очень важно в случае регистрации сигналов от обоня-

тельного анализатора, поскольку кодирование информации на уровне первичного звена обработки сенсорной информации (обонятельной луковицы) осуществляется посредством пространственно-временных паттернов гломерулярной активности [14, 18–23, 61].

В настоящее время работы, связанные с визуализацией кальция, сосредоточены в основном на шумоподавлении, коррекции движения, классификации для идентификации клеток и количественной оценки кальциевых сигналов [62]. Проблемы биосенсоров, связанные с совместимостью живых организмов с техническими средствами, позволяющими проводить измерения, до сих пор не решены полностью. В частности, при разработке таких систем необходимо учитывать межиндивидуальные особенности локальных перегруппировок стереотипных (относительно анатомических ориентиров) позиций одорант-специфичных гломерул [19, 21, 22, 25, 63–65], а также гетерогенные свойства индивидуальных гломерул, связанные с временными параметрами фазо-зависимых гломерулярных ответов относительно вдохов [52]. Указанные проблемы требуют дополнительных усилий для ввода в эксплуатацию биосенсоров, связанные с калибровкой подобной системы для каждого анализируемого вещества и его концентраций.

Настоящая работа решает вопросы, связанные гетерогенными свойствами индивидуальных гломерул, что обеспечивает дополнительные возможности в реализации биосенсорных систем, основанных на оптической визуализации кальциевых сигналов гломерул. На основании полученных экспериментальных данных мы рекомендуем физиологически обоснованные временные параметры ольфакторной стимуляции, поскольку в современных научных исследованиях по данной тематике нет единого представления по этому вопросу [6, 31, 41, 43, 66]. Эволюция предложенного нами подхода к разработке биосенсорной системы возможна при использовании минискапа с большим полем зрения [67], позволяющего проводить оптическую визуализацию через краниальные окна у свободно подвижных грызунов, что поможет сделать биосенсорную систему портативной.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00683, <https://rscf.ru/project/22-25-00683/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Все экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по биоэтике Южного федерального университета (протокол № 4 от 29.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Н. Кирой, П. О. Косенко, И. Е. Шепелев и др., Журн. аналит. химии, **78** (8), 1 (2023).
2. V. Akimov, E. Alfinito, J. Bausells, et al., Analog. Integr. Circ. Sig. Process., **57**, 197 (2008).
3. H. J. Ko and T. H. Park, J. Biol. Eng., **10** (17), 1 (2016).
4. Y. Lu, Y. Yao, S. Li, et al., Sensor Rev., **37** (4), 396 (2017).
5. О. Д. Новикова, Г. А. Набережных и А. А. Сергеев, Биофизика, **66** (4), 668 (2021).
6. K. Gao, S. Li, L. Zhuang, et al., Biosens. Bioelectron., **102**, 150 (2018).
7. I. V. Shcherban, P. O. Kosenko, O. G. Shcherban, et al., Inform. Sci. Control Systems, **5**, 62 (2020).
8. K. Mori, H. Nagao, and Y. Yoshihara, Science, **286** (5440), 711 (1999).
9. T. C. Bozza and J. S. Kauer, J. Neurosci., **18** (12), 4560 (1998).
10. B. Malnic, J. Hirono, T. Sato, et al., Cell, **9** (5), 713 (1999).
11. T. Bozza, P. Feinstein, C. Zheng, et al., J. Neurosci., **22** (8), 3033 (2002).
12. P. Mombaerts, Annu. Rev. Neurosci., **22**, 487 (1999).
13. X. Zhang and S. Firestein, Nat. Neurosci., **5** (2), 124 (2002).
14. R. Vassar, S. K. Chao, R. Sitcheran, et al., Cell, **79** (6), 981 (1994).
15. P. Mombaerts, F. Wang, C. Dulac, et al., Cell, **87** (4), 675 (1996).
16. B. Zapiec and P. Mombaerts, Cell Rep., **30** (12), 4220 (2020).
17. T. Imai, Semin. Cell Dev. Biol., **35**, 180 (2014).
18. K. Mori and Y. Yoshihara, Prog. Neurobiol., **45**, 585 (1995).
19. Y. Oka, S. Katada, M. Omura, et al., Neuron, **52**, 857 (2006).
20. B. D. Rubin and L. C. Katz, Neuron, **23** (3), 499 (1999).
21. E. R. Soucy, D. F. Albeanu, A. L. Fantana, et al., Nat. Neurosci., **12** (2), 210 (2009).
22. B. Zapiec and P. Mombaerts, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **112** (43), E5873 (2015).
23. S. DeMaria and J. Ngai, J. Cell Biol., **191** (3), 443 (2015).
24. N. Uchida, Y. K. Takahashi, M. Tanifuji, et al., Nat. Neurosci., **3** (10), 1035 (2000).
25. L. Belluscio and L. C. Katz, J. Neurosci., **21** (6), 2113 (2001).
26. Y. K. Takahashi, M. Kurosaki, S. Hirono, et al., J. Neurophysiol., **92** (4), 2413 (2004).
27. K. M. Igarashi and K. Mori, J. Neurophysiol., **93** (2), 1007 (2005).
28. K. Mori, Y. K. Takahashi, K. M. Igarashi, et al., Physiol. Rev., **86** (2), 409 (2006).

29. B. A. Johnson and M. Leon, *J. Comp. Neurol.*, **503** (1), 1 (2007).
30. K. Touhara, in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Ed. by A. Lajtha and K. Mikoshiba (Springer, Boston, 2009), pp. 139–160.
31. M. Wachowiak and L. B. Cohen, *Neuron*, **32** (4), 723 (2001).
32. M. Meister and T. Bonhoeffer, *J. Neurosci.*, **21** (4), 1351 (2001).
33. M. Wachowiak, L.B. Cohen, *J. Neurophysiol.*, **89** (3), 1623 (2003).
34. M. L. Fletcher, A. V. Masurkar, J. Xing, et al., *J. Neurophysiol.*, **102** (2), 817 (2009).
35. H. Spors, M. Wachowiak, L. B. Cohen, et al., *J. Neurosci.*, **26** (4), 1247 (2006).
36. R. M. Carey, J. V. Verhagen, D. W. Wesson, et al., *J. Neurophysiol.*, **101** (2), 1073 (2009).
37. B. Bathellier, O. Gschwend, and A. Carleton, in *The Neurobiology of Olfaction*, Ed. by A. Menini (CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 2010), pp. 329–340.
38. T. Kurahashi and T. Shibuya, *Brain Res.*, **515** (1–2), 261 (1990).
39. F. Zufall and T. Leinders-Zufall, *Chem. Senses*, **25** (4), 473 (2000).
40. D. Chaudhary, L. Manella, A. Arellanos, et al., *Behav. Neurosci.*, **124** (4), 490 (2010).
41. D. A. Wilson, *J. Neurophysiol.*, **80** (2), 998 (1998).
42. D. A. Wilson, *J. Neurophysiol.*, **84** (6), 3036 (2000).
43. D. A. Wilson, *J. Neurophysiol.*, **90** (1), 65 (2003).
44. A. R. Best and D. A. Wilson, *J. Neurosci.*, **24** (3), 652 (2004).
45. A. M. McNamara, P. D. Magidson, C. Linster, et al., *Learn Mem.*, **15** (3), 117 (2008).
46. J. R. Schafer, I. Kida, F. Xu, et al. *Neuroimage*, **31** (3), 1238 (2006).
47. J. V. Verhagen, D. W. Wesson, T. I. Netoff, et al., *Nat. Neurosci.*, **10** (5), 631 (2007).
48. B. G. Sanganahalli, M. R. Rebello, P. Herman, et al., *Neuroimage*, **126**, 208 (2016).
49. R. A. Arefev, V. N. Kirov, N. V. Bulat et al., *J. Neurosci. Methods*, **361**, 1 (2021).
50. E. Meisami. *Chem. Senses*, **15** (4), 407 (1990).
51. F. Pain, B. L. Heureux, and H. Gurden, *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 2689 (2011).
52. R. Iwata, H. Kiyonari, and T. Imai, *Neuron*, **96** (5), 1139 (2017).
53. L. Zhuang, T. Guo, D. Cao, et al., *Biosens. Bioelectron.*, **67**, 694 (2015).
54. K. Gao, S. Li, L. Zhuang, et al., *Biosens. Bioelectron.*, **102**, 150 (2018).
55. E. Shor, P. Herrero-Vidal, A. Dewan, et al., *Biosens. Bioelectron.*, **195**, 113664 (2022).
56. P. Zhu, S. Liu, Y. Tian, et al., *ACS Chem. Neurosci.*, **13** (12), 1727 (2022).
57. R. Biran, D. C. Martin, and P. A. Tresco. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **82**(1),169 (2007).
58. J. Thelin, H. Jörntell, E. Psouni, et al., *PLoS One*, **6** (1), e16267 (2011).
59. L. S. Kumosa. *Adv. Sci. (Weinh)*, **10** (6), e2205095 (2023).
60. G. J. Broussard and L. Petreanu, *J. Neurosci. Methods*, **360**, 109251 (2021).
61. M. Wachowiak, W. Denk, and R. W. Friedrich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** (24), 9097 (2004).
62. M. Robbins, C. N. Christensen, C. F. Kaminski, et al., *F1000Res.*, **10**, 258 (2021).
63. J. Strotmann, S. Conzelmann, A. Beck, et al., *J. Neurosci.*, **20** (18), 6927 (2000).
64. A. Nakashima, N. Ihara, M. Shigeta, et al., *Science*, **365** (46), 1 (2019).
65. K. Zhu, S. Burton, M. Nagai, et al., *Nature Commun.*, **13**(1), 5137 (2022).
66. M. C. Cheung, W. Jang, J. E. Schwob, et al., *Front. Neural. Circuits*, **7**, 207 (2014).
67. C. Guo, G. J. Blair, M. Sehgal, et al. *Sci. Adv.*, **9**(16), eadg391 (2023).

Biosensor Systems: Determination of Optimal Time Parameters of Olfactory Stimulation

A.E. Matukhno*, M.V. Petrushan*, L.V. Lysenko*, **, and V.N. Kirov*

*Research Technology Center of Neurotechnology, Southern Federal University,
prosp. Stachki 194, Rostov-on-Don, 344090 Russia

**Department of Physics, Southern Federal University, ul. Zorge 5, Rostov-on-Don, 344090 Russia

Biosensor systems are improving swiftly and become increasingly important in areas such as defense and security, medical field, especially, cancer screening and detection, environmental quality monitoring, and so forth. The present work describes the development of a biosensor system, based on the use of macroscopic animal olfactory bulb (OB) visualized by optical imaging of odor-evoked glomerular activity patterns. The difficulties that automatic detection of odor-evoked patterns presents under multiple stimulation are associated with adaptation processes, which are manifested as a reversible change in the sensitivity of the neural structures of the olfactory system. The optimal stimulus duration and interstimulus intervals for stabilizing the glomerular response and getting images of glomerular activity patterns under the multiple odor stimulation with constant accuracy have been experimentally found. The results obtained show the availability of other resource in addition to the existing tools used for the development of biosensor systems.

Keywords: biosensor system, multiphoton microscopy, olfactory bulb