

# DOGHOUSE: новый метод исследования пространственно-временной динамики активности мозга

А. А. Лазуткин<sup>1</sup>, С. А. Шуваев<sup>2</sup>

Данные, получаемые путём окрашивания и микроскопии целого мозга, анализируют путём автоматического вписывания трехмерных реконструкций в 3D-атлас и обнаружения меченых клеток в отдельных областях. Однако математический аппарат, который позволял бы осуществлять, с одной стороны, точный автоматизированный количественный анализ меченых клеток, а, с другой стороны, позволял бы сопоставлять полученную информацию о числе клеток во всем мозге с его функциональной анатомией, в настоящий момент недостаточно развит. Для решения этой проблемы нами был разработан DOGHOUSE – метод изучения пространственно-временной динамики активности целого мозга. Он состоит из двух компонент. CORGI – алгоритм вписывания образцов мозга в пространстве и их синхронизации во времени, который преодолевает различия между непохожими образцами мозга. DALMATIAN – алгоритм обнаружения клеток в образцах целого мозга, позволяющий автоматически идентифицировать клетки даже в сложных случаях, когда они плотно упакованы относительно друг друга. Наш метод был апробирован на образцах мозга взрослых и развивающихся мышей и показал характеристики, соответствующие или превышающие таковые, получаемые имеющимися аналогами. Предложенный метод автоматизирует такие задачи как сравнение трехмерных образцов мозга групп животных и мониторинг развития мозга. Все компоненты метода находятся в открытом доступе.

**Ключевые слова:** целый мозг, 3D-анализ, динамика развития, микроскопия, вписывание, подсчёт

<sup>1</sup> *Лазуткин Александр Алексеевич* — старший научный сотрудник; Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва; Центр генетики развития и отдел анестезиологии Университета Стоуни-Брук, Стоуни-Брук, Нью-Йорк, e-mail: lazutkin.a.a@gmail.com.

Lazutkin Alexander — senior researcher; Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Center for Developmental Genetics and Department of Anesthesiology, Stony Brook University, Stony Brook, NY.

<sup>2</sup> *Шуваев Сергей Алексеевич* — аспирант; Лаборатория Колд-Спринг-Харбор, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк.

Shuvaev Sergey — postgraduate student; Department of Neuroscience of Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, e-mail: sshuvaev@cshl.edu.

## 1. Введение

Начиная с 2000-х годов началось взрывное развитие технологий трехмерной визуализации несекционированных образцов биологической ткани, в частности, мозга. Главной движущей силой для этого стало появление широкого спектра новых оптических методов, позволяющих снимать крупные образцы с клеточным разрешением [1], и последовавшее за этим развитие новых гистохимических техник: whole-mount иммуногистохимии [2] и оптического просветления [3]. В современной науке идет постоянное совершенствование методов трехмерной визуализации, однако, использование их для картирования активности мозга во время когнитивных задач до сих пор находится в зачаточном состоянии [4],[5]. Такое отставание, главным образом, обусловлено недостаточным развитием математического аппарата, который позволял бы осуществлять, с одной стороны точный автоматизированный количественный анализ активных клеток, а, с другой стороны, позволял бы сопоставлять полученную информацию о числе клеток во всем мозге с его функциональной анатомией. В этой связи нами была поставлена задача разработки технологии трехмерного имиджинга и анализа мозга животных и создание метода псевдо-4D-визуализации динамических процессов в мозге. Разрабатываемая нами технология включает в себя несколько этапов от пробоподготовки и получения трехмерных изображений до перевода их в математические данные. Последнее требует выполнения целого ряда алгебраических процедур: оптимизация трехмерных изображений, их эквализация, совмещение изображений мозга и регистрация их в трехмерный атлас мозга, и, наконец, количественный анализ. В настоящей работе мы обобщаем наши наработки для решения этих задач, которые мы объединили под названием DOGHOUSE. Он состоит из двух компонент. CORGI (Customizable Object Registration for Groups of Images) – алгоритм вписывания образцов мозга в пространстве и их синхронизации во времени, который преодолевает различия между непохожими образцами мозга [6]. DALMATIAN (Dependable Algorithm for Matrix Image Analysis) – алгоритм обнаружения клеток в образцах целого мозга, позволяющий автоматически идентифицировать клетки даже в сложных случаях, когда они плотно упакованы относительно друг друга [7].

## 2. CORGI: совмещение непохожих образцов мозга в пространстве и времени с высокой точностью

Для выполнения задачи сравнения трехмерных изображений мозга на основе плотностей сигнала в целом мозге необходимо, чтобы локализация морфологически идентичных структур в изображениях разных об-

разцов совпадала. Это достижимо при помощи метода математического совмещения объемных изображений, называемого в литературе методом регистрации. Не все существующие на сегодня методы регистрации обладают достаточной точностью совмещения образцов. Мы выявили следующие основные причины возникновения данных неточностей для образцов взрослого мозга: большая вариативность обонятельных луковиц и ошибочное математическое совмещение границы боковых желудочков и внутренней выстилки желудочков мозга. При совмещении образцов развивающегося мозга наблюдается еще большее число проблем. Во-первых, мозг в процессе развития претерпевает существенные деформации за малое время. Таким образом, успешный алгоритм вписывания образцов детского мозга должен быть способен преодолевать ярко выраженные различия между образцами мозга на разных стадиях развития. Во-вторых, для определённых моментов в развитии мозга может быть доподлинно неизвестно, что именно является стандартом, а что – отклонением, так как атласы развития мозга фокусируются лишь на небольшом числе определённых этапов развития. Как следствие, успешный метод вписывания образцов детского мозга должен балансировать между точностью вписывания и сохранением исходных данных. В-третьих, развитие мозга протекает с индивидуальными различиями в скорости. С целью сохранения детальной информации путём предотвращения усреднения образцов мозга на разных стадиях развития, метод совмещения образцов мозга должен быть дополнен механизмом синхронизации образцов мозга во времени. С целью решения данных задач в предложенном протоколе были применены: i) предварительная фильтрация изображений, включающая выявление контуров областей мозга и двоичной маски образцов для более точного совмещения областей мозга; ii) поиск преобразования мозга с помощью алгоритма симуляции закалки (Монте-Карло) на итерационно уточняемой координатной сетке, позволивший совмещать области непохожих образов мозга сохраняя сходимость алгоритма; iii) регуляризацию преобразования путём учёта деформационной энергии преобразования для максимального сохранения исходной информации об образце и iv) синхронизацию образцов путём классического многомерного шкалирования на основе корреляций между образцами. Метод был апробирован на 28 образцах развивающегося мозга, где было проведено сравнение качества совмещения нашего метода и существующих методов (iDISCO и CUBIC). CORGI и CUBIC проявили себя наилучшим образом в пространственном вписывании образов; CORGI потребовал в 32 раза меньше вычислений. Отмечено, что CORGI проявил себя лучше, чем CUBIC в совмещении мозжечка; обратная тенденция наблюдалась в совмещении рострального миграционного пути. Оба алгоритма проявили себя лучше iDISCO, а также лучше CUBIC при

числе итераций как у CORGI. Наш алгоритм, таким образом, успешно проявил себя в совмещении образцов развивающегося мозга. Предложенный метод является модульным; его отдельные части (фильтрация изображений, Монте-Карло, совмещение во времени) могут использоваться как отдельно, так и вместе с другими существующими алгоритмами.

### **3. DALMATIAN: обнаружение и подсчет близко-расположенных клеток**

Во время работы над количественным анализом в трехмерных образцах мозга нами были выявлены типовые трудности автоматического обнаружения меченых клеток в образцах ткани. А именно: i) различия между отдельными образцами, включая различия в морфологии, а также в интенсивности сигнала и фона; ii) неспецифическая флюоресценция, в т.ч. флюоресценция кровеносных сосудов и ткани; iii) неоднородность метки, маркирующей клетки – типичная проблема для делящихся клеток; iv) неоднородность фона и v) плотно упакованные клетки – проблема, также типичная для делящихся клеток и клеток сетчатки глаза. В разработанном нами алгоритме мы использовали: i) выравнивание изображений по гистограмме для устранения различий между отдельными образцами; ii) вычитания изображений, снятых на разной длине волны для устранения неспецифической флюоресценции; iii) низкочастотный фильтр против неоднородности метки и iv) высокочастотный фильтр против неоднородности фона, а также v) алгоритм водораздела для выявления потенциальных клеток и бутстреп для фильтрации потенциальных клеток по размеру. Мы протестировали наш алгоритм на гистологических срезах ткани с клетками, маркированными с помощью EdU, BrdU, c-Fos, DAPI, а также в образцах целых гиппокампов с клетками, маркированными с помощью EdU, Nestin-CFP, где мы провели сравнение точности обнаружения клеток нашим алгоритмом и существующими алгоритмами (включённым в пакеты Imaris и ImageJ Fiji). Во всех тестах DALMATIAN показал лучший результат в обнаружении меченых клеток; результат (f-мера) зависел только от соотношения сигнал-шум в образцах и не менялся в зависимости от факторов, идентифицированных нами как проблематичные при автоматическом подсчёте клеток. Таким образом, DALMATIAN успешно проявил себя в обнаружении меченых клеток, включая плотно упакованные делящиеся клетки.

Таким образом, разработанный нами метод DOGHOUSE был апробирован на образцах мозга взрослых и развивающихся мышей и показал характеристики, соответствующие или превышающие имеющиеся на тестовых выборках данных. Предложенный метод автоматизирует такие

задачи как сравнение групп животных и мониторинг развития мозга. Все компоненты метода находятся в открытом доступе [8],[9].

*Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект» и грантов РФФИ №19-15-00247, РФФИ №19-29-04173 и Министерства науки и образования РФ №075-15-2020-801.*

## Список литературы

- [1] Power R.M., Huisken J., “A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging”, *Nature Methods*, **14**:4 (2017), 360-373.
- [2] Renier N. et al., “iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging”, *Cell*, **159** (2014), 896-910.
- [3] Jährling N. et al., “Light-Sheet Fluorescence Microscopy: Chemical Clearing and Labeling Protocols for Ultramicroscopy”, *Methods in Molecular Biology*, **1563** (2017), 33-49.
- [4] Murakami T.C. et al., “A Three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing”, *Nature Neuroscience*, **21** (2018), 625-637.
- [5] Renier N. et al., “Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes”, *Cell*, **165** (2016), 1789-1802.
- [6] Shuvaev S.A., et al., “Spatiotemporal 3D image registration for mesoscale studies of brain development”, *Scientific Reports*, 2022, в печати.
- [7] Shuvaev S.A., et al., “DALMATIAN: An algorithm for automatic cell detection and counting in 3D”, *Frontiers in Neuroanatomy*, **11** (2007), 117.
- [8] <https://github.com/KoulakovLab/Registration>
- [9] <https://github.com/KoulakovLab/Dalmatian>

## **DOGHOUSE: a new assay to probe spatiotemporal dynamics of brain-wide activity**

**Lazutkin A.A., Shuvaev S.A.**

To analyze the data generated with whole-brain staining and imaging approaches, several assays have been proposed registering brain samples to atlases and detecting stained cells in individual brain regions. However, the algorithms for quantifying labeled cells in the brain and grounding these counts to the brain’s functional anatomy are still in the early stages of development. To bridge this gap, we introduce DOGHOUSE, an end-to-end assay for probing spatiotemporal dynamics of brain-wide activity. The assay consists of two components. CORGI, a software package for registering whole-brain sample data in space and time, overcomes the differences

between dissimilar perinatal brains. DALMATIAN, a software package for cell detection in whole-brain sample data, separates densely packed dividing cells. The staining protocol has been validated for the staining specificity whilst the software packages have shown competitive performance meeting or exceeding the state-of-the-art on diverse datasets. Our assay automates a variety of tasks including group comparison and monitoring brain development dynamics. All methods are available for download via open access.

*Keywords:* whole-brain, 3D-analysis, developmental dynamics, microscopy, registration, morphing, cell counting

## References

- [1] Power R.M., Huisken J., “A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging”, *Nature Methods*, **14**:4 (2017), 360-373.
- [2] Renier N. et al., “iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging”, *Cell*, **159** (2014), 896–910.
- [3] Jährling N. et al., “Light-Sheet Fluorescence Microscopy: Chemical Clearing and Labeling Protocols for Ultramicroscopy”, *Methods in Molecular Biology*, **1563** (2017), 33–49.
- [4] Murakami T.C. et al., “A Three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing”, *Nature Neuroscience*, **21** (2018), 625–637.
- [5] Renier N. et al., “Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes”, *Cell*, **165** (2016), 1789–1802.
- [6] Shuvaev S.A., et al., “Spatiotemporal 3D image registration for mesoscale studies of brain development”, *Scientific Reports*, 2022, in press.
- [7] Shuvaev S.A., et al., “DALMATIAN: An algorithm for automatic cell detection and counting in 3D”, *Frontiers in Neuroanatomy*, **11** (2007), 117.
- [8] <https://github.com/KoulakovLab/Registration>
- [9] <https://github.com/KoulakovLab/Dalmatian>