

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем

«До захисту»

Зав. кафедри молекулярної
і медичної біофізики

доктор фіз.-мат. наук, доцент
(науковий ступінь, вчене звання)

_____ В.П. Берест
(підпис)

«___» _____ 2023 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА

ВИКОРИСТАННЯ КВАНТОВИХ ТОЧОК У ПРОЦЕСАХ НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЇ

Науковий керівник

кандидат фіз.-мат. наук, доцент, ХНУ ім. В. Н. Каразіна
(науковий ступінь, вчене звання, посада, місце роботи)

_____ О. О. Горобченко
(підпис)

Виконав студент групи РБ-61,
спеціальність: 105 Прикладна
фізика та наноматеріали

_____ А. Г. Булова
(підпис)

РЕФЕРАТ

Булова А.Г. Використання квантових точок у процесах нейровізуалізації. Дипломна робота. Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2023. 75 с., 12 рис., 2 табл., 106 джерел.

КВАНТОВІ ТОЧКИ, НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЯ, КЛІТИННА ВІЗУАЛІЗАЦІЯ, ЧУТЛИВІ ДО НАПРУГИ БАРВНИКИ, GENETICALLY ENCODED CALCIUM INDICATORS (GECI), GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)

Об'єкт дослідження: нервові клітини, квантові точки.

Предмет дослідження: флюоресценція квантових точок для нейровізуалізації *in vivo*.

Мета роботи: проаналізувати можливість використання квантових точок як індикатора нервового потенціалу дії.

Методи дослідження: аналіз і систематизація літературних даних.

Результати дослідження: існуючі експерименти показують, що квантові точки можуть успішно відстежувати мембранні потенціали нейронів, проте до розуміння механізмів взаємодії з біологічними структурами ще далеко. Це стосується також вивчення їх взаємодії з різними клітинними компонентами, а також вплив на клітинні функції і загальну життєздатність.

Однією з ключових проблем є визначення найбільш ефективної структури наночастинок, яка б не завдавала шкоди організму і мала б мінімальну цитотоксичність.

В цьому напрямку є ефективними квантові точки, які вже довели свою значущість у наукових дослідженнях. Їхній потенціал у нейровізуалізації є новим напрямком у нейронауці та медичній візуалізації, що може призвести до нових відкриттів та покращення діагностичних методів. Отже, подальші дослідження та розробки в цій галузі можуть відіграти ключову роль у реалізації повного потенціалу квантових точок у медицині та біотехнологіях.

ABSTRACT

Bulova A.G. The use of quantum dots in processes of neural visualization. Diploma. V. N. Karazin Kharkiv National University, 2023. 75 p., 12 figs., 2 табл., 106 references.

QUANTUM DOTS, NEUROIMAGING, CELL IMAGING, VOLTAGE SENSITIVE DYES, GENETICALLY ENCODED CALCIUM INDICATORS (GECI), GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)

Research object: nerve cells, quantum dots.

Subject of research: electrical activity of neurons in vivo.

The purpose of the work: to analyze the possibility of using quantum dots as a nerve spike indicator.

Research methods: analysis and systematization of literary data.

Research results: existing experiments show that quantum dots can successfully track the membrane potentials of neurons, but the mechanisms of interaction with biological structures are still far from being understood. This also applies to the study of their interaction with various cellular components, as well as the impact on cellular functions and general viability.

One of the key problems is to determine the most effective nanoparticle structure that would not harm the body and have minimal cytotoxicity.

Quantum dots, which have already proven their importance in scientific research, are effective in this direction. Their potential in neuroimaging is a new direction in neuroscience and medical imaging that may lead to new discoveries and improved diagnostic techniques. Therefore, further research and development in this field can play a key role in realizing the full potential of quantum dots in medicine and biotechnology.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	8
 1 ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ТЕХНОЛОГІЙ НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЇ ТА АНАЛІЗ ЇХ НЕДОЛІКІВ.....	14
1.1 Методи сканування структури мозку	15
1.1.1 Позитронно-емісійна томографія та Комп'ютерна томографія.....	15
1.1.2 Магнітно-резонансна томографія та функціональна магніторезонансна томографія (МРТ/фМРТ).....	18
1.1.2.1 Сучасні контрастні речовини для МРТ	19
1.2 Методи зчитування електричної активності мозку.....	21
1.2.1 Електро-енцефалограма (ЕЕГ).....	21
1.2.2 Магнітоенцефалографія (МЕГ).....	24
1.3 Клітинна візуалізація	26
1.3.1 Флуоресцентна візуалізація	26
1.3.2 Внутрішньоклітинне та навколоклітинне маркування.....	28
1.3.2.1 Флуоресцентні етикетки	30
1.3.2.2 Хромогенні/колориметричні етикетки	31
1.3.2.3 Радіоактивні мітки.....	32
2 НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЯ У КОНТЕКСТІ ДЕКОДУВАННЯ ПАТТЕРНІВ АКТИВНОСТІ МОЗКУ	33
2.1 Основна проблематика дослідження патернів активності мозку.....	34
2.1.1 Застосування ЕЕГ та МЕГ та їх обмеження	35
2.2 Практичне застосування результатів інтерпретування активності мозку.....	37
2.3 Перспективні методи зняття обмежень актуальних технологій	

декодування.....	39
3 ХАРАКТЕРИСТИКА ПОТЕНЦІАЛ-ЗАЛЕЖНИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ МАРКЕРІВ У НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЇ IN VIVO	40
3.1 GEVI.....	41
3.2 GESI.....	44
4 ОСОБЛИВОСТІ ТА АКТУАЛЬНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КВАНТОВИХ ТОЧОК.....	45
4.1 Специфіка досліджень перспективності методу.....	49
4.2 Кількісний вимір напруги.....	53
4.3 Актуальна проблематика застосування.....	58
ВИСНОВКИ.....	61
СПИСОК ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ.....	62

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AD – хвороба Альцгеймера;

AP – alkaline phosphatase (лужна фосфатаза);

ArcLight – різновид генетично модефікованих індикаторів напруги;

DAB – діамінобензидин;

Di-8-ANEPPS – барвник є чутливим зондом для виявлення субмілісекундних змін мембранного потенціалу (AminoNaphthylEthenylPyridinium);

DWI – diffusion weighted imaging;

FM – тип барвників для плазматичної мембрани клітин (Fei-Mao);

GCaMP – різновид генетично модифікованих кальцієвих індикаторів;

GECI – генетично модифіковані кальцієві індикатори (genetically encoded calcium indicators);

GEVI – генетично модифіковані індикатори напруги (genetically encoded voltage indicators);

GFP – green fluorescent protein;

HD-EEG – high density electroencephalography;

HRP – пероксидаза хрона;

ISH – In Situ Hybridization;

MVPA – multivariate pattern analysis (мультиваріативний аналіз патернів);

RH 414 – різновид флуоресцентного нейронального зонду;

RSN (ОСШ) – відношення сигнал/шум;

T1 – тип контрастних речовин МРТ для жиру і м'яких тканин;

T2 – тип контрастних речовин МРТ для рідин і аномальних явищ;

VSDI – voltage sensitive dye imaging;

VSI – voltage sensitive indicators;

ЕЕГ – електроенцефалографія;

МЕГ – магнітоенцефалографія;

МРТ – магнітно-резонансна томографія;

ІГХ – імуногістохімія;

ПЕТ – позитрон-емісійна томографія;

СКВІД – SQUID, superconducting quantum interference device;

фМРТ – функціональна магнітно-резонансна томографія.

ВСТУП

Нейробіологія як точка дотику низки наук, метою яких є вивчення нервової системи в конкретних, але в той же час схожих аспектах (молекулярних, клітинних, еволюційних, структурних, функціональних, еволюційних, обчислювальних та клінічних), стала ключовим напрямком у пошуках взаємозв'язків між структурою і функцією нервових систем та поведінкою, сприйняттям і реакцією.

Відкриття контрасту, що залежить від рівня кисню в крові, на магнітно-резонансних зображеннях з градієнтним розподілом проклало шлях до нового підходу до картування мозку людини [16]. Цей метод швидко став кращим інструментом для неінвазивного дослідження активності мозку, що перевершує позитронно-емісійну томографію, завдяки більш високій просторово-часовій роздільності та мінімальній інвазивності.

Паралельно було виявлено, що основи когнітивних функцій залежать як від функціональної диференціації (завдяки локалізованим нейронним модулям), так і інтеграції областей мозку, здатних формувати розподілені функціональні мережі. Це відкриття призвело до двох фундаментальних питань: як взаємодіють функціональні розподілені області мозку під час виконання когнітивного завдання? І як ми можемо виявити та оцінити причинний вплив тієї чи іншої області мозку на інші? Намагаючись зрозуміти ці найважливіші питання організації мозку, ми буквально стали свідками бурхливого зростання досліджень нейровізуалізації [76,18,65].

Історично склалося так, що у більшості функціональних досліджень нейровізуалізації використовувалися завдання щодо виявлення областей мозку, активність яких реагує на певну категорію стимулів. Важливо, що функціональну архітектуру мозку можна охарактеризувати за відсутності будь-яких конкретних зовнішніх впливів (тобто коли суб'єкт перебуває у стані спокою), що є значною перевагою під час роботи з групами пацієнтів. Функціональну зв'язність можна вивчити будь-яким із доступних неінвазивних методів дослідження функції мозку людини (тобто методами

ядерної візуалізації (позитронно-емісійна томографія (ПЕТ) та однофотонно-емісійна комп'ютерна томографія (ОФЕКТ)), електрофізіологічними методами (електро- та магнітоенцефалографія (ЕЕГ/МЕГ)), або функціональна МРТ (фМРТ)). Більшість досліджень проводиться з використанням фМРТ, оскільки в дослідницьких умовах це зараз найбільш широко використовуваний інструмент для вивчення функцій мозку людини і має деякі переваги перед іншими методами як з погляду просторового та тимчасового розв'язання, так і з точки зору чутливості до кіркових та підкіркових структур [15]. Він також є широко доступним у клінічній практиці, оскільки можна використовувати клінічні МРТ-сканери.

Поточна тенденція у клінічній радіології полягає у виявленні відхилень на зображеннях окремих суб'єктів шляхом візуального огляду [73]. Очевидно, що успіх цього підходу багато в чому залежить від попереднього досвіду рентгенолога, який дав звіт, і від очікувань, які радіолог привносить в інтерпретацію сканування щодо потенційних відхилень при конкретному синдромі. Візуальна перевірка даних функціональної візуалізації навіть після великої статистичної обробки, яка може ідентифікувати функціональні активації або RSN, навряд чи буде життєздатним підходом, враховуючи багатство наборів даних. Тому методи кількісної оцінки цього типу даних і, отже, отримання перевірених і точних показників, які можуть розрізняти різні клінічні синдроми, мають першорядне значення.

Більшість актуальних технологій, які зараз широкодоступні, працюють не з електронною активністю мозку, а аналізують непрямі чинники роботи мозку [35]. У випадку з фМРТ (якщо ми не говоримо про контрастні барвники, про які йтиметься нижче) являє собою дослідження активності кровопостачання мозку, а точніше градієнт щільності реакції атомів водню при насиченні мозку кров'ю, що є супутнім фактором його активності. Це дозволяє говорити про факт активності мозку, але не про фактичні процеси, що відбуваються в ньому. За допомогою аналогічних технологій можна аналізувати реакції на стимули, але не пояснювати явище, що протікають у ньому, з дозволом до нейрона.

Існуючі методи роботи з дослідженням електро-хімічної активністю мозку за допомогою непрямого аналізу (мається на увазі за активністю супутніх факторів) зараз вимагає додаткових обчислень і хоча є досить ефективними (такі як дифузно-зважена МРТ (DWI) [84]), однаково мають вагомні мінуси, щоб актуалізувати завдання розробки неінвазивних сенсорів електричної активності.

Наявні обмеження зумовили тенденцію до розробки методів візуалізації нейронної активності, які поєднують у собі переваги як візуалізації всього мозку, так і методів електрофізіології: можна візуалізувати нейронну активність з дозволом одного нейрона або тисяч нейронів одночасно, досліджуючи просторові взаємини цих нейронів [49, 20]. Тимчасова роздільна здатність зазвичай становить від мілісекунд до секунд, залежно від конкретного методу. Ці методи можна використовувати для візуалізації активності дисоційованих клітин у культурі, зрізів тканин у ваннах та навіть інтактного мозку у живих організмах.

Візуалізація нейронної активності залежить від спеціалізованих флуоресцентних зондів, які повідомляють про зміни мембранного потенціалу, концентрацію кальцію або злиття синаптичних бульбашок. Цими зондами можуть бути органічні барвники [42], які вчений додає до нервової системи перед проведенням експерименту, або генетично закодований флуоресцентний білок, що стабільно експресується у трансгенній тварині [11, 64]. Барвники мають тенденцію виявляти кращі часові властивості та характеристики сигнал/шум, ніж білки. Однак генетично закодовані білки можуть бути орієнтовані на певні типи клітин мозку, що дозволяє вченим спостерігати активність у молекулярно визначених ланцюгах.

Методи, що візуалізують зміни мембранного потенціалу, є найближчими аналогами електрофізіологічних записів, оскільки вони повідомляють про зміни напруги в мембранах нейронів з високою тимчасовою роздільною здатністю. Візуалізація на барвниках, чутливих до напруги (VSDF), нині є основним методом, з допомогою якого вчені візуалізують зміни напруги [99].

Однак нові генетично закодовані індикатори напруги (GEVI) тепер дозволяють відображати мембранний потенціал генетично визначених типах клітин [25].

Сучасні методи візуалізації нейронної активності пропонують різноманітні підходи, кожен зі своїми унікальними перевагами та обмеженнями. Чутливі до напруги барвники, такі як Di-8-ANEPPS і RH 414, виділяються високою тимчасовою роздільною здатністю, хоча страждають від низької інтенсивності сигналу і маркування проміскуїт. Генетично кодовані сенсори напруги, наприклад, ArcLight, забезпечують специфічність маркування, але мають нижчу тимчасову роздільну здатність і високий фоновий рівень [10]. Для візуалізації кальцієвих іонів застосовуються як нераціонометричні індикаторні барвники (Fluo-3, Fluo-4, Calcium Green-2), так і раціонометричні (Fura-2, Indo-1), кожен з яких має свої особливості у чутливості та стійкості до артефактів. Генетично кодовані сенсори кальцію, такі як GCaMP, характеризуються специфічністю маркування, але також схильні до проблеми тривалого часу згасання сигналу [45].

З іншого боку, для маркування синаптичних везикул використовуються FM барвники (FM1-43, AM4-64), які дозволяють контролювати кількість мічених везикул, але можуть створювати високий фоновий рівень і складності з вимиванням з мозкових зрізів [11]. рН-чутливі флуоресцентні білки, такі як SynaptopHluorin, ідеально підходять для вивчення пресинаптичного вивільнення, але мають обмеження у специфічності візуалізації окремих синапсів [29]. Всі ці методи стикаються із загальним недоліком: вони можуть бути схильні до різних артефактів, пов'язаних з експериментальними умовами, такими як фотознебарвлення, вплив концентрації барвника і потенційний вплив на біологічні сигнальні шляхи. Отже, існує нагальна потреба у розробці більш точних і надійних методів візуалізації, здатних подолати ці обмеження та забезпечити більш чітке та точне зображення нейронної активності.

Актуальність використання квантових точок у нейровізуалізації та біомедицини обумовлена їх унікальними властивостями, які роблять їх

особливо привабливими для подолання існуючих обмежень у цій галузі. Однією з ключових переваг квантових точок є їхня висока фотостабільність, що дозволяє їм зберігати флуоресценцію протягом тривалого часу без значного погіршення сигналу. Це робить їх ідеальними для довгострокових досліджень та спостережень у біологічних системах [52].

Крім того, квантові точки ефективно працюють у ближньому інфрачервоному діапазоні, включаючи перше (650-950 нм) та друге (1000-1400 нм) "вікно" біологічної проникності [31,75]. Ці діапазони важливі, оскільки вони дозволяють світлу проникати глибше в біологічні тканини з мінімальним поглинанням та розсіюванням, що підвищує ефективність візуалізації глибоких тканин, включаючи структури мозку. Також важливою характеристикою квантових точок є можливість тонкого налаштування їхньої оболонки, що забезпечує покращене цільове таргетування [68]. Це дозволяє точно доставляти квантові точки до специфічних клітин або молекул, що відкриває нові можливості для діагностики та терапії на молекулярному рівні.

Тим не менш, незважаючи на ці значні переваги, використання квантових точок все ще пов'язане з низкою проблем та викликів. Основним з них є питання біосумісності: наскільки безпечно застосування квантових точок у біологічних системах, особливо з урахуванням їхньої потенційної токсичності та впливу на живі клітини та тканини [80]. Цей аспект вимагає додаткових досліджень та тестування, щоб повністю оцінити довгострокові наслідки їх використання у медичних додатках.

У рамках даної дипломної роботи ставиться за мету провести всебічний аналіз та оцінку потенційного використання клітинних індикаторів напруги для застосування *in vivo*. Основна увага приділяється ретельному розгляду проблематики та перспективності цих підходів, що дозволить виявити ключові питання, від вирішення яких залежить гнучкість та доступність застосування. Кожне з цих питань підкреслює актуальність та необхідність подальших досліджень у цій галузі, позначаючи шляхи розвитку та покращення методу для його ефективного використання в біомедичній медицині. Ця робота

спрямована на глибоке розуміння потенціалу та обмежень технологій, прагнучи надати цінні наукові та практичні рекомендації для майбутніх досліджень та розробок у цій галузі нейровізуалізації.

1 ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ СУЧАСНИХ ТЕХНОЛОГІЙ НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЇ ТА АНАЛІЗ ЇХ НЕДОЛІКІВ

Нейровізуалізацію можна розділити на два напрями: дослідження структури нервового волокна і дослідження процесів, що відбуваються в ньому. У першому випадку основним критерієм точності є просторова роздільна здатність сканування, тоді як у другому випадку додається і тимчасова. Ефективність кожного методу визначається саме на основі цих двох факторів, тоді як доцільність методів це багато в чому компроміс між доступністю та шириною спектра завдань, які даний метод може закрити.

На даний момент серед усіх існуючих методів нейровізуалізації в клінічній практиці застосовується не так багато, і більшість з них застосовні не лише у сфері дослідження нервової системи, а й інших галузей інтересів. З цієї причини навіть такі добре відомі технології як магнітоенцефалографія (МЕГ) на даний момент залишаються не надто поширеними через свою вузьку специфіку при досить високих витратах на обладнання [24].

З цієї причини, хоча на даний момент ми маємо досить широкий спектр технологій неінвазивного дослідження структури головного мозку і нервових тканин, спектр інструментів дослідження їх поведінки в інтенсивному стані залишається вкрай обмеженим. Ця проблема зумовлює складність проведення нейробіологічних досліджень, особливо у контексті розуміння основ нейронних ланцюгів складної, натуралістичної поведінки.

Проте більшість сучасних нейробіологічних досліджень потребує комбінованого підходу у скануванні мозку, це визначає той факт, що на даний момент не існує технологій нейровізуалізації, які втратили свою ефективність. Всі вони модифікуються відповідно до вимог свого часу і працюють у синергії один з одним щоб вирішити поставлені завдання. Кожен метод має як свої переваги, і обмеження, що у своє чергу і дозволяє створювати комбіновані підходи.

У цьому розділі описані існуючі методи нейровізуалізації, які у своєму

технологічному розвитку дозволили науковому співтовариству досягти тієї точки, в якій ми знаходимося зараз, і стати перед тими проблемами, які ще вирішити.

1.1 Методи сканування структури мозку

1.1.1 Позитронно-емісійна томографія та Комп'ютерна томографія (ПЕТ/КТ)

Поява КТ у 60-х роках минулого століття поява комп'ютерної томографії стала першим кроком на шляху здобуття тривимірної моделі інтактного мозку. Сама технологія рентгеноскопії існує вже досить давно, проте саме можливість математично обробляти отримані дані від сканування з різних ракурсів дало змогу отримувати тривимірні знімки та зрізи. Тим не менш, головне обмеження КТ обумовлено тим, що рентгенівське випромінювання найбільш чутливе до твердих тканин, а тому картина для м'яких тканин має куди менш задовільну якість порівняно з іншими методиками. Проте КТ має місце у середовищі роботи з травматичними випадками, де головна увага приділяється порушенням черепної структури, чи дослідженню сторонніх тіл. У питаннях дослідження сторонніх тіл, важливим плюсом КТ залишається той факт, що на відміну від МРТ у нього немає обмежень на використання в тих випадках, якщо є ймовірність що в біологічних тканинах знаходиться сторонній об'єкт, що магнітиться.

Вагомою модифікацією КТ стала поява ПЕТ - неінвазивного методу візуалізації, здатного відстежувати динамічний розподіл радіофармпрепаратів (наприклад речовини мічені Фтором-18 (^{18}F)) в організмі, за рахунок виявлення позитронів, що їх випускають. Таким чином, метод ПЕТ у злитті з КТ дозволяє отримувати детальну картину розподілу речовини в анатомії організму [34]. Завдяки високому співвідношенню сигнал/шум та ефективності проникнення радіоактивних молекул ПЕТ може виявляти мету з міліметровою роздільною здатністю незалежно від клітинного складу

навколишніх тканин, на відміну від інших неінвазивних методів візуалізації, таких як КТ або МРТ. Отже, можливість розробки унікального ПЕТ-зонда відносно гнучка, а це означає, що для ПЕТ-маркування можна пробувати використовувати різні сполуки.

Висока деталізація ПЕТ є головною перевагою даного методу щодо стандартного КТ і навіть МРТ, проте його головний недолік обумовлений тим, що як клітинний зонд тут використовуються радіоактивні матеріали, а отже токсичні для організму. У зв'язку з цим важливим аспектом роботи у даній методиці є швидкість відновлення безпечного середовища в організмі. Через це є сильні обмеження для довгострокового відстеження функцій та процесів в організмі, таких як відстеження перебігу нейродегенеративних, онкологічних чи запальних захворювань [35].

Проблемою скринінгу за допомогою ПЕТ є її виняткова діагностична спрямованість, яка не дозволяє проводити сканування без чіткого припущення про те, що потрібно визначити. Маркуючі речовини ПЕТ спрямовані на зв'язування з конкретною метою в якій потенційно знаходиться вогнище захворювання, і для проведення ПЕТ необхідні підстави. Фтордезоксиглюкоза (^{18}F -FDG), найбільш поширений зонд ПЕТ, візуалізує метаболізм глюкози, де її яскравий сигнал з'являється в областях тіла з високим енергетичним попитом, таких як ракові клітини та активні нейрони (Рис. 1.1).

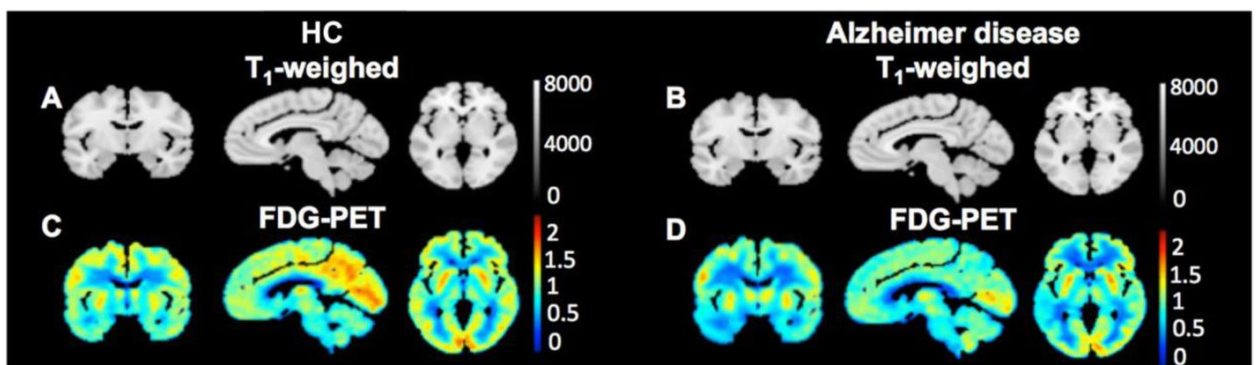


Рисунок 1.1 – Модальність ПЕТ/КТ. Стандартизовані коефіцієнти поглинання глюкози (SUVR) відносно мозочка за допомогою ПЕТ-сканування ^{18}F -FDG здорової контрольної групи (НС) і пацієнта з хворобою Альцгеймера [5].

Таким чином, ^{18}F -FDG використовувався для діагностики кількох неврологічних захворювань, включаючи хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона та гліому [1, 47, 97]. Крім ^{18}F -FDG, для діагностики нейродегенеративних захворювань було вивчено індикатори, що впливають на загальні явища неврологічних захворювань, такі як сильні запальні реакції.

Прямий хімічний скринінг з використанням великої кількості бібліотек невеликих флуоресцентних молекул виявив нову невелику флуоресцентну молекулу, названу CDnir7 (з'єднання з позначенням ближнього інфрачервоного діапазону 7), як флуоресцентний зонд для селективного мічення активованої активної мікрогії/макрофага зрівнянно з неактивованим контролем [72]. Цікаво, що CDnir7 продемонстрував специфічне позначення мозку мишей з AD *in vivo* за допомогою мультиспектральної оптоакустичної томографії, а це означає, що мета CDnir7 може використовуватися як новий біомаркер для біовізуалізації AD (Рис. 1.2) [5]. Хоча біомолекула-мішень для CDnir7 ще не ідентифікована, її потенціал для діагностики неврологічних захворювань призведе до подальшої розробки CDnir7 як ПЕТ-зонд, аналогічний нещодавньому дво модальному зонду, який використовуватиметься як для флуоресценції, так і для ПЕТ-візуалізації.

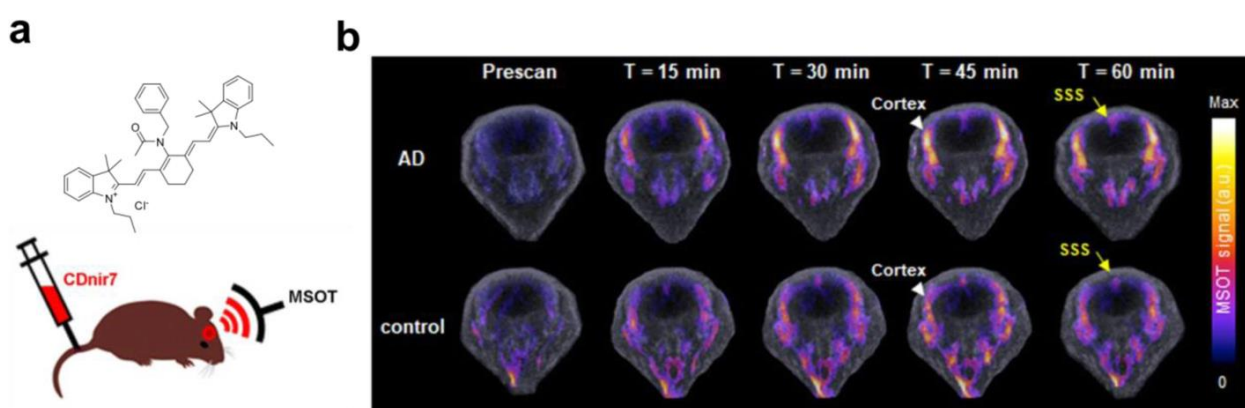


Рисунок 1.2 - Модальність візуалізації MSOT. а Хімічна структура CDnir7 та схема експерименту. б Сигнали MSOT в корі як AD, так і контрольного мозку до (Prescan) і після внутрішньовенної ін'єкції CDnir7. SSS, верхній сагітальний синус [5].

1.1.2 Магнітно-резонансна томографія та функціональна магніторезонансна томографія (МРТ/фМРТ)

МРТ використовує радіочастотні імпульсні сигнали для вирівнювання ядер атомів водню за контуром людського тіла. Коли протилежне резонуючі ядро атома водню повертається, сканер сприймає сигнал і перетворює його на зображення. Отже, багаті на водень м'які тканини, такі як м'язи, зв'язки, кровоносні судини і мозок, підходять для отримання МРТ-зображень [69].

Завдяки своїй неінвазивності і нетоксичності, кілька знімків МРТ дозволяють відстежувати динамічні зміни в мозку людини, що залежать від часу. Функціональна МРТ (фМРТ) опосередковано вимірює нервову активність мозку, виявляючи зміни кровотоку, покладаючись на той факт, що мозковий кровотік відбувається одночасно з активацією нервів. Метод контрастування, що залежить від рівня кисню в крові, був розроблений як основна форма фМРТ в 1990 з використанням парамагнітного дезоксигемоглобіну в якості природної контрастної речовини. З того часу фМРТ широко використовується для функціонального картування мозку при різних когнітивних станах або нервових розладах з точністю до міліметра завдяки високій просторово-часовій роздільній здатності [41]. В даний час цей метод застосовується для визначення цільової області гліоми головного мозку [95] та епілепсії перед операцією [15], а також для діагностики ряду нервових розладів (шизофренія, розлад аутистичного спектру, легкі когнітивні порушення, хвороба Альцгеймера, біполярний розлад та велике депресивне розлад) шляхом порівняння даних фМРТ пацієнта з величезним набором довідкових даних про мозок здорової людини, таких як DiaNet та NeuroMark (Рис. 1.3) [2, 6, 89]. Однак аналітичний час для отримання сигналу з шуму є вузьким місцем у певних умовах, таких як надзвичайна ситуація. Також в цьому контексті проблемою виступають задачі на довгострокове відстежування процесів, чи потреба у регулярному скануванні, так як кожне сканування займає достатньо багато часу.

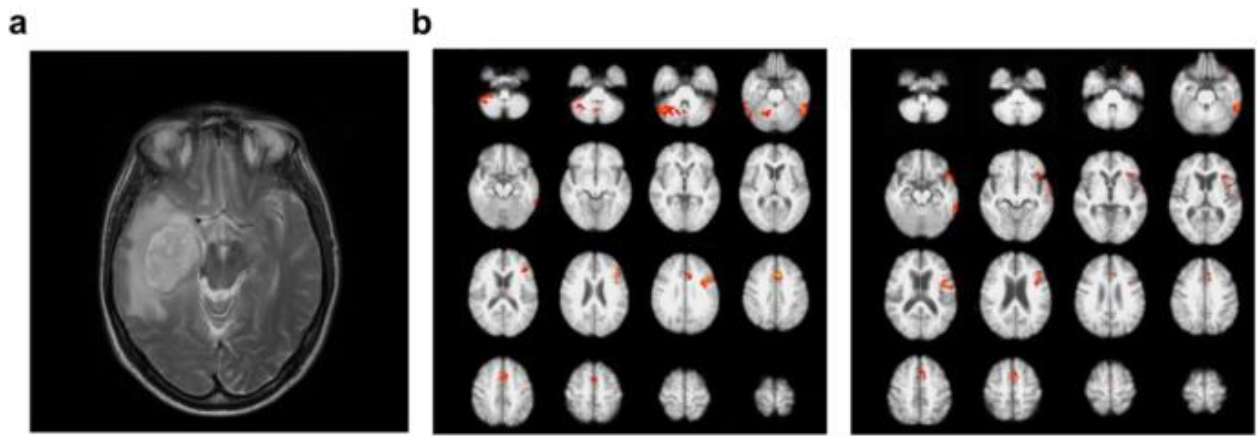


Рисунок 1.3 - Модальність МРТ/фМРТ. аксіальний МРТ-зріз пацієнта з пухлиною головного мозку. б Залежне від BOLD фМРТ-сканування завдання вільного мовлення, виконане здоровими контрольними особами (ліворуч) і суб'єктами з хворобою Альцгеймера (праворуч) [89].

Дифузійно-зважена МРТ (DWI) це метод МРТ, що дозволяє визначити ступінь дифузії води. Через короткий час, необхідний для візуалізації, DWI використовується в клініці для виявлення гострого інфаркту мозку шляхом генерації високих сигналів DWI протягом декількох хвилин [46]. Візуалізація білої речовини, переважно утвореної в результаті мієлінізації, є відмінною мішенню для клінічної МРТ головного мозку, особливо при діагностиці розсіяного склерозу (РС) та інших нейродегенеративних захворювань. Проте їх специфічність може бути збільшена для ідентифікації конкретної біомолекули, оскільки традиційні методи МРТ створюють контраст зображення з урахуванням різної резонансної активності атомів водню [65].

1.1.2.1 Сучасні контрастні речовини для МРТ

Магнітні матеріали вивчалися за допомогою МРТ для отримання найкращого зображення за рахунок збільшення швидкості релаксації молекул води та специфічності за рахунок властивостей матеріалів [16, 69]. У клінічній практиці переважно використовувати контрастні речовини T1 порівняно з T2, які можуть затемнити бажану область, що призводить до меншого контрастного ефекту та спотворення сигналу. Контрастні речовини T1 на

основі гадолінію мають переваги, засновані на їх високому магнітному моменті та стабільності (відсутність пов'язаних електронів), що призвело до їх найбільш широкого використання в останні десятиліття. Альтернативно, марганець та барій також використовуються як контрастні речовини T1. Однак ці контрастні речовини майже не використовувалися для візуалізації мозку, головним чином через їхню токсичність [7, 53].

Залізо є важливою речовиною для біоматеріалів, таких як гемоглобін, і може швидко метаболізуватися в організмі, що робить його більш біосумісним. Однак іон двовалентного заліза (Fe^{2+}) повинен трансформуватися у відповідну форму ліганду, щоб його можна було використовувати як контрастну речовину T1 [92]. Адаптація парамагнітних металопротеїнів це унікальний підхід до створення контрастної речовини на основі іонів заліза, особливо для виявлення дофаміну при МРТ головного мозку. Важливим відкриттям було те, що дофамін мав спорідненість зв'язуватися з субстрат-зв'язувальною кишенею VM3h, тим самим викликаючи зниження релаксації, а це означає, що МРТ дозволяє активувати дофамін (Рис 1.4).

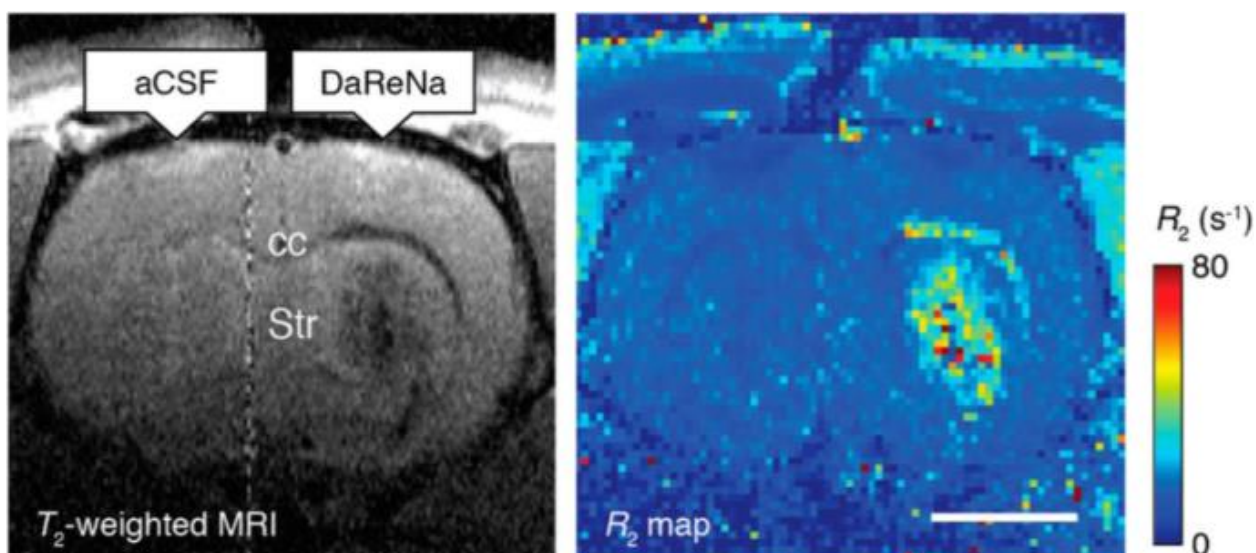


Рисунок 1.4 - МРТ контрастна речовина. Інфузія DaReNa, комплексу SPION, покритого сенсором дофаміну (VM3h), демонструє посилення контрасту та розслаблення поблизу місця ін'єкції (стриатум, Str) і вздовж мозолистого тіла (cc). Масштаб = 2 мм [76].

Різні мутантні форми, у тому числі VM3h-8C8, VM3h-9D7 та VM3h-B7, були ідентифіковані за допомогою білкової інженерії в ході декількох раундів мутагенезу з акцентом на його високу спорідненість до дофаміну [61]. Недавнє дослідження виявило різні нейромодуючі ефекти дофаміну смугастого тіла шляхом поєднання фМРТ та методів молекулярної візуалізації дофаміну [31]. Незважаючи на його потенціал для візуалізації конкретних біомолекул, необхідні подальші дослідження МРТ для прориву в доставці модифікованого пептиду для МРТ мозку людини [53].

Досягнення аналізі зв'язків з допомогою фМРТ полегшили характеристику функціональних зв'язків між різними областями чи мережами мозку. Кореляції на основі початкових значень, аналіз незалежних компонентів (ІСА) та теорія графів використовувалися для картування та вивчення доступних моделей зв'язності, пов'язаних з різними когнітивними процесами та неврологічними розладами [18]. Інтеграція мультимодальної візуалізації. Поєднання фМРТ з іншими методами візуалізації, такими як ЕЕГ та МEG, забезпечує повне розуміння функцій мозку. Ці мультимодальні підходи можуть одночасно вимірювати нейронну активність у різних просторових та часових масштабах, надаючи додаткову інформацію та покращуючи інтерпретацію результатів фМРТ. Ці нещодавні досягнення у методах фМРТ, методах візуалізації та методах аналізу даних значно розширили наше розуміння функцій мозку та захворювань. Вони відкривають нові можливості для вивчення функціональних та структурних зв'язків, картування мереж мозку, розшифрування когнітивних процесів та виявлення біомаркерів неврологічних захворювань.

1.2 Методи зчитування електричної активності мозку

1.2.1 Електроенцефалографія (ЕЕГ)

Значення фМРТ та ЕЕГ у вивченні активності мозку та неврологічних

розладів. ФМРТ і ЕЕГ є методами нейровізуалізації, що найбільш широко використовуються і добре зарекомендували себе. ФМРТ та ЕЕГ надають додаткову інформацію про діяльність мозку. ЕЕГ записує електричну активність мозку з високою тимчасовою роздільною здатністю. Деякі з основних застосувань ЕЕГ включають картографування активності мозку: ЕЕГ можна використовувати для картування розташування та часу активності мозку, пов'язаної з різними когнітивними процесами. Це може дати уявлення про нейронні механізми, що лежать в основі цих процесів. Вивчення нейронних коливань: ЕЕГ можна використовувати для вивчення ритмічних патернів нейронної активності, відомих як нейронні коливання [55].

Традиційні системи ЕЕГ використовують обмежену кількість електродів, що призводить до рідкісного просторового охоплення шкіри голови. Однак недавні досягнення призвели до створення ЕЕГ-систем високої щільності з великою кількістю електродів (наприклад, 128, 256 або 512 каналів) [56]. ЕЕГ високої щільності дозволяє більш точно відображати просторову активність мозку та покращувати локалізацію нервових джерел. Гнучкі сухі електроди. Звичайним електродам ЕЕГ потрібен провідний гель або паста для встановлення гарного електричного контакту зі шкірою голови. Навпаки, були розроблені вільні та сухі електроди, які пропонують зручніші та зручніші варіанти розміщення електродів. Крім того, ці електроди можуть підтримувати хорошу якість сигналу та скорочувати час підготовки, що робить їх більш придатними для довгострокового моніторингу та клінічного застосування.

Високоплотнісна електроенцефалографія (HD-EEG) є передовою методикою, яка використовує значно більшу кількість електродів на шкірі голови порівняно зі стандартною низькоплотнісною ЕЕГ (LD-EEG), де зазвичай використовується від 19 до 25 електродів (Рис. 1.5). У типових записах HD-EEG використовується щонайменше 64 канали. Після цього кількості можливе подальше збільшення кількості електродів, але це призводить до поступового зменшення вигод від підвищення просторової

роздільної здатності.

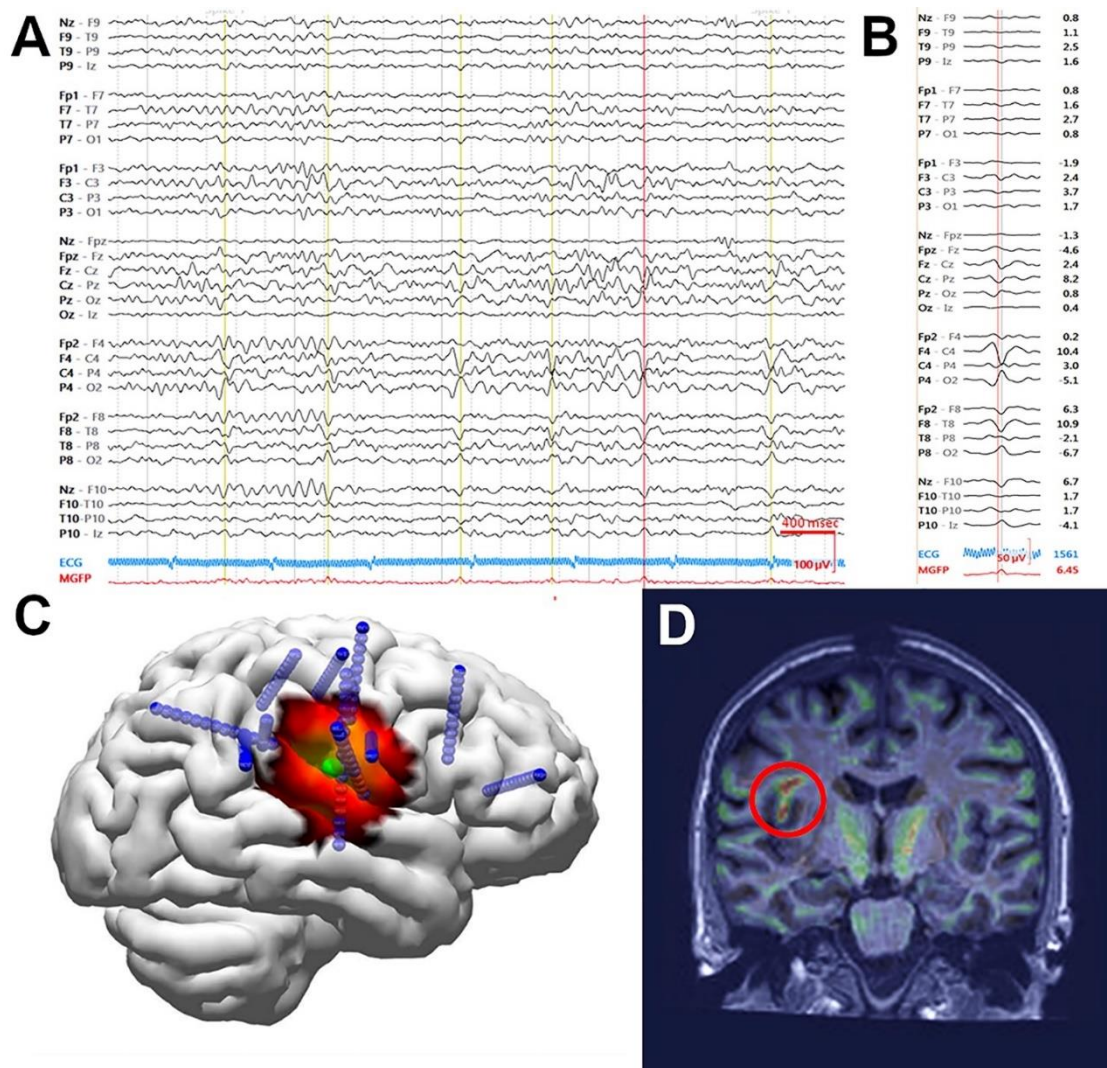


Рисунок 1.5 - Приклад запису HD-EEG, що показує велику кількість IED у правій центрально-тім'яній області. Вибрані для усереднення СВУ позначені вертикальними лініями. Дані були смугово відфільтровані від 2 до 55 Гц. В) Усереднене відстеження напруги 39 типових IED. С) Диполь (зелений) та оцінка ESI (теплова карта, sLORETA) у середині нахилу наростання усереднених IED, обидва локалізовані на перироландієвій передній кришці. Подальше розміщення глибинних електродів показано синім кольором. D) Морфометричний аналіз виявив аномалію (червоне коло), локалізовану разом із областю, визначеною HD-EEG та інвазивним записом [44].

При цьому основні мінуси EEG навіть з появою електродів високої

густини залишаються незмінними - роздільна здатність даного методу залишається досить низькою і дає обмежені результати. З цієї причини в контексті ЕЕГ неможливо говорити про нейровізуалізацію як таку, оскільки даний метод не дає можливості чіткої локалізації сигналів, а швидше формує узагальнений набір даних про стан мозку. Будь-яка клінічна діагностика ЕЕГ ґрунтується на порівнянні наявних параметрів з деякими еталонними значеннями, і характерні відхилення дозволяють робити висновки про патології.

1.2.2 Магнітоенцефалографія (МЕГ)

Магнітоенцефалографія (МЕГ) відіграє вирішальну роль у діагностиці захворювань головного мозку. Відношення сигнал/шум (ВСШ МЕГ = 2,2 дБ, ВСШ ЕЕГ < 1 дБ) і просторова роздільна здатність (СР МЕГ = 2-3 мм, СР ЕЕГ = 7-10 мм) вище для МЕГ, ніж для ЕЕГ, тому МЕГ потенційно полегшує точний моніторинг коркової активності. МЕГ є ідеальним кандидатом для клінічного застосування у пацієнтів, які не можуть пройти суворі клінічні процедури до та під час візуалізації. Перший сигнал МЕГ був виміряний в 1968 в Університеті Іллінойсу фізиком Девідом Коен з використанням мідної індукційної котушки як детектор, що призвело до отримання сигналів МЕГ [24] з неадекватним співвідношенням сигнал/шум (ВСШ). Пізніше було використано надпровідний квантовий інтерференційний пристрій (СКВІД), розроблений Циммерманом, який збільшив відношення сигнал/шум сигналів МЕГ і тим самим відкрив шлях до отримання сигналів МЕГ без усереднення сигналів [25]. У комерційному обладнанні МЕГ кілька датчиків розміщувалися у вигляді масиву, як у моделі шолома, що підвищувало ефективність вимірювання та роздільну здатність обробки сигналів МЕГ. Завдяки технологічним досягненням останніх десятиліть, наприклад, охоплення всієї голови, складним алгоритмам придушення шуму та гелієвим системам з нульовим википанням, МЕГ була розвинена як багатоканальна система усієї голови та знаходить своє застосування у клінічній візуалізації.

Сучасні МEG-системи оснащені, наприклад, 306 датчиками. Одна з існуючих конструкцій включає датчики, що містять магнітометри та градієнтометри в одному сенсорному елементі. Така конструкція сприяє поліпшенню співвідношення сигнал/шум для прилеглих кіркових джерел, придушення навколишнього шуму і навіть пригнічення прилеглих артефактів, створюваних, наприклад, стимуляторами блукаючого нерва,

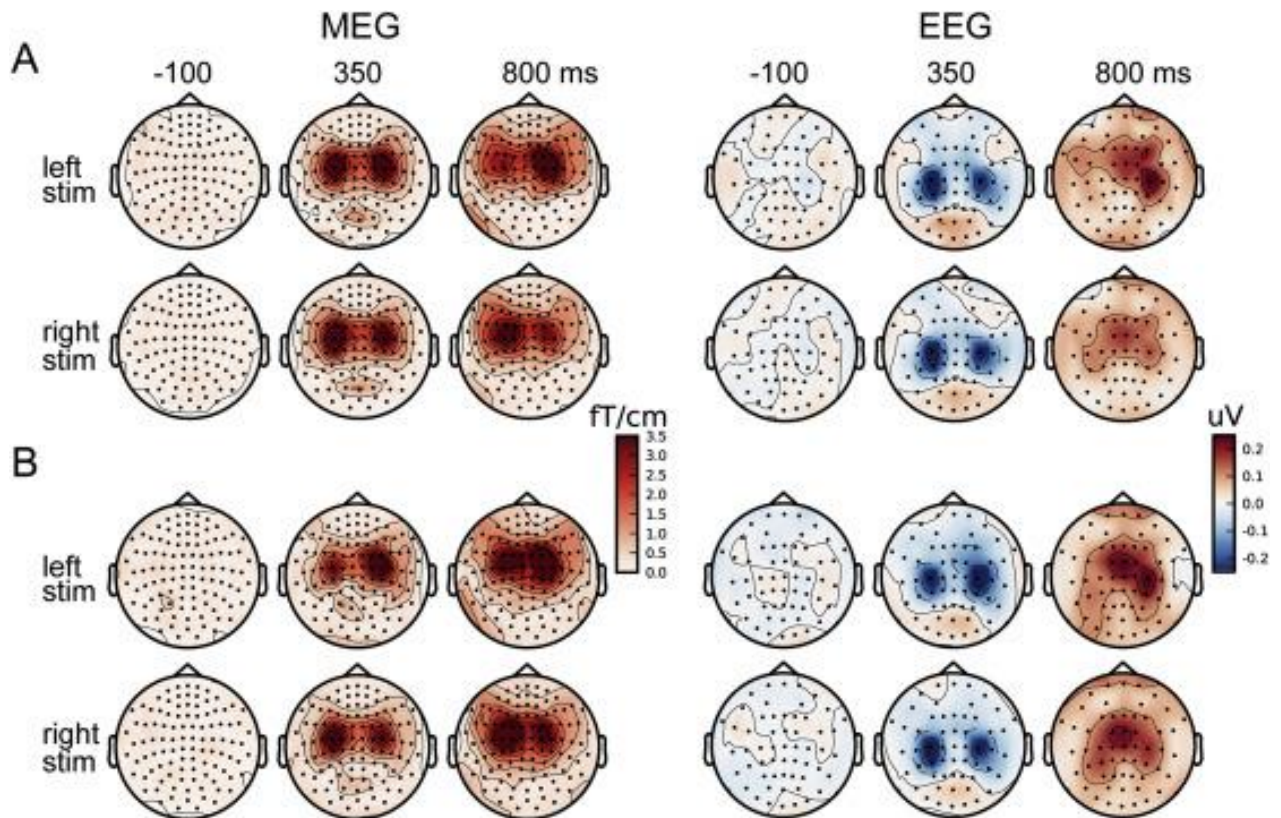


Рисунок 1.6 - Топографічні карти, що показують усереднену по групі ($n = 24$) напруженість поля модуляції ритму ~ 20 Гц до (А) тактильної та (В) пропріоцептивної стимуляції як на МEG, так і на EEG (магнітне поле проти електричного потенціалу шкіри голови). Зауважте, що МEG topoplots показує векторні суми градієметрів (позитивне значення) у кожному місці [25].

кардіостимуляторами та стимуляторами глибоких відділів мозку (Рис. 1.6).

MEГ має два клінічні застосування: локалізацію епілептичних вогнищ та передопераційну оцінку кандидатів на операцію на головному мозку. МEG також є важливим інструментом нейровізуалізації для терапевтичного планування деяких психічних розладів та аналізу відхилень, таких як аутизм

[9, 78], інсульт [63], травма голови [77] та моніторинг введення ліків [66].

Основна проблема технології МЕГ у її високій дороговартості, що не дозволяє поширити її досить широко. З цієї причини МЕГ застосовується у досить вузькому спектрі проблем, основна з яких – нейрохірургія. Складність проведення скринінгу так само робить свій внесок у цей процес. При цьому роздільна здатність МЕГ достатня для діагностичної роботи, її застосування в дослідженні нейрональних структур досить обмежене, оскільки наявних 2-3 мм просторового дозволу МЕГ недостатньо. У результаті, якщо не говорити про дослідження специфічних захворювань, потенціал МЕГ на даний момент знаходиться в одній точці з фМРТ, проте останній через свою доступність застосовується значно ширше.

1.3 Клітинна візуалізація

1.3.1 Флуоресцентна візуалізація

Флуоресцентна візуалізація — один з інструментів візуалізації, що найчастіше використовуються, в дослідницьких і клінічних умовах, що застосовується як до фіксованих, так і до живих зразків [60]. Переваги флуоресценції включають її високу чутливість, специфічність та просторова роздільна здатність, який може досягати субклітинного рівня. Однак специфічне націлювання на потрібну біомолекулу за допомогою флуоресценції тривалий час не могло бути застосоване через відсутність технології мічення. З часу першого повідомлення в 1941 методи імунофлуоресцентного мічення використовувалися для відстеження конкретної біомолекули з антитілом, пов'язаним з яскравими і фотостабільними флуоресцентними невеликими молекулами [49]. Біомолекули, що відстежуються, включають ендогенні білки, пептиди, нуклеїнові кислоти, глікопротеїни, ліпіди і білкові мітки, що самі маркуються, які можуть розпізнаватись антитілами (Рис 1.7). Використання зеленого флуоресцентного білка (GFP) на початку 1990-х років призвело до численних

досліджень з використанням GFP для різних цілей у фундаментальних дослідженнях, таких як флуоресцентне переміщення цільового білка і флуоресцентне переміщення певного типу клітин живого організму [50] експресії GFP, вимагає перенесення великої касети експресії GFP, що зазвичай досягається шляхом ін'єкції вірусних частинок в ділянку, що цікавить, або створення трансгенної тварини. Оскільки обидва ці методи непридатні для діагностичних цілей, особливо для людини, виникла потреба у розробці

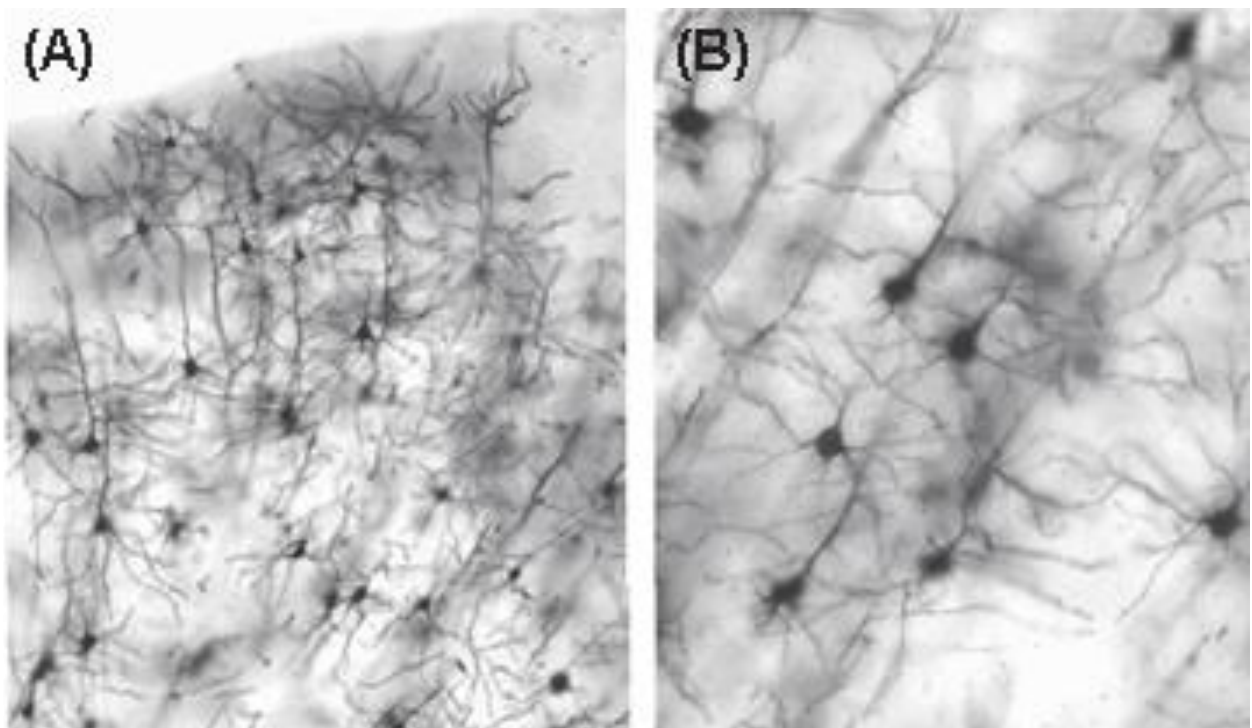


Рисунок 1.7 - Забарвлення по Гольджі дозволяє побачити структуру нейронів у найдрібніших деталях. Випадкові нейрони вибірково забарвлюються в (А) 100-кратному зображенні кори головного мозку миші, пофарбованої Гольджі, і (Б) при більш високому збільшенні [101].

безпечної методики, специфічної до біомолекул та високої флуоресценції.

У контексті роботи з тканинами *in vitro* варто відзначити, що хоча ліпіди, білки, вуглеводи та інші органічні молекули забезпечують нервову систему її структуру та довговічність, понад три чверті маси мозку становить вода. Ця композиція має важливі наслідки для будь-якого вченого, який цікавиться вивченням структури мозку, зокрема те, що необроблені ділянки мозку майже

повністю прозорі. Якщо не провести гістохімічне фарбування, структура нервової системи залишиться невидимою і виглядатиме як тонкий шматочок желатину, прикріплений до предметного скла [70]. Обробка зрізів мозку різними барвниками посилює контраст між різними структурами мозку та дозволяє досліднику візуалізувати клітини, волокна чи інші особливості нервової системи. Кожен із цих методів забезпечує контраст із конкретними структурами мозку, щоб вони виділялися серед інших водних структур у нейронному зразку.

З цієї причини мікроскопічне дослідження зрізів мозку вимагає особливого підходу в питаннях його контрастного фарбування що дозволяє досліджувати мозок на субклітинному рівні.

1.3.2 Внутрішньоклітинне та навколоклітинне маркування

Попередні методи маркують тіла клітин та/або аксони після того, як мозок вже зафіксований та розділений на секції. Також можна маркувати окремі нейрони під час експерименту для подальшого гістологічного аналізу, щоб активність або функцію нейрона можна було пов'язати зі структурою та розташуванням нейрона в мозку (Табл. 1.1). Під час електрофізіологічних експериментів учений може використовувати скляну піпетку, щоб заповнити нейрон, що цікавить, хімічною речовиною, яку пізніше можна буде візуалізувати за допомогою гістологічних методів. Ця хімічна речовина зазвичай є варіантом молекули під назвою біотин, наприклад біоцитин або нейробіотин, властивості якого роблять його корисним для подальшої гістології. Вчений може внутрішньоклітинно маркувати клітини *in vivo* або зрізах [83]. Під час сеансу позаклітинного запису кінчик електрода можна додати до мембрани нейрона для міжклітинного маркування. Це маркування може повністю заповнити дендрити або розгалуження аксонів нейрона.

Таблиця 1.1 - Різні види клітинних етикеток [103].

Тип Етикетки	Коментар	Метод візуалізації
Флуоресцентні барвники	Зелений: FITC, Alexa 488, Cy2	Флуоресцентна мікроскопія
	Красный: Rhodamine, Texas red, Alexa594, Cy3	
	Инфракрасный: Cy5	
Квантові Точки (КТ)	Спектральные параметры свечения отличаются в зависимости от размера частицы;	Флуоресцентна мікроскопія
Лужна фосфатаза (AP)	Субстрат NBT/BCIP дає синьо-фіолетовий продукт	Зазвичай світлова мікроскопія, хоча доступні флуоресцентні субстрати
Пероксидаза хрому (HRP)	Субстрат DAB дає коричневий/чорний продукт	Світлова або електронна мікроскопія кольорового продукту DAB
Пероксидаза хрому (HRP)	Субстрат X-gal або IPTG дає синьо-фіолетовий продукт	Зазвичай світлова мікроскопія, хоча доступні флуоресцентні субстрати
Біотін	Біотинізовані антитіла або білки виявляються за допомогою авідину, кон'югованого з іншою описаною міткою (флуоресцентною, хромогенною або золотою)	Світлова, флуоресцентна або електронна мікроскопія залежно від типу мітки, кон'югованої з авідином
Дигоксигенін	Використовується для позначення зондів ISH, виявлених за допомогою антидіоксигену в зонді, кон'югованому з іншою міткою, часто AP	Світлова або флуоресцентна мікроскопія, залежно від субстрату для етикетки
Радіоактивний ізотоп (35S,33P,3H,125I)	Зонди ISH: 35S, 33P, 3H Білки: 3H, 125I	Електронна мікроскопія
Золото	Електронно-щільна мітка, яка використовується для виявлення імунного фарбування в ЕМ	Електронна мікроскопія

Зонд, такий як антитіло при імуногістохімії (ІГХ) або антисмисловий ланцюг при гібридизації *in situ* (ISH), сам по собі не видно. Для візуалізації зонд повинен бути пов'язаний з етикеткою, яку можна візуалізувати або реагує з іншими хімічними речовинами з утворенням видимого продукту. Використання конкретної мітки залежить від ряду факторів, включаючи необхідний ступінь специфічності, чи будуть використовуватися інші методи комбінації і які типи мікроскопів доступні. У таблиці 1.1 описані поширені типи міток (флуоресцентні, хромогенні, радіоактивні та колоїдне золото) та способи їх виявлення [57].

1.3.2.1 Флуоресцентні етикетки

Флуоресцентні молекули повсюдно застосовують у біологічних дослідженнях. Флуоресцентні білки, такі як GFP, можуть бути генетично закодовані та бути репортерними білками. Інші небілкові флуорофори можна приєднувати до різних молекулярних зондів. Оскільки ці флуоресцентні зонди мають різні спектри збудження та випромінювання, вчені можуть використовувати декілька флуоресцентних міток для візуалізації різних генів, білків та структур в одному і тому ж нейронному зразку.

Для маркування зондів є безліч флуорофорів. Зазвичай флуоресцентні мітки включають органічний ціанін і флуорові барвники Alexa, які є у продажу і часто використовуються для мічення антитіл [72]. Квантові точки являють собою напівпровідникові нанокристали, які надзвичайно яскраві та стійкі до фотознебарвлення, що робить їх особливо корисними для візуалізації живих клітин протягом тривалих періодів часу [73].

Флуоресценція – чутливий метод виявлення, оскільки пов'язані флуорофори випромінюють світло на темному тлі. Прикріплення кількох флуорофорів до зонда може посилити сигнал та покращити виявлення [93]. Однак таке посилення також ускладнює кількісне визначення точних рівнів досліджуваної речовини, оскільки ступінь посилення не обов'язково залежить лінійно від кількості присутньої речовини.

Структури з флуоресцентною міткою можна зробити видимими у світлових та електронних мікроскопах за допомогою процесу, що називається фотоконверсією. Флуорофори можуть фотоконвертувати хімічний діамінобензидин (DAB), субстрат, який зазвичай використовується для хромогенних ферментів. Порушення певних флуорофорів світлом відповідної довжини хвилі у присутності DAB призводить до утворення осаду темного кольору [75].

1.3.2.2 Хромогенні/колориметричні етикетки

Хромогенні або колориметричні мітки є ферментами, які реагують з субстратом з утворенням забарвленого продукту, видимого під світловим мікроскопом. Найчастіше використовувані комбінації - це лужна фосфатаза (AP) з субстратами NBT/BCIP для отримання забарвлення від синього до фіолетового кольору; пероксидаза хрому (HRP) із субстратом DAB з утворенням плями від коричневого до чорного кольору; та β -галактозидазу (генетично кодована lacZ) з субстратом X-gal або IPTG для отримання забарвлення від синього до пурпурового. Також доступні комерційно доступні субстрати, які виробляють флуоресцентні, а не кольорові продукти, хоча найчастіше використовують колориметричні субстрати [76].

Хоча біотин сам по собі не є хромогенною міткою, він зазвичай кон'югується з антитілами або включається до олігонуклеотидних зондів ISH. Потім біотинільований зонд можна виявити з використанням біотин-специфічного партнера зв'язування авідину/стрептавідину, кон'югованого з хромогенною міткою, такий як AP або HRP. Авідин та біотин можуть утворювати великі комплекси та значно посилювати сигнал порівняно з використанням одного зонда. Дигоксигенін (скорочено dig, звучить як «дідж») — ще одна поширена молекула, яка включається до зондів ISH як альтернатива радіоактивним міткам. Антидигоксигенінові антитіла, що кон'юговані з хромогенними ферментами, використовуються для виявлення присутності диго-міченого зонда [77].

1.3.2.3 Радіоактивні мітки

Радіоактивні ізотопи, або радіоізотопи, мають нестабільне ядро, яке випадково розпадається з утворенням іншого атома. У процесі розпаду ці ізотопи випромінюють або енергійні субатомні частинки, наприклад електрони, або випромінювання, наприклад, гамма-промені. Використовуючи хімічний синтез для включення одного або декількох радіоактивних атомів в невелику молекулу, що цікавить, таку як цукор, амінокислота або нейротрансмітер, долю цієї молекули можна простежити в ході будь-якої біологічної реакції [100].

Радіоізотопи ^{35}S і ^{33}P , які в першу чергу використовуються для мічення ISH-олігонуклеотидних зондів, включені в послідовність зонда, що дозволяє здійснювати чутливе виявлення навіть генів, що експресуються на низьких рівнях [80]. Однак може бути складно відкалібрувати час, необхідний для впливу на емульсію, щоб отримати правильне співвідношення сигнал/шум, і для того, щоб побачити сигнал, може знадобитися кілька тижнів або місяців.

^3H і ^{125}I - радіоізотопи, які використовуються для мічення білків і нуклеїнових кислот для дослідження низки процесів, таких як локалізація рецепторів, проліферація та транспорт білків [102]. Радіоактивно мічені ліганди, додані у зразок, можуть зв'язуватися з активними рецепторами, що дозволяє виявити авторадіографічне присутність цих рецепторів.

2 НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЯ У КОНТЕКСТІ ДЕКОДУВАННЯ ПАТЕРНІВ АКТИВНОСТІ МОЗКУ

Однією з найінтригуючих задач у сфері нейровізуалізації є декодування активності мозку. Цей напрямок досліджень зосереджується на аналізі патернів мозкової активності та їх кореляції з різними зовнішніми стимулами. В основі декодування лежить ідея, що різні думки, відчуття та дії корелюють з певними патернами активності в мозку. Тому ключовим аспектом декодування є розшифрування цих патернів, щоб зрозуміти, які когнітивні процеси чи сприйняття вони представляють [35]. Це включає дослідження того, як різні області мозку взаємодіють і координуються для створення єдиного досвіду або реакції. Для цього використовуються різні методи нейровізуалізації, такі як МРТ або ЕЕГ, які надають дані про мозкову активність. Потім ці дані аналізуються за допомогою алгоритмів та статистичних методів для виявлення відповідних патернів.

Думка про те, що активність мозку можна декодувати, розклавши його функції на окремі патерни, закладає той факт, що насамперед у ньому присутній процес кодування, який необхідний для подальшого декодування. Процес кодування є трансформацією зовнішніх стимулів і реакцій організму в унікальні нейронні сигнали. Це включає кодування сенсорної інформації, думок, спогадів і почуттів у специфічні патерни активності в різних областях мозку. Кодування в мозку – це складний та багаторівневий процес, який залежить від типу стимулу, контексту, особистого досвіду та поточного стану організму [36]. В основі цього процесу лежить взаємодія між різними нейронними мережами, які координують та інтегрують інформацію. Розуміння цього процесу кодування є ключовим для декодування мозкової активності, оскільки воно дозволяє інтерпретувати нейронні патерни та пов'язувати їх з конкретними когнітивними функціями чи станами. Це стає можливим завдяки використанню розвинених методів нейровізуалізації та аналітичних підходів, які допомагають дослідникам розшифрувати складні

нейронні коди та патерни активності мозку.

2.1 Основна проблематика дослідження патернів активності мозку

Одним із основних обмежень сучасних методів, таких як функціональна магнітно-резонансна томографія (fMPT), є їх відносно низька роздільна здатність. Хоча розмір вокселів fMPT може змінюватись, часто він становить близько декількох міліметрів, що значно перевищує розмір окремих нейронів. Таким чином, fMPT надає дані на рівні груп нейронів, а не окремих клітин [17].

Кожен воксель у зображенні fMPT являє собою певний обсяг мозкової тканини, і дослідження включає аналіз мозкової активності, розділеної на ці вокселі. Спостереження за тим, як різні вокселі активуються у відповідь на конкретні стимули, дозволяє формувати карту мозку та карту нейрональних реакцій. Однак цей метод має важливі обмеження.

Насамперед, це обмеження просторового дозволу, яке призводить до того, що одержувані патерни активності є відносно грубими і не можуть детально відобразити всі аспекти нейронної активності [27, 38, 59]. Наприклад, при аналізі моторної активності fMPT може визначити загальний напрямок чи характер руху, але не його силу чи швидкість. Працюючи з тактильними стимулами fMPT не надає інформації про характеристики дотику, як-от текстура чи температура об'єкта.

Інша проблема полягає у складності одночасного аналізу множинних патернів активності, які можуть бути пов'язані з обробкою одного стимулу або виконувати незалежні завдання [27]. Наприклад, аналіз кольору та просторової глибини зображення є реакціями на візуальний стимул, але без спеціалізованих методів обробки даних ці різні аспекти активності можуть бути помилково інтерпретовані як єдиний патерн [56, 70].

Також варто наголосити на проблемах, пов'язаних з інтерпретацією мозкової активності. Суб'єктивність в інтерпретації даних та

мультифункціональність мозкових областей ускладнюють точне розуміння того, які саме процеси відповідають за конкретні патерни активності [54, 55]. Проблема низькорівневих властивостей об'єктів також є значним обмеженням. Наприклад, вплив низькорівневих візуальних властивостей на процес класифікації об'єктів мозком може призвести до хибних інтерпретацій. Це ставить високі вимоги для фільтрації аспектів сигнал/шум для сканування фМРТ [48, 58].

На додаток до воксельного декодування, що використовується у функціональній магнітно-резонансній томографії (fMPT), існують інші методи аналізу мозкової активності, кожен з яких пропонує свої унікальні підходи та можливості. Мультиваріативний аналіз патернів (MVPA) є одним із таких методів [43], що застосовує алгоритми машинного навчання для виявлення патернів у мозковій активності. MVPA дозволяє виявляти більш тонкі та складні патерни активності, недоступні для воксельного аналізу, і може надати глибше розуміння функціональної організації мозку. Однак цей метод вимагає більших обсягів даних і складніших обчислювальних процесів, що може обмежувати його застосування.

2.1.1 Застосування ЕЕГ та МEG та їх обмеження

Як уже говорилося вище, Електроенцефалографія (ЕЕГ) також є важливим інструментом у дослідженні мозку. ЕЕГ реєструє електричну активність мозку через електроди, розміщені на шкірі голови, і відрізняється високою тимчасовою роздільною здатністю, що робить її ідеальною для вивчення динаміки мозкової активності. Однак ЕЕГ страждає від обмеженого просторового дозволу та труднощів у точній локалізації джерел сигналів.

У процесі зчитування даних електроенцефалографії (ЕЕГ) використовується кілька ключових етапів. Початок процесу обумовлений розміщенням електродів на шкірі голови пацієнта. Ці електроди здатні реєструвати електричну активність мозку. Розташування електродів зазвичай відповідає стандартній схемі, такий як система 10-20, що забезпечує

стандартизацію та можливість порівняння даних. Коли нейрони в мозку активуються, вони утворюють електричні поля, які реєструються цими електродами. Ці поля є сумарна активність великої кількості нейронів [51].

Після реєстрації електричної активності мозку починається етап ампліфікації сигналів [37]. Сигнали, отримані від електродів, зазвичай слабкі, тому вони посилюються подальшого аналізу. Посилення сигналів дозволяє дослідникам чіткіше розрізняти різні патерни мозкової активності. Однак ці сигнали часто містять шум та артефакти, які можуть виходити від різних джерел, включаючи рухи пацієнта та електричні перешкоди. Тому наступним кроком є фільтрація даних для виключення небажаних компонентів [101].

Після фільтрації сигнали ЕЕГ діляться більш дрібні сегменти виділення конкретних особливостей і патернів [85]. Наприклад, можуть аналізуватися частоти хвиль або специфічні патерни активності, що відповідають певним когнітивним завданням або сенсорним стимулам. Використовуючи статистичний аналіз, методи машинного навчання та інші алгоритми, дослідники прагнуть зрозуміти, як ці патерни корелюють із різними психологічними станами чи зовнішніми стимулами.

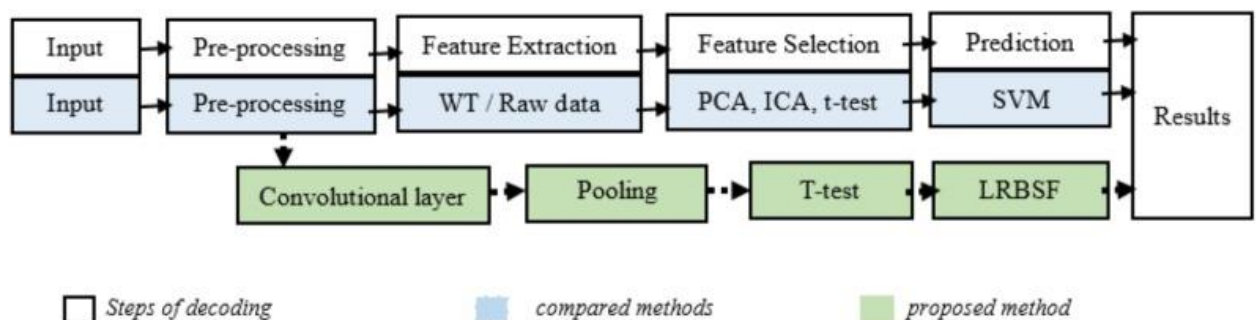


Рисунок 2.1 - Декілька варіантів процесу декодування активності мозку через ЕЕГ [36]

Магнітоенцефалографія (МЕГ) надає альтернативний підхід до вимірювання мозкової активності, вимірюючи магнітні поля, що створюються активністю мозку [67]. Подібно ЕЕГ, МЕГ має високу тимчасову роздільну здатність, але також пропонує поліпшену роздільну здатність. З іншого боку обмеження МЕГ насамперед полягає у вартості обладнання.

Всі ці методи мають одне загальне обмеження - проблематика локалізації активності нейронів на клітинному рівні. Теоретичне збільшення просторової роздільної здатності дає можливість визначити локалізацію спайків у просторі, проте залишається проблема зв'язування конкретного нейрона з точкою в якій спайк був зроблений. Ця проблема розв'язується теоретично. Однак на даний момент немає технології клітинного картування інтактного мозку, а отже завдання декодування активності мозку залишається суто теоретичним моделюванням отриманих даних про електричну активність у просторі, але без прив'язки до нейрональних ланцюгів.

2.2 Практичне застосування результатів інтерпретування активності мозку

У сфері декодування мозкової активності сучасні досягнення відкривають нові горизонти розуміння складних процесів, які протікають у людському мозку. Значний прогрес було досягнуто у розробці та вдосконаленні технік нейровізуалізації, таких як фМРТ, ЕЕГ та МEG, які тепер дозволяють спостерігати та аналізувати мозкову активність з високою точністю. Розвиток алгоритмів машинного навчання та мультиваріативного аналізу патернів значно покращив здатність дослідників інтерпретувати ці дані, дозволяючи виявляти складні патерни активності, пов'язані з конкретними когнітивними процесами та станами. Також важливі кроки були зроблені у напрямку створення нейрокомп'ютерних інтерфейсів, що надає можливості для відновлення втрачених функцій та покращення якості життя людей з неврологічними порушеннями [62].

Прогрес у галузі нейроінтерфейсів тісно пов'язаний із поглибленням наших знань про інтерпретацію мозкової активності. З моменту появи перших мікроелектродів з вольфраму для запису окремих нейронних одиниць у 1957 році, почався процес осмислення того, як електричні сигнали, що генеруються мозком, можуть бути перетворені на інформацію, доступну для розуміння та

використання [98, 99]. Наступним кроком стала електрична стимуляція субталамічної структури для лікування гіперкінезу, що продемонструвало можливість втручання у мозкові процеси та викликання бажаних змін у поведінці.

У 1969-1976 роках дослідження перейшли до уточнення механізмів кодування та кондиціювання кортикальної одиничної активності, що дозволило більш точно керувати мозковою стимуляцією [8]. З 1980 року почалося використання інвазивного візуального кортикального стимулятора для шрифту Брайля, що підтвердило можливість відновлення певних видів сприйняття за допомогою прямої стимуляції мозку [14]. Ці відкриття закладали основу майбутнього розвитку нейроінтерфейсів, які б перетворювали мозкову активність в управляючі сигнали для зовнішніх пристроїв.

До кінця 20 століття та на початку 21 століття було досягнуто значного розвитку в галузі глибокої мозкової стимуляції для лікування неврологічних розладів, що показало важливість точної локалізації та контролю за мозковою активністю. Ці досягнення супроводжувалися розробкою методів, таких як векторний метод популяції для декодування напрямку руху та використанням макаками роботизованих рук за допомогою інвазивних нейроінтерфейсів, що додатково підкреслювало потенціал прямого переведення нейронної активності команди для машин [40, 66].

З розвитком технологій у 2016 році стало можливим використання нейроінтерфейсів для покращення ходьби після спинальної травми у мавп [3]. Це стало яскравим свідченням того, що нейронні сигнали можуть бути ефективно інтерпретовані та використані для відновлення функцій. Технологічним проривом у цьому напрямку став Neuralink, який у 2019 році продемонстрував інтегровану платформу з гнучкими електродами, що дозволяють високопродуктивну взаємодію з нейронною активністю [71].

2.3 Перспективні методи зняття обмежень актуальних технологій декодування

Говорячи про перспективи подолання проблем просторового вирішення декодування мозкової активності, особливу увагу варто приділити методу двофотонної мікроскопії. Ця технологія є інноваційним підходом, що дозволяє спостерігати за активністю нейронів у тканинах мозку на клітинному рівні з високою просторовою роздільною здатністю [28]. Основна перевага двофотонної мікроскопії полягає в здатності фокусувати збудження світла виключно в точці фокусування лазера, що суттєво знижує фотоушкодження та покращує якість зображення глибоких тканин мозку.

Для ефективної роботи двофотонної мікроскопії необхідне використання флуоресціюючих зондів, які здатні специфічно приєднуватися до клітин мозку, що цікавлять. Кальцієві маркери, такі як Fluo-4, Fura-2 та Indo-1 є прикладами таких зондів, оскільки вони змінюють свої флуоресцентні властивості при зв'язуванні з іонами кальцію, що відбувається під час нейронної активності [39]. Це дозволяє не тільки відстежувати активність окремих нейронів, а й візуалізувати більші нейронні мережі в динаміці.

Крім того, квантові точки є ще одним типом флуоресціюючих зондів, які можуть бути використані в двофотонній мікроскопії [19]. Завдяки своїй унікальній здатності до флуоресценції за певних довжин хвиль і високої фотостабільності, квантові точки відкривають нові можливості для тривалого і детального спостереження за мозковою активністю.

Використання цих флуоресціюючих зондів у рамках двофотонної мікроскопії дає можливість значно покращити розуміння механізмів нейронної активності, відкриваючи нові шляхи для дослідження роботи мозку та розробки нейроінтерфейсів. Таким чином, двофотонна мікроскопія постає як перспективний метод подолання обмежень, пов'язаних із просторовим дозволом у дослідженні мозку, надаючи унікальні інструменти для вивчення його структури та функцій на мікроскопічному рівні.

З ПЕРСПЕКТИВА ЗАСТОСУВАННЯ ПОТЕНЦІАЛ-ЗАЛЕЖНИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ МАРКЕРІВ У НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЇ IN VIVO

Традиційні методи, такі як магнітно-резонансна томографія (МРТ), комп'ютерна томографія (КТ), електроенцефалографія (ЕЕГ) та магнітно-енцефалографія (МЕГ), незважаючи на їх важливість, мають обмеження з точки зору просторової роздільності та детальності візуалізації внутрішньоклітинних процесів. Флуоресцентні етикетки виконують функцію маркеру для відстежування, але не характеризують самі процеси в організмі і більшість з них можливо використовувати *in vitro*. На даний момент цю проблему вирішує VSDI методи візуалізації, котрі наразі виступають одним з найбільш перспективних варіантів. VSDI надає можливість спостерігати за електричною активністю нейронів в реальному часі, пропонуючи значно вищу просторову роздільність і глибше розуміння механізмів, що стоять за нейронними процесами (Табл. 3.1). Це відкриває двері до більш точної і деталізованої візуалізації нейронних мереж в живих організмах, дозволяючи науковцям краще розуміти складні нейробіологічні процеси.

Візуалізація нейронної активності потребує спеціалізованих флуоресцентних зондів, які можуть фіксувати зміни мембранного потенціалу, концентрації кальцію або процесів злиття синаптичних бульбашок. Як такі зонди можуть виступати органічні барвники, що вносяться в нервову систему перед експериментом, або генетично закодовані білки флуоресцентні, стабільно експресовані в трансгенних моделях [10]. Незважаючи на те, що барвники часто мають кращі часові характеристики і співвідношення сигнал/шум, генетично закодовані білки надають унікальну можливість цілеспрямовано досліджувати активність в молекулярно визначених нейронних ланцюгах.

Таблиця 3.1 - Найчастіше використовувані датчики нейронної активності [103]

Категорія	Приклади	Переваги	Недоліки
Чутливі до напруги барвники	Di-8-ANEPPS, RH 414	Висока тимчасова роздільна здатність (час відгуку в мікросекундах).	Невеликі зміни інтенсивності сигналу (близько 0,1%). Безладне маркування.
Генетично закодовані датчики напруги	ArcLight	Високоспецифічне таргетування	Нижча тимчасова роздільна здатність, ніж у барвників (мілісекунди). Високе тло.
Нераціонометричні індикаторні барвники кальцію	Fluo-3, Fluo-4, calcium Green-2	Зміни інтенсивності прямої флуоресценції корелювали з концентрацією Ca^{2+} .	Схильний до появи артефактів, специфічних для експерименту. Неможливо відкалібрувати.
Ратіометричні індикаторні барвники кальцію	Fura-2, Indo-1	Великі зміни сигналу (10%). Стійкий до специфічних для експерименту артефактів, таких як концентрація навантаження та фотознебарвлення. Включає калібрування.	Більш складний збір та вимірювання даних, ніж при використанні нераціонометричних барвників. Буферизація внутрішньоклітинного Ca^{2+} може змінити сигнальні шляхи, якщо він є у високих концентраціях.
Генетично закодовані датчики кальцію	GCaMP	Високоспецифічне таргетування	Може мати тривалий час загасання сигналу, що забезпечує низьку тимчасову роздільну здатність. Буферизація внутрішньоклітинного Ca^{2+} може змінити сигнальні шляхи, якщо він є у високій концентрації.
Маркери синаптичних бульбашок на основі барвників	FM dyes (FM1- 43, AM4-64)	Можна варіювати стимуляцію та вплив барвника, щоб контролювати кількість мічених везикул.	Маркує всі поверхні мембран, тому фон може бути високим і його важко вимити зі зрізів мозку.
pH-чутливі флуоресцентні білки	Synaptop Hluorin	Дозволяє вивчити пресинаптичний викид.	Багато сайтів активного вивільнення можуть ускладнити візуалізацію певних синапсів.

3.1 GEVI

Методи, що візуалізують зміни мембранного потенціалу, є найближчими аналогами електрофізіологічних записів, оскільки вони

повідомляють про зміни напруги в мембранах нейронів з високою тимчасовою роздільною здатністю. Візуалізація на барвниках, чутливих до напруги (VSDI), нині є основним методом, з допомогою якого вчені візуалізують зміни напруги. Однак нові генетично закодовані індикатори напруги (GEVI) тепер дозволяють відображати мембранний потенціал генетично визначених типах клітин [47].

Вони класифікуються на два типи: засновані на перенесенні резонансної енергії Ферстера (FRET) між двома флуоресцентними білками та індикатори, що змінюють інтенсивність свічення одного флуоресцентного білка. Першим FRET-базованим сенсором Ca^{2+} був Cameleon, розроблений групою Міявакі та співавторів. Цей сенсор складається з Ca^{2+} -чутливого кальмодуліну та пептиду M13, розташованих між двома варіантами GFP. Зміна концентрації кальцію викликає взаємодію CaM-M13, що збільшує ефективність FRET і відображається у зміні подвійної емісії донора та акцептора [48]. Поліпшення таких сенсорів на основі FRET включали налаштування орієнтації хромофора з варіантами Venus для збільшення динамічного діапазону відповіді, а також заміну CaM-M13 на тропонін C або структурне перепроєктування інтерфейсу кальмодулін-M13 для мінімізації обурення клітин. Раціометричний вимір таких FRET-сенсорів дозволяє коригувати артефакти руху та кровотоку, а також квантифікувати внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} . Однак, сенсори на основі FRET часто демонструють меншу чутливість у порівнянні з сенсорами, заснованими на одному флуоресцентному білку.

GEVIs дозволяють досліджувати активність молекулярно певних підмножин нейронів, долаючи обмеження історичних інструментів. Наприклад, ArcLight, новий GEVI, відрізняється покращеним розміром сигналу та співвідношенням сигнал/шум. Візуалізація динаміки кальцію, центрального елемента у багатьох фізіологічних процесах нейронів, також відіграє ключову роль у зв'язку електричної активності та біохімічних подій. Зміни концентрації кальцію можуть бути непрямим індикатором зміни електричної активності. Важливо, що флуоресцентні індикатори кальцію

існують як у формі барвників, так і індикаторів, що генетично кодуються.

У порівнянні з VSDI, кальцієва візуалізація забезпечує більші та стабільні зміни видимого сигналу, але з меншою тимчасовою роздільною здатністю. Кальцієві індикаторні барвники можуть бути ратіометричними або нератіометричними, кожен з яких має свої переваги та недоліки. Ратіометричні барвники, такі як Fura-2, змінюють спектральні властивості в залежності від наявності Ca^{2+} , дозволяючи коригувати фонові зміни флуоресценції [98]. Нератіометричні барвники, включаючи Fluo-3 та Fluo-4, характеризуються прямим зв'язком між інтенсивністю флуоресценції та концентрацією кальцію, що робить їх більш простими у використанні.

Поява однокомпонентних флуоресцентних сенсорів кальцію, заснованих на використанні кругових пермутованих флуоресцентних білків (срFP), стала значним кроком у галузі візуалізації нейронної активності. Ранні версії таких сенсорів, включаючи Pericam та GCaMP, використовували CaM та M13 із вставленим срYFP або срGFP. Ці рецептори зазнали еволюції, значно покращивши свою чутливість і знайшли застосування *in vivo*. Особливо проривним став GCaMP6 завдяки високому відношенню сигнал/шум, що дозволило ефективно відстежувати кальцієву активність в окремих нейронах та їх ансамблях. Подальше поліпшення GCaMP6 призвело до створення серій jGCaMP7 та jGCaMP8, де jGCaMP7 показав ще більшу чутливість та яскравість базальної флуоресценції, що полегшило візуалізацію кальцію в шипиках та сомах нейронів. Остання серія jGCaMP8 була розроблена шляхом заміни пептиду M13 на пептид ендотеліальної синтази оксиду азоту, що дало змогу датчику швидше реагувати, що особливо важливо для відстеження потенціалів дії. Аналогічна стратегія була застосована при розробці серії XCaMP, де M13 був замінений пептид сккар з нейронального білка CaMKK, що дозволило датчику лінійно реагувати на зміни концентрації кальцію [112].

3.2 GECI

Для поліпшення співвідношення сигнал/шум кальцієвої візуалізації були розроблені генетично закодовані індикатори кальцію (GECIs), націлені на субклітинні структури. Наприклад, Axon-GCaMP6, що збагачує аксональні структури, створений шляхом злиття білка, пов'язаного зі зростанням GAP43, з GCaMP6m. Це дозволило проводити *in vivo* записи орієнтації та налаштування напрямку аксонів без контамінації сигналу кальцію соматодендрітичної структури. Також розроблені червоно-зрушені та ближні до інфрачервоного діапазону GECIs для мультиплексної візуалізації та покращення глибини зображення [45]. Приклади включають R-GECO1 та RCaMP1, а також наступні оптимізовані версії, такі як jRGECO1a та jRCaMP1b. На додаток, були створені негринові GECIs, що використовують флюоресцентні білки, що зв'язують білівердин ближні до інфрачервоного діапазону, наприклад, NIR-GECO1 і FRET-базований iGECI. Оптимізація яскравості та фотостабільності цих сенсорів значно покращить SNR для візуалізації *in vivo*.

Розробка генетично закодованих індикаторів напруги, заснованих на областях чутливості до напруги вольтаж-залежних фосфатаз або світлозалежних протонних насосів (опсинів), відкрила нові можливості для точного визначення паттернів збудження та властивостей кодування цільових нейронів [22]. Ці GEVI створені для вимірювання змін мембранного потенціалу. Незважаючи на те, ізуалізація напруги є більш складним завданням порівняно з кальцієвою візуалізацією, останні зусилля в галузі інженерії сенсорів дозволили візуалізувати спайкінг в генетично визначених нейронних популяціях у тварин під час їх поведінки.

Поточні GEVI ще далеко від оптимальних характеристик і зараз їх використання є можливим лише у деяких лабораторіях. Очікується, що практично корисні GEVI в поєднанні з GECI забезпечать більш точне вивчення обробки інформації в мозку [46].

4 ОСОБЛИВОСТІ ТА АКТУАЛЬНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КВАНТОВИХ ТОЧОК

Нещодавній інтерес до квантових точок (КТ) викликаний їх багатообіцяючими властивостями, такими як профілі поглинання і випромінювання, що налаштовуються, високі перерізи поглинання, стійкість до фотовигорання, функціоналізовані поверхні і фізична міцність. Особливо привабливим стало використання КТ у біологічній візуалізації, де їх внутрішні властивості знаходять широке застосування. Наприклад, квантово-обмежений ефект Старка (QCSE), який описує зміни у фотолюмінесценції КТ під дією електричного поля, пропонує природний спосіб виявлення змін електричних полях шляхом моніторингу випромінювання КТ. Це відкриває можливості візуалізації мембранного потенціалу в електрично активних клітинах [82].

КТ привертають увагу своїми оптичними властивостями, активністю та застосуванням у галузі електротехніки. Завдяки контрольованій зміні зазору між його валентною зоною та зоною провідності, його електронні властивості можна досліджувати декількома способами, наприклад, при оцінці перенесення заряду, фотокаталізі, електрохемілюмінесценції, перетворенні світла на електричну енергію та інших [74].

Раніше його розглядали лише як спосіб флуоресцентного маркування клітин, проте починаючи з 2018 року почало з'являтися все більше статей, що описують перспективу застосування КТ як VSI, що стало відправною точкою для пошуку ширшого спектра застосувань для цих наночастинок. На даний момент у фокусі дослідників знаходиться низка напрямків, таких як методи таргетування, токсичність, багатоколірне маркування, методи доставки та обхід гематоенцефалічних бар'єрів [29]. Основною проблемою в їх розробці є відсутність методів для оцінки реакції КТ на напруги у водно-електролітичних середовищах, характерних для біологічних систем. Загалом було проведено відносно мало досліджень щодо оцінки реакції КТ на зміни напруги в живих клітинах. Вимірювання фотолюмінесценції

в широкому полі з використанням безлічі частинок на нейрональних клітинах показали, що КТ можуть бути використані для більш чутливого відстеження локальних змін напруги (ΔPL до двох разів вище), ніж існуючі барвники для візуалізації кальцію, що робить їх особливо придатними для відстеження подпорогових подій. Завдяки своїй нульмерній природі та меншому розміру в порівнянні з їх радіусом Бора при збудженні, вони, серед іншого, виявляють різні оптичні, електричні та магнітні властивості. Ці унікальні характеристики роблять їх дуже цінними та застосовними у цих галузях [13, 30].

На даний момент дослідження показали, що трансмембранні електричні поля, характерні для нейрональних імпульсів (~ 10 мВ/нм), модулюють електронну структуру КТ і можуть викликати зміни інтенсивності її флуоресценції на $\sim 5\%$ та зсуви довжини хвилі випромінювання на ~ 1 нм, залежно від розміру КТ та складу діелектричного середовища [87]. Більше того, спеціально розроблені датчики КТ, що складаються з двох різних матеріалів, можуть демонструвати суттєві ($\sim 30\%-70\%$) зміни інтенсивності флуоресценції під час імпульсів нейронів. Використовуючи теорію виявлення сигналів, було показано, що звичайні КТ повинні бути здатні повідомляти про динаміку напруги з мілісекундною точністю на декількох десятках або більше окремих нейронів у діапазоні оптичних та нейрофізіологічних умов.

Нещодавно розроблені методи хімічного синтезу призвели до створення нанокристалів, які окремо обмежують просторову довжину функцій хвильових електронів і дірок. Вони відомі як напівпровідникові наночастинки типу II за аналогією зі структурами, синтезованими методами мікровиробництва, і зазвичай складаються з напівпровідникових наностержнів, вирощених на квантових ядрах точок. Оскільки хвости окремих несучих хвильових функцій чутливіші до напруги, ніж інші, зонд з перекриттям електронів і дірок, обмеженим хвостами будь-якої хвильової функції, демонструватиме підвищену чутливість до напруги. Асиметрія структури має ефект, аналогічний до електричного попереднього зміщення

квантової точки, створюючи фіксований електричний дипольний момент, який більш чутливий до невеликих зсувів поля. Це змінює залежність зсуву флуоресценції від напруженості прикладеного поля на лінійну залежність, на відміну квадратичної залежності для звичайних КТ.

Напівпровідникові гетероструктури типу II мають більшу чутливість до напруги, ніж системи ядро-оболонки [90] (Рис. 4.1). (А) Модулі хвильових функцій основного стану за наявності напруги для квантової ями CdTe розміром 5 нм з граничними умовами нескінченної квадратної ями. (Б) Дробова зміна модулів хвильової функції дірок у порівнянні з $V = 0$ мВ. (С – Н) Модулі хвильових функцій основного стану (С, Е, G) та дробові зміни часу життя (D, F, H) залежно від прикладеної напруги в одновимірній моделі нанокристалу ядро-оболонка CdTe – ZnS (C,D), а також нанокристали II типу, що складаються з CdTe-CdSe (E, F) та CdTe-ZnTe (G, H) (Рис. 4.2). Вертикальні пунктирні лінії позначають розподіл матеріалів. За згодою (С,Е,Г) модулі хвильової функції дірки змінюються знаками. Чорні вертикальні шкали належать до потенціалів.

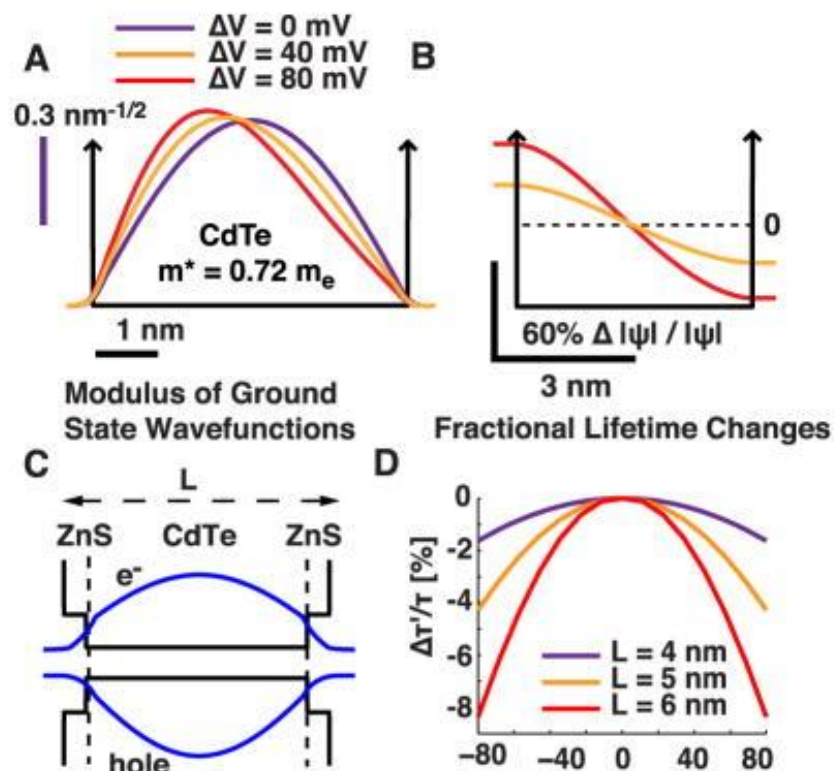


Рисунок 4.1 - Електро-хімічні властивості квантових точок [67].

Кольорові вертикальні шкали належать до хвильових функцій. Горизонтальні та вертикальні масштабні лінійки G застосовні також до C і E.

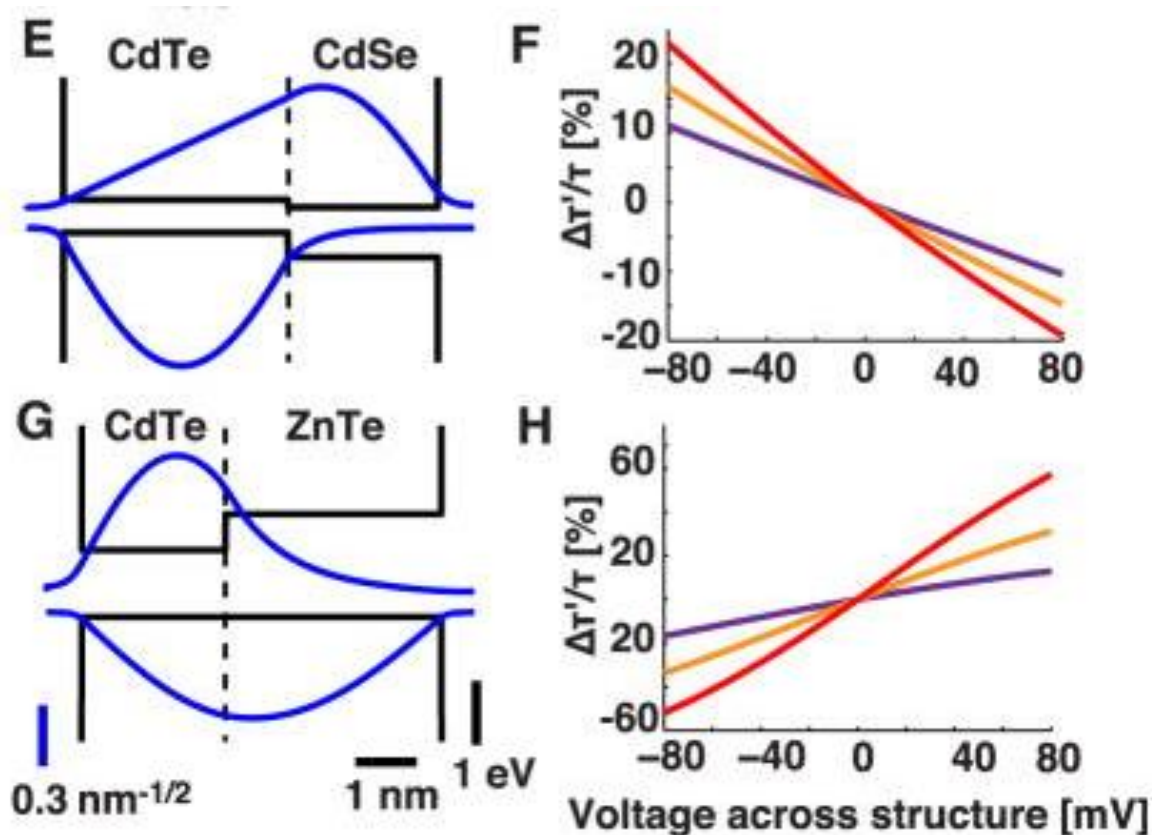


Рисунок 4.2 - Електро-хімічні властивості квантових точок [67].

Хоча механізми, засновані на оптичному детектуванні, такі як флуоресцентно-резонансне перенесення енергії (FRET), флуоресценція та хемілюмінесцентно-резонансне перенесення енергії (CRET), вже широко вивчені, використання квантових точок (КТ) в області фотоелектрохімічних сенсорів відносно мало вивчене. Декілька досліджень продемонстрували потенціал неорганічних КТ як зонди напруги як на рівні ансамблю, так і на рівні окремих молекул. Після початкової роботи Маршалла та ін., яка теоретично показала перспективність використання КТ як датчиків напруги, Роуланд та ін. використовували твердотільне ємнісний пристрій, щоб продемонструвати, що і час життя, і інтенсивність ФЛ КТ модулюються електричним полем, при цьому точки, що містять вирівнювання смуг типу

II показують помітно кращий відгук при ансамблевих вимірах [33, 67]. Крім того, Парк та ін. припустили, що КТ (наностержні) у формі «стрижня» мають найбільш оптимальну форму для характеристики напруги, продемонстрували їх ефективність на одночастковому рівні, а також успішне включення в модельні мембрани. Зовсім недавно, використовуючи схему збалансованого фотодетектування, Bar-Elli et al. показали, що реакцію ФЛ КТ на напругу можна спостерігати при візуалізації в широкому полі, демонструючи потенціал візуалізації подій збудження в багатьох нейронах одночасно [82].

4.1 Специфіка досліджень перспективності методу

Незважаючи на значний обсяг роботи, залишається кілька невирішених питань. По-перше, всі подібні дослідження проводилися в твердотільних ємнісних структурах, де напруженість поля підтримується постійним по всьому активному шару. Це контрастує із клітинними системами, де електричне поле створюється трансмембранним потоком катіонів або аніонів [12]. Отже, щоб оцінити весь потенціал КТ, вимірювання повинні проводитися у водних іонних середовищах, у яких зміни напруги опосередковані іонними, а не електронними перегрупуваннями. У більш загальному плані, зазвичай використовувані ємнісні структури складно виготовити: потрібно кілька циклів осадження діелектрика, де умови високої енергії можуть пошкодити точки, розташовані всередині пристрою. Це зумовило складність кількісної оцінки здатності КТ відчувати чутливість до напруги високопродуктивним, відтворюваним та неруйнівним способом. Крім того, оцінка датчиків напруги КТ проводилася в основному тільки на матеріалах на основі II-VI CdX (X = S, Se або Te), цитотоксичність яких можна знизити шляхом ретельного проектування, але, як правило, менш бажані для живих систем. Альтернативою цим матеріалам є нещодавно розроблені КТ на основі

Індія III-V, які зазвичай виявляють меншу цитотоксичність [87]. Додаткові дослідження фізіологічних ефектів показали, що хоча КТ CdSe/CdS демонструють більш високу реакцію ФЛ на деполяризацію мембрани, їх низька цитотоксичність робить InP/ZnS більш придатними для вимірювань напруги в живих системах. Ці результати надають методологію для раціональної розробки датчиків напруги на основі КТ та підкреслюють їхній потенціал для візуалізації змін напруги клітинної мембрани.

Щоб датчики напруги КТ повністю розкрили свій потенціал, такі біологічно безпечні з'єднання повинні бути досліджені як у пристроях, так і *in vivo*. Основні проблеми, пов'язані з електрохімічною поведінкою цих напівпровідників, включають їх низьку розчинність та коефіцієнт дифузії, що ускладнює точне вимірювання струму. Крім того, окислювально-відновні процеси, що викликають видалення або додавання електронів частинки, часто призводять до хімічної незворотності, що може впливати на відтворюваність вимірювань. В одному дослідженні було оцінено кореляцію між електрохімічною забороненою зоною та світловим електронним спектром. Особливо у квантових точках на основі CdS спостерігалася активна участь наночастинок як у ролі донорів, так і акцепторів електронів [34].

У твердотільних ємнісних структурах було показано, що ФЛ КТ CdSe/CdS квазитипу II можна модулювати до 60% при застосуванні електричних полів $\sim 0,8$ МВ/см [33]. Аналогічне дослідження оцінило реакцію електричного поля в умовах наближених до середовищ клітинних мембран, проводячи експерименти з аналогічними CdSe/CdS з біпіридином, а також відносно недослідженими КТ InP/ZnS. Відгук ФЛ вимірювався по ансамблю точок з передбачуваною товщиною шару ~ 10 нм.

Було показано реакцію ФЛ КТ CdSe/CdS на додаток поля $\sim 0,9$ МВ/см (аналогічно за величиною зміни поля при деполяризації мембрани нейронів) з використанням краплі 1М KNO₃. Відповідно до

попередніх досліджень, при застосуванні цього поля можна спостерігати явне червоне зміщення (~ 3 нм) та гасіння піку ФЛ на $\sim 60\%$ (кількісно обумовлене як $|\Delta PL/PL|$, де ΔPL - зміна ФЛ (пік) інтенсивності при додатку поля, а PL - пікова інтенсивність випромінювання при нульовому полі, інтенсивність ФЛ інтегрується в діапазоні 600-750 нм), поряд з деяким ступенем розширення ФЛ [97]. Аналогічні значення електричного поля, необхідного для створення заданої зміни ФЛ [33]. При цьому будь-які зміни можуть бути пов'язані з хімічними відмінностями у використовуваних КТ.

Гасіння ФЛ є повністю оборотним, тобто при поверненні до нульового поля інтенсивність і форма ФЛ повертаються до вихідних значень, що свідчить про те, що поле ніяк не погіршує якість точок. Більш того, КТ, покриті ізолюючою оболонкою з SiO_2 , демонструють аналогічну ступінь гасіння ФЛ, що вказує на те, що електрохімічні ефекти або ефекти перенесення заряду не відіграють істотної ролі у відгуку, що спостерігається. Повторення вимірювань на кількох пристроях та в діапазоні напруг показує, що для полів вище $0,6$ МВ/см відгук ФЛ лінійно масштабується з прикладеною напругою.

Цитотоксична дія наночастинок CdX ($X = S, Se, Te$) на клітини добре вивчена. Хоча викид токсичного Cd^{2+} можна зменшити шляхом ретельної модифікації поверхні, вони є складними зондами напруги, особливо враховуючи, що вивільнення таких іонів може змінювати струми через іонні канали. КТ фосфіду індія III-V були так само перевірені як більш біосумісні клітинні зонди. Хоча вони, можливо, менш досліджені, ніж наночастинок CdX , вони мають аналогічний налаштовується набором властивостей ФЛ і форми/розміру [39]. InP/ZnS . показали аналогічний рівень гасіння ФЛ з максимумом $|\Delta PL/PL| \sim 70\%$, яка досягається в цих матеріалах при додатку полів $\sim 0,95$ МВ/см. Пік ФЛ зміщується у синій колір ($\sim 1,5$ нм) при додатку поля [139].

У асиметричних КТ, судячи з орієнтації КТ всередині

електричного поля, спостерігається як синє, і червоне зміщення максимуму піку ФЛ [82]. Аналогічна величина $|PL/PL|$ реакція на точки CdSe/CdS дозволяє припустити, що КТ InP/ZnS однаково підходять як зонди. Загалом використання точок InP/ZnS демонстрували легке фотознебарвлення при конфокальному збудженні, що вказує на те, що розробка покращених матеріалів щодо цих точок може підвищити їхню життєздатність. Важливо відзначити, що ці ефекти знебарвлення відбуваються протягом кількох хвилин, що значно перевищує тривалість експериментів як у проведених дослідженнях на установках, так і живих клітинах, яка становила близько секунд.

Для фіксованої прикладеної напруги $|PL/PL|$ можна також очікувати, що вона змінюватиметься залежно від концентрації іонів. У міру зменшення концентрації іонів довжина дебаївського екранування буде збільшуватися, потенціал падатиме на більшій відстані, а загальна напруженість поля, що випробовується КТ, буде зменшуватися.

Зменшення концентрації іонів з 1 М до 1 мкМ призводить до зменшення $|PL/PL|$ від 45 до 10%. У клітинах ссавців внутрішньоклітинні концентрації іонів зазвичай варіюються від 10^{-6} М до 10^{-2} М, і, отже, це підтверджує, що КТ життєздатні як датчики напруги в межах біологічної межі концентрації. Проте, наприклад, можливо, зміна концентрації іонів змінює частку заряджених точок, що, як передбачається, сприяє гасіння ФЛ.

Для будь-якого компонента, чутливого до напруги на основі ФО, теоретичний швидкий час відгуку на полі визначатиметься балансом часу життя ФЛ і часу, необхідного електронним станам або структурі, щоб відреагувати на присутність поля. Для КТ CdSe/CdS час життя ФЛ становить ~ 9 нс. В органічних барвниках час життя ФЛ зазвичай набагато менше - 10-100 пс, що набагато ближче до тимчасового масштабу, прийнятого для структурних, якщо не електронних перегруповань молекул під дією поля [4].

4.2. Кількісний вимір напруги

Оскільки фотон (живе зображення) поступово замінює електрон (патч-затискач) для зондування напруги нейронів, все ще залишаються проблеми щодо виявлення локальних (субмікрометрових) змін напруги та подпорогових подій, які включають невеликі зміни мембранного потенціалу. Хоча ефективність КТ у відповідь на електричне поле було продемонстровано багато разів (у тому числі й вище), у небагатьох дослідженнях вивчалось, чи можна перевести ці ефекти на кількісну візуалізацію мембранного потенціалу в нейронах. Отже, щоб спочатку оцінити, чи ФЛ КТ реагує на зміну напруги в живих клітинах і як точність/величина співвідноситься з загальноприйнятими методами, такими як патч-кламп. Подібні дослідження поставили собі за мету провести вимірювання на аксонах RGC, отриманих із зачатків ока *Xenopus laevis* (ембріональна жаба) [91]. КТ CdSe/CdS або InP/ZnS вводили в ранні ембріональні клітини, що дають початок центральній нервовій системі, з подальшим культивуванням диференційованих нейронів та деполяризацією нейрональної мембрани, спричиненої осмотичним шоком. Потім ФЛ з КТ усередині первинних нейронів детектували з використанням установки. При цьому точна локалізація КТ усередині нейрональних клітин була невідома, тобто хоча КТ досить малі, щоб перебувати в мембрані, не можна точно сказати, чи знаходяться вони в ній або десь ще всередині клітини. Нейрональна мембрана RGC *Xenopus* має напругу спокою ~ -70 мВ, яка швидко падає за величиною (тобто до 0 мВ) після осмотичного шоку з подальшим відновленням або смертю клітин. Оскільки деполяризація клітини відповідає зменшенню електричного поля КТ (близько $0,9$ МВ/см), їх яскравість повинна збільшуватися під час події деполяризації; це важливо, оскільки дозволяє відрізнити деполяризацію мембрани від будь-яких ефектів знебарвлення або мерехтіння точок, які можуть свідчити про зменшення інтенсивності ФЛ з часом [91].

Спочатку інтенсивність ФЛ швидко збільшується, зазвичай з двома або трьома піками у відповіді. Після шоку інтенсивність ФЛ повільно падає - це узгоджується з пошкодженням аксонів в результаті шоку, що іноді в кінцевому підсумку призводить до загибелі клітин або відновлення та відновлення мембранного потенціалу. Відповідь $\Delta PL/PL$ велика і становить $\sim 70\%$, і порівняння цього значення показує, що відсутність інших факторів це відповідає зміні поля $\sim 0,9$ МВ/см, що випробовується точками. Аналіз попередніх літературних досліджень, у яких патч-фіксація виконувалася на порівняних клітинах, дозволяє припустити, що це розумне значення для зміни поля при деполяризації клітин, демонструючи, що розроблена платформа має потенціал як інструмент калібрування для індикаторів напруги для подальшого аналізу.

Стимульована деполяризація мембран через осмотичний шок викликає падіння внутрішньоклітинного поля, що призводить до збільшення фотолюмінесценції (Рис. 4.3). (b) Приклади трас фотолюмінесценції квантових точок після деполяризації в різних умовах (вгорі зліва): CdSe/CdS квантові точки, завантажені в ембріон концентрації 0,5 мг/мл, показують різке збільшення фотолюмінесценції на 66% при деполяризації. В інших випадках збільшення фотолюмінесценції менше (32% для CdSe, завантажених в ембріон концентрації 0,1 мг/мл). InP/ZnS квантові точки, завантажені в ембріон концентрації 0,5 мг/мл, показують різке збільшення фотолюмінесценції приблизно на 11% при деполяризації. Квантові точки також реагують на деполяризацію, спричинену додаванням глюконату калію. Слабкі коливання фотолюмінесценції, які можна побачити після початкової різкої зміни фотолюмінесценції, можуть відповідати додатковим подіям деполяризації. Зазначається, що потужність лазера та час збору даних спектрометра варіювалися між експериментами, що пояснює відмінності в шумі та абсолютних показниках [4].

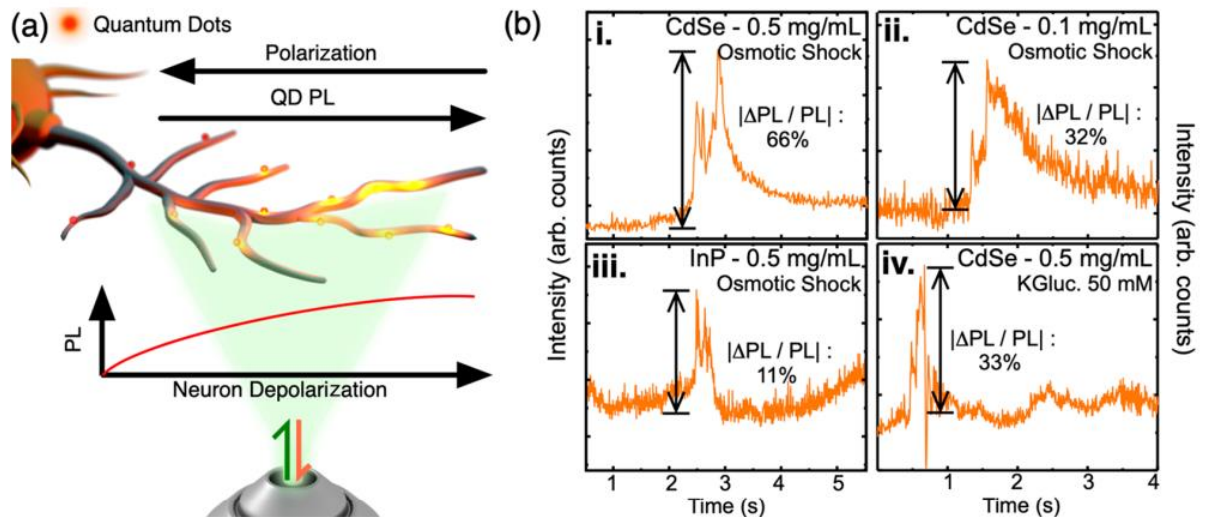


Рисунок 4.3 - Фотолюмінесцентна відповідь квантових точок в аксонах ретинальних гангліозних клітин *Xenopus laevis* на деполяризацію клітини. (a) Схематичне зображення установки, що показує нейрони, освітлені 532 нм лазером, при цьому фотолюмінесценція квантових точок реєструється у відображенні [4].

Кінцевою метою розробки будь-якого індикатора напруги є використання для оцінки і відображення локальних змін мембранного потенціалу з високою точністю. У цьому контексті дослідження були розширені до застосування схеми формування зображень фотолюмінесценції (ФЛ) у широкому полі, щоб подолати обмеження, пов'язані з виявленням в одній точці. КТ були застосовані для візуалізації аксонів RGC *Xenopus*, що експресують індикатор кальцію (jGCaMP7f), із різною центральною частотою випромінювання порівняно з квантовими точками. Будь-які неприкріплені КТ видалялися шляхом багаторазового промивання. Важливо відзначити, що випромінювання GCaMP не пригнічувалося КТ, що відповідає очікуванням, враховуючи слабе перекриття між випромінюванням GCaMP та поглинанням КТ та відносно велику відстань між ними.

Інтенсивність випромінювання GCaMP збільшувалася зі

зростанням концентрації кальцію, що зазвичай використовується як індикатор мембранного потенціалу через високу щільність потенціалзалежних кальцієвих каналів у мембранах нейронів. Хоча кальцієві барвники не сприймають мембранний потенціал так само, як КТ, порівняння відносної величини змін ФЛ між цими двома типами сенсорів становить інтерес для візуалізації. У дослідженнях, де одночасно візуалізувалася деполяризація мембрани за допомогою GCaMP та потенціал-чутливого барвника, виявлено, що відповідь GCaMP була сильнішою. Ці результати підтверджувалися аналогічними вимірюваннями, що контролюють одночасні зміни PL VSD та КТ при деполяризації нейронів (Рис. 4.4).

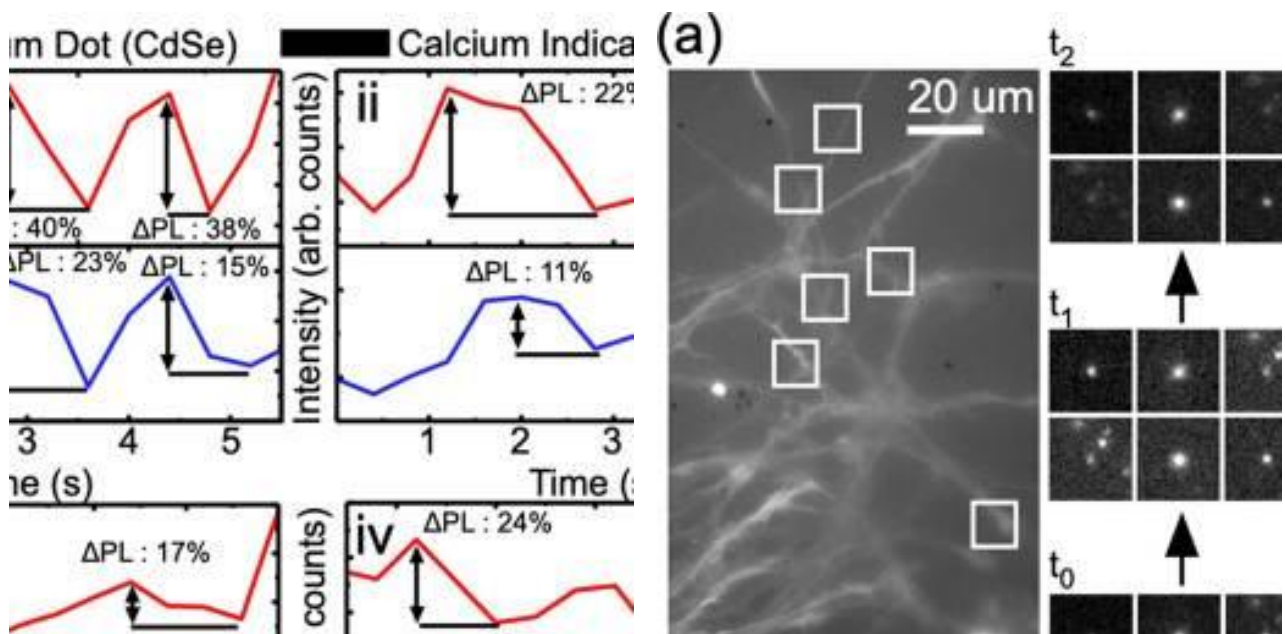


Рисунок 4.4 - Використання репортерів напруги КТ для виявлення деполяризації мембран нейронів за допомогою фотолюмінесценції [4].

Для моніторингу реакції ФЛ як КТ, так і барвника на деполяризацію мембрани, спричинену осмотичним шоком, використовувався двоканальний запис із збудженням/виявленням епіфлуоресценції в широкому полі. На типовому зображенні флуоресценції (в каналі емісії барвника) білими прямокутниками

відзначалося розташування нанокристалів CdSe/CdS. Локальну яскравість одиночних (або групи) КТ можна було відстежувати у часі, при цьому інтенсивність їхнього випромінювання точно відображала сигнал кальцію.

Щоб оцінити здатність квантових точок (КТ) відстежувати локальні зміни мембранної напруги, були побудовані графіки інтенсивності фотолюмінесценції (ФЛ) залежно від часу для КТ та індикаторного барвника кальцію. Спостерігалася сильна кореляція між інтенсивністю барвника та КТ, що дозволило відокремити інформативні зміни ФЛ від випадкових флуктуацій. Неприкріплені до нейронів точки демонстрували лише малі випадкові флуктуації ФЛ. Зміна ФЛ КТ (ΔPL) була значно більшою (від ~ 5 до 60%) порівняно з кальцієвим барвником, вказуючи на підвищену чутливість КТ до змін у мембранах нейронів.

Зміни ФЛ/напруги у схемі з широким полем виявлення були значно меншими порівняно зі сфокусованим збудженням/збором. У контексті отримання кількісних даних відповідної зміни поля фактори, пов'язані з агрегацією точок і перекриттям нейронів, могли бути частково ігноровані, оскільки аналізувалися поодинокі або кілька КТ. Порівняння зміни ФЛ з даними, отриманими на інших пристроях, дозволяло хоча б напівкількісно відстежувати локальне поле при деполяризації. Наприклад, зміна PL на $\sim 40\%$ відповідала зміні поля $\sim 0,8$ МВ/см, тоді як зміна ФЛ $\sim 20\%$ вказувала на поля ближче до $0,6$ МВ/см.

Експерименти були також проведені з КТ InP/ZnS, проте їх нижча яскравість та швидке фотознебарвлення утруднили повну оцінку їхньої реакції. Незважаючи на це, покращена чутливість КТ у схемі візуалізації у широкому полі порівняно з традиційними барвниками підкреслює їхню перспективність у відстеженні локалізованих змін напруги. Порівняння експериментальних даних з каліброваними змінами ФО на пристрої надає метод кількісного моніторингу.

Застосування більш товстої оболонки для придушення мерехтіння, прив'язка лігандів до певних сайтів зв'язування та зниження агрегації для покращення розподілу точок можуть додатково підвищити надійність вимірів.

Необхідно також враховувати успіх кальцієвих барвників, особливо в контексті їхньої швидкої дії та здатності локалізуватися у певних органелах. У майбутніх дослідженнях, де використовуватиметься одночасна візуалізація КТ та електрофізіологічні вимірювання за допомогою патч-клампу, можна встановити кількісний зв'язок між цими результатами. Важливо відзначити, що гіперполяризація мембрани, що є зниженням мембранного потенціалу нижче рівня спокою, також є важливим аспектом нейронної активності. Теоретично, КТ PL має бути чутливим і до цього процесу, що може доповнити використання кальцію або інших чутливих барвників. Експерименти показали, що сигнали від цих двох типів сенсорів, мабуть, не заважають один одному, відкриваючи додаткові можливості їх застосування.

4.3 Актуальна проблематика застосування

Торкаючись теми токсичності КТ, на даний момент це питання є наріжним каменем усієї перспективи застосування цієї технології. Насамперед через те, що КТ на основі кадмію є найбільш поширеними в цьому середовищі, тоді як Кадмій сам по собі є токсичним і може викликати запальну реакцію. Тому зараз випробовуються два варіанти вирішення цього завдання: розробка альтернативних біосумісних КТ та застосування лігандів для підвищення біосумісності. Одними з перших біосумісних КТ були наночастинки на основі Індія, вони можуть бути менш токсичними порівняно з КТ на основі кадмію, зменшуючи вплив на життєздатність клітин і викликаючи менше пошкодження ДНК. Тим не менш, існують суперечливі дані про токсичність різних типів КТ. Наприклад, було виявлено, що КТ на основі срібла можуть негативно впливати на клітини та процеси фотосинтезу рослин. Серед

альтернатив квантовим точкам кадмію виділяються леговані квантові точки, такі як сульфід цинку, легований марганцем, завдяки їх низькій токсичності. Особливий інтерес представляють квантові точки на основі вуглецю, які демонструють низьку токсичність як *in vitro*, так і *in vivo*, та відкривають перспективи використання у біомедичних додатках [79]. Незважаючи на ці обнадійливі дані, необхідні додаткові дослідження для повного розуміння та оцінки токсичності квантових точок різних типів.

У дослідженні 2019 року було перевірено токсичність легованих азотом вуглецевих квантових точок (NCKT) *in vitro* з використанням кількох клітинних ліній, включаючи клітини HEK293, HepG2 та HeLa. Оцінка *in vitro* показала, що КТ вуглецю не впливали на життєздатність клітинних ліній, що тестуються, навіть при найвищій концентрації 400 мкг/мл. Більш того, оцінка вуглецевих КТ *in vivo* у мишей-альбіносів не виявила помітних змін маси тіла або рівнів ферментів, які часто пов'язані з токсичністю наноматеріалів. Крім того, що КТ на основі вуглецю нетоксичні в біологічних умовах, вони є «зеленішим» типом КТ, оскільки вони не складаються з важких металів, як традиційні КТ [57].

Ліганди відіграють ключову роль у поліпшенні розчинності квантових точок, що є критично важливим для їх клінічного використання. Дослідження показали, що зміна гідрофобних лігандів на гідрофільні може значно покращити розчинність та біосумісність квантових точок. Крім того, різні типи лігандів впливають на клітинне поглинання та токсичність квантових точок, що наголошує на необхідності ретельного підбору лігандів для специфічних біомедичних застосувань [13].

Покриття поверхні КТ є вирішальним чинником взаємодії з клітинами і, отже, впливає їх інтерналізацію. Гідрофільні КТ можуть мати нейтральний, катіонний або аніонний поверхневий заряд, і було продемонстровано, що катіонні наночастки засвоюються більш ефективно, ніж інші. Це з більш високим спорідненістю катіонних КТ до негативно зарядженої клітинної мембрани. Катіонні покриття можна отримати з використанням позитивно

заряджених полімерів, пептидів чи інших лігандів. Позитивні заряди в основному виходять з використанням залишків, що містять аміно. Крім того, зв'язування дисульфідного містка з катіонним полімером покращує швидкість його поглинання. Ці дисульфідні групи можуть індукувати реакцію дисульфідного обміну з тіолсодержащими сполуками, присутніми на клітинній мембрані. Багато груп, що використовують катіонні сполуки для внутрішньоклітинної доставки, повідомили, що відбувається вихід з ендосом. Було висловлено припущення, що речовини, що містять аміно, потрапляючи в кислі ендосоми, можуть протонуватися, діючи як основа [80]. Це явище призведе до зниження кислотності ендосом, що призведе до збільшення осмолярності ендосом та подальшого вивільнення їхнього вантажу в цитозоль. Цей ефект отримав назву "ефект протонної губки". Однак цей вихід із ендосом досі залишається спірним. Катіонні системи також пов'язані з цитотоксичністю, такою як пошкодження мітохондрій і апоптоз, тоді як повідомлення про аніонні наночастки показали менш токсичні ефекти на клітини.

Обговорювані аспекти наочно демонструють, що з синтезі квантових точок (КТ) і виборі їх типу потрібно враховувати низку чинників, що з їх майбутнім використанням. Кожен тип КТ має свої унікальні властивості, починаючи від рівня токсичності до характеристик флуоресценції, які можуть бути покращені, так і погіршені в залежності від вибору оболонки та лігандів. Це робить вибір структури нанокон'югату критично важливим, оскільки він є компромісом між ефективністю дії КТ та їх безпекою для біомедичних застосувань. Тому для досягнення оптимального результату важливо ретельно підходити до кожного етапу синтезу та модифікації КТ, з урахуванням кінцевої мети їх використання, чи то діагностика, лікування чи дослідження в галузі нейробиології. Таким чином, глибоке розуміння взаємозв'язків між структурою, властивостями та біосумісністю КТ відкриває шлях до створення більш безпечних та ефективних інструментів для медичної науки.

ВИСНОВКИ

На сьогоднішній день квантові точки (КТ) демонструють значні перспективи в галузі нейровізуалізації та відстеження електричної активності нейронів у живих організмах. Їхні унікальні властивості, такі як висока фотостабільність і гнучке налагодження люмінесценції, роблять їх багатообіцяючими кандидатами для використання. Однак, незважаючи на потенціал, перед широким впровадженням стоять серйозні виклики.

1. Однією з ключових проблем є визначення найбільш ефективної структури наночастинок, яка б не завдавала шкоди організму і мала б мінімальну цитотоксичність. Важливо, щоб КТ були безпечними для біологічних систем, що потребує ретельного проектування їх хімічного складу, покриття та функціональності. Крім того, необхідне детальне калібрування КТ для їх ефективного використання в біологічних середовищах, оскільки поточні дослідження не дають повної ясності щодо їхньої поведінки в живих організмах.

2. Існуючі експерименти показують, що КТ можуть успішно відстежувати мембранні потенціали нейронів, проте до розуміння механізмів взаємодії з біологічними структурами ще далеко. Це включає вивчення їх взаємодії з різними клітинними компонентами, а також вплив на клітинні функції і їх загальну життєздатність.

3. Незважаючи на ці перешкоди, квантові точки вже довели свою значущість у наукових дослідженнях, викликаючи дедалі більший інтерес вчених. Їхній потенціал у нейровізуалізації та моніторингу нейронної активності є новим напрямком у нейронауці та медичній візуалізації, що може призвести до нових відкриттів та покращення діагностичних методів. Отже, подальші дослідження та розробки в цій галузі можуть відіграти ключову роль у реалізації повного потенціалу квантових точок у медицині та біотехнологіях.

СПИСОК ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

- 1 18F-FDG PET in parkinsonism: differential diagnosis and evaluation of cognitive impairment / P. T. Meyer et al. *Journal of nuclear medicine*. 2017. Vol. 58, no. 12. P. 1888–1898. URL: <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.186403> (date of access: 06.12.2023).
- 2 Abnormal intrinsic and extrinsic connectivity within the magnetic mismatch negativity brain network in schizophrenia: a preliminary study / D. Dima et al. *Schizophrenia research*. 2012. Vol. 135, no. 1-3. P. 23–27. URL: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2011.12.024> (date of access: 06.12.2023).
- 3 A brain–spine interface alleviating gait deficits after spinal cord injury in primates / M. Capogrosso et al. *Nature*. 2016. Vol. 539, no. 7628. P. 284–288. URL: <https://doi.org/10.1038/nature20118> (date of access: 06.12.2023).
- 4 A brief review of non-invasive brain imaging technologies and the near-infrared optical bioimaging / B. Kim et al. *Applied microscopy*. 2021. Vol. 51, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s42649-021-00058-7> (date of access: 06.12.2023).
- 5 All-Optical detection of neuronal membrane depolarization in live cells using colloidal quantum dots / M. Caglar et al. *Nano letters*. 2019. Vol. 19, no. 12. P. 8539–8549. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b03026> (date of access: 06.12.2023).
- 6 A macrophage uptaking near-infrared chemical probe CDnir7 for in vivo imaging of inflammation / N.-Y. Kang et al. *Chemical communications*. 2014. Vol. 50, no. 50. P. 6589. URL: <https://doi.org/10.1039/c4cc02038c> (date of access: 06.12.2023).
- 7 Amyloid-PET and 18F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias / G. Chételat et al. *The lancet neurology*. 2020. Vol. 19, no. 11. P. 951–962. URL: [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(20\)30314-8](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(20)30314-8) (date of access: 06.12.2023).

- 8 Angelovski G., Tóth É. Strategies for sensing neurotransmitters with responsive MRI contrast agents. *Chemical society reviews*. 2017. Vol. 46, no. 2. P. 324–336. URL: <https://doi.org/10.1039/c6cs00154h> (date of access: 06.12.2023).
- 9 Asanuma H., Arnold A., Zarzecki P. Further study on the excitation of pyramidal tract cells by intracortical microstimulation. *Experimental brain research*. 1976. Vol. 26, no. 5. URL: <https://doi.org/10.1007/bf00238820> (date of access: 06.12.2023).
- 10 ASD-DiagNet: a hybrid learning approach for detection of autism spectrum disorder using fmri data / T. Eslami et al. *Frontiers in neuroinformatics*. 2019. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fninf.2019.00070> (date of access: 06.12.2023).
- 11 Barth A. L. Visualizing circuits and systems using transgenic reporters of neural activity. *Current opinion in neurobiology*. 2007. Vol. 17, no. 5. P. 567–571. URL: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.10.003> (date of access: 06.12.2023).
- 12 Barth A. L. Visualizing circuits and systems using transgenic reporters of neural activity. *Current opinion in neurobiology*. 2007. Vol. 17, no. 5. P. 567–571. URL: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.10.003> (date of access: 06.12.2023).
- 13 Bezanilla F. How membrane proteins sense voltage. *Nature reviews molecular cell biology*. 2008. Vol. 9, no. 4. P. 323–332. URL: <https://doi.org/10.1038/nrm2376> (date of access: 06.12.2023).
- 14 Bhattacharya P., Bimberg D., Arakawa Y. Special issue on optoelectronic devices based on quantum dots. *Proceedings of the IEEE*. 2007. Vol. 95, no. 9. P. 1718–1722. URL: <https://doi.org/10.1109/jproc.2007.900896> (date of access: 06.12.2023).
- 15 ‘Braille’ reading by a blind volunteer by visual cortex stimulation / W. H. Dobbins et al. *Nature*. 1976. Vol. 259, no. 5539. P. 111–112. URL: <https://doi.org/10.1038/259111a0> (date of access: 06.12.2023).
- 16 Brain imaging in the assessment for epilepsy surgery / J. S. Duncan et al. *The lancet neurology*. 2016. Vol. 15, no. 4. P. 420–433.

- URL: [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)00383-x](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(15)00383-x) (date of access: 06.12.2023).
- 17 Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. / S. Ogawa et al. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1990. Vol. 87, no. 24. P. 9868–9872. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9868> (date of access: 06.12.2023).
 - 18 Brain systems for encoding and retrieval of auditory–verbal memory. An in vivo study in humans / P. C. Fletcher et al. *Brain*. 1995. Vol. 118, no. 2. P. 401–416. URL: <https://doi.org/10.1093/brain/118.2.401> (date of access: 06.12.2023).
 - 19 Bullmore E., Sporns O. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature reviews neuroscience*. 2009. Vol. 10, no. 3. P. 186–198. URL: <https://doi.org/10.1038/nrn2575> (date of access: 06.12.2023).
 - 20 Cell imaging using two-photon excited cds fluorescent quantum dots working within the biological window / N. Zhang et al. *Nanomaterials*. 2019. Vol. 9, no. 3. P. 369. URL: <https://doi.org/10.3390/nano9030369> (date of access: 06.12.2023).
 - 21 Characterization of photoinduced electron tunneling in gold/sam/q-cdse systems by time-resolved photoelectrochemistry / E. P. A. M. Bakkers et al. *The journal of physical chemistry B*. 2000. Vol. 104, no. 31. P. 7266–7272. URL: <https://doi.org/10.1021/jp000286u> (date of access: 06.12.2023).
 - 22 Chemistry of MRI contrast agents: current challenges and new frontiers / J. Wahsner et al. *Chemical reviews*. 2018. Vol. 119, no. 2. P. 957–1057. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363> (date of access: 06.12.2023).
 - 23 Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems / F. Zhang et al. *Nature reviews neuroscience*. 2007. Vol. 8, no. 8. P. 577–581. URL: <https://doi.org/10.1038/nrn2192> (date of access: 06.12.2023).

- 24 Clinical applications of diffusion weighted imaging in neuroradiology / M. Drake-Pérez et al. *Insights into Imaging*. 2018. Vol. 9, no. 4. P. 535–547. URL: <https://doi.org/10.1007/s13244-018-0624-3> (date of access: 06.12.2023).
- 25 Cohen D. Magnetoencephalography: detection of the brain's electrical activity with a superconducting magnetometer. *Science*. 1972. Vol. 175, no. 4022. P. 664–666. URL: <https://doi.org/10.1126/science.175.4022.664> (date of access: 06.12.2023).
- 26 Cohen D. Magnetoencephalography: evidence of magnetic fields produced by alpha-rhythm currents. *Science*. 1968. Vol. 161, no. 3843. P. 784–786. URL: <https://doi.org/10.1126/science.161.3843.784> (date of access: 06.12.2023).
- 27 Comparing MEG and EEG in detecting the ~20-Hz rhythm modulation to tactile and proprioceptive stimulation / M. Illman et al. *NeuroImage*. 2020. Vol. 215. P. 116804. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.116804> (date of access: 06.12.2023).
- 28 Cousin M. Use of FM1-43 and other derivatives to investigate neuronal function. *Current protocols in neuroscience*. 2003. Vol. 23, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0206s23> (date of access: 06.12.2023).
- 29 Cox D. D., Savoy R. L. Functional magnetic resonance imaging (fMRI) “brain reading”: detecting and classifying distributed patterns of fMRI activity in human visual cortex. *NeuroImage*. 2003. Vol. 19, no. 2. P. 261–270. URL: [https://doi.org/10.1016/s1053-8119\(03\)00049-1](https://doi.org/10.1016/s1053-8119(03)00049-1) (date of access: 06.12.2023).
- 30 Denk W., Strickler J., Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990. Vol. 248, no. 4951. P. 73–76. URL: <https://doi.org/10.1126/science.2321027> (date of access: 06.12.2023).
- 31 Designing peptide nanoparticles for efficient brain delivery / A. Duro-Castano et al. *Advanced drug delivery reviews*. 2020. Vol. 160. P. 52–77. URL: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.10.001> (date of access: 06.12.2023).

- 32 Design of portable electrochemiluminescence sensing systems for point-of-care-testing applications / S. Xia et al. *Chinese chemical letters*. 2022. P. 107799. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2022.107799> (date of access: 06.12.2023).
- 33 Directed evolution of a magnetic resonance imaging contrast agent for noninvasive imaging of dopamine / M. G. Shapiro et al. *Nature biotechnology*. 2010. Vol. 28, no. 3. P. 264–270. URL: <https://doi.org/10.1038/nbt.1609> (date of access: 06.12.2023).
- 34 Distribution and binding of ¹⁸F-labeled and ¹²⁵I-labeled analogues of ACI-80, a prospective molecular imaging biomarker of disease: A whole hemisphere post mortem autoradiography study in human brains obtained from Alzheimer's disease patients / B. Gulyás et al. *Neurochemistry international*. 2012. Vol. 60, no. 2. P. 153–162. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.10.010> (date of access: 06.12.2023).
- 35 Electric field modulation of semiconductor quantum dot photoluminescence: insights into the design of robust voltage-sensitive cellular imaging probes / C. E. Rowland et al. *Nano letters*. 2015. Vol. 15, no. 10. P. 6848–6854. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02725> (date of access: 06.12.2023).
- 36 Electronic characterization and photocatalytic properties of CdS/TiO₂ semiconductor composite / J. C. Tristão et al. *Journal of photochemistry and photobiology A: chemistry*. 2006. Vol. 181, no. 2-3. P. 152–157. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.11.018> (date of access: 06.12.2023).
- 37 Emerging imaging methods to study whole-brain function in rodent models / M. Markicevic et al. *Translational psychiatry*. 2021. Vol. 11, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01575-5> (date of access: 06.12.2023).
- 38 Face encoding and recognition in the human brain. / J. V. Haxby et al. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1996. Vol. 93, no. 2.

- P. 922–927. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.922> (date of access: 06.12.2023).
- 39 Feel your reach: an eeg-based framework to continuously detect goal-directed movements and error processing to gate kinesthetic feedback informed artificial arm control / G. R. Müller-Putz et al. *Frontiers in human neuroscience*. 2022. Vol. 16. URL: <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.841312> (date of access: 06.12.2023).
- 40 FMRI activity patterns in human LOC carry information about object exemplars within category / E. Eger et al. *Journal of cognitive neuroscience*. 2008. Vol. 20, no. 2. P. 356–370. URL: <https://doi.org/10.1162/jocn.2008.20019> (date of access: 06.12.2023).
- 41 Folate-Receptor-Mediated delivery of inorganic quantum dots for bioimaging using confocal and two-photon microscopy / D. J. Bharali et al. *Journal of the american chemical society*. 2005. Vol. 127, no. 32. P. 11364–11371. URL: <https://doi.org/10.1021/ja051455x> (date of access: 06.12.2023).
- 42 Georgopoulos A., Schwartz A., Kettner R. Neuronal population coding of movement direction. *Science*. 1986. Vol. 233, no. 4771. P. 1416–1419. URL: <https://doi.org/10.1126/science.3749885> (date of access: 06.12.2023).
- 43 Goldsmith C. J., Städele C., Stein W. Optical imaging of neuronal activity and visualization of fine neural structures in non-desheathed nervous systems. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 7. P. e103459. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103459> (date of access: 06.12.2023).
- 44 Guide to research techniques in neuroscience. Elsevier, 2022. URL: <https://doi.org/10.1016/c2018-0-04205-x> (date of access: 06.12.2023).
- 45 Haxby J. V. Multivariate pattern analysis of fMRI: the early beginnings. *NeuroImage*. 2012. Vol. 62, no. 2. P. 852–855. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.016> (date of access: 06.12.2023).

- 46 High-Density EEG in current clinical practice and opportunities for the future / S. M. Stoyell et al. *Journal of clinical neurophysiology*. 2021. Vol. 38, no. 2. P. 112–123. URL: <https://doi.org/10.1097/wnp.0000000000000807> (date of access: 06.12.2023).
- 47 High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments / H. Dana et al. *Nature methods*. 2019. Vol. 16, no. 7. P. 649–657. URL: <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0435-6> (date of access: 06.12.2023).
- 48 Hires S. A., Tian L., Looger L. L. Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators. *Brain cell biology*. 2008. Vol. 36, no. 1-4. P. 69–86. URL: <https://doi.org/10.1007/s11068-008-9029-4> (date of access: 06.12.2023).
- 49 How much is enough—Can resting state fMRI provide a demarcation for neurosurgical resection in glioma? / D. C. Ghinda et al. *Neuroscience & biobehavioral reviews*. 2018. Vol. 84. P. 245–261. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.11.019> (date of access: 06.12.2023).
- 50 Identifying natural images from human brain activity / K. N. Kay et al. *Nature*. 2008. Vol. 452, no. 7185. P. 352–355. URL: <https://doi.org/10.1038/nature06713> (date of access: 06.12.2023).
- 51 Illuminating the brain: advances and perspectives in optoelectronics for neural activity monitoring and modulation / S. Xu et al. *Advanced materials*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1002/adma.202303267> (date of access: 06.12.2023).
- 52 Introduction of green fluorescent protein (GFP) into hippocampal neurons through viral infection / R. Malinow et al. *Cold spring harbor protocols*. 2010. Vol. 2010, no. 4. P. pdb.prot5406. URL: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5406> (date of access: 06.12.2023).
- 53 Jee S. Brain oscillations and their implications for neurorehabilitation. *Brain & neurorehabilitation*. 2021. Vol. 14, no. 1. URL: <https://doi.org/10.12786/bn.2021.14.e7> (date of access: 06.12.2023).

- 54 João Pedro R., De-Simone S. G. Electro sensors based on quantum dots and their applications in diagnostic medicine. *New advances in biosensing*. 2023. URL: <https://www.intechopen.com/online-first/87374> (date of access: 06.12.2023).
- 55 Jun Y., Lee J., Cheon J. Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. *Angewandte chemie international edition*. 2008. Vol. 47, no. 28. P. 5122–5135. URL: <https://doi.org/10.1002/anie.200701674> (date of access: 06.12.2023).
- 56 Kable J. W., Glimcher P. W. The neural correlates of subjective value during intertemporal choice. *Nature neuroscience*. 2007. Vol. 10, no. 12. P. 1625–1633. URL: <https://doi.org/10.1038/nn2007> (date of access: 06.12.2023).
- 57 Kamitani Y., Tong F. Decoding the visual and subjective contents of the human brain. *Nature neuroscience*. 2005. Vol. 8, no. 5. P. 679–685. URL: <https://doi.org/10.1038/nn1444> (date of access: 06.12.2023).
- 58 Kanai R., Walsh V., Tseng C.-h. Subjective discriminability of invisibility: a framework for distinguishing perceptual and attentional failures of awareness. *Consciousness and cognition*. 2010. Vol. 19, no. 4. P. 1045–1057. URL: <https://doi.org/10.1016/j.concog.2010.06.003> (date of access: 06.12.2023).
- 59 Kanber Y., Pusztaszeri M., Auger M. Immunocytochemistry for diagnostic cytopathology—A practical guide. *Cytopathology*. 2021. Vol. 32, no. 5. P. 562–587. URL: <https://doi.org/10.1111/cyt.12993> (date of access: 06.12.2023).
- 60 Kastner S. Mechanisms of directed attention in the human extrastriate cortex as revealed by functional MRI. *Science*. 1998. Vol. 282, no. 5386. P. 108–111. URL: <https://doi.org/10.1126/science.282.5386.108> (date of access: 06.12.2023).
- 61 Kaul C., Rees G., Ishai A. The gender of face stimuli is represented in multiple regions in the human brain. *Frontiers in human neuroscience*. 2011. Vol. 4. URL: <https://doi.org/10.3389/fnhum.2010.00238> (date of access: 06.12.2023).

- 62 Kiernan J. A. Histological & histochemical methods: theory and practice. Pergamon, 1989. 433 p.
- 63 Li N., Jasanoff A. Local and global consequences of reward-evoked striatal dopamine release. *Nature*. 2020. Vol. 580, no. 7802. P. 239–244. URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2158-3> (date of access: 06.12.2023).
- 64 Loriette C., Amengual J. L., Ben Hamed S. Beyond the brain-computer interface: decoding brain activity as a tool to understand neuronal mechanisms subtending cognition and behavior. *Frontiers in neuroscience*. 2022. Vol. 16. URL: <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.811736> (date of access: 06.12.2023).
- 65 Magnetoencephalography in neurosurgery / J. P. Mäkelä et al. *Neurosurgery*. 2006. Vol. 59, no. 3. P. 493–511. URL: <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000232762.63508.11> (date of access: 06.12.2023).
- 66 Manganese oxide nanomaterials: synthesis, properties, and theranostic applications / B. Ding et al. *Advanced materials*. 2020. Vol. 32, no. 10. P. 1905823. URL: <https://doi.org/10.1002/adma.201905823> (date of access: 06.12.2023).
- 67 Marshall J. D., Schnitzer M. J. Optical Strategies for Sensing Neuronal Voltage Using Quantum Dots and Other Semiconductor Nanocrystals. *ACS Nano*. 2013. Vol. 7, no. 5. P. 4601–4609. URL: <https://doi.org/10.1021/nn401410k> (date of access: 06.12.2023).
- 68 McINTOSH A. R. Understanding neural interactions in learning and memory using functional neuroimaging. *Annals of the new york academy of sciences*. 1998. Vol. 855, no. 1 OLFACTION AND. P. 556–571. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10625.x> (date of access: 06.12.2023).
- 69 Mckhann G. M. Cortical control of a prosthetic arm for self-feeding. *Neurosurgery*. 2008. Vol. 63, no. 2. P. N8–N9. URL: <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000335797.80384.06> (date of access: 06.12.2023).

- 70 MEG sensor selection for neural speech decoding / D. Dash et al. *IEEE access*. 2020. Vol. 8. P. 182320–182337. URL: <https://doi.org/10.1109/access.2020.3028831> (date of access: 06.12.2023).
- 71 Methods for intracellular delivery of quantum dots / S. O. Souza et al. *Topics in current chemistry*. 2021. Vol. 379, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1007/s41061-020-00313-7> (date of access: 06.12.2023).
- 72 MRI contrast agents: Classification and application (Review) / Y.-D. Xiao et al. *International journal of molecular medicine*. 2016. Vol. 38, no. 5. P. 1319–1326. URL: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2744> (date of access: 06.12.2023).
- 73 Multiscale pattern analysis of orientation-selective activity in the primary visual cortex / J. D. Swisher et al. *Journal of neuroscience*. 2010. Vol. 30, no. 1. P. 325–330. URL: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4811-09.2010> (date of access: 06.12.2023).
- 74 Musk E. An integrated brain-machine interface platform with thousands of channels. *Journal of medical internet research*. 2019. Vol. 21, no. 10. P. e16194. URL: <https://doi.org/10.2196/16194> (date of access: 06.12.2023).
- 75 Neural stem cell isolation from the whole mouse brain using the novel FABP7-binding fluorescent dye, CDr3 / C. Leong et al. *Stem cell research*. 2013. Vol. 11, no. 3. P. 1314–1322. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.002> (date of access: 06.12.2023).
- 76 Neuroimaging of consciousness / ed. by A. E. Cavanna et al. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013. URL: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37580-4> (date of access: 06.12.2023).
- 77 Neurotransmitter-Responsive Nanosensors for T2-Weighted Magnetic Resonance Imaging / V. Hsieh et al. *Journal of the American Chemical Society*. 2019. Vol. 141, no. 40. P. 15751–15754. URL: <https://doi.org/10.1021/jacs.9b08744> (date of access: 06.12.2023).

- 78 Nirmal M., Brus L. Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals. *Accounts of chemical research*. 1999. Vol. 32, no. 5. P. 407–414. URL: <https://doi.org/10.1021/ar9700320> (date of access: 06.12.2023).
- 79 NIR-quantum dots in biomedical imaging and their future / H. M. Gil et al. *IScience*. 2021. Vol. 24, no. 3. P. 102189. URL: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102189> (date of access: 06.12.2023).
- 80 Noradrenergically mediated plasticity in a human attentional neuronal network / J. T. Coull et al. *NeuroImage*. 1999. Vol. 10, no. 6. P. 705–715. URL: <https://doi.org/10.1006/nimg.1999.0513> (date of access: 06.12.2023).
- 81 Objective documentation of traumatic brain injury subsequent to mild head trauma / J. D. Lewine et al. *Journal of head trauma rehabilitation*. 2007. Vol. 22, no. 3. P. 141–155. URL: <https://doi.org/10.1097/01.htr.0000271115.29954.27> (date of access: 06.12.2023).
- 82 Paetau R. Magnetoencephalography in pediatric neuroimaging. *Developmental science*. 2002. Vol. 5, no. 3. P. 361–370. URL: <https://doi.org/10.1111/1467-7687.00375> (date of access: 06.12.2023).
- 83 Planning and spatial working memory: a positron emission tomography study in humans / A. M. Owen et al. *European journal of neuroscience*. 1996. Vol. 8, no. 2. P. 353–364. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01219.x> (date of access: 06.12.2023).
- 84 Quantum dot cellular uptake and toxicity in the developing brain: implications for use as imaging probes / M. Zhang et al. *Nanoscale advances*. 2019. Vol. 1, no. 9. P. 3424–3442. URL: <https://doi.org/10.1039/c9na00334g> (date of access: 06.12.2023).
- 85 Quantum dots: the cutting-edge nanotheranostics in brain cancer management / P. Chakraborty et al. *Journal of controlled release*. 2022. Vol. 350. P. 698–715. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.08.047> (date of access: 06.12.2023).

- 86 Rapid voltage sensing with single nanorods via the quantum confined stark effect / O. Bar-Elli et al. *ACS photonics*. 2018. Vol. 5, no. 7. P. 2860–2867. URL: <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.8b00206> (date of access: 06.12.2023).
- 87 Recent developments in multimodality fluorescence imaging probes / J. Zhao et al. *Acta pharmaceutica sinica B*. 2018. Vol. 8, no. 3. P. 320–338. URL: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.010> (date of access: 06.12.2023).
- 88 Reduced visualization of cerebral infarction on diffusion-weighted images with short diffusion times / A. Boonrod et al. *Neuroradiology*. 2018. Vol. 60, no. 9. P. 979–982. URL: <https://doi.org/10.1007/s00234-018-2065-6> (date of access: 06.12.2023).
- 89 Robust transcoding sensory information with neural spikes / Q. Xu et al. *IEEE transactions on neural networks and learning systems*. 2021. P. 1–12. URL: <https://doi.org/10.1109/tnnls.2021.3107449> (date of access: 06.12.2023).
- 90 Signal transduction pathway activity compensates dopamine D2/D3 receptor density changes in Parkinson's disease: a preliminary comparative human brain receptor autoradiography study with [3H]raclopride and [35S]GTP γ S / S. Farkas та ін. *Brain research*. 2012. T. 1453. С. 56–63. URL: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.014> (дата звернення: 06.12.2023).
- 91 Size-Dependent spectroscopy of inp quantum dots / O. I. Mićić et al. *The journal of physical chemistry B*. 1997. Vol. 101, no. 25. P. 4904–4912. URL: <https://doi.org/10.1021/jp9704731> (date of access: 06.12.2023).
- 92 Sparse estimation automatically selects voxels relevant for the decoding of fMRI activity patterns / O. Yamashita et al. *NeuroImage*. 2008. Vol. 42, no. 4. P. 1414–1429. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.05.050> (date of access: 06.12.2023).
- 93 Spontaneous low frequency BOLD signal variations from resting-state fMRI are decreased in Alzheimer disease / S. Kazemifar et al. *Plos one*. 2017. Vol. 12,

- no. 6. P. e0178529. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178529> (date of access: 06.12.2023).
- 94 Stable aqueous znO@polymer core-shell nanoparticles with tunable photoluminescence and their application in cell imaging / H.-M. Xiong et al. *Journal of the american chemical society*. 2008. Vol. 130, no. 24. P. 7522–7523. URL: <https://doi.org/10.1021/ja800999u> (date of access: 06.12.2023).
- 95 Stoney S. D., Machne X. Mechanisms of accommodation in different types of frog neurons. *Journal of general physiology*. 1969. Vol. 53, no. 2. P. 248–262. URL: <https://doi.org/10.1085/jgp.53.2.248> (date of access: 06.12.2023).
- 96 Structure-Relaxivity relationships of magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging / Z. Zhou et al. *Advanced materials*. 2019. Vol. 31, no. 8. P. 1804567. URL: <https://doi.org/10.1002/adma.201804567> (date of access: 06.12.2023).
- 97 Tanaka N. K., Dye L., Stopfer M. Dual-labeling method for electron microscopy to characterize synaptic connectivity using genetically encoded fluorescent reporters in Drosophila. *Journal of neuroscience methods*. 2011. Vol. 194, no. 2. P. 312–315. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.10.020> (date of access: 06.12.2023).
- 98 The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex / A. Karni et al. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1998. Vol. 95, no. 3. P. 861–868. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.861> (date of access: 06.12.2023).
- 99 The additional value of 18F-FDG PET and MRI in patients with glioma: a review of the literature from 2015 to 2020 / N. Quartuccio et al. *Diagnostics*. 2020. Vol. 10, no. 6. P. 357. URL: <https://doi.org/10.3390/diagnostics10060357> (date of access: 06.12.2023).
- 100 Tong F., Pratte M. S. Decoding patterns of human brain activity. *Annual review of psychology*. 2012. Vol. 63, no. 1. P. 483–509. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-120710-100412> (date of access: 06.12.2023).

- 101 Visualizing alzheimer's disease mouse brain with multispectral optoacoustic tomography using a fluorescent probe, cdnir7 / S.-J. Park et al. *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48329-4> (date of access: 06.12.2023).
- 102 Wokosin D. L., Loughrey C. M., Smith G. L. Characterization of a range of fura dyes with two-photon excitation. *Biophysical journal*. 2004. Vol. 86, no. 3. P. 1726–1738. URL: [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74241-1](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74241-1) (date of access: 06.12.2023).
- 103 Yen C., Lin C.-L., Chiang M.-C. Exploring the frontiers of neuroimaging: a review of recent advances in understanding brain functioning and disorders. *Life*. 2023. Vol. 13, no. 7. P. 1472. URL: <https://doi.org/10.3390/life13071472> (date of access: 06.12.2023).
- 104 Yuste R. Imaging in neuroscience and development: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. 700 p.
- 105 Zafar R., Dass S. C., Malik A. S. Electroencephalogram-based decoding cognitive states using convolutional neural network and likelihood ratio based score fusion. *Plos one*. 2017. Vol. 12, no. 5. P. e0178410. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178410> (date of access: 06.12.2023).
- 106 Zelickson B. D., Zelickson A. S. Current concepts in electron microscopy. *International journal of dermatology*. 1993. Vol. 32, no. 4. P. 232–242. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1993.tb04260.x> (date of access: 06.12.2023).