
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ОБЪЕДИНЕНИЕ МЕТОДОВ ОДНОФОТОННОЙ
МИНИАТЮРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ
И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГИСТРАЦИИ ДЛЯ
ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА *IN VIVO***

© 2024 г. А. И. Ерофеев^{1, *}, Е. К. Винокуров¹, И. Е. Антифеев², О. Л. Власова¹,
И. Б. Безпрозванный^{1, 3}

¹Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Институт
биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

²Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург, Россия

³Отделение физиологии, Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас,
Техас, США

*E-mail: alexandr.erofeew@gmail.com

Поступила в редакцию 21.04.2024 г.

После доработки 06.06.2024 г.

Принята к публикации 04.07.2024 г.

Однофотонный миниатюрный флуоресцентный микроскоп (минископ) позволяет визуализировать кальциевую активность *in vivo* у свободно передвигающихся лабораторных животных, обеспечивая возможность отслеживания клеточной активности в ходе изучения процессов формирования памяти, обучения, сна и социального взаимодействия. Однако использование кальциевых сенсоров для прижизненной визуализации имеет ограничения, связанные с их относительно медленной (миллисекундной) кинетикой, что осложняет регистрацию высокочастотной спайковой активности. Интеграция методов однофотонной миниатюрной флуоресцентной микроскопии с электрофизиологической регистрацией, обладающей микросекундным разрешением, представляет собой потенциальное решение этой проблемы. Такое сочетание методов дает возможность одновременной регистрации оптической и электрофизиологической активности на одном животном *in vivo*. В данном исследовании разработан гибкий полиимидный микроэлектрод, который был совмещен с градиентной линзой минископа. Проведенные в исследовании тесты *in vivo* подтвердили, что совмещенный с градиентной линзой микроэлектрод реализует одновременную однофотонную кальциевую визуализацию и регистрацию локальных полевых потенциалов в гиппокампе взрослой мыши.

Ключевые слова: гиппокамп, визуализация кальция, минископ, электрофизиология, микроэлектроды, *in vivo*

DOI: 10.31857/S0869813924070091, **EDN:** BDKVNM

СОКРАЩЕНИЯ И ТЕРМИНЫ

Измерители RLC – это приборы, используемые для измерения электрических параметров компонентов и цепей, таких как сопротивление (R), индуктивность (L) и емкость (C).

Локальные полевые потенциалы (ЛПП) – электрические сигналы, которые отражают суммарную активность популяций нейронов в определённой области мозга.

Минископ – однофотонный миниатюрный флуоресцентный микроскоп.

Парилен С (Поли-пара-ксилилен) – полимер, который широко используется как биосовместимое, устойчивое к коррозии покрытие в медицинских устройствах, электронике и др. Данный полимер оптически прозрачен, используется в виде пленок или покрытий благодаря своим хорошим диэлектрическим и теплоизоляционным свойствам, а также химической инертности.

Тетрод – это миниатюрный электрод, состоящий из нескольких проводников, обычно четырех, уложенных параллельно друг другу. Он используется в нейрофизиологических исследованиях для записи электрической активности нейронов в живых организмах.

Фотоэлектрический артефакт – это нежелательное искажение или помеха в измерениях или данных, вызванная воздействием света на оборудование или сенсоры.

Ca²⁺ – кальций.

GCaMP – генетически-кодируемые кальциевые индикаторы, тип интенсифицированных биосенсоров, используемых для обнаружения и измерения концентрации ионов кальция в живых клетках. Представляют собой слияние зеленого флуоресцентного белка (GFP), кальмодулина (CaM) и M13, пептидной последовательности из киназы легкой цепи миозина.

GRIN-линза (градиентно-индексная линза) – оптическая линза с изменяющимся поперечным коэффициентом преломления вдоль своей оси. Этот тип линзы имеет специальную структуру, которая обеспечивает изменение показателя преломления от центра к краям линзы, что позволяет фокусировать свет на протяжении всей длины линзы.

PEDOT: PSS (поли(3,4-этилендиокситиофен): полистиролсульфонат) – это смесь полимеров, широко используемая в электронике и оптике благодаря своим уникальным электропроводным и оптическим свойствам. Этот материал обладает высокой проводимостью при комнатной температуре и хорошей прозрачностью в видимом спектре.

ВВЕДЕНИЕ

Визуализация кальция (Ca²⁺) *in vivo* и электрофизиологическая регистрация нейронной активности с помощью микроэлектродов в живых организмах являются перспективными методами современной нейробиологии. Основной причиной объединения электрофизиологических методов с визуализацией кальция являются ограничения, связанные с использованием кальциевых индикаторов [1, 2], т.к. визуализация Ca²⁺ имеет низкое временное разрешение по сравнению с электрофизиологическими методами [3–5]. Кроме того, такое сочетание методов дает возможность регистрации разных типов активности (оптической и электрофизиологической) на одном животном *in vivo*.

Двухфотонная и однофотонная микроскопия – методы визуализации, широко используемые в биологических исследованиях для визуализации клеток и тканей с высоким разрешением. Каждый метод имеет свои уникальные особенности и области применения, обусловленные принципами поглощения фотонов и взаимодействия с биологическими образцами. Однофотонная микроскопия основывается на принципе поглощения одного фотона, необходимого для перевода молекулы из основного в возбужденное состояние. Для данного процесса необходимы фотоны с высокой

энергией (малой длиной волны), соответствующей разнице энергий между основным и возбужденным состояниями флуорофора. Возбужденные молекулы, в свою очередь, испускают фотоны меньшей энергии (большей длины волны), что сопровождается их возвращением в основное состояние, которое регистрируется для формирования изображения. Данный метод позволяет получать изображения образцов с высоким разрешением, но имеет ограничение по глубине проникновения (до 200 мкм) из-за рассеяния и поглощения более коротких длин волн в биологических тканях [6]. Двухфотонная микроскопия основана на принципе одновременного поглощения двух фотонов меньшей энергии (большей длины волны) для возбуждения молекулы из основного состояния в возбужденное, этот процесс известен как «двухфотонный эффект» [7]. Ключевые преимущества двухфотонной микроскопии по сравнению с однофотонной включают высокую проникающую способность (до 1 мм), обусловленную меньшим рассеянием и поглощением более длинных волн, а также более высокое разрешение и скорость сканирования. Благодаря нелинейному характеру двухфотонного поглощения возбуждение флуорофоров ограничено областью фокальной точки, что снижает фотообесцвечивание и фотоповреждение образца за пределами фокальной области [8]. Вследствие этих характеристик двухфотонная микроскопия наиболее широко применяется для прижизненной кальциевой визуализации [7, 9, 10].

Для электрофизиологической регистрации применяются микроэлектроды из различных токопроводящих материалов, например, меди, золота, алюминия и титана [11], а также матрицы на основе углеродных нанотрубок и графена [12, 13]. В качестве подложек могут использоваться гибкие полимеры [11], которые выполняют защитную и диэлектрическую функцию, а в качестве жесткой подложки – кремний. При этом микроэлектроды возможно комбинировать в микроэлектродные массивы, включающие до тысяч контактов [14]. При использовании микроэлектродов в нейробиологических исследованиях для токопроводящих материалов и для полимерных подложек важны такие свойства, как биосовместимость и устойчивость к коррозии. В свою очередь, проводимость материала, а также конструкция и геометрия микроэлектродов определяют импеданс и пространственную разрешающую способность.

Импеданс – это мера сопротивления микроэлектрода переменному току. В нейробиологических исследованиях *in vivo* на нейронных популяциях импеданс измеряется в диапазонах частот от 0.1 до 1000 Гц. Низкие значения импеданса являются важной характеристикой для записи нейронной активности, так как значения выше 5 МΩ могут вызывать шумы и затухание сигнала [15]. Важно учитывать, что значение импеданса можно снизить за счет увеличения эффективной площади и шероховатости поверхности микроэлектрода при гальваническом покрытии и осаждении проводящими полимерами PEDOT и PEDOT/PSS [16], платиновой чернью [17] и оксидом иридия [18]. Измерение импеданса микроэлектрода происходит с помощью RLC-метра по методу автоматической балансировки электрического моста [19].

Также важной характеристикой микроэлектродов, определяющей точность локализации нейронной активности, является пространственная разрешающая способность, которая зависит от плотности размещения контактов электродов, их конструкции и диаметра токопроводящих дорожек [20]. Металлические контакты микроэлектродов для электрофизиологических записей имеют диаметр от 10 до 200 мкм и межэлектродное расстояние от 10 до 500 мкм в зависимости от типа микроэлектродов, исследуемой области и типа сигнала [21].

В качестве жесткой подложки при изготовлении микроэлектродов часто используют кремний. Однако такие микроэлектроды обладают недостаточной прочностью и могут вызывать воспалительные реакции [22]. По этой причине появились микроэлектроды на гибкой полимерной подложке, которые более биосовместимы и подходят для хронической имплантации в мозг, кроме того, они лучше адаптируются под движение ткани, что помогает избежать повреждения [23]. Для гибких микроэлектродов

используют такие материалы, как SU-8 (покрытие на основе эпоксидной смолы) [24], парилен-С (органический гидрофобный полимер с высокой биосовместимостью) [25], PDMS (силикон) [26] и полиимид (химически и термически стабильный биосовместимый полимер) [27].

Полиимидные микроэлектроды активно используются в нейробиологических исследованиях благодаря своей биосовместимости, диэлектрической прочности и гибкости, превосходящей хрупкие микроэлектроды на основе кремния [11]. В частности, микроэлектроды на основе полиимида стали применять для регистрации локальных полевых потенциалов. ЛПП, получаемые путем низкочастотной фильтрации исходного сигнала, регистрируемого микроэлектродами, в основном отражают синаптическую активность популяции нейронов вокруг микроэлектрода [28].

В ходе экспериментов полиимидные микроэлектроды обеспечили надежную хроническую нейронную запись у лабораторных грызунов, продемонстрировав практическое применение и долговечность в течение нескольких недель после операции [23, 29]. Их механическая и электрическая стабильность была подтверждена после длительного воздействия фосфатно-солевого буфера и испытаниями *in vivo*, что свидетельствует об их долговечности [30]. Кроме того, у микроэлектродов на основе полиимида отсутствует фотоэлектрический эффект в отличие от кремниевых микроэлектродов [31].

В качестве токопроводящего материала для микроэлектродов часто используют медь из-за ее доступности и высокой электрической проводимости (5.96×10^7 См/м), однако данный материал обладает плохой биосовместимостью и склонен к окислению [32], поэтому дополнительно токопроводящие дорожки могут гальванировать золотом, которое нетоксично, широко используется в медицине и устойчиво к коррозии [33].

На данный момент разработано несколько видов микроэлектродов для совмещения двухфотонной визуализации и электрофизиологической регистрации [34–40], например, для электрокортикографии (ЭКоГ) [41]. В одной из работ [36] использовались прозрачные графеновые микроэлектроды и конфокальная двухфотонная микроскопия для одновременной визуализации кальция и регистрации нейронной активности в переживающих срезках гиппокампа. В другом исследовании [37] была проведена одновременная двухфотонная визуализация и регистрация кортикальной активности *in vivo* с использованием прозрачных графеновых микроэлектродов, нанесенных на оптически прозрачную подложку из парилена-С [42, 43]. Также в одной из статей [38] был описан прозрачный массив микроэлектродов, выполненных из тонких пленок в форме сети углеродных нанотрубок, для сочетания с двухфотонной микроскопией, что позволило успешно выявить корреляцию между сигналом ЭКоГ и двухфотонной кальциевой визуализацией в иктальном состоянии. В других исследованиях [39, 40] сообщалось о применении прозрачного кортикального массива микроэлектродов из полимера PEDOT: PSS для одновременной электрофизиологической регистрации и кальциевой визуализации с помощью двухфотонной микроскопии. Дополнительные сведения о прозрачных микроэлектродах можно найти в обзорах Kuzum с соавт. [36] и Cho с соавт. [44].

Однако у *in vivo* двухфотонной микроскопии имеются значительные ограничения, такие как необходимость фиксации экспериментального животного и ограничения в визуализации глубоких структур мозга. Проблема фиксации была преодолена после создания двухфотонных миниатюрных микроскопов [45–48]. Несмотря на преимущества таких микроскопов, их широкое использование в современных исследованиях в настоящее время ограничено из-за сложностей, связанных с их внедрением и стоимостью [49]. Тем не менее развитие генетически-кодируемых кальциевых индикаторов [50] и КМОП-сенсоров в портативных устройствах привело к развитию миниатюрной однофотонной микроскопии, которая позволила проводить исследования на свободно перемещающихся лабораторных животных [51]. В результате появились однофотонные миниатюрные флуоресцентные микроскопы (минископы), которые стали перспективным инструментом для визуализации нейронной активности *in vivo* благодаря своим компактными размерам,

хорошему разрешению, возможности визуализации глубоких структур головного мозга, например, гиппокамп за счёт имплантации GRIN-линз [52–57].

Следует отметить, что в настоящее время объединение электрофизиологической регистрации и однофотонной миниатюрной микроскопии остается нерешенной проблемой, однако было предпринято несколько попыток для ее преодоления. На текущий момент представлен проект (Ephys miniscope, E-Scope) и научное исследование [1], в которых были предложены возможные варианты объединения однофотонной визуализации кальция *in vivo* и электрофизиологической регистрации.

Проект E-Scope (<http://miniscope.org/neuronex/ephys-miniscope/>) основан на модификации однофотонного миниатюрного микроскопа, которая заключается в формировании направляющих на корпусе минископа для размещения в них тетродов. Такой подход позволяет регистрировать нейронную активность с помощью тетродов путем их размещения под или около градиентной линзы и осуществлять одновременную визуализацию кальция [56]. Несомненным преимуществом данного подхода является возможность регистрации большого количества каналов (16, 32, 64 и 128 каналов), однако существенным недостатком является необходимость хронической фиксации минископа вместе с массивом тетродов. Кроме того, недостатками также являются дополнительное повреждение тканей мозга при имплантации тетродов и увеличение габаритов и массы минископа, что может негативно сказаться на поведении экспериментального животного.

В исследовании Wu с соавт. [1] использовался другой подход, который заключался в размещении прозрачного микроэлектрода на нижнем торце градиентной (GRIN) линзы. При таком подходе не требуется хронически фиксировать минископ вместе с микроэлектродом. Также не происходит значительного увеличения габаритов, массы миниатюрного микроскопа и дополнительного повреждения тканей мозга. Разработанный 4-канальный прозрачный микроэлектрод позволил одновременно записывать электрофизиологические данные и визуализировать кальциевую активность у свободно перемещающейся мыши. Тем не менее существенным недостатком рассмотренного подхода является ограничение в количестве регистрируемых каналов, так как контакты микроэлектрода, расположенные на нижней поверхности GRIN-линзы, частично закрывают область визуализации.

В данном исследовании предлагается альтернативный метод, заключающийся в объединении гибкого микроэлектрода с медными токопроводящими дорожками и позолоченными регистрирующими контактами на полиимидной подложке с боковой стороной градиентной линзы для одновременной однофотонной кальциевой визуализации и электрофизиологической регистрации *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные мыши

Для проведения данного исследования была создана колония мышей дикого типа из линии B6SJL (номер стока #100012), поставляемых Лабораторией Джексона (Бар Харбор, Мэн, США). Животные размещались в условиях вивария, в клетках по четыре – пять особей, с обеспечением регулируемого светового цикла день/ночь продолжительностью 12/12 ч и постоянным доступом к корму и воде.

Микроэлектрод

Для проведения исследования в программе Altium Designer (Altium, Сан-Диего, Калифорния, США) был разработан 12-канальный (6 регистрирующих контактов на каждой стороне) полиимидный микроэлектрод (рис. 1), а также переходной шлейф для подключения микроэлектрода к беспроводному электрофизиологическому модулю [58] (рис. 2).

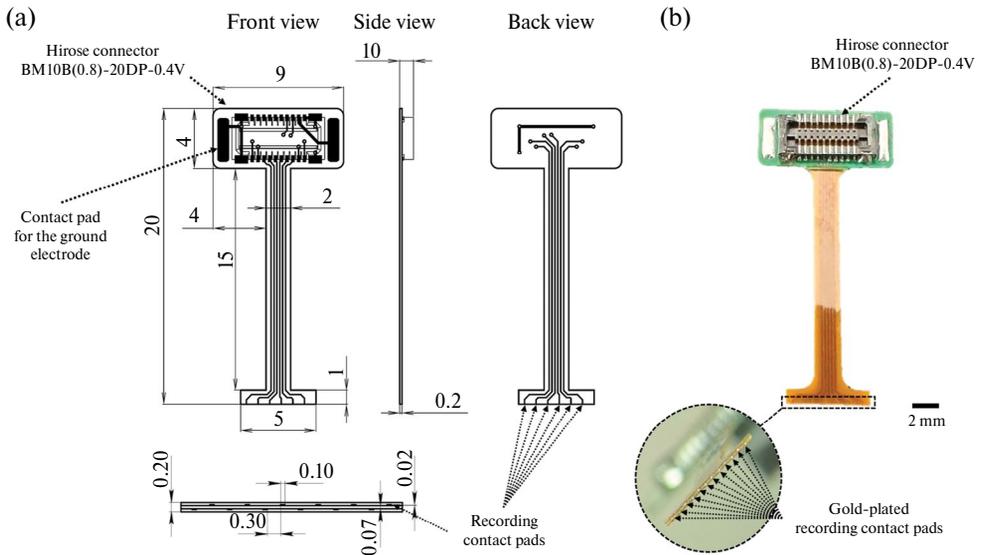


Рис. 1. 12-контактный полиимидный микроэлектрод, разработанный для объединения с градиентной линзой минискапа: (а) – Схема; (б) – Фотография микроэлектрода.

Производство микроэлектрода и переходного шлейфа осуществлялось в компании ООО «Резонит» (Москва, Россия), специализирующейся на производстве и сборке печатных плат.

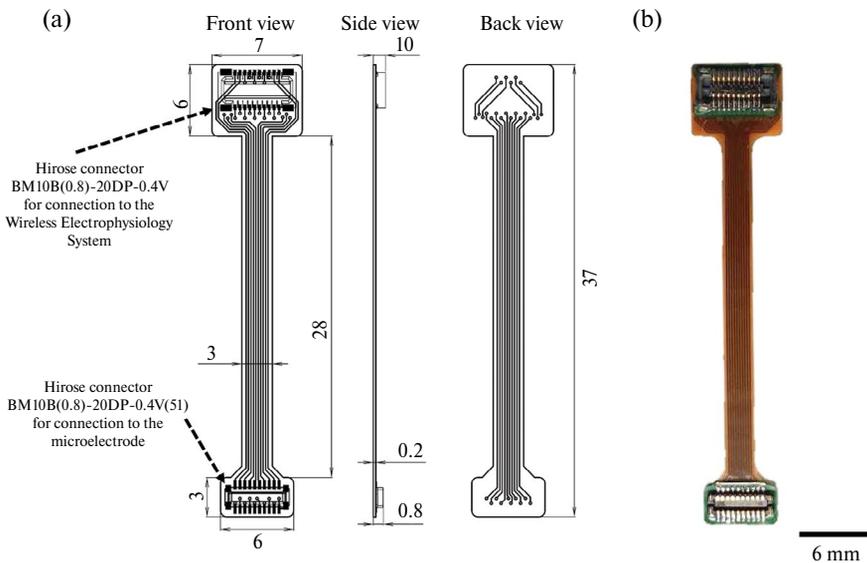


Рис. 2. Переходной шлейф для подключения микроэлектрода к беспроводному электрофизиологическому комплексу: (а) – Схема; (б) – Фотография переходного шлейфа.

Микроэлектрод и переходной шлейф изготавливались из полиимидной основы, ламинированной медной фольгой с обеих сторон (рис. 3а). На первом этапе на заготовку наносился фоточувствительный материал (фоторезист) в условиях чистой комнаты с желтым освещением, чтобы исключить воздействие ультрафиолетового света (рис. 3б). Далее проводилось экспонирование фоторезиста (рис. 3с) с использованием позитивного фотошаблона, соответствующего схеме микроэлектрода или переходного шлейфа. После удаления фотошаблона изображение проявлялось на фоторезисте, где незасвеченные участки растворялись, а засвеченные участки оставались на плате, так как полимеризовались и теряли способность к растворению (рис. 3д). Эти участки были необходимы для избирательного гальванического осаждения меди (рис. 3е). Затем для защиты осажденных участков наносился металлорезист, имеющий более низкую скорость травления по сравнению с медью (рис. 3ф). После удаления фоторезиста проводилось травление меди, во время которого незащищенная медь растворялась, оставляя рисунок токопроводящих дорожек (рис. 3г). После травления удалялся металлорезист (рис. 3h) и наносился покровный слой полиимида с предварительно сформированными отверстиями, соответствующими местоположению контактов (рис. 3i). На заключительной стадии открытые участки меди покрывались золотом для завершения процесса изготовления микроэлектрода (рис. 3j).

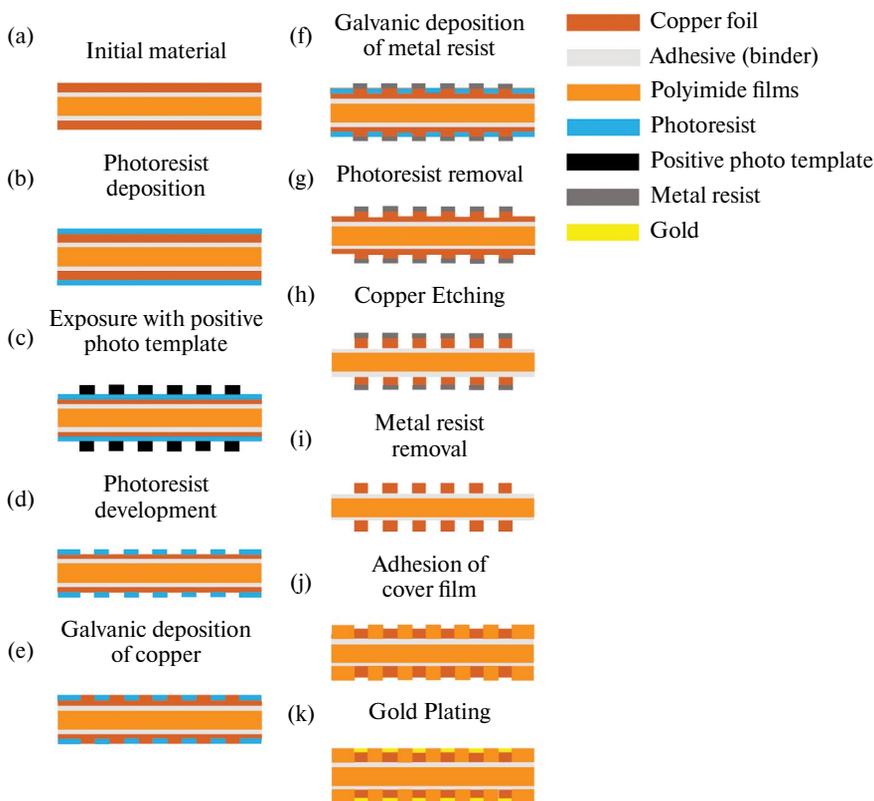


Рис. 3. Процесс производства микроэлектрода и переходного шлейфа в поперечном сечении: (а) – Исходный материал; (б) – нанесение фоторезиста; (с) – экспонирование фоторезиста; (д) – проявление фоторезиста; (е) – гальваническое осаждение меди; (ф) – нанесение металлорезиста; (г) – удаление фоторезиста; (h) – травление меди; (i) – удаление металлорезиста; (j) – нанесение покровного слоя полиимида; (k) – нанесение слоя золота.

На каждой стороне микроэлектрода было сформировано по 6 токопроводящих каналов, образующих в сумме 12 регистрирующих контактов. Эти контакты располагались в шахматном порядке на торце нижней части микроэлектрода, размеры которой составляли 5×1 мм (рис. 1а). Толщина микроэлектрода составляла 0.2 мм. Размеры регистрирующих контактов составляли 0.1×0.02 мм, а межэлектродное расстояние – 0.3 мм. Общая длина микроэлектрода равнялась 20 мм, длина полиимидного шлейфа – 15 мм, а его ширина – 2 мм.

Для подключения к беспроводному электрофизиологическому модулю на микроэлектроде использовался разъем Hirose BM10B(0.8)-20DP-0.4V (Hirose Electric, Канагава, Япония). После изготовления микроэлектрода регистрирующие контакты покрывались слоем золота толщиной 5 мкм. Данный слой формировался методом электроосаждения из раствора золота с концентрацией 0.8 г/л при плотности тока 15 мА/мм² и температуре 25 °С, используя лабораторный источник питания (АКИП, Ижевск, Россия). Оценка импеданса микроэлектрода осуществлялась в 0.1 М фосфатно-солевом буфере. Измерение импеданса проводилось с помощью RLC метра (АММ-3035, АКТАКОМ, Москва, Россия). В процессе измерений использовались переменные синусоидальные сигналы с амплитудой напряжения 5 мВ и частотами от 0.1 до 1000 Гц. В указанном диапазоне частот значения импеданса колебались от 6.28 до 0.14 МΩ.

Финальная форма микроэлектрода формировалась путем его расположения вокруг градиентной линзы диаметром 1.8 мм так, чтобы торцы линзы и микроэлектрода были выровнены. Для фиксации этой конструкции использовалось металлическое кольцо, изготовленное из стальной трубки диаметром 2 мм, разрезанной продольно с одной стороны (рис. 4а). Конструкция формовалась в течение 2 мин при температуре 300 °С. Затем микроэлектрод крепился к градиентной линзе с использованием гелеобразного цианоакрилатного клея общего назначения Loctite 454 (Henkel, Дюссельдорф, Германия). Шлейф микроэлектрода отгибался на 90 градусов относительно GRIN-линзы (рис. 4б), при этом расстояние от верхнего торца линзы до места изгиба составляло 1.5 мм. Эта операция обеспечивала надежную фиксацию линзы при имплантации в головной мозг лабораторного животного и последующей установке опорной площадки минискапа.

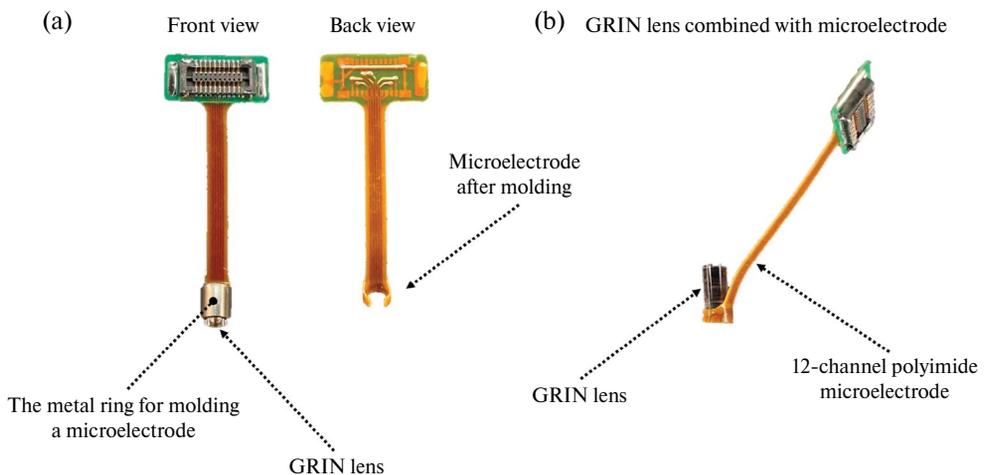


Рис. 4. 12-канальный микроэлектрод. (а) – Формовка 12-канального микроэлектрода вокруг GRIN-линзы диаметром 1.8 мм с использованием металлического кольца для последующей термической обработки; (б) – Комплекс GRIN-линза-микроэлектрод.

Стереотаксические хирургические операции

Все хирургические вмешательства выполнялись под общей анестезией с использованием изофлурана в концентрации 1.5–2%. Начало хирургической процедуры осуществлялось после подтверждения отсутствия болевых рефлексов у животного.

Для прижизненной кальциевой визуализации и одновременной электрофизиологической регистрации в гиппокамп правого полушария 3-месячной мыши дикого типа линии B6SJL вводили 1 мкл аденоассоциированного вируса AAV5.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 с титром 1×10^{13} вирусных частиц на мл. Доставка вируса в гиппокамп осуществлялась со скоростью 100 нл в мин с помощью шприца 75 RN на 5 мкл (#65460–03, Hamilton, Рино, Невада, США) в соответствии со стандартным протоколом [59]. Процедура проводилась с использованием следующих координат стереотаксической установки (68001, RWD Life Science, Шэньчжэнь, Китай): AP –2.1; DV –1.8; ML –2.1.

Через 4 недели после введения вируса производилась имплантация GRIN-линзы диаметром 1.8 мм (#64–519, Edmund Optics, Флорида, США), объединенной с микроэлектродом. Относительно координат имплантации вируса формировались направляющие отверстия и проводилась круговая краниотомия размером 2.1 мм с использованием стоматологического бора. После этого костный фрагмент и твердая мозговая оболочка были аккуратно удалены. В случае кровотечения зона имплантации дополнительно промывалась фосфатно-солевым буферным раствором и заполнялась гемостатической губкой (ФНПЦ Белкозин, Россия). На противоположной от места имплантации стороне черепа с помощью стоматологического бора создавалось небольшое отверстие для установки микровинта M1 x 3, который соединялся с серебряной проволокой (#783500, AM-systems, Вашингтон, США). Эта проволока затем подключалась к контакту заземления микроэлектрода. Для удаления слоев коры над гиппокампом использовался стоматологический аспиратор OM-1 (Утес, Россия) и шприц с тупым концом [56]. Во время этой процедуры область отбора периодически заполнялась фосфатно-солевым буфером, процесс продолжался до появления серебристых волокон. Затем комплекс GRIN-линза-микроэлектрод с помощью специального крепления фиксировался в стереотаксической установке и опускался на глубину 1.4 мм ниже верхней части черепа в заранее подготовленную область имплантации. Наружная поверхность GRIN-линзы и микроэлектрода закреплялась на черепе с помощью цианокрилатного клея Cosmofen CA-500.200 (Weiss Chemie, Хайгер, Германия). После высыхания клея держатель GRIN-линзы удалялся, а костная ткань покрывалась светоотверждаемым стоматологическим цементом ДентЛайт флоу (ВладМиВа, Россия). По завершении операции уровень анестезии изофлураном снижался до 0%, животному подкожно вводилось 0.1 мл дексаметазона «Кортексон Ретард» (SYVA Laboratorios S.A, Леон, Испания) и его переносили в клетку с терморегулирующим электрическим подогревательным ковриком для восстановления.

В начальный послеоперационный период животное получало мягкую пищу, такую как мелкоизмельченная каша. Через три недели после имплантации производилась фиксация опорной площадки (base plate) минискапа на черепе животного с использованием светоотверждаемого стоматологического цемента (ДентЛайт флоу, ВладМиВа, Россия). Минископ подключался к цифро-аналоговому преобразователю (Labmaker, Берлин, Германия) и осуществлялась визуализация с использованием свободно распространяемого программного обеспечения Portable Miniscope Data Acquisition (Pomidaq, 0.5.1, <https://github.com/bothlab/pomidaq>) на персональном компьютере. Опорная площадка крепилась к нижней части минискапа UCLA Miniscope v3 (Labmaker, Берлин, Германия) с помощью магнитов и фиксирующего винта. После совмещения минискапа с имплантированной GRIN-линзой и получения четкого изображения флуоресцирующих нейронов опорная площадка фиксировалась на черепе с помощью цемента.

Визуализация кальция и электрофизиология in vivo

Визуализация кальциевой активности нейронов гиппокампа, экспрессирующих GCaMP6f в области CA1, проводилась через семь недель после стереотаксического введения вирусной конструкции AAV5.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40. Для этого использовался миниатюрный флуоресцентный микроскоп UCLA Miniscope v3 (Labmaker, Берлин, Германия) массой 2.8 г. Флуоресценция нейронов гиппокампа регистрировалась при возбуждении синим светом через имплантированную градиентную линзу. В качестве источника света использовался синий светодиод с длиной волны 470 нм LXML-PB01-0030 (Lumileds, Хаарлеммермер, Нидерланды), установленный в UCLA Miniscope v3. Настройка фокуса изображения флуоресцирующих нейронов осуществлялась с помощью фокусирующего слайдера минископа (рис. 5a). Процесс регистрации флуоресценции нейронов гиппокампа области CA1 с помощью минископа можно описать следующим образом (рис. 5a):

- *Стадия возбуждения:* излучение от синего светодиода проходит через полусферическую линзу N-BK7 (Edmund Optics, Баррингтон, Нью-Джерси, США) для коллимации и фокусировки светового пучка. Этот пучок затем проходит через фильтр возбуждения ET470/40x (Chroma Technology Corp, Беллоуз-Фоллс, Вермонт, США), который пропускает свет с длиной волны 470 ± 20 нм и отражается от дихроического зеркала T4951pxr (Chroma Technology Corp, Беллоуз-Фоллс, Вермонт, США), направляясь в градиентную линзу (#64-519, Edmund Optics, Флорида, США) для фокусировки на нейронах гиппокампа.
- *Регистрация флуоресценции:* флуоресцентное излучение от нейронов проходит обратно через градиентную линзу, отражается от дихроического зеркала и проходит через фильтр эмиссии ET525/50m (Chroma Technology Corp, Беллоуз-Фоллс, Вермонт, США), который пропускает свет с длиной волны 525 ± 25 нм. Свет далее корректируется ахроматической двоянной линзой (увеличение от 6x до 7x) N-BAF10/N-SF10 (Edmund Optics, Баррингтон, Нью-Джерси, США) для уменьшения хроматических aberrаций и фокусируется на КМОП-сенсоре.
- *Преобразование и передача данных:* световой сигнал на КМОП-сенсоре преобразуется в электрические сигналы, которые передаются по гибкому коаксиальному кабелю CW2040-3650 SR (Cooner Wire, Чатсворт, Калифорния, США) в контроллер системы сбора данных DAQ (Labmaker, Берлин, Германия). Информация из системы сбора данных передается на персональный компьютер через USB3.0-кабель по протоколу USB Video Class (UVC).

Регистрация нейронной активности осуществлялась с использованием беспроводной электрофизиологической системы (рис. 5b) массой 0.95 г [58]. Система состояла из носимого беспроводного модуля и программного обеспечения с открытым исходным кодом для управления и регистрации данных. Носимый модуль был построен на базе микропроцессора-приемника-передатчика NRF52805-CAAA-R7 (Nordic Semiconductor, Тронхейм, Норвегия) и 32-канальной микросхемы униполярного входного усилителя RHD2132 (Intan Technologies, Лос-Анджелес, Калифорния, США). Дифференциальный коэффициент усиления, обеспечиваемый микросхемой RHD2132, составлял 192 В/В.

Основные компоненты носимого модуля включали два 20-позиционных розеточных разъема VM10NB(0.8)-20DS-0.4V(51) (Hirose Electric, Канагава, Япония); керамическую антенну 2450AT18A100E (Johanson Technology, Камарилло, Калифорния, США); контроллер заряда литий-ионных и литий-полимерных батарей MCP73812T-420I/OT (Microchip Technology Inc, Чандлер, Аризона, США); стационарный стабилизатор с низким падением напряжения MCP1700-3002E/TO (Microchip Technology Inc, Чанд-

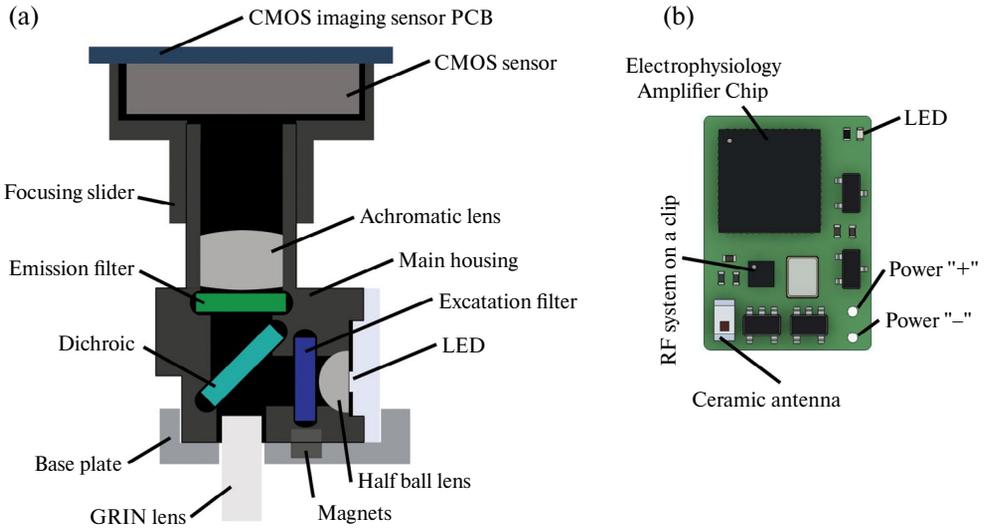


Рис. 5. Схематическое изображение: (a) – Миниатюрного флуоресцентного микроскопа (минископ); (b) – Беспроводного электрофизиологического модуля.

лер, Аризона, США); стабилизатор напряжения TLV70033_SOT23–5 (Texas Instruments, Даллас, Техас, США); датчик Холла KTH1601SL-ST3 (CONNTEK Microelectronics Technology, Цюаньчжоу, Китай); светодиод KPHHS-1005SECK (Kingbright, Шанхай, Китай) и кварцевый резонатор на 32 МГц NX2520SA (NDK, Токио, Япония).

Передача данных проводилась по протоколу Bluetooth Low Energy, что обеспечивало высокую энергоэффективность и достаточную пропускную способность для передачи электрофизиологических данных. Частота дискретизации, поддерживаемая беспроводным модулем, равнялась: 1000 Гц для двух каналов, 500 Гц для четырех каналов, 250 Гц для восьми каналов, 125 Гц для шестнадцати каналов, до 62 Гц для тридцати двух каналов.

Подключение всей системы осуществлялось в соответствии со схемой на рис. 6 и изображением на рис. 7а.

Крепление беспроводного модуля к минископу осуществлялось с помощью электроизоляционной двусторонней клейкой ленты. Для обеспечения электропитания беспроводного модуля электрофизиологической системы использовалось напряжение 5V от конденсатора на плате минископа вместо подключения внешнего аккумулятора (рис. 7б). Такое решение было принято с целью уменьшения общей массы и габаритов конструкции.

Оптическая (визуализация Ca^{2+}) и электрофизиологическая регистрация нейронной активности проводилась в камере Фарадея для экранирования внутреннего пространства от внешних электромагнитных и электромагнитных полей.

Запись данных прижизненной кальциевой визуализации проводилась с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом Pomidaq v0.5.1 (<https://github.com/bothlab/pomidaq>). Видеоданные регистрировались со скоростью 20 кадров в секунду. Уровень усиления флуоресцентного сигнала (Gain) на КМОП-сенсоре минископа был установлен на среднее значение (Medium). Интенсивность светодиода LXML-PB01–0030 (Lumileds, Хаарлеммермер, Нидерланды) регулировалась в диапазоне от 8 до 16% максимальной мощности (35 люмен). Все полученные данные сохранялись в формате AVI с разрешением 752 на 480 пикселей.

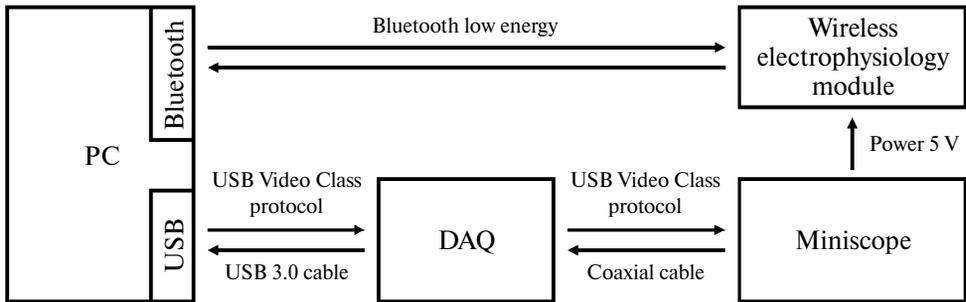


Рис. 6. Принципиальная схема подключения системы одновременной прижизненной визуализации кальция и электрофизиологической регистрации. Миниатюрный флуоресцентный микроскоп (минископ) соединён с системой сбора данных (DAQ) при помощи коаксиального кабеля. В свою очередь DAQ подключен к персональному компьютеру через кабель USB3.0, который обеспечивает передачу данных, питание и управление минископом. Питание от USB-порта персонального компьютера передаётся на DAQ, а затем по коаксиальному кабелю поступает на минископ. Таким образом, напряжение 5 В формируется на конденсаторе печатной платы (PCB) минископа и далее подаётся на беспроводной электрофизиологический модуль. Передача данных с модуля на персональный компьютер осуществляется по протоколу Bluetooth Low Energy.

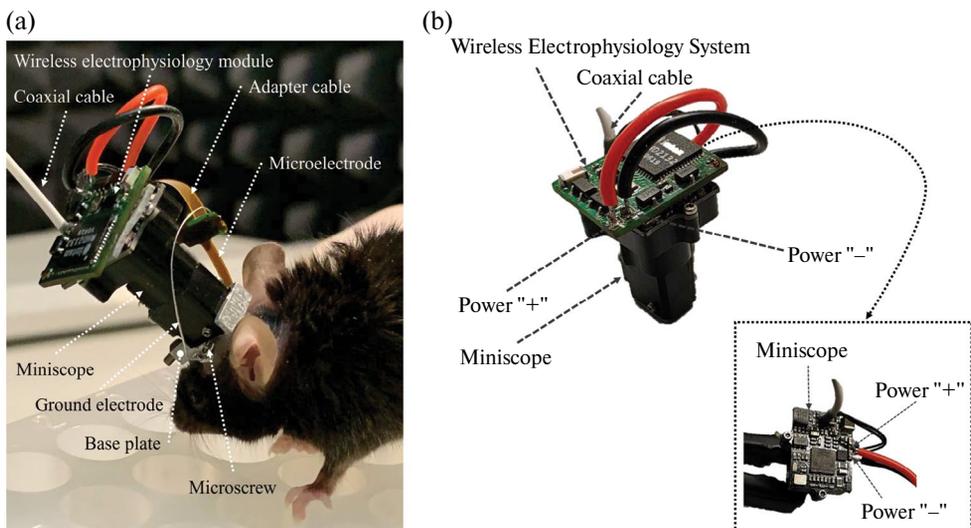


Рис. 7. Компоненты системы для одновременной прижизненной кальциевой визуализации и электрофизиологической регистрации: (а) – Внешний вид всей системы; (б) – Подключение беспроводного электрофизиологического модуля к минископу. В рамке, выделенной пунктирной линией, показано подключение питания беспроводного электрофизиологического модуля к конденсатору на плате минископа.

Запись электрофизиологических данных осуществлялась с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом `ble_mouse.py` (<https://github.com/lmn-projects/WES-2.0/tree/main/software>), разработанного для беспроводной электрофизиологической системы. Нейронная активность регистрировалась в двухканальном

режиме без фильтрации помех с частотой дискретизации 1000 Гц. Данные сохранялись в формате csv – текстовом формате данных, используемом для хранения табличной информации.

Синхронизация кальциевой и электрофизиологической регистрации достигалась путем одновременного запуска программ Pomidaq v0.5.1 и ble_mouse.py с помощью свободно распространяемого программного обеспечения AutoHotkey v2.0.

Обработка данных

Обработка и визуализация данных осуществлялась с использованием дистрибутива языков программирования Python и R для научных вычислений – Anaconda версии 2024.02–1 (<https://www.anaconda.com/download>).

Обработка данных минискапа производилась в среде Jupyter Notebook с применением пакета с открытым исходным кодом Minian (<https://github.com/deniseacailab/minian>) для анализа и визуализации данных однофотонной миниатюрной флуоресцентной микроскопии [60]. Используемые параметры были установлены по умолчанию. Установка пакета Minian проводилась с использованием пакетного менеджера Mamba (<https://mamba.readthedocs.io/en/latest/installation/mamba-installation.html>). Результатом обработки исходных данных с использованием пакета Minian стало определение спонтанной Ca^{2+} -активности нейронов, которая выражалась в виде относительного изменения интенсивности свечения ($\Delta F/F$). Количественный анализ данных осуществлялся с использованием пакета с открытым исходным кодом NeuroActivityToolkit (<https://github.com/spbstu-applied-math/NeuroActivityToolkit>) [61].

Электрофизиологические данные анализировались также в Jupyter Notebook. Загрузка данных из CSV-файлов производилась функцией `genfromtxt` библиотеки NumPy. Выравнивание базовой линии записей нейронной активности осуществлялось с помощью медианного фильтра `medfilt` из той же библиотеки. Для устранения электрического шума на частоте 50 Гц использовался фильтр Баттерворта 8-го порядка, реализованный через функции `signal.butter` и `signal.filtfilt` библиотеки SciPy. Амплитуда локальных полевых потенциалов определялась с помощью функции `signal.find_peaks`, при этом пороговое значение для поиска пиков составляло 0.1 мВ. Визуализация данных, включая диаграммы распределения электрического импеданса и активности Ca^{2+} , проводилась с использованием библиотеки Matplotlib.

Электрический импеданс Z определялся как сумма активного сопротивления R и реактивного сопротивления X . В контексте регистрации биопотенциалов, таких как нейронная активность, реактивное сопротивление считалось емкостным и обозначалось как X_C . Реактивное емкостное сопротивление X_C вычислялось по следующей формуле:

$$X_C = \frac{1}{2\pi f C},$$

где f – частота, C – емкость.

Значение импеданса определялось по следующей формуле:

$$Z = \sqrt{R^2 + X_C^2},$$

где R – активное сопротивление, X_C – емкостное реактивное сопротивление.

Соотношение сигнал-шум (SNR) рассчитывалось по формуле:

$$\text{SNR} = 20 \log_{10} \left(\frac{A_{\text{signal}}}{A_{\text{noise}}} \right),$$

где A_{signal} – амплитуда ЛПП, а A_{noise} – амплитуда шума.

Среднее количество «активаций нейронов» за единицу времени (Burst rate) рассчитывалось следующим образом:

$$\text{Burst rate} = \frac{\sum_{x \in A} \text{active}(x)}{t},$$

где A – множество нейронов, $\text{active}(x)$ равно 1, если нейрон активен, и 0 в противном случае, t – временной интервал.

Частота сетевых спайков (Network spike rate) определялась как процент активных нейронов за заданный временной интервал и рассчитывалась по формуле:

$$\text{Network spike rate} = \frac{\sum_{x \in A} \text{active}(x)}{\text{size}(A)},$$

где A – множество нейронов, $\text{active}(x)$ равно 1, если нейрон активен, и 0 в противном случае, $\text{size}(A)$ – количество нейронов в множестве.

Пиковое значение сетевых спайков (Network spike peak), которое представляет собой максимальное количество одновременно активных клеток в заданный временной промежуток, рассчитывалось по формуле:

$$\text{Network spike peak} = \max_{i=1}^t \left(\frac{\sum_{x \in A} \text{active}(x_i)}{\text{size}(A)} \right),$$

где $\text{size}(A)$ – количество нейронов в множестве, $\text{active}(x_i)$ равно 1, если нейрон активен в момент i , и 0 в противном случае, t – временной интервал.

Коэффициент корреляции Пирсона r между двумя переменными X и Y вычислялся по формуле:

$$r = \frac{\sum(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2 \sum(Y_i - \bar{Y})^2}},$$

где X_i и Y_i – значения переменных X и Y в i -том наблюдении, и \bar{X} и \bar{Y} – средние значения переменных X и Y . Эта формула выражает стандартизированное ковариационное отношение между двумя переменными и показывает, насколько одна переменная изменяется в зависимости от другой. Значение коэффициента r изменяется в диапазоне от -1 до 1 , где 1 указывает на полную положительную корреляцию, -1 – на полную отрицательную корреляцию, а 0 означает отсутствие линейной взаимосвязи.

Статистический анализ

Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Измерения проводились на одной лабораторной мыши дикого типа (B6SJL). При измерении импеданса было использовано 6 микроэлектродов, измерения проводились для всех регистрирующих контактов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Импеданс микроэлектрода

Для данного исследования разработан 12-канальный гибкий полиимидный микроэлектрод проникающего типа, который имплантируется непосредственно в ткань мозга и требует хирургического вмешательства [11]. Данный тип микроэлектродов предназначен для регистрации ПД и ЛПП [62]. Конструкция разработанного микроэлектрода ориентирована на регистрацию ЛПП.

Диапазон частот локальных полевых потенциалов популяций нейронов составляет от 1 Гц до 300 Гц, в то время как для отдельных нейронов диапазон увеличивается от 300 до 5 кГц [63]. Частоты локальных полевых потенциалов нейронов гиппокампа чаще всего характеризуются тета-ритмом (7–9 Гц) [64], острыми волнообразными колебаниями (150–250 Гц) [65] и гамма-ритмом (60–120 Гц) [66, 67]. Таким образом, регистрируемые в гиппокампе ЛПП находятся в диапазоне от 7 до 250 Гц.

Рекомендуется, чтобы значение импеданса не превышало 2–5 МΩ, поскольку высокие значения импеданса могут привести к ослаблению сигнала в зависимости от конструкции микроэлектрода и системы усиления регистрируемого сигнала [15].

Анализ импеданса разработанного микроэлектрода показал следующие значения: при частоте 7 Гц среднее значение импеданса составило 1.95 ± 0.12 МΩ, при частоте 50 Гц 0.42 ± 0.01 МΩ, при частоте 100 Гц 0.28 ± 0.03 МΩ, при частоте 200 Гц 0.27 ± 0.05 МΩ, при частоте 300 Гц 0.2 ± 0.01 МΩ (рис. 8).

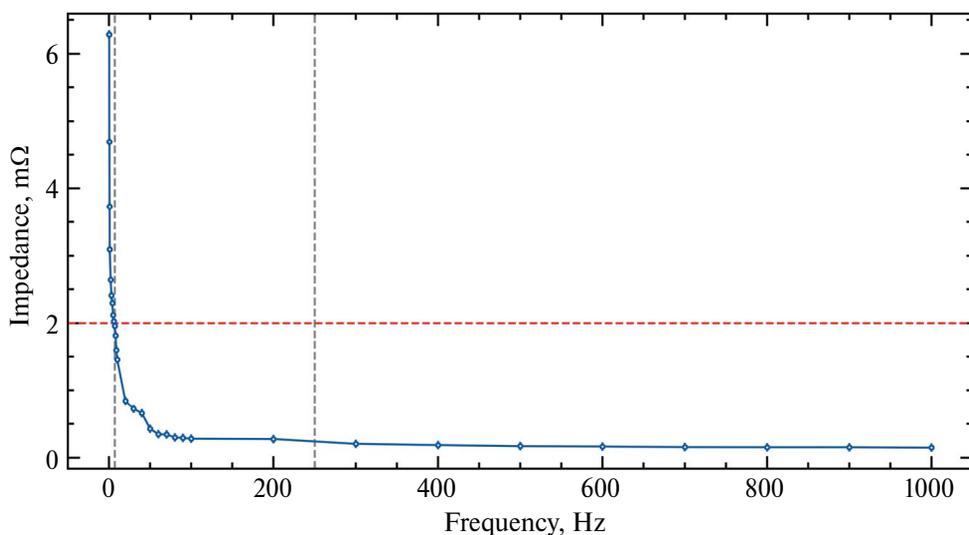


Рис. 8. Распределение импеданса регистрирующих контактов разработанного 12-канального микроэлектрода. При измерении импеданса применялись переменные синусоидальные сигналы с амплитудой напряжения 5 мВ и частотами от 0.1 до 1000 Гц. Пунктирными темно-серыми линиями отмечен диапазон частот от 7 до 250 Гц. Сплошной линией красного цвета отмечен уровень импеданса равный 2 МΩ.

С уменьшением частоты f происходит увеличение емкостного сопротивления X_C , поскольку X_C обратно пропорционально f . В результате это приводит к увеличению общего импеданса Z , что подтверждается экспериментальными данными. Такая зависимость имеет важное значение при выборе параметров для анализа нейронной активности. В диапазоне частот сигнала от 7 до 250 Гц значение импеданса разработанного микроэлектрода составило менее 2 МΩ.

Кальциевая визуализация и электрофизиологическая регистрация in vivo

Через несколько дней после фиксации опорной площадки на черепе лабораторной мыши в камере Фарадея проводилась визуализация Ca^{2+} и электрофизиологическая регистрация активности нейронов гиппокампа. Минископ с подключенным беспроводным электрофизиологическим модулем крепился к опорной площадке с помощью маг-

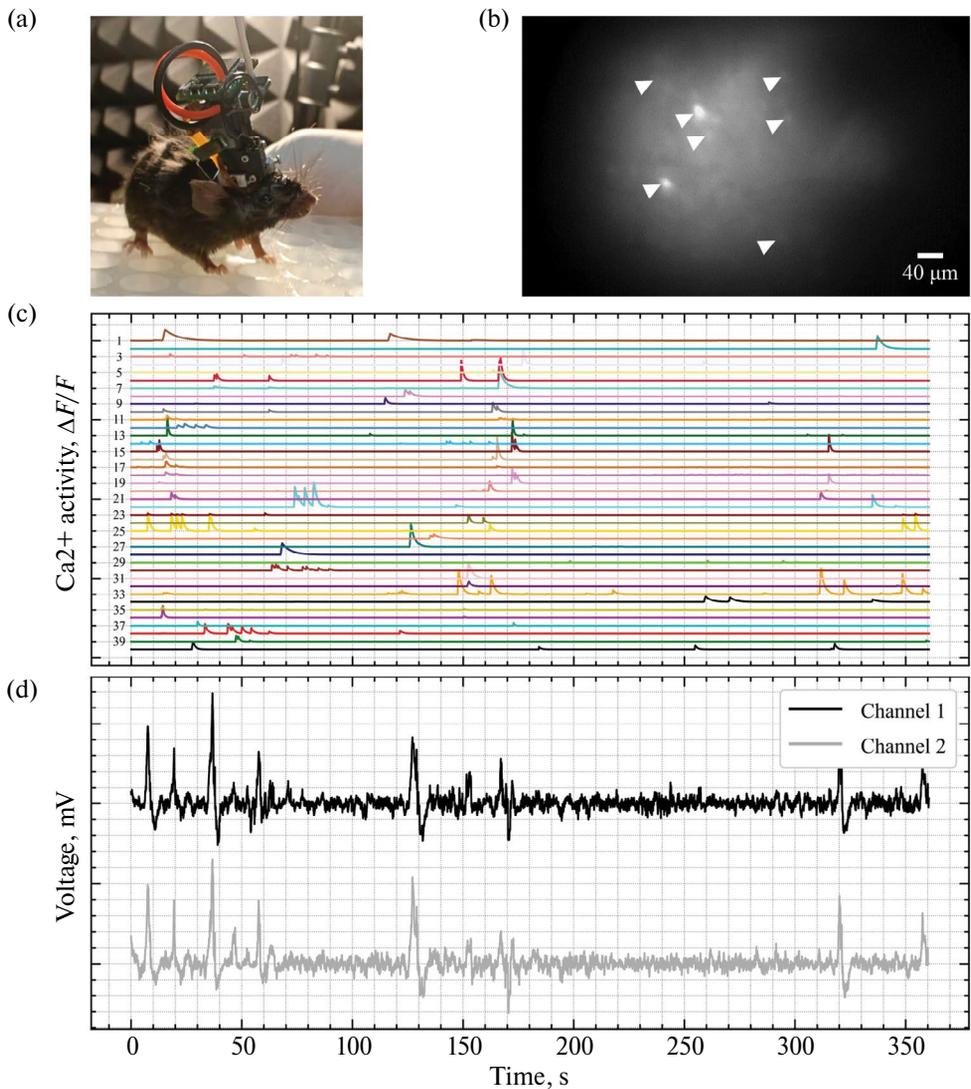


Рис. 9. Одновременная визуализация Ca^{2+} и регистрация локальных полевых потенциалов *in vivo*: (a) – Фотография системы для одновременной прижизненной кальциевой визуализации и электрофизиологической регистрации у лабораторной мыши во время проведения эксперимента; (b) – Изображение флуоресцирующих нейронов (отмечены белыми треугольниками), полученное с помощью однофотонного миниатюрного флуоресцентного микроскопа; (c) – Пример нормированной спонтанной Ca^{2+} -активности для 40 нейронов области CA1 гиппокампа, идентифицированных программой MiniAn; (d) – Пример электрофизиологической записи, полученной с помощью беспроводного электрофизиологического комплекса во время кальциевой визуализации.

нитов и фиксирующего винта (рис. 9а). Микроэлектрод подключался к беспроводному модулю через переходной шлейф. Результаты одновременной прижизненной визуализации Ca^{2+} и электрофизиологической регистрации во время свободного перемещения лабораторной мыши представлены на рис. 9. Пример исходных данных, полученных с помощью микроскопа, представлен на рис. 9б.

На рис. 9с представлена спонтанная Ca^{2+} -активность нейронов гиппокампа области CA1 в виде относительного изменения интенсивности свечения ($\Delta F/F$). Данные были получены после обработки исходных данных (рис. 9б) с использованием программного обеспечения Minian. Зарегистрированные ЛПП показаны на рис. 9д. Полученные результаты подтверждают, что разработанный микроэлектрод в сочетании с GRIN-линзой позволяет проводить одновременную визуализацию Ca^{2+} и электрофизиологическую регистрацию.

Анализ электрофизиологических данных показал, что среднее значение амплитуды ЛПП составило 0.18 ± 0.01 мВ для первого канала и 0.15 ± 0.01 мВ для второго. Для сравнения: средняя амплитуда шума составила 0.025 ± 0.001 мВ для обоих каналов. Максимальные значения амплитуды ЛПП достигли 0.24 мВ и 0.30 мВ соответственно.

Полученные значения SNR составили 16.94 dB и 15.22 dB для первого и второго каналов соответственно. Мощность сигнала составила 0.034 ± 0.005 Вт для первого канала и 0.025 ± 0.005 Вт для второго. Среднеквадратичное значение для первого и второго каналов составило 0.18 мВ и 0.16 мВ соответственно.

Как было отмечено ранее, первичная обработка данных кальциевой визуализации проводилась с использованием программного обеспечения Minian. Получение средних значений параметров, таких как частота всплесков активности (Burst rate), частота сетевых спайков (Network spike rate) и пиковое значение сетевых спайков (Network spike peak) осуществлялось посредством программного обеспечения NeuroActivityToolkit.

Анализ данных кальциевой визуализации показал, что средняя частота всплесков активности (Burst rate) составляет 0.96 ± 0.15 активных клеток в секунду. Средняя частота сетевых спайков (Network spike rate) достигла значения $3.91 \pm 0.21\%$. Среднее пиковое значение сетевых спайков (Network spike peak) составило $3.63 \pm 0.18\%$.

Далее мы рассчитали коэффициент корреляции Пирсона для оценки степени линейной зависимости между кальциевыми сигналами и регистрируемыми ЛПП. Расчет коэффициента корреляции Пирсона является широко используемым методом статистического анализа [68, 69]. Коэффициенты корреляции вычислялись для каждой пары данных, что позволило оценить, насколько тесно изменения одного сигнала связаны с изменениями в другом. Коэффициенты корреляции Пирсона варьировались от незначительных до умеренных, что указывает на слабую и умеренную линейную зависимость между кальциевыми сигналами и ЛПП. Например, для кальциевого сигнала под номером 1 корреляция с ЛПП первого и второго каналов составила -0.060 и -0.082 соответственно, что указывает на слабую линейную связь. Для кальциевого сигнала под номером 13 корреляция с ЛПП первого и второго каналов составила 0.288 и 0.323 соответственно, что указывает на умеренную положительную корреляцию.

Результаты исследования иллюстрируют эффективность использования GRIN-линзы в сочетании с микроэлектродами для одновременной *in vivo* визуализации кальциевой активности и электрофизиологической регистрации. Полученные данные подтверждают, что разработанный метод обеспечивает расширенную информацию о нейронной активности во время свободного перемещения лабораторной мыши.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе представлен подход, который позволяет одновременно осуществлять наблюдение за кальциевой активностью и регистрацию ЛПП в гиппокампе свободно передвигающихся мышей. Разработанная система включает микроэлектрод, ко-

торый размещён вокруг градиентной линзы таким образом, что не оказывает влияния на её оптические характеристики. Это обеспечивает отсутствие фотоэлектрических артефактов и искажений при визуализации Ca^{2+} .

Размеры регистрирующих контактов разработанного микроэлектрода составили 100×20 мкм с межэлектродным расстоянием 300 мкм. Данная конфигурация пригодна для регистрации ЛПП. Микроэлектроды с большими по площади регистрирующими контактами могут одновременно регистрировать активность большего количества нейронов [70, 71], однако они дают эффект усреднения, который снижает пиковую амплитуду сигнала [63, 72]. Также стоит отметить, что большей площади регистрации можно добиться за счет использования более высокой плотности регистрирующих контактов. Если учитывать, что средний размер сомы нейрона гиппокампа области CA1 составляет 15–20 мкм [73], текущая конфигурация микроэлектрода не подходит для регистрации спайковой активности отдельных нейронов. Следовательно, в дальнейшем представляется необходимым увеличение количества регистрирующих контактов, а также уменьшение их размеров и межэлектродного расстояния для улучшения точности и разрешающей способности микроэлектрода. Еще одним улучшением разработанного микроэлектрода может стать замена материала подложки с полиимида на парилена С [74]. Переход на использование парилена С обусловлен его меньшей гигроскопичностью и повышенной устойчивостью к воздействию физиологических сред. Благодаря возможности напыления этого материала создание покрытий из тонких пленок позволит существенно снизить толщину микроэлектрода, что улучшит его функциональные характеристики и уменьшит инвазивность при использовании.

Как было отмечено ранее, импеданс микроэлектрода определяется рядом факторов, включая материал токопроводящих дорожек, покрытие электрода, его геометрию, частоту измерений, среду использования, а также возраст и состояние электрода [11]. Высокий импеданс может негативно влиять на качество записываемых сигналов, увеличивая уровень теплового шума и ухудшая соотношение сигнал-шум [75]. Это особенно важно при регистрации слабых биопотенциалов, таких как нейронная активность [76]. Высокий импеданс также может снижать амплитуду полезного сигнала и повышать чувствительность к электрическим помехам, вызывая фазовые искажения на высоких частотах, что усложняет интерпретацию данных [71, 77]. Разработанный полиимидный микроэлектрод характеризуется низким импедансом, обеспечивающим регистрацию ЛПП без значительного затухания в диапазоне от 7 до 250 Гц [11, 78]. При увеличении частоты сигнала наблюдалось снижение импеданса, которое составило 1.95 ± 0.12 МΩ при 7 Гц, 0.42 ± 0.01 МΩ при 50 Гц, 0.28 ± 0.03 МΩ при 100 Гц, 0.27 ± 0.05 МΩ при 200 Гц и 0.2 ± 0.01 МΩ при 300 Гц. Полученная зависимость объясняется тем, что емкостное реактивное сопротивление X_c обратно пропорционально частоте сигнала, что приводит к уменьшению общего импеданса Z . Снижение импеданса разработанного микроэлектрода было достигнуто благодаря геометрии его регистрирующих контактов (100×20 мкм), что увеличило площадь соединения с тканью, а также с помощью покрытия золотом, которое обладает высокой электропроводностью (4.11×10^7 См/м) и химической стабильностью [11].

При дальнейшем усовершенствовании конструкции микроэлектрода, а именно увеличении количества регистрирующих контактов за счет уменьшения их размеров и межэлектродного расстояния импеданс будет возрастать. Для решения этой проблемы необходимым будет применение дополнительных покрытий, таких как PEDOT или чернение платиной (Pt black), которые увеличивают шероховатость и эффективную площадь регистрирующих контактов [79]. Кроме того, дальнейшее снижение импеданса позволит проводить более длительные хронические эксперименты, поскольку с течением времени импеданс микроэлектрода увеличивается вследствие электрохимического износа и инкапсуляции биологическими тканями [80, 81].

Основная цель данной работы заключалась в демонстрации возможностей реализации прижизненной визуализации Ca^{2+} и электрофизиологической регистрации у свободно передвигающихся животных с использованием решений с открытым исходным кодом. Мы продемонстрировали, что предложенная система позволяет одновременно визуализировать Ca^{2+} -активность и регистрировать локальные полевые потенциалы. Хотя в настоящей версии статьи основной акцент сделан на описании конструкции микроэлектрода и его технических аспектах, представлен также краткий анализ корреляции кальциевых и полевых сигналов. Однако для проведения полноценного анализа необходимо преодолеть ряд ограничений, в частности, увеличить количество регистрируемых каналов и частоту дискретизации до 1000 Гц. В будущем мы планируем улучшить прошивку беспроводного электрофизиологического модуля для повышения его производительности.

Рассматривая сравнение визуализации Ca^{2+} и электрофизиологической регистрации, следует отметить, что визуализация Ca^{2+} позволяет изучать нейронную динамику сотен клеток и целенаправленно анализировать активность специфических типов нейронов [82, 83]. Также с использованием Ca^{2+} -визуализации можно выявить пространственные зависимости между нейронами со схожими паттернами активности [84]. С помощью визуализации Ca^{2+} можно отслеживать активность отдельных нейронов в течение длительного времени для исследования процессов обучения и формирования памяти [85, 86]. Однако этот метод не регистрирует активность напрямую, а фиксирует изменения концентрации внутриклеточного кальция, что косвенно отражает нейронную активность [2, 87]. При этом Ca^{2+} -визуализация характеризуется сравнительно низким соотношением сигнал/шум и ограниченным динамическим диапазоном [88]. В дополнение, в процессе анализа поведения животных наблюдаются значительные колебания частоты спайков, которые могут различаться на порядки как в разные поведенческие периоды, так и среди нейронов одного типа [89–91]. Кроме того, корреляция между спайками и кальций-зависимой флуоресценцией может различаться в зависимости от типа нейронов и даже среди отдельных нейронов одного типа [92, 93].

С другой стороны, электрофизиологические записи обеспечивают прямую регистрацию нейронной активности с высоким соотношением сигнал/шум, временной точностью и динамическим диапазоном [20]. Однако этот метод обладает ограничениями, такими как менее точное выявление нейронов с низкой активностью [94] и регистрация небольшого подмножества относительно активных нейронов [20]. Кроме того, возможность отслеживания одной и той же популяции нейронов во времени остаётся сложной задачей из-за зарастания и подвижности микроэлектрода [95, 96]. В отличие от визуализации Ca^{2+} процесс разделения спайков, связанных с отдельными нейронами, может приводить к появлению артефактов, таких как слияние спайков от разных нейронов [94]. Эти особенности делают электрофизиологические и оптические методы взаимодополняющими в комплексных нейробиологических исследованиях. В ряде исследований предпринимались попытки сопоставить визуализацию кальция с электрофизиологической регистрацией, и в целом было выявлено качественное согласие между данными методами, хотя оценки основывались на статических и относительно грубых измерениях [82, 92]. Однако в другом исследовании, в котором сравнивалась активность, зарегистрированная с помощью электрофизиологических и оптических методов от сопоставимых популяций нейронов во время выполнения одной и той же поведенческой задачи, было обнаружено, что различные методы регистрации могут привести к расхождению в результатах [94]. В результате наших исследований была выявлена слабая или умеренная корреляция между Ca^{2+} -сигналами и ЛПП. Различия в уровнях корреляции между Ca^{2+} -сигналами могут отражать разнообразие функциональной динамики нейронных ансамблей, участвующих в генерации этих сигналов. В нашем случае наиболее вероятно, что такие расхождения связаны с особенностями

расположения и удалённостью регистрирующих контактов микроэлектрода, интегрированного с градиентной линзой. Это предположение подчёркивает важность учета геометрических и пространственных аспектов при интерпретации полученных данных. Сопоставление и поиск корреляции между кальциевыми и полевыми сигналами представляет собой сложную и неоднозначную задачу, требующую проведения отдельных масштабных исследований.

В данной работе применялась беспроводная электрофизиологическая система для снижения ограничений передвижения животных, вызванных скручиванием кабелей. Этот проект является переходным этапом к полностью беспроводной системе. В дальнейшем планируется интеграция с беспроводными минископами [97], что позволит исключить проводные соединения и минимизировать риски, связанные с ограничением движений животных во время экспериментов. Кроме того, возможно использование двухфотонных миниатюрных микроскопов, которые позволяют визуализировать активность не только в соме, но и в дендритах и шипиках нейронов у свободно передвигающихся животных [98].

Несмотря на работоспособность предложенного подхода, его использование ограничено проблемами синхронизации между минископом и электрофизиологической системой в процессе регистрации. Данное ограничение связано с аппаратными особенностями беспроводного модуля [58], что предполагает необходимость их преодоления в будущих версиях беспроводной электрофизиологической системы. К тому же, одним из недостатков методики является ручная формовка микроэлектрода вокруг GRIN-линзы, что может влиять на точность позиционирования. Решение этой проблемы предполагается с использованием металлической пресс-формы, где градиентная линза и микроэлектрод будут фиксироваться в зажиме с продольным разрезом цилиндра и упором для выравнивания. Процесс нагрева пресс-формы позволит достичь необходимой формы микроэлектрода для его дальнейшего объединения с GRIN-линзой.

Совместная прижизненная визуализация Ca^{2+} и электрофизиологическая регистрация являются перспективными методами в нейробиологических исследованиях, особенно для изучения воздействия различных фармакологических средств на активность нейронных ансамблей. Сочетание этих методов может применяться при разработке новых терапевтических агентов для лечения или уменьшения клинических проявлений различных нейродегенеративных заболеваний. Данный подход позволяет проводить анализ Ca^{2+} - и электрофизиологической активности нейронов у свободно передвигающихся лабораторных животных, что значительно расширяет возможности исследований в области нейробиологии. Важно отметить, что эта методика может способствовать пониманию механизмов функционирования и нарушений в нейронных ансамблях, связанных с поведением, восприятием и когнитивными процессами. В дальнейшем планируется провести анализ активности нейронов гиппокампа лабораторных мышей как дикого типа, так и с моделью болезни Альцгеймера во время оценки условно-рефлекторного замирания, используя разработанный метод одновременной визуализации Ca^{2+} и регистрации ЛПП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании предложено решение по объединению гибкого полиимидного микроэлектрода с градиентной линзой минископа для одновременной визуализации Ca^{2+} -активности и электрофизиологической регистрации *in vivo* в гиппокампе взрослой мыши. Результаты, полученные в ходе данного исследования, подтверждают эффективность предложенного подхода и его применимость для изучения нейронной активности во время проводимых исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарны Большаковой Анастасии Викторовне за административную помощь, а также сотрудникам Лаборатории молекулярной нейродегенерации за помощь и полезные советы в написании статьи.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. А. И., В. Е. К., А. И. Е. и Б. И. Б.), администрирование проекта (Е. А. И., А. И. Е. и О. Л. В.), сбор данных (Е. А. И., В. Е. К. и А. И. Е.), обработка данных (Е. А. И., В. Е. К.), визуализация данных (Е. А. И., В. Е. К.), написание и редактирование манускрипта (Е. А. И., В. Е. К. и А. И. Е.), рецензирование и редактирование манускрипта (О. Л. В., Б. И. Б.), получение финансирования (Е. А. И., Б. И. Б.). Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда «Исследование кальциевой и электрофизиологической активности нейронов гиппокампа *in vivo* у мышей с моделью болезни Альцгеймера» (проект № 22–75–00028). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Биоэтического комитета Петербургского политехнического университета Петра Великого, протокол № 4-n-b от 15 января 2024 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu X, Yang X, Song L, Wang Y, Li Y, Liu Y, Yang X, Wang Y, Pei W, Li W (2021) A Modified Miniscope System for Simultaneous Electrophysiology and Calcium Imaging *in vivo*. *Front Integr Neurosci* 15: 682019. <https://doi.org/10.3389/fnint.2021.682019>
2. Erofeev AI, Vinokurov EK, Vlasova OL, Bezprozvanny IB (2023) GCaMP, a Family of Single-Fluorophore Genetically Encoded Calcium Indicators. *Rus Physiol J im IM Sechenova* 109(7): 819–843. (In Russ). <https://doi.org/10.1134/S0022093023040142>
3. Sofroniew NJ, Flickinger D, King J, Svoboda K (2016) A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for *in vivo* imaging. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.14472>
4. Hamel EJ, Grewe BF, Parker JG, Schnitzer MJ (2015) Cellular level brain imaging in behaving mammals: an engineering approach. *Neuron* 86(1): 140–159. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.055>
5. Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, Keller PJ (2013) Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Methods* 10(5): 413–420. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2434>
6. Rovinsky Y, Saperin G (1992) Handbook of biological confocal microscopy, revised edition (Ed) James B. Pawley Plenum Press. New York and London (1990, 1989). <https://doi.org/10.1002/sca.4950140210>
7. Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248(4951): 73–76. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>

8. *Zipfel WR, Williams RM, Webb WW* (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21(11): 1369–1377.
<https://doi.org/10.1038/nbt899>
9. *Ter Veer MJT, Pfeiffer T, Nagerl UV* (2017) Two-Photon STED Microscopy for Nanoscale Imaging of Neural Morphology In Vivo. *Methods Mol Biol* 1663: 45–64.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7265-4_5
10. *Zatonyi A, Madarasz M, Szabo A, Lorincz T, Hodovan R, Rozsa B, Fekete Z* (2020) Transparent, low-autofluorescence microECoG device for simultaneous Ca(2+) imaging and cortical electrophysiology in vivo. *J Neural Eng* 17(1): 016062.
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/ab603f>
11. *Erofeev A, Antifeev I, Bolshakova A, Bezprozvanny I, Vlasova O* (2022) In Vivo Penetrating Microelectrodes for Brain Electrophysiology. *Sensors (Basel)* 22(23).
<https://doi.org/10.3390/s22239085>
12. *Lu Y, Liu X, Hattori R, Ren C, Zhang X, Komiyama T, Kuzum D* (2018) Ultra-low Impedance Graphene Microelectrodes with High Optical Transparency for Simultaneous Deep 2-photon Imaging in Transgenic Mice. *Adv Funct Mater* 28(31).
<https://doi.org/10.1002/adfm.201800002>
13. *Keefer EW, Botterman BR, Romero MI, Rossi AF, Gross GW* (2008) Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. *Nat Nanotechnol* 3(7): 434–439.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2008.174>
14. *Nam Y, Wheeler BC* (2011) In vitro microelectrode array technology and neural recordings. *Crit Rev Biomed Eng* 39(1): 45–61.
<https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v39.i1.40>
15. *Fan B, Wolfrum B, Robinson JT* (2021) Impedance scaling for gold and platinum microelectrodes. *J Neural Eng* 18(5).
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/ac20e5>
16. *Gerwig R, Fuchsberger K, Schroepel B, Link GS, Heusel G, Kraushaar U, Schuhmann W, Stett A, Stelzle M* (2012) PEDOT-CNT Composite Microelectrodes for Recording and Electrostimulation Applications: Fabrication, Morphology, and Electrical Properties. *Front Neuroeng* 5: 8.
<https://doi.org/10.3389/fneng.2012.00008>
17. *Oka H, Shimono K, Ogawa R, Sugihara H, Taketani M* (1999) A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J Neurosci Methods* 93(1): 61–67.
[https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(99\)00113-2](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(99)00113-2)
18. *Harris AR, Paolini AG* (2017) Correlation of Impedance and Effective Electrode Area of Iridium Oxide Neural Electrodes. *Austr J Chem* 70(9): 1016–1024.
<https://doi.org/10.1071/CH17218>
19. *Cai Y, Wang X, Yu X, Zhao H, Zhai Z, Wang H* (2023) Auto-balancing bridge based wide impedance spectrum measurement with consideration of Op-Amp input impedance. *Rev Sci Instrum* 94(10).
<https://doi.org/10.1063/5.0167842>
20. *Buzsaki G* (2004) Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 7(5): 446–451.
<https://doi.org/10.1038/nn1233>
21. *Cogan SF* (2008) Neural stimulation and recording electrodes. *Annu Rev Biomed Eng* 10: 275–309.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160518>
22. *Karumbaiah L, Saxena T, Carlson D, Patil K, Patkar R, Gaupp EA, Betancur M, Stanley GB, Carin L, Bellamkonda RV* (2013) Relationship between intracortical electrode design and chronic recording function. *Biomaterials* 34(33): 8061–8074.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.016>
23. *Cheung KC, Renaud P, Tanila H, Djupsund K* (2007) Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis. *Biosens Bioelectron* 22(8): 1783–1790.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.035>
24. *Kotzar G, Freas M, Abel P, Fleischman A, Roy S, Zorman C, Moran JM, Melzak J* (2002) Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices. *Biomaterials* 23(13): 2737–2750.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00007-8)
25. *Kim BJ, Kuo JT, Hara SA, Lee CD, Yu L, Gutierrez CA, Hoang TQ, Pikov V, Meng E* (2013) 3D Parylene sheath neural probe for chronic recordings. *J Neural Eng* 10(4): 045002.
<https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/4/045002>
26. *Johnston I, McCluskey Associate Professor D, Tan C, Tracey M* (2014) Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering. *J Micromech Microengin* 24: 035017.
<https://doi.org/10.1088/0960-1317/24/3/035017>

27. Kim B, Meng E (2016) Review of polymer MEMS micromachining. *J Micromech Microengin* 26: 013001.
<https://doi.org/10.1088/0960-1317/26/1/013001>
28. Ray S (2023) How Do Local Field Potentials Measured with Microelectrodes Differ from iEEG Activity? *Intracranial EEG: A Guide Cognitiv Neuroscientists*: 273–282.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-20910-9_17
29. Fiáth R, Hofer KT, Csikós V, Horváth D, Nánási T, Tóth K, Pothof F, Böhrer C, Asplund M, Ruther P, Ulbert I (2018) Long-term recording performance and biocompatibility of chronically implanted cylindrically-shaped, polymer-based neural interfaces. *Biomed Tech (Berl)* 63(3): 301–315.
<https://doi.org/10.1515/bmt-2017-0154>
30. Baek DH, Lee J, Byeon HJ, Choi H, Young Kim I, Lee KM, Jung Ho Pak J, Pyo Jang D, Lee SH (2014) A thin film polyimide mesh microelectrode for chronic epidural electrocorticography recording with enhanced contactability. *J Neural Eng* 11(4): 046023.
<https://doi.org/10.1088/1741-2560/11/4/046023>
31. Cruttenden CE, Taylor JM, Hu S, Zhang Y, Zhu XH, Chen W, Rajamani R (2017) Carbon Nano-Structured Neural Probes Show Promise for Magnetic Resonance Imaging Applications. *Biomed Phys Eng Express* 4(1).
<https://doi.org/10.1088/2057-1976/aa948d>
32. Prochazka A, Mushahwar VK, McCreery DB (2001) Neural prostheses. *J Physiol* 533(Pt 1): 99–109.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0099b.x>
33. Robinson FR, Johnson MT (1961) Histopathological studies of tissue reactions to various metals implanted in cat brains. *ASD Tech Rep* 61(397): 13.
34. Schweigmann M, Caudal LC, Stopper G, Scheller A, Koch KP, Kirchhoff F (2021) Versatile Surface Electrodes for Combined Electrophysiology and Two-Photon Imaging of the Mouse Central Nervous System. *Front Cell Neurosci* 15: 720675.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.720675>
35. Cecchetto C, Vassanelli S, Kuhn B (2021) Simultaneous Two-Photon Voltage or Calcium Imaging and Multi-Channel Local Field Potential Recordings in Barrel Cortex of Awake and Anesthetized Mice. *Front Neurosci* 15: 741279.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.741279>
36. Kuzum D, Takano H, Shim E, Reed JC, Juul H, Richardson AG, de Vries J, Bink H, Dichter MA, Lucas TH, Coulter DA, Cubukcu E, Litt B (2014) Transparent and flexible low noise graphene electrodes for simultaneous electrophysiology and neuroimaging. *Nat Commun* 5: 5259.
<https://doi.org/10.1038/ncomms6259>
37. Thunemann M, Lu Y, Liu X, Kilic K, Desjardins M, Vandenberghe M, Sadegh S, Saisan PA, Cheng Q, Weldy KL, Lyu H, Djurovic S, Andreassen OA, Dale AM, Devor A, Kuzum D (2018) Deep 2-photon imaging and artifact-free optogenetics through transparent graphene microelectrode arrays. *Nat Commun* 9(1): 2035.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04457-5>
38. Zhang J, Liu X, Xu W, Luo W, Li M, Chu F, Xu L, Cao A, Guan J, Tang S, Duan X (2018) Stretchable Transparent Electrode Arrays for Simultaneous Electrical and Optical Interrogation of Neural Circuits in Vivo. *Nano Lett* 18(5): 2903–2911.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00087>
39. Donahue MJ, Kaszas A, Turi GF, Rozsa B, Slezia A, Vanzetta I, Katona G, Bernard C, Malliaras GG, Williamson A (2018) Multimodal Characterization of Neural Networks Using Highly Transparent Electrode Arrays. *eNeuro* 5(6).
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0187-18.2018>
40. Qiang Y, Artoni P, Seo KJ, Culaclii S, Hogan V, Zhao X, Zhong Y, Han X, Wang PM, Lo YK, Li Y, Patel HA, Huang Y, Sambangi A, Chu JSV, Liu W, Fagiolini M, Fang H (2018) Transparent arrays of bilayer-nanomesh microelectrodes for simultaneous electrophysiology and two-photon imaging in the brain. *Sci Adv* 4(9): eaat0626.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aat0626>
41. Renz AF, Lee J, Tybrandt K, Brzezinski M, Lorenzo DA, Cerra Cheraka M, Lee J, Helmchen F, Voros J, Lewis CM (2020) Opto-E-Dura: A Soft, Stretchable ECoG Array for Multimodal, Multiscale Neuroscience. *Adv Healthc Mater* 9(17): e2000814.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202000814>
42. Kozai TD, Vazquez AL (2015) Photoelectric artefact from optogenetics and imaging on microelectrodes and bioelectronics: New Challenges and Opportunities. *J Mater Chem B* 3(25): 4965–4978.
<https://doi.org/10.1039/C5TB00108K>

43. Seo J-W, Kim K, Seo K-W, Kim MK, Jeong S, Kim H, Ghim J-W, Lee JH, Choi N, Lee J-Y, Lee HJ (2020) Artifact-Free 2D Mapping of Neural Activity In Vivo through Transparent Gold Nanonetwork Array. *Advanc Funct Mater* 30(34): 2000896.
<https://doi.org/10.1002/adfm.202000896>
44. Cho YU, Lim SL, Hong J-H, Yu KJ (2022) Transparent neural implantable devices: a comprehensive review of challenges and progress. *npj Flexible Electron* 6(1): 53.
<https://doi.org/10.1038/s41528-022-00178-4>
45. Engelbrecht CJ, Johnston RS, Seibel EJ, Helmchen F (2008) Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging in vivo. *Optics Express* 16(8): 5556–5564.
<https://doi.org/10.1364/OE.16.005556>
46. Zong W, Wu R, Chen S, Wu J, Wang H, Zhao Z, Chen G, Tu R, Wu D, Hu Y, Xu Y, Wang Y, Duan Z, Wu H, Zhang Y, Zhang J, Wang A, Chen L, Cheng H (2021) Miniature two-photon microscopy for enlarged field-of-view, multi-plane and long-term brain imaging. *Nature Methods* 18(1): 46–49.
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-01024-z>
47. Zong W, Obenhaus HA, Skytoen ER, Eneqvist H, de Jong NL, Vale R, Jorge MR, Moser MB, Moser EI (2022) Large-scale two-photon calcium imaging in freely moving mice. *Cell* 185(7): 1240–1256.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.017>
48. Vogt N (2022) Two-photon imaging in freely behaving mice. *Nat Methods* 19(5): 518.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01502-6>
49. Aharoni D, Khakh BS, Silva AJ, Golshani P (2019) All the light that we can see: a new era in miniaturized microscopy. *Nat Methods* 16(1): 11–13.
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0266-x>
50. Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods* 6(12): 875–881.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1398>
51. Ghosh KK, Burns LD, Cocker ED, Nimmerjahn A, Ziv Y, Gamal AE, Schnitzer MJ (2011) Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat Methods* 8(10): 871–878.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1694>
52. Flusberg BA, Nimmerjahn A, Cocker ED, Mukamel EA, Barretto RP, Ko TH, Burns LD, Jung JC, Schnitzer MJ (2008) High-speed, miniaturized fluorescence microscopy in freely moving mice. *Nat Methods* 5(11): 935–938.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1256>
53. Jennings JH, Ung RL, Resendez SL, Stamatakis AM, Taylor JG, Huang J, Veleta K, Kantak PA, Aita M, Shilling-Scrivero K, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Otte S, Stuber GD (2015) Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell* 160(3): 516–527.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.026>
54. Liberti WA, Perkins LN, Leman DP, Gardner TJ (2017) An open source, wireless capable miniature microscope system. *J Neural Eng* 14(4): 045001.
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa6806>
55. Jacob AD, Ramsaran AI, Mocle AJ, Tran LM, Yan C, Frankland PW, Josselyn SA (2018) A Compact Head-Mounted Endoscope for In Vivo Calcium Imaging in Freely Behaving Mice. *Curr Protoc Neurosci* 84(1): e51.
<https://doi.org/10.1002/cpns.51>
56. Zhang L, Liang B, Barbera G, Hawes S, Zhang Y, Stump K, Baum I, Yang Y, Li Y, Lin DT (2019) Miniscope GRIN Lens System for Calcium Imaging of Neuronal Activity from Deep Brain Structures in Behaving Animals. *Curr Protoc Neurosci* 86(1): e56.
<https://doi.org/10.1002/cpns.56>
57. de Groot A, van den Boom BJG, van Genderen RM, Coppens J, van Veldhuijzen J, Bos J, Hoedemaker H, Negrello M, Willuhn I, De Zeeuw CI, Hoogland TM (2020) NiNscope, a versatile miniscope for multi-region circuit investigations. *Elife* 9.
<https://doi.org/10.7554/eLife.49987>
58. Erofeev A, Antifeev I, Vinokurov E, Bezprozvanny I, Vlasova O (2023) An Open-Source Wireless Electrophysiology System for In Vivo Neuronal Activity Recording in the Rodent Brain: 2.0. *Sensors (Basel)* 23(24).
<https://doi.org/10.3390/s23249735>
59. Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P (2006) Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 1(6): 3166–3173.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.450>

60. Dong Z, Mau W, Feng Y, Pennington ZT, Chen L, Zaki Y, Rajan K, Shuman T, Aharoni D, Cai DJ (2022) Minian, an open-source miniscope analysis pipeline. *Elife* 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.70661>
61. Gerasimov E, Mitenev A, Pchitskaya E, Chukanov V, Bezprozvanny I (2023) NeuroActivityToolkit-Toolbox for Quantitative Analysis of Miniature Fluorescent Microscopy Data. *J Imaging* 9(11). <https://doi.org/10.3390/jimaging9110243>
62. Kim GH, Kim K, Lee E, An T, Choi W, Lim G, Shin JH (2018) Recent Progress on Microelectrodes in Neural Interfaces. *Materials (Basel)* 11(10). <https://doi.org/10.3390/ma11101995>
63. Viswam V, Obien MEJ, Franke F, Frey U, Hierlemann A (2019) Optimal Electrode Size for Multi-Scale Extracellular-Potential Recording From Neuronal Assemblies. *Front Neurosci* 13: 385. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00385>
64. Zutshi I, Brandon MP, Fu ML, Donegan ML, Leutgeb JK, Leutgeb S (2018) Hippocampal Neural Circuits Respond to Optogenetic Pacing of Theta Frequencies by Generating Accelerated Oscillation Frequencies. *Curr Biol* 28(8): 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.061>
65. Buzsaki G, Horvath Z, Urioste R, Hetke J, Wise K (1992) High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* 256(5059): 1025–1027. <https://doi.org/10.1126/science.1589772>
66. Chrobak JJ, Buzsaki G (1998) Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J Neurosci* 18(1): 388–398. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00388.1998>
67. Kemere C, Carr MF, Karlsson MP, Frank LM (2013) Rapid and continuous modulation of hippocampal network state during exploration of new places. *PLoS One* 8(9): e73114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073114>
68. Akoglu H (2018) User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med* 18(3): 91–93. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>
69. Harrison XA (2021) A brief introduction to the analysis of time-series data from biologging studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 376(1831): 20200227. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0227>
70. Vannimenu PY, Hardouin P, Thevenon A, Walter MP, Duquesnoy B, Gluckman E, Bauters F, Delcambre B (1988) [Candida spondylodiscitis treated with itraconazole]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 55(11): 957–958.
71. Ward MP, Rajdev P, Ellison C, Irazoqui PP (2009) Toward a comparison of microelectrodes for acute and chronic recordings. *Brain Res* 1282: 183–200. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.052>
72. Vymazal M, Vymazalova Z, Frysakova M (1984) Surgical treatment and postoperative correction using gel contact lenses in monocular congenital cataracts. *Cesk Oftalmol* 40(5): 293–298.
73. Yamada H, Kageyama N, Kato T, Sakakibara T (1981) The diagnosis of syringomyelia (author's transl. *No Shinkei Geka* 9(5): 573–582.
74. Coelho BJ, Pinto JV, Martins J, Rovisco A, Barquinha P, Fortunato E, Baptista PV, Martins R, Igreja R (2023) Parylene C as a Multipurpose Material for Electronics and Microfluidics. *Polymers (Basel)* 15(10). <https://doi.org/10.3390/polym15102277>
75. Hassler C, Boretius T, Stieglitz T (2011) Polymers for neural implants. *J Polymer Sci Part B: Polymer Physics* 49(1): 18–33. <https://doi.org/10.1002/polb.22169>
76. Robinson DA (1968) The electrical properties of metal microelectrodes. *Proceed IEEE* 56(6): 1065–1071. <https://doi.org/10.1109/PROC.1968.6458>
77. Buzsaki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents – EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* 13(6): 407–420. <https://doi.org/10.1038/nrn3241>
78. Neto JP, Baião P, Lopes G, Frazão J, Nogueira J, Fortunato E, Barquinha P, Kampff AR (2018) Does Impedance Matter When Recording Spikes With Polytrodes? *Front Neurosci* 12: 715. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00715>
79. Yang S, Yang Y, Geng L, Adedokun G, Xie D, Liu R, Xu L (2021) Surface Modification to Improve the Electrochemical Performance of Neural Microelectrode Arrays. *5th IEEE Electron Devices Technol & Manufact Confer (EDTM)*. 8–11 April 2021. 1–3.
80. Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM (2005) Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J Neurosci Methods* 148(1): 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.08.015>

81. *Sankar V, Patrick E, Dieme R, Sanchez JC, Prasad A, Nishida T* (2014) Electrode impedance analysis of chronic tungsten microwire neural implants: understanding abiotic vs. biotic contributions. *Front Neuroeng* 7: 13.
<https://doi.org/10.3389/fneng.2014.00013>
82. *Stringer C, Pachitariu M, Steinmetz N, Carandini M, Harris KD* (2019) High-dimensional geometry of population responses in visual cortex. *Nature* 571(7765): 361–365.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1346-5>
83. *Fu Y, Tucciarone JM, Espinosa JS, Sheng N, Darcy DP, Nicoll RA, Huang ZJ, Stryker MP* (2014) A cortical circuit for gain control by behavioral state. *Cell* 156(6): 1139–1152.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.050>
84. *Kerlin AM, Andermann ML, Berezovskii VK, Reid RC* (2010) Broadly tuned response properties of diverse inhibitory neuron subtypes in mouse visual cortex. *Neuron* 67(5): 858–871.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.002>
85. *Huber D, Gutnisky DA, Peron S, O'Connor DH, Wiegert JS, Tian L, Oertner TG, Looger LL, Svoboda K* (2012) Multiple dynamic representations in the motor cortex during sensorimotor learning. *Nature* 484(7395): 473–478.
<https://doi.org/10.1038/nature11039>
86. *Komiyama T, Sato TR, O'Connor DH, Zhang YX, Huber D, Hooks BM, Gabbito M, Svoboda K* (2010) Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. *Nature* 464(7292): 1182–1186.
<https://doi.org/10.1038/nature08897>
87. *Grienberger C, Konnerth A* (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73(5): 862–885.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011>
88. *Peron S, Chen TW, Svoboda K* (2015) Comprehensive imaging of cortical networks. *Curr Opin Neurobiol* 32: 115–123.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.03.016>
89. *O'Connor DH, Peron SP, Huber D, Svoboda K* (2010) Neural activity in barrel cortex underlying vibrissa-based object localization in mice. *Neuron* 67(6): 1048–1061.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.026>
90. *Hromadka T, Deweese MR, Zador AM* (2008) Sparse representation of sounds in the unanesthetized auditory cortex. *PLoS Biol* 6(1): e16.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060016>
91. *Li N, Chen TW, Guo ZV, Gerfen CR, Svoboda K* (2015) A motor cortex circuit for motor planning and movement. *Nature* 519(7541): 51–56.
<https://doi.org/10.1038/nature14178>
92. *Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS* (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499(7458): 295–300.
<https://doi.org/10.1038/nature12354>
93. *Maravall M, Mainen ZF, Sabatini BL, Svoboda K* (2000) Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J* 78(5): 2655–2667.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76809-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76809-3)
94. *Wei Z, Lin BJ, Chen TW, Daie K, Svoboda K, Druckmann S* (2020) A comparison of neuronal population dynamics measured with calcium imaging and electrophysiology. *PLoS Comput Biol* 16(9): e1008198.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008198>
95. *Dhawale AK, Poddar R, Wolff SB, Normand VA, Kopelowitz E, Olveczky BP* (2017) Automated long-term recording and analysis of neural activity in behaving animals. *Elife* 6.
<https://doi.org/10.7554/eLife.27702>
96. *Tolias AS, Ecker AS, Siapas AG, Hoenselaar A, Keliris GA, Logothetis NK* (2007) Recording chronically from the same neurons in awake, behaving primates. *J Neurophysiol* 98(6): 3780–3790.
<https://doi.org/10.1152/jn.00260.2007>
97. *Barbera G, Liang B, Zhang L, Li Y, Lin DT* (2019) A wireless miniScope for deep brain imaging in freely moving mice. *J Neurosci Methods* 323: 56–60.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.05.008>
98. *Silva AJ* (2017) Miniaturized two-photon microscope: seeing clearer and deeper into the brain. *Light Sci Appl* 6(8): e17104.
<https://doi.org/10.1038/lsa.2017.104>

Integration of Single-Photon Miniature Fluorescence Microscopy and Electrophysiological Recording Methods for *in Vivo* Studying Hippocampal Neuronal Activity

A. I. Erofeev^{a, #}, E. K. Vinokurov^a, I. E. Antifeev^b, O. L. Vlasova^a, and I. B. Bezprozvanny^{a, c}

^a*Institute of Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great St. Petersburg polytechnic university, St. Petersburg, Russia*

^b*Institute of Analytical Instrumentation, St. Petersburg, Russia*

^c*Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, United States of America*

[#]*e-mail: alexandr.erofeew@gmail.com*

The miniature single-photon fluorescent microscope (miniscope) enables the visualization of calcium activity *in vivo* in freely moving laboratory animals, providing the capability to track cellular activity during the investigation of memory formation, learning, sleep, and social interactions. However, the use of calcium sensors for *in vivo* imaging is limited by their relatively slow (millisecond-scale) kinetics, which complicates the recording of high-frequency spike activity. The integration of methods from single-photon miniature fluorescent microscopy with electrophysiological recording, which possesses microsecond resolution, represents a potential solution to this issue. Such a combination of techniques allows for the simultaneous recording of optical and electrophysiological activity in a single animal *in vivo*. In this study, a flexible polyimide microelectrode was developed and integrated with the gradient lens of the miniscope. The *in vivo* tests conducted in this research confirmed that the microelectrode combined with the gradient lens facilitates simultaneous single-photon calcium imaging and local field potential recording in the hippocampus of an adult mouse.

Keywords: hippocampus, calcium imaging, miniscope, electrophysiology, microelectrodes, *in vivo*