На правах рукописи

Агрба Екатерина Александровна

СЕЛЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГИППОКАМПА ПРИ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

03.03.01 — физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород — 2018

Работа выполнена на кафедре нейротехнологий Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» и в отделе молекулярно-клеточных технологий ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:	доктор биологических наук, профессор, **Мухина Ирина Васильевна**
Официальные оппоненты:	**Кичигина Валентина Федоровна**, доктор биологических наук, лаборатория системной организации нейронов, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, заведующий лабораторией
	Солнцева Елена Ивановна, доктор биологических наук, лаборатория функциональной синаптологии, отдел исследований мозга, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», ведущий научный сотрудник
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П. К. Анохина»

Защита состоится: «27» сентября 2018 года в 15:00 на заседании диссертационного совета Д 212.166.21 при ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского и на сайте: https://diss.unn.ru/files/2018/842/diss-Agrba-842.pdf

Автореферат разослан «____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук Соколова Е. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы. Исследование функций мозга является одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений биологии. К фундаментальным проблемам современной нейрофизиологии относятся изучение колебательных процессов в нейронных системах мозга и выявление принципов получения, обработки, преобразования и передачи информации в мозге, а также соответствующие преобразования мозга на клеточно-сетевом и структурно-функциональном уровнях. Неизменный интерес к проблемам появления, распространения и обработки информации в мозге обусловлен не только стремлением получить новые фундаментальные знания о функциях мозга, но и перспективой создать искусственные интеллектуальные системы на основе закономерностей работы биологических нейронных сетей.

Для исследования процессов создания и распространения сигналов в нейронных сетях могут быть использованы мультиэлектродные матрицы, позволяющие осуществлять многоканальное детектирование биоэлектрической активности (Thomas, 1972; Pine, 1980; Wheeler, 1986; Ben-Jacob, 2008; Maccione, 2010 и Amin, 2016), как *in vivo*, так и *in vitro*. Мультиэлектродные матрицы позволяют проследить распространение импульсов в нейронных сетях, визуализируя пространственное и морфологическое строение нейронной сети. Более того, в ряде случаев мультиэлектродные матрицы позволяют исследовать активность одной клетки или процесс передачи информации как на клеточном, так и на субклеточном уровнях синхронно регистрируя паттерны активности (пространственно-временное распределение активности в сети) нейронной сети. Такой подход позволяет экспериментально изучать синаптическую пластичность и обработку информации в нейросетях, а также исследовать отклики на различные внешние стимулы, что позволит разрабатывать новые модели нейросетей, сравнивая их поведение в соответствии с экспериментально получаемой информацией.

В качестве экспериментальных моделей сетевой динамики последнее десятилетие активно используются культуры диссоциированных клеток мозга (Wagenaar, 2006; Pulvermüller, 2009; DeMarse, 2001; Mendis, 2016, Lazarenko, 2018). Нейроны, соединенные синаптическими связями, способны генерировать паттерны биоэлектрической активности, которые являются одним из способов кодирования информации (Abeles, 1991; Kandel, 2000; Николс, 2003; Poli, 2016). Многими авторами (Martinoia, 2005; Su, 2006; Boehler, 2007; Jimbo, 2007; Brewer, 2008; Spencer, 2012; Muthmann, 2015; Huang, 2017) отмечается, что паттерны спонтанной активности нейронной сети изменяются в процессе развития культуры. Механизмы этих изменений к настоящему времени до конца не изучены. В последнее время нейронные сети на мультиэлектродной матрице активно используются для исследования механизмов обучения (Pimashkin, 2013; Chiolerio, 2017), памяти (Massobrio, 2015, Pasquale, 2017), адаптивного управления (Massobrio, 2015, Scarsi, 2017).

Таким образом, можно отметить большое количество работ, посвященных изучению сетевой сигнализации, косвенно свидетельствующее об актуальности данного вопроса. В то же время, вопросы сетевой пластичности и механизмов информационных функций нейронных сетей, таких как хранение и преобразование информации, остаются слабо изученными.

Цели работы и постановка задачи

Целью данной работы явилось выявление и характеристика в составе нейронных сетей групп нейронов, обладающих свойством селективности в ответ на электрическую стимуляцию, а также изучение динамики селективных свойств нейронов в процессе развития первичной культуры гиппокампа *in vitro*.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Выявить критические периоды изменения спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей диссоциированных клеток гиппокампа по мере их развития *in vitro*;
2. Выявить наличие способности классифицировать внешний сигнал отдельными группами нейронов в составе нейронной сети при низкочастотной электрической стимуляции различных участков сети;
3. Разработать критерии оценки свойства селективности нейронов в составе нейронной сети первичных культур гиппокампа;
4. Изучить изменение свойства селективности нейронов в процессе развития первичных культур гиппокампа *in vitro*.

Научная новизна

В процессе длительного культивирования диссоциированных гиппокампальных клеток мышей линии *in vitro* выявлено три критических периода изменения спонтанной биоэлектрической активности, после 21–28 дня происходит стабилизации активности.

Впервые обнаружено свойство групп нейронов в локальной сети генерировать статистически различимые последовательности импульсов в ответ на низкочастотную электрическую стимуляцию участков нейронной сети, названное селективностью. Выявлено, что вызванное низкочастотной электрической стимуляцией направление распространения сигнала в локальной сети нейронов зависит от стимулируемого участка сети. Взаимосвязь между стимулируемым электродом и параметрами вызванного ответа указывает на способность простейшей нейронной сети *in vitro* выполнять информационную функцию — классифицировать внешний сигнал.

Для оценки селективности нейронов в качестве численных характеристик ответа нейронной сети было выбрано количество спайков в вызванных сетевых пачках, отражающих активность вовлечения нейронов в вызванную активность, и времена возникновения первых синаптически вызванных спайков после стимула, отражающих путь распространения сигнала по нейронным сетям от источника стимуляции.

Селективность является динамическим свойством группы нейронов в составе локальной сети и меняется в зависимости от периода развития первичной культуры гиппокампа *in vitro*.

Основные научные положения

1. Развитие культур диссоциированных клеток гиппокампа можно разделить на 3 стадии по характеру регистрируемой спонтанной электрофизиологической активности нейронов в составе нейронных сетей — от отдельных спайков до сложной сетевой пачечной и суперпачечной активности (3–5-е, 14–16-е и 18–21-е сутки развития *in vitro*);
2. Отдельные группы нейронов первичной культуры гиппокампа обладают динамической селективностью к входному сигналу, поступающему с различных стимулируемых участков сети, т.е. способны классифицировать внешний сигнал;

3. Параметрами, характеризующими селективность нейронов в составе нейронной сети, являются общее количество спайков в сетевой пачке и время возникновения первых вызванных спайков после стимула в вызванной сетевой пачке.

Научная и практическая значимость

Выявленные закономерности функционирования нейронных сетей могут быть использованы при изучении механизмов регуляции сетевой активностью при действии внешних факторов. Результаты, связанные с выявлением селективности нейронов в простейшей сети, позволят разработать новые модели искусственных нейронных сетей, что, в свою очередь, приведет к созданию нейрогибридных технологий управления нейронными сетями мозга, обеспечивающих сопряжение нейронных структур с электронными системами с целью замещения утраченных функций мозга в результате травм либо нейродегенеративных заболеваний.

Предложенная в работе методика поиска селективных нейронов может быть использована для создания биоинженерных технологий «мозг-на-чипе» с целью изучения и скрининга новых лекарственных препаратов, влияющих на нейрогенез, обучение, память в процессе доклинических исследований. Разработанные теоретические и методические подходы изучения функционирования простейших нейронных сетей могут быть использованы в учебном процессе как в качестве лабораторного практикума, так и лекционного курса для студентов и аспирантов биомедицинских специальностей.

Личный вклад соискателя

При работе над диссертацией автором было проанализировано 185 источников отечественной и зарубежной литературы, лично выполнены экспериментальные исследования, обработка и анализ полученных данных, подготовлены научные статьи и другие публикации. Автор неоднократно выступала с докладами на международных, всероссийских и региональных конференциях и симпозиумах. Выбор темы исследования, постановка задач и обсуждение полученных результатов проводились совместно с научным руководителем.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены:

на 15 международных конференциях — «Topical Problems of Biophotonics — 2013» (Нижний Новгород, 2013), 8th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays (Ройтлинген, Германия, 2012), «На пути к нейроморфному интеллекту: эксперименты, модели и технологии» (Нижний Новгород, 2011), 8-th International Conference «Holoexpo-2011. Holography. Science and practice» (Минск, Республика Беларусь, 2011), «Topical Problems of Biophotonics — 2011» (Санкт-Петербург – Нижний Новгород, 2011), 15-я международная школа-конференция «Биология — наука 21 века» (Пущино, 2011), 18-я международная конференция «Ломоносов — 2011» (Москва, 2011), The Monte Verita' Workshop on the Frontiers in Neuroengineering (Аскона, Швейцария, 2010), 7th FENS forum of European Neuroscience (Amsterdam, 2010), 14-я международная школа-конференция «Биология — наука 21 века» (Пущино, 2010), 17-я международная конференция «Ломоносов — 2010» (Москва, 2010), «Topical Problems of Biophotonics — 2009» (Нижний Новгород, 2009), International Workshop on Nonlinear Dynamics in Biological Systems and Soft-matter Biophysics (Тайвань, 2009), 15-я международная конференция по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону, 2009), «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2009);

на 11 всероссийских конференциях — 4-й Съезд биофизиков России: симпозиум II «Физические основы физиологических процессов» (Нижний Новгород, 2012), 16-я научная школа «Нелинейные волны — 2012» (Нижний Новгород, 2012), Всероссийская конференция с международным участием «Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга» (Москва, 2010), 13-я Всероссийская научно-техническая конференция «Нейроинформатика — 2011» (Москва, 2011), Всероссийская школа «Нейротехнологии 2010. Биоэкономика, основанная на знаниях: политика инновационного пути развития биотехнологии» (Бекасово, Московская область, 2010), 21-й Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010), 3-й Всероссийский конгресс студентов и аспирантов-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия — 2010» (Нижний Новгород, 2010), 15-я научная школа «Нелинейные волны — 2010» (Нижний Новгород, 2010), Научная сессия НИЯУ МИФИ (Москва, 2010), Всероссийская конференция «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пущино, 2009), Всероссийская конференция «Нелинейная динамика в когнитивных исследованиях» (Нижний Новгород, 2009);

на 3 региональных конференциях — Форум молодых учёных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (Нижний Новгород, 2013), 17-я Нижегородская сессия молодых ученых (естественные, математические науки) (Нижний Новгород, 2012), 16-я Нижегородская сессия молодых ученых (естественные науки) (Нижний Новгород, 2011).

По материалам диссертационной работы опубликованы 5 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации результатов кандидатских диссертаций, и рецензируемых научных изданиях, входящих в международные системы цитирования, и 41 работе в научных журналах, материалах конференций, сборниках научных статей и методических пособиях.

Структура и объем работы

Диссертация традиционно изложена на 122 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, главы результатов исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Диссертационная работа иллюстрирована 28 рисунками, список литературы включает 185 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Методы исследования локальных нейронных сетей культур диссоциированных клеток мозга включали длительное культивирование дифференцированных клеток гиппокампа на мультиэлектродной матрице, стимуляцию и многоканальную регистрацию активности нейронных сетей, микроскопию в светлом поле, иммуноцитохимическое фенотипирование клеточного состава культуры диссоциированных клеток гиппокампа, фармакологический анализ вызванной сетевой пачки импульсов, математический анализ биоэлектрической активности нейронных сетей. Объектом исследования были первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных (E18) эмбрионов мышей линии CBA.

Многоэлектродная система MED64 (AlphaMed Sciences, Япония)

С целью регистрации основных электрофизиологических показателей работы нейронных сетей культивирование клеток проводилось на многоэлектродном зонде

системы MED64 (AlphaMed Sciences, Япония), который представляет собой электрофизиологический комплекс и состоит из усилителя, зонда и соединяющего устройства (коннектора). Зонд имеет стеклянное основание 50x50x0,7 мм с центральной цилиндрической камерой с диаметром 22 мм и высотой 5 мм, в центре которой на площади 1 $мм^2$ расположена 64-электродная матрица для записи спонтанной активности и электрической стимуляции нейронов. Квадратные микроэлектроды состоят из оптически прозрачного оксида индия (In_2O_3), легированного оксидом олова (SnO_2) (Indium tin oxide – ITO, 0,15 мкм), покрыты черной платиной и имеют размер каждой стороны 50 мкм. Межэлектродное расстояние в матрице составляет 100 мкм. Изолирующее покрытие полиакриламид покрывает дно зонда пленкой с толщиной 1,4 мкм. При регистрации электрической активности, амплитуда потенциала на электроде обратно пропорционально зависит от расстояния от этого электрода до продуцирующей потенциал клетки.

Первичные клеточные культуры

В исследовании использовались 37 первичных культур клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных (E18) эмбрионов мышей линии CBA. Все экспериментальные процедуры, содержание и уход за экспериментальными животными соответствовали Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»; Приказу Министерства здравоохранения и Российской Федерации от 15 августа 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»; Национальном стандарте РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и были согласованы с Этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России и комиссией по биоэтике при Центре доклинических исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

В первой серии экспериментов на 22 клеточных культурах диссоциированных клеток гиппокампа *in vitro* определялось изменение спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей, наблюдаемое в процессе развития. Во второй серии экспериментов 15 культур подвергались ежедневной низкочастотной электрической стимуляции для определения локализации групп нейронов в нейронной сети, обладающих свойством селективности. Также в процессе исследования проводилась оценка изменений селективности в процессе развития культур.

Для диссоциирования клеток ткань гиппокампа в течение 20 минут обрабатывалась 0.25 % раствором трипсина (Invitrogen 25200-056, США). Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде NBM1, содержащей 92,5 % NeurobasalTM (Invitrogen 21103-049, США), 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко К055, Россия), 2 % биоактивной добавки B27 (Invitrogen 17504-044, США) и 0,5 % L-глутамина (Invitrogen 25030-024, США). Затем диссоциированные клетки помещали для культивирования на мультиэлектродный зонд (MED64 AlphaMed Sciences, Япония), матрица которого была предварительно простерилизована и обработана полиэтиленимином (Sigma P3143, США), служащим опорным субстратом для клеток. Жизнеспособность культуры диссоциированных клеток гиппокампа поддерживалась в условиях инкубатора (Sanyo MCO-18AIC, Япония) в газовой смеси с 5 % CO_2 при температуре 35,5^{o}C. Культивирование клеток проходило в течение 52 суток *in vitro*.

Морфологические методы исследования

Микрофотографии культуры диссоциированных клеток гиппокампа получали в режиме светлого поля с помощью инвертированного микроскопа Leica DMIL HC

(Германия), об. x10, 20, 40, иммуноцитохимическое фенотипирование зрелых первичных культур гиппокампа проводили с использованием первичных антител к MAP-2 – microtubule associated protein, микротрубочкоассоциированному протеину, GFAP – glial fibrille acid protein – глиальному фибриллярному кислому белку. Ядра клеток маркировали с помощью флуоресцентного окрашивания ядерной ДНК 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Подготовленные пробы просматривались с помощью конфокального лазерного флуоресцентного микроскопа, LSM 880 (Zeiss, Германия) при увеличении объектива 20x. Для анализа полученных изображений использовали пакет программ ImageJ (Wayne Rasband (NIH)).

Детектирование импульсов в сигнале

Каждый электрод мультиэлектродной матрицы регистрировал изменения потенциала внеклеточной среды. На фоне шумовой составляющей (8–10 мкВ) при возбуждении близлежащих к электроду нейронов регистрировался слабый импульсный сигнал с амплитудой 15–30 мкВ. Метод вычисления порога T времён возникновения импульсов из шума проводился на основе медианы σ модуля сигнала:

$$T = n\sigma, \sigma = median\left(\frac{|x|}{0.6745}\right),$$

где x — сигнал, пропущенный через полосовой фильтр 0,3–8 кГц, n — коэффициент чувствительности порога, σ — медиана нормированного сигнала, и нормированный на стандартное отклонение сигнала с нулевым числом спайков (Quiroga R., 2004). В работе использовался порог n=8, позволяющий детектировать спайки с амплитудой 10–60 мкВ.

Для определения времён возникновения сетевой пачечной активности была построена частотно-временная диаграмма F(t): каждые 50 мс подсчитывалось общее количество импульсов на всех электродах и откладывалось по оси ординат, по оси абсцисс откладывалось время. Для определения времени начала, T_S, и конца, T_E, сетевой пачки вводился порог детектирования:

$$T_{Burst} = C_B \times \sigma(F(t)),$$

где σ — среднеквадратичный разброс значений на частотно-временной диаграмме, C_B — коэффициент чувствительности порога, равный 0,1, подбирался экспериментально на основе визуального критерия возникновения в записи популяционного разряда.

Математический анализ сетевой пачечной активности

Анализ включал в себя детектирование и статистическую обработку следующих характеристик пачечной активности сети: межпачечный интервал; длительность сетевых пачек; количество импульсов в сетевых пачках; частота импульсов внутри сетевых пачек; характеристики паттерна активации сетевой пачки.

Стимуляция первичных культур клеток гиппокампа

Методы стимуляции нейронных культур включали как стандартные схемы стимуляции, входящие в состав программного обеспечения многоэлектродной системы MED64 (AlphaMed Sciences, Япония), так и оригинальный авторский протокол стимуляции по двум соседним электродам одновременно (стимуляция сайтов — областей культуры). В оригинальном протоколе культуры стимулировались последовательностью биполярных импульсов тока амплитудой 50 мкА и длительностью 500 мкс, подаваемых на различные пары электродов матрицы с частотой 0,05–0,2 Гц. При этом импульсы на электродах в паре имели

противоположную полярность, что обеспечивало локализацию тока стимуляции в их окрестности. Электроды сохранялись от разрушения за счёт применения малых амплитуд тока.

Протокол (схема) проведения экспериментов с электрической стимуляцией культур клеток гиппокампа:

1. Запись спонтанной активности в течение 30 мин до стимуляции.
2. Выбор пар электродов, стимуляция которых вызывает сетевые пачки активности в культуре клеток. Притом для каждого эксперимента находилась выделенная пара электродов, импульсы тока в которых вызывали бы сетевую пачку импульсов почти во всей сети.
3. Стимуляция клеток выбранной парой электродов по 10 мин. При этом стимуляция может необратимо изменять биоэлектрическую активность всей нейронной сети. Поэтому, чтобы проверить воспроизводимость селективного ответа на определённые стимулы, проводилась повторная стимуляция теми же электродами.
4. Запись спонтанной нейронной активности в течение 30 мин после стимуляции.

Записи позволяли оценить общий уровень активности в культуре до и после стимуляции и проверить стабильность активности и функциональной связности всей сети на протяжении эксперимента.

Фармакологический метод изучения вызванной сетевой активности

Фармакологический метод выявления синаптически связанных вызванных ответов включал использование антагонистов синаптических глутаматных рецепторов в возбуждающих синапсах: 10 мкМ APV (R-2-амино-5-фосфонопентаноат) как антагонист NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторов и 10 мкМ NBQX (2,3-дигидрокси-6-нитро-7-сульфамоилбензо[f]хиноксалин-2,3-дион) как антагонист AMPA (α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовой кислоты) рецепторов.

Методы статистического анализа

Для характеристики данных, полученных по результатам экспериментов, использовались методы описательной статистики. Полученные результаты представлены в виде Me±me, где Me — медиана регистрируемого параметра по серии экспериментов, me — доверительный интервал медианы. Для определения статистического различия параметров в зависимых выборках с отличным от нормального распределением, использовался критерий Вилкоксона. В случае независимых выборок – критерий Манна-Уитни. Вывод о наличии статистически значимых различий делался при доверительной значимости $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение

Формирование нейронной сети культуры клеток гиппокампа

Нейрональная сеть формировалась в несколько этапов. В результате ферментной и механической обработки при диссоциации гиппокампа большинство клеток утрачивало отростки, округлялись. Поэтому в клеточной суспензии, помещённой на мультиэлектродную матрицу, можно было видеть лишь тела диссоциированных клеток с крупным круглым ядром и узким ободком цитоплазмы (рисунок 1А).

Начальные сегменты отростков сохранялись только у отдельных клеток. В конце первых суток культивирования большая часть жизнеспособных клеток прикреплялась к субстрату изолированно или небольшими группами (агрегатами). На 3–4 сутки культивирования у клеток начинали формироваться отростки с утолщениями на краях — конусами или колбами роста — с тонкими подвижными пальцевидными

выростами (рисунок 1Б). В течение первой недели культивирования растущие отростки нервных и глиальных клеток образовывали на поверхности субстрата сложные сплетения. Через 2 недели культивирования в монослойных клеточных культурах практически завершалось формирование нейронной сети (рисунок 1В) с множественными синаптическими связями. Связи между нейронами образовывались хаотично и культуры диссоциированных клеток гиппокампа формировались со случайной направленностью морфофункциональных связей. Статистически было определено, что на 1 мм^2 двухслойной культуры по данным иммуноцитохимического окрашивания на 17-й день развития *in vitro* (n=6) содержалось 548,8±107,5 нейронов и 4779,0±306,5 астроцитов.

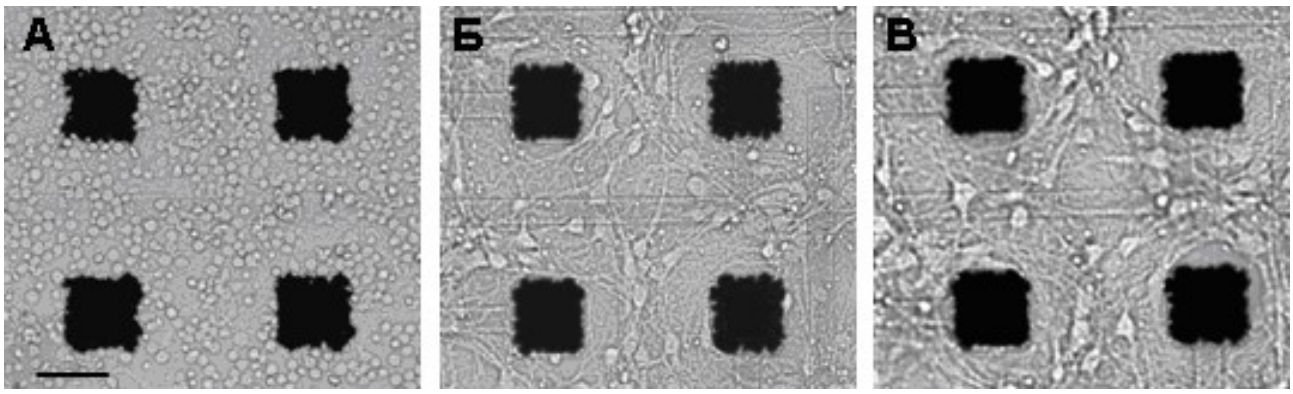

Рисунок 1. Клетки гиппокампа в культуре на многоэлектродной матрице системы MED64 (AlphaMed Sciences, Япония) через 2 часа (А), 4 суток (Б) и 10 суток (В) *in vitro*. Черные квадраты — электроды. Длина отрезка внизу слева на панели А — 50 мкм

Основные закономерности эволюции биоэлектрической активности нейронной сети культуры в развитии *in vitro*

В начале развития культуры биоэлектрическая активность сети отсутствовала. На 3–5 сутки развития *in vitro* регистрируемая активность представляла собой последовательности спонтанных несвязанных событий в виде единичных спайков (внеклеточно регистрируемых потенциалов действия) с длительностью 1–1,5 мс и с амплитудой 25,0±2,4 мкВ на всех электродах. Вместе с тем появлялась пачечная активность на отдельных электродах. Возникновение спонтанной активности связано с ростом и усложнением морфологии клеток, включая рост дендритов и аксона. Хотя на данном этапе еще отсутствовали зрелые химические синапсы, рост волокон увеличивал эффективную площадь, с которой клетка могла получать сигналы в виде внеклеточных шумовых возмущений. Интеграция таких возмущений в клетке на определённом этапе (3–5 сутки развития *in vitro*) вызывала генерацию спонтанных потенциалов действия и, как следствие, регистрацию электродами матрицы спайков.

Дальнейшее развитие культуры клеток гиппокампа (начиная с 7-х суток культивирования) характеризовалось наличием устойчивых (стабильных во времени) межнейронных связей и появлением сетевой пачечной активности. В экспериментах с многоэлектродными зондами, под пачечной активностью подразумеваются короткие периоды, в течение которых частота спайковой активности многих клеток на одном внеклеточном электроде или нескольких электродах превышает базовый уровень. Таким образом, сетевая пачечная активность – короткая пространственно-временная последовательность спайков нескольких нейронов, детектируемая на внеклеточных электродах с короткими межспайковыми интервалами не более 100 мс (рисунок 2).

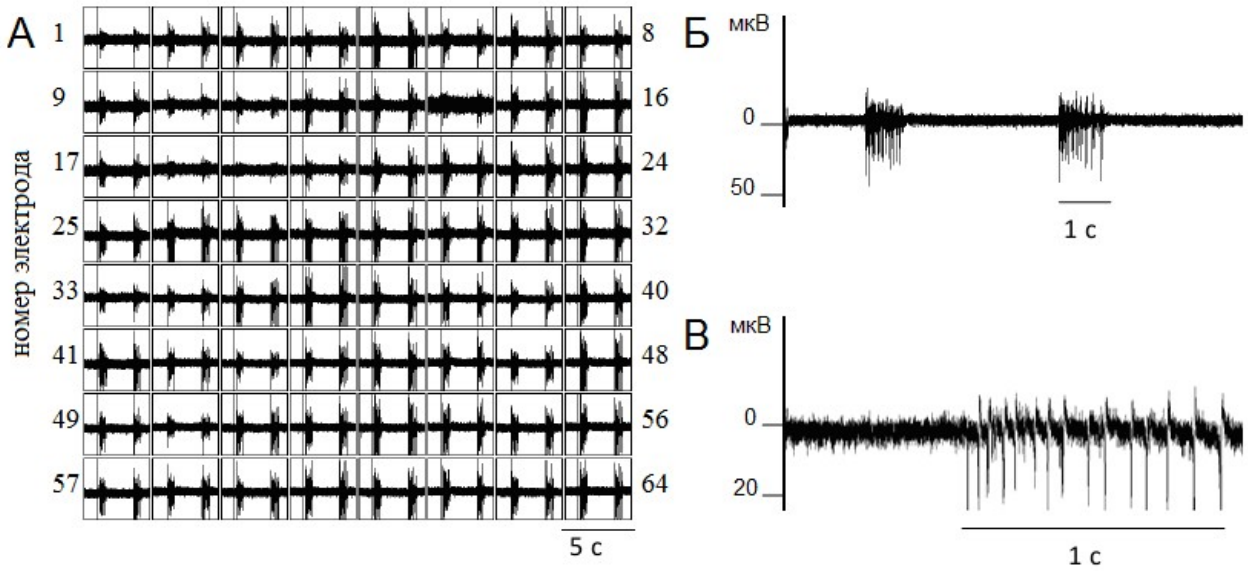

Рисунок 2. Пачечная активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа на 9–е сутки развития *in vitro*. А — спонтанная пачечная активность нейронов, регистрируемая одновременно на каждом из 64-х микроэлектродов в культуре клеток гиппокампа на зонде системы MED64 (AlphaMed Sciences, Япония), Б — спонтанная пачечная активность, регистрируемая на одном микроэлектроде за 5 с, В — одиночная пачка, зарегистрированная с одного электрода

Появление сетевой пачечной активности обусловлено развитием химических синаптических контактов и свидетельствует о формировании зрелой сети. Более высокая плотность клеток способствовала развитию более тесной структуры связей на каждую клетку и, как следствие, вела к ранней генерации спонтанной сетевой пачечной активности в различных участках сети. Спайковые паттерны (временны́е структуры) в пределах отдельной сетевой пачки разрядов оказались в некотором смысле «самоподдерживающимися».

Возбуждение циркулировало по нейронной сети без специфического внешнего воздействия таким образом, что паттерны периодически повторялись. Сетевая пачечная активность культур диссоциированных клеток гиппокампа сохранялась на протяжении всего времени жизни культуры, но пространственно-временная структура активности изменялась по мере развития. С увеличением возраста культуры паттерн активности усложнялся и появлялся устойчивый «рисунок» пачки, что характеризовало последовательные этапы становления зрелой нейронной сети в отсутствии афферентации от внешних сигналов. Заключительным этапом развития биоэлектрической сетевой активности (18–21 сутки развития *in vitro)* стало появление регулярных сетевых пачек с переменным, а в дальнейшем (до 52 суток культивирования *in vitro)* с фиксированным количеством импульсов. Последнее свойство свидетельствует о формировании устойчивой зрелой нейронной сети.

В ходе количественного анализа параметров сетевой пачечной активности (длительность пачек, межпачечный интервал, количество и частота спайков в пачке) было изучено их изменение в процессе «онтогенеза» культур *in vitro* от одиночных спайков до сетевой пачечной активности. Пачечная активность диссоциированных культур клеток гиппокампа сохранялась на протяжении всего времени жизни культуры, но пространственно-временная структура в процессе развития изменялась (рисунок 3).

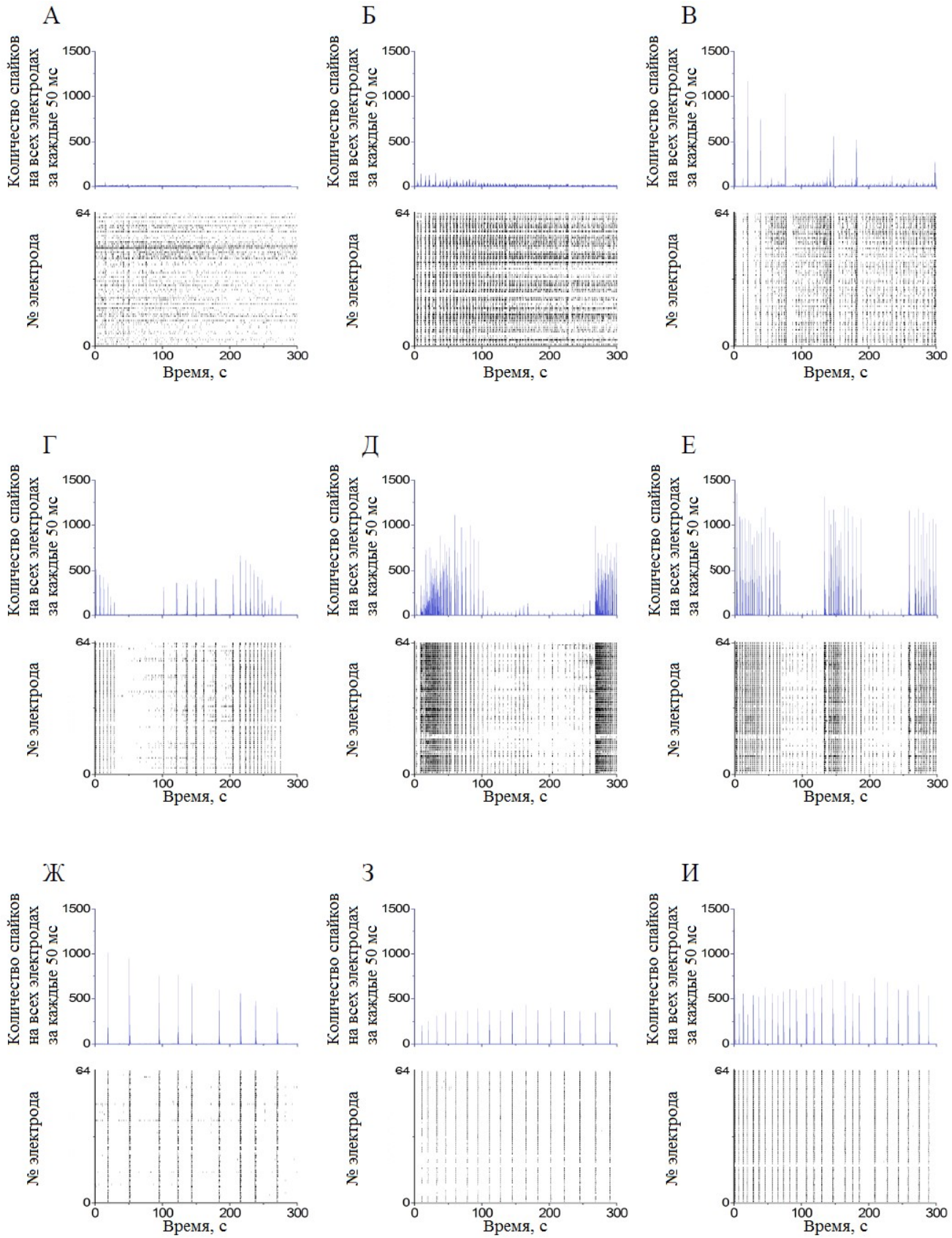

Рисунок 3. Растровые диаграммы спонтанной сетевой пачечной активности культуры диссоциированных клеток гиппокампа на 5 день (А), 7 день (Б), 9 день (В), 11 день (Г), 14 день (Д), 17 день (Е), 21 день (Ж), 25 день (З), и 28 день (И) развития *in vitro*

Характеристика вызванного сетевого ответа нейронных сетей при стимуляции первичной культуры клеток гиппокампа

Последовательность импульсов электрической стимуляции через электроды матрицы вызывала отклик нейронной сети в виде сетевых пачек активности. Вызванная сетевая пачка состояла из двух ответов: прямой внесинаптический ответ в виде потенциалов действия за счёт открытия потенциал-зависимых Na^+-каналов на мембране отростков нейронов, расположенных непосредственно на стимулирующих электродах, и синаптический ответ за счёт прохождения потенциалов действия уже через синапсы между нейронами в сети. Для точного измерения временны́х интервалов прямого и синаптического ответа стимуляция культуры проводилась с одновременным добавлением в нейробазальную среду 10 мкМ APV и 10 мкМ NBQX, которые блокируют NMDA и AMPA рецепторы соответственно. Выявлено, что стимуляция нейронов, культивируемых на мультиэлектродной матрице, одиночными короткими импульсами вызывала реверберирующий сетевой ответ в виде пачки биоэлектрических импульсов после каждого стимула. Вызванные внесинаптические спайки с задержкой менее 10 мс после электрической стимуляции не связаны с проведением импульса в сети через химические синапсы и в дальнейшем анализе не рассматривались.

Оценка селективных свойств нейронов в культуре клеток гиппокампа на предъявление электрической стимуляции

Для решения задачи разработки критериев оценки селективности ответов нейронной сети и выявлению наличия селективности нейронных ответов были проведены эксперименты с низкочастотной электрической стимуляцией нейронов в составе нейронной сети культуры клеток гиппокампа.

Селективность определялась как способность нейронов генерировать статистически различимые ответы по времени возникновения первых спайков после стимула и общему количеству спайков в вызванной сетевой пачке на низкочастотную стимуляцию различных входов (электродов). Считалось, что эти параметры (времена возникновения первых спайков после стимула и количество спайков в вызванной сетевой пачке) связаны с кодированием информации в нейронных сетях.

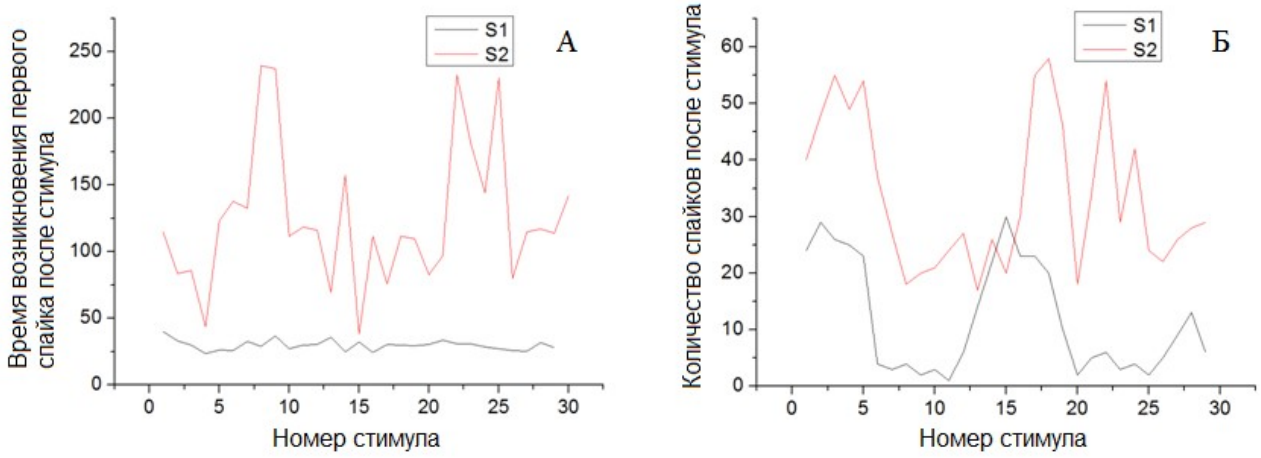

Рисунок 4. Среднее время возникновения спайков после стимула на одном электроде (А), демонстрирующем селективные свойства группы нейронов в составе нейронной сети и среднее число спайков после стимула на одном электроде (Б), не демонстрирующем селективные свойства группы нейронов в составе нейронной сети при стимуляции двух участков сети S1 и S2

Допускалось, что вариабельность времени возникновения первых спайков после стимула обусловлена тем, что распространение сигнала между клетками в сети проходит разными путями. По временам возникновения первых спайков после каждого стимула и числа спайков в сетевой пачке определялось, различимы ли статистически данные параметры для каждого электрода между ответами на стимуляцию двумя различными группами электродов. Если времена возникновения первого спайка и число спайков в сетевой пачке, регистрируемые на электроде, статистически различимы, считалось, что нейроны данной группы избирательны к двум типам входных стимулов (рисунок 4).

Анализ селективности времени появления первых спайков и количества спайков в сетевой пачке после стимула

В исследовании селективных свойств культуры клеток гиппокампа интерес представляли только нейроны, способные генерировать ответ на каждую стимулируемую группу электродов. Такие вызванные ответы нейронной сети в среднем по разным дням и культурам были зарегистрированы на 81±11 % электродов (рисунок 5, столбец 1). Однако количество электродов, регистрирующих только селективный ответ нейронов, всегда значимо меньше (30 %), чем общее число электродов, активных при стимуляции. Следует отметить, что только 10 % нейронных групп сохраняли свою селективность на протяжении двух последовательных суток низкочастотной стимуляции (9±6 % электродов, регистрирующих селективный ответ нейронов по времени возникновения первых спайков после стимула, и 11±8 % — по общему количеству спайков в вызванной сетевой пачке).

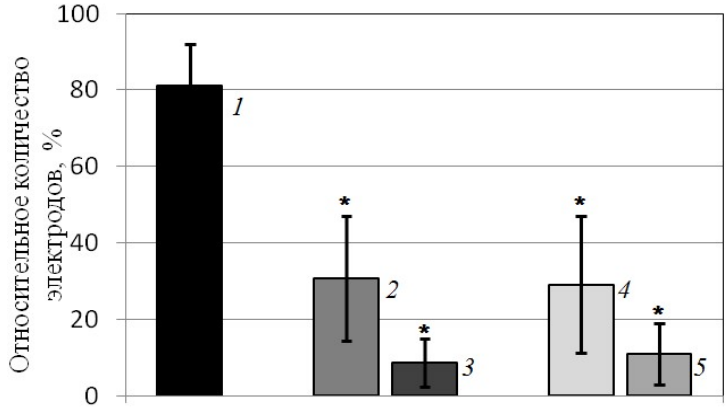

Рисунок 5. Относительное количество активных электродов: активных электродов на все выбранные варианты стимулов (1), электродов, демонстрирующих селективность ответа нейронов по времени возникновения первых спайков после стимула в течение одних суток (2) и сохраняющих свою селективность на протяжении двух последовательных суток (3), и электродов, демонстрирующих селективность ответа нейронов по общему количеству спайков в вызванной сетевой пачке в течение одних суток (4) и сохраняющих свою селективность на протяжении двух последовательных суток (5). * — статистически значимые различия относительно количества активных электродов

При сравнении распределения селективных групп нейронов при стимуляции последовательно трех различных стимулируемых участков сети было показано, что в каждом случае можно выделить группы нейронов, демонстрирующие селективный ответ по времени возникновения первых спайков или общему количеству спайков

в вызванной сетевой пачке в течение дня. Также были найдены электроды, селективные свойства которых сохранялись на протяжении 3-х суток *in vitro* (рисунок 6).

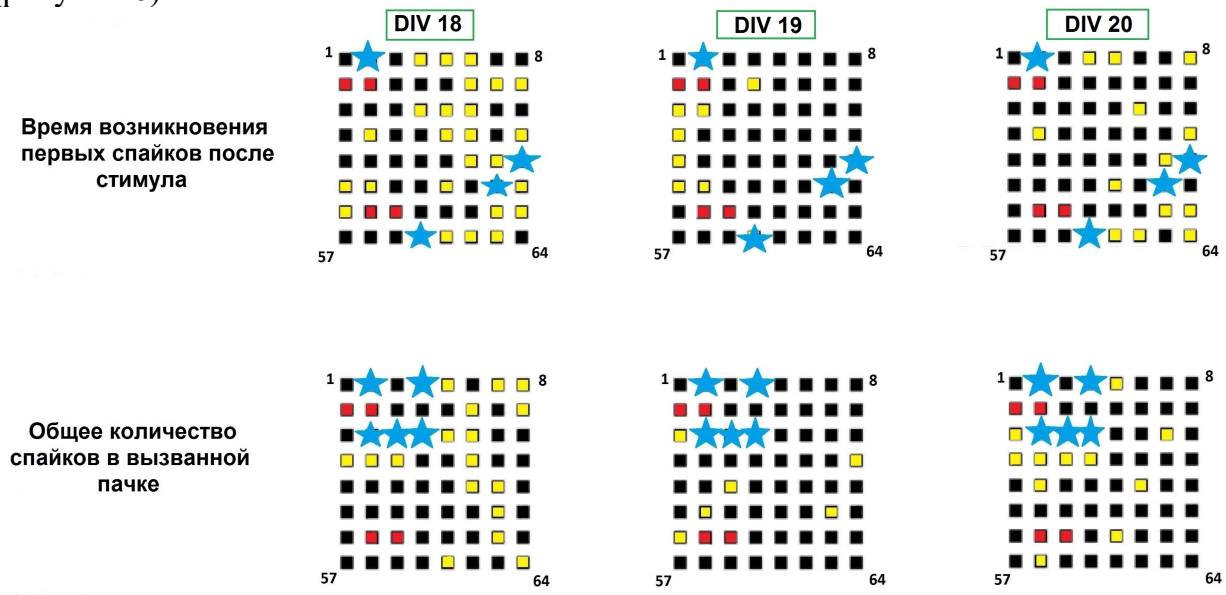

Рисунок 6. Положение электродов на матрице, регистрирующих селективный ответ нейронов по времени возникновения первых спайков и общему количеству спайков в сетевой пачке. Красным цветом выделены пары стимулируемых электродов, желтым — электроды, регистрирующие селективные ответы нейронов в течение дня, синими звездами — электроды, регистрирующих селективный ответ нейронов, селективные свойства которых сохранялись на протяжении 3-х суток *in vitro*. DIV — day *in vitro*

Таким образом, было выявлено, что в исследуемых культурах диссоциированных клеток гиппокампа существуют области, позволяющие различать ответ по времени возникновения первых спайков или общему количеству спайков сети при стимуляции 3-х различных ее областей, что может быть важно при кодировании информации. С течением времени культивирования клеток гиппокампа области селективности нейронных сетей спонтанно меняются, т.е. одни области нейронных сетей культуры утрачивают селективность, а другие приобретают.

Было показано, что количество электродов, регистрирующих селективный ответ нейронов с 10-е по 14-е сутки развития *in vitro*, поддерживается на уровне 50 % от общего количества электродов (рисунок 7). В это время формировалась спонтанная сетевая пачечная активность сети с варьирующейся частотой следования малых сетевых пачек, а затем — с длинными регулярными сетевыми суперпачками. Далее с 14-е по 23-и сутки развития *in vitro* количество электродов, обнаруживающих селективный ответ нейронов, резко уменьшалось до 10–15 %, что соответствовало по времени появлению в сети спонтанной активности в виде регулярных сетевых пачек с переменным количеством импульсов. С 23-х по 27-е сутки развития *in vitro* количество электродов, выявивших селективность ответа нейронов, снова возрастало до первоначального значения (около 50 % от общего числа электродов). Затем (с 27-х суток развития *in vitro*) количество электродов с селективным ответом культуры снижалось до 20–25 % от общего количества электродов. Низкочастотная электрическая стимуляция в этот период проводилась через каждые 10 суток, поэтому достоверно можно утверждать о сохранении некоторого среднего количества

электродов, регистрирующих селективный ответ нейронов на протяжении второй половины срока культивирования.

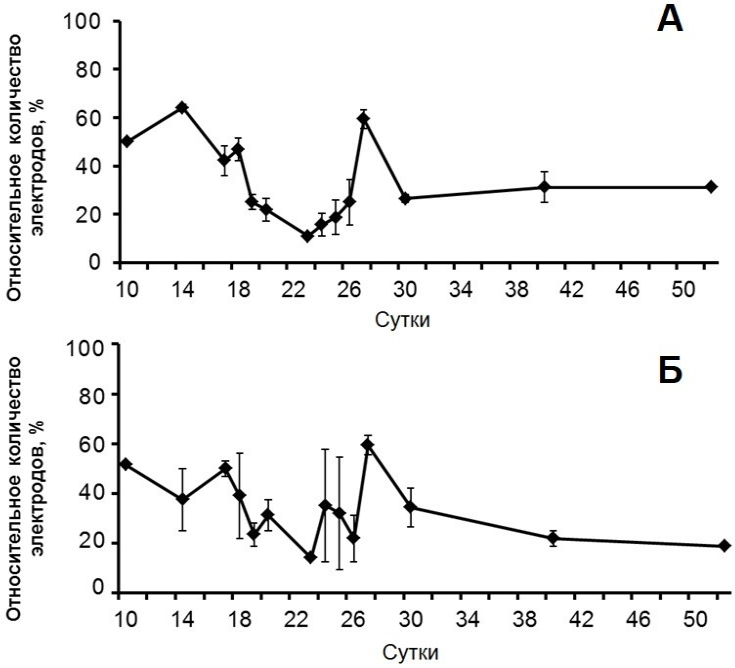

Рисунок 7. Количество электродов, зарегистрировавших селективность ответа нейронов по времени возникновения первых спайков после стимула в сетевой пачке (А) и по общему количеству спайков в вызванной сетевой пачке (Б), в разные сутки развития *in vitro*

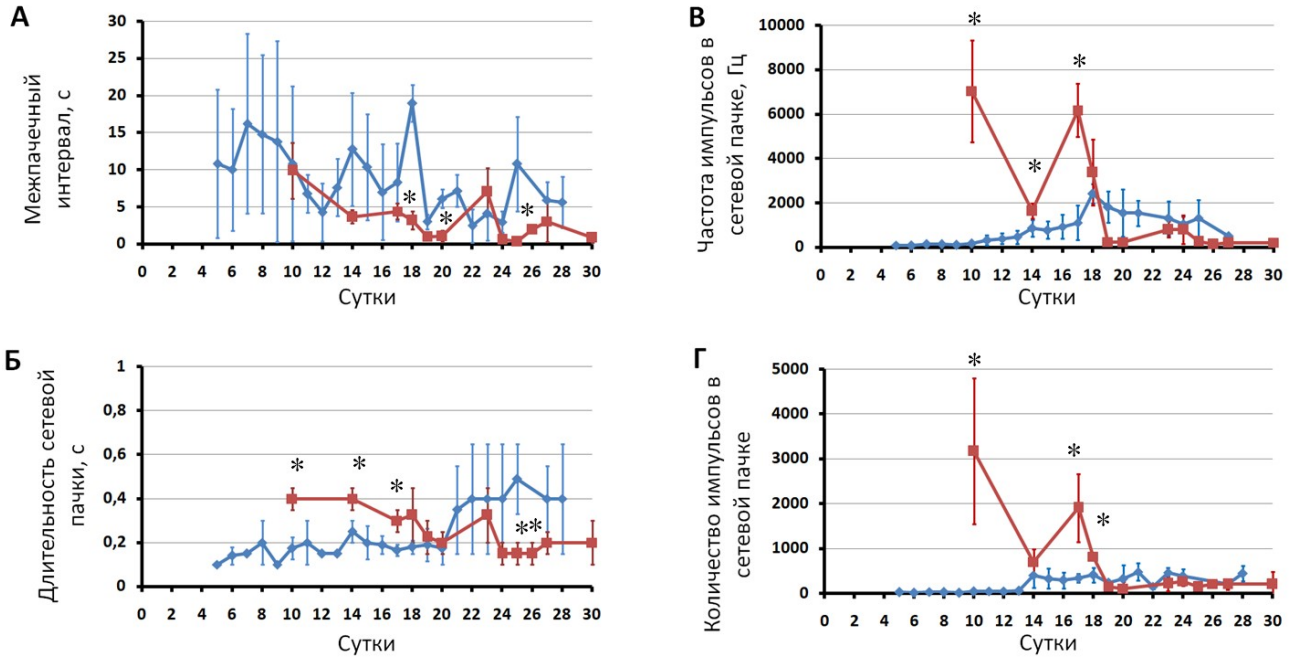

Рисунок 8. Динамика изменения параметров спонтанной сетевой пачечной активности: межпачечного интервала (А), длительности сетевых пачек (Б), частоты импульсов в сетевых пачках (В) и количества импульсов в сетевых пачках (Г) в зависимости от дня развития для контрольной группы культур диссоциированных клеток гиппокампа (синяя линия) и группы культур диссоциированных клеток, которые подвергались низкочастотной электрической стимуляции (красная линия). Данные представлены в формате Me± me, где Me — медиана по разным культурам, me — доверительный интервал медианы, * — p<0,05, критерий Манна-Уитни

Таким образом, нейронные сети культуры диссоциированных клеток гиппокампа сохраняют свойство селективности на протяжении всего времени своего развития. Количество электродов, регистрирующих селективный ответ нейронов, может варьироваться в связи с изменением следующих показателей спонтанной активности культуры: длительностью сетевых пачек и межпачечного интервала, количеством и частотой спайков в сетевой пачке. Выявлено, что низкочастотная электрическая стимуляция изменяла спонтанную активность культур по сравнению с контрольной группой (рисунок 8).

На 10–14 день развития *in vitro*, когда количество электродов, регистрирующих селективный ответ нейронов, достаточно велико (около 50 %), длительность спонтанной сетевой пачки сохраняется на высоком уровне (0,4 с). Высокая длительность сетевой пачки может объясняться появлением в этот период времени в сети сетевых суперпачек. Затем к 27 дню длительность пачек уменьшается до 0,18 с. Количество импульсов в сетевой пачке также резко уменьшается с 3000 до 700, частота импульсов в сетевой пачке с 7000 до 1500 Гц, а межпачечный интервал с 10 до 3 с.

Заключение

Показано, что в процессе развития культур диссоциированных клеток гиппокампа *in vitro* до 21–28 дня происходило изменение параметров регистрируемой спонтанной биоэлектрической активности, связанное с формированием единой морфо-функциональной сети нейронов в условиях поддержания гомеостаза среды *in vitro*.

Исследована селективность ответа нейронов на внешнюю электрическую стимуляцию как общее функциональное свойство биологических нейронных сетей. Селективность определялась как способность нейронов генерировать статистически различимые ответы на афферентную низкочастотную электрическую стимуляцию.

Охарактеризованы численные параметры, достоверно подтверждающие селективность ответов групп нейронов, культивируемых на мультиэлектродной матрице на афферентную низкочастотную электрическую стимуляцию: количество спайков в вызванных сетевых пачках и времена возникновения первых синаптически вызванных спайков после стимула.

Было выявлено, что индуцированное низкочастотной электрической стимуляцией распространение сигнала в сети нейронов обладает уникальностью и определяется положением стимулируемой группы нейронов относительно расположения в нейронной сети стимулируемой области. В свою очередь, по полученному вызванному ответу, классифицированному группой селективных нейронов, можно определить область стимуляции (стимулируемую пару электродов). Данное свойство нейронной сети можно использовать для классификации внешних сигналов. Выявленные закономерности позволяют корректировать имеющиеся и создавать новые модели нейронных сетей.

Выводы

1. Развитие биоэлектрической активности культур диссоциированных клеток гиппокампа эмбрионов мышей (E18) имеет 3 нестационарные стадии, характеризуемые переходом от простых форм спайковой активности в сложные формы пачечной и суперпачечной активности (3–5-е, 14–16-е и 18–21-е сутки развития *in vitro*).

2. Группы нейронов в составе нервной сети первичной культуры диссоциированных клеток гиппокампа обладают свойством классификации входного сигнала. Селективность нейронных групп определяется как способность участков нейронной сети генерировать статистически различимые между собой ответы на различную афферентную низкочастотную электрическую стимуляцию.

3. Количественными критериями, характеризующими способность нейронов классифицировать входной сигнал, являются общее количество спайков и времена возникновения первых синаптических спайков в вызванной сетевой пачечной активности. Большинство групп селективных нейронов различает входной сигнал либо по количеству спайков, либо по времени возникновения первых синаптических спайков, только 4 % нейронов классифицируют сигнал, используя оба параметра.

4. Группы нейронов в составе нейронной сети первичной культуры клеток гиппокампа (от 50 до 30 %), обладающие свойством селективности, выявляются в период с 10-х по 52-е сутки развития. Их количество и расположение изменяется в период с 10 по 30 сутки развития культуры *in vitro*. 10 % групп селективных нейронов могут сохранять характеристики селективности до 3-х суток.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., **Корягина Е.А.** Мультиэлектродные матрицы – новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети // Современные технологии в медицине. –2009. – №1. – С. 8–15.

2. **Корягина Е.А.**, Пимашкин А.С., Казанцев В.Б., Мухина И.В. Динамика вызванной биоэлектрической активности нейронных сетей *in vitro* // Вестник Нижегородского госуниверситета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология.– 2011. – № 2. Ч. 2. – С. 254-261.

3. Pimashkin A., Kastalskiy I., Simonov A., **Koryagina E.**, Mukhina I., Kazantsev V. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures // Frontiers in Computational Neuroscience. – 2011. – Vol. 5. Article 46. doi: 10.3389/fncom.2011.00046.

4. **Агрба Е.А.**, Мухина И.В. Пространственно-временная характеристика нейросетевой активности первичных культур гиппокампа // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2013. – № 4 (1). – С. 139–144.

5. Pimashkin A., Gladkov A., **Agrba E.**, Mukhina I., Kazantsev V. Selectivity of stimulus induced responses in cultured hippocampal networks on microelectrode arrays // Cognitive Neurodynamics. – 2016. – Vol. 10, Iss. 4. – P. 287–299. doi: 10.1007/s11571-016-9380-6.

Публикации в других научных журналах, сборниках научных статей, тезисах конференций:

6. Мухина И.В., Хаспеков Л.Г., Казанцев В.Б., Коротченко С.А., **Корягина Е.А.**, Обухова Л. М., Ведунова М. В. Мультиэлектродная система MED64 в исследовании синаптической пластичности в культуре диссоциированных клеток гиппокампа // Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии и нейропластичности (Материалы Всероссийской конференции с международным участием). – М.: Научный мир, 2008. – С. 481–486.

7. Мухина И.В., Хаспеков Л.Г., Казанцев В.Б., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Бобров М.Ю., Фрумкина Л.Е., Захаров Ю.Н., Коротченко С.А., **Корягина Е.А.**

Функциональные характеристики клеток гиппокампа в нейроглиальной сети, развивающейся *in vitro*: кальциевый имиджинг и спонтанная активность в культуре на мультиэлектродной матрице // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация»: Сборник статей. – Пущино, 2009. – Т.1. – С. 38–142.

8. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., **Корягина Е.А.** Динамика развития функциональной активности нейронной сети гиппокампа *in vitro* при культивировании на мультиэлектродной матрице MED64 // Материалы XV Международной конференции по нейрокибернетике. 23–25 сентября 2009. С. 124–127.
9. Коротченко С.А., Ведунова М.В., **Корягина Е.А.**, Бобров М.Ю., Генрикхс Е.Е., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В. Модуляция спонтанной биоэлектрической активности нейронной сети первичной культуры гиппокампа глутаматом и N-арахидоноилдофамином // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга». 2-3 декабря 2010 года. – М.: Научный мир, 2010. – С. 390-394.
10. Симонов А.Ю., Пимашкин А.С., **Корягина Е.А.**, Прокин И.С., Миронов В.И., Кастальский И.А., Савихин С.А., Терентьев А.Б., Иудин Д.И., Мухина И.В., Казанцев В.Б. Эффекты сетевой сигнализации в моделях спонтанно развивающихся нейрональных сетей в диссоциированных культурах клеток мозга // XIII Всероссийская научно-техническая конференция "Нейроинформатика-2011": лекции по нейроинформатике. – М.: НИЯУ-МИФИ. – 2010. – С. 138-184.
11. Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Khaspekov L.G., Zakharov Y.N., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Korotchenko S.A., **Koryagina E.A.**, Martyanov E. Study the functional properties of low density hippocampal neuronal networks using multi-electrode arrays // Joint Symposium on International Workshop on Nonlinear Dynamics in Biological Systems and Soft-matter Biophysics, Taipei, Taiwan. – 2009. – P. 35
12. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., **Корягина Е.А.** Исследование пластичности нейрональной сети гиппокампа *in vitro* при культивировании на мультиэлектродной матрице MED64 // Нелинейная динамика в когнитивных исследованиях: Всероссийская конференция, 13–15 мая 2009 г., Нижний Новгород: Тезисы докладов. – Нижний Новгород: ИПФ РАН, 2009. – С. 97–99.
13. Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Khaspekov L.G., Korotchenko S.A., **Koryagina E.A.** Network dynamics and spiking activity in cultured hippocampal neurons // Материалы международного симпозиума «Topical Problems of Biophotonics — 2009», Нижний Новгород, 19–24 июля 2009 г. – С. 218–219.
14. Мухина И.В., Хаспеков Л.Г., Казанцев В.Б., Коротченко С.А., **Корягина Е.А.**, Фрумкина Л.Е., Митрошина Е.В., Ведунова М.В. Спонтанная активность нейронной сети в культуре клеток гиппокампа на мультиэлектродной матрице MED64 // Материалы Всероссийской конференции «Гиппокамп и память: норма и патология», 25–28 июля, Пущино, 2009. – С. 46–47.
15. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Коротченко С.А., **Корягина Е.А.**, Пимашкин А.С. Пластичность биологических нейронных сетей *in vitro*: развитие и обучение // Научная сессия НИЯУ МИФИ-2010. Аннотации докладов. В 3 томах. – Т. 2. Нанофизика и нанотехнологии. Фундаментальные проблемы науки. – М.: НИЯУ МИФИ, 2010. – С. 267.

16. **Корягина Е.А.**, Мухина И.В., Казанцев В.Б. Динамика активности нейронной сети гиппокампа при культивировании на мультиэлектродной матрице MED64 // Научная сессия НИЯУ МИФИ-2010. Аннотации докладов. В 3 томах. – Т. 2. Нанофизика и нанотехнологии. Фундаментальные проблемы науки. – М.: НИЯУ МИФИ, 2010. – С. 269.
17. **Корягина Е.А.**, Мухина И.В., Казанцев В.Б. Исследование спонтанной биоэлектрической активности в нейронной сети диссоциированной культуры гиппокампа *in vitro* на мультиэлектродной матрице MED64 // XV научная школа «Нелинейные волны — 2010». Фундаментальные и прикладные задачи нелинейной физики. Конференция молодых ученых. 6–12 марта 2010 года. Тезисы докладов. – Нижний Новгород, 2010. – С. 65–66.
18. **Корягина Е.А.** Исследование спонтанной активности в нейронной сети гиппокампа на мультиэлектродной матрице MED64 // Ломоносов — 2010: XVII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 12–15 апреля 2010 г.; Москва, МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. – С. 226–227.
19. **Корягина Е.А.**, Мухина И.В., Казанцев В.Б. Динамика спонтанной биоэлектрической активности в сети гиппокампальных нейронов *in vitro* // Биология — наука 21 века: 14 -я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых, (Пущино, 19–23 апреля 2010 года). Сборник тезисов. – С. 143.
20. **Корягина Е.А.**, Мухина И.В., Казанцев В.Б. Закономерности динамики нейросетевой активности диссоциированной культуры гиппокампа при культивировании на мультиэлектродной матрице MED64 // Биосистемы: организация, поведение, управление. Материалы 62-й и 63-й научных студенческих конференций биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 15-16 апреля 2009 года и 27 апреля 2010 года. – Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 2010. – С. 60-62.
21. Пимашкин А.С., **Корягина Е.А.**, Казанцев В.Б., Мухина И.В. Детекция спайков в электрической активности культуры нейронов // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». – Нижний Новгород, 2010. – С. 183.
22. Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Vedunova M.V., Khaspekov L.G., Mitroshina E.V., Zakharov Y.N., Korotchenko S.A., **Koryagina E.A.** Cultured hippocampal function network during development and its N-arachidonoyldopamine modulation // 7th FENS forum of European Neuroscience, Amsterdam, July 3–7, 2010. – Ref.: FENS Abstr. Vol.5. – Abstract no: 192.37.
23. Alexey Pimashkin, Innokentiy A. Kastalsky, Alexander U. Simonov, **Ekaterina A. Koryagina**, Svetlana A. Korotchenko, Irina V. Mukhina and Victor B. Kazantsev. Spike patterns similarity in bursts of spontaneous activity in hippocampal cultures using MEA // Front. Neuroeng. Conference Abstract: The Monte Verita' Workshop on the Frontiers in Neuroengineering. Ascona, Switzerland, 5 Sep - 9 Sep, 2010. doi: 10.3389/conf.fneng.2010.10.00011.
24. Коротченко С.А., Мухина И.В., Ведунова М.В., **Корягина Е.А.**, Хаспеков Л.Г., Бобров М.Ю. Модуляция спонтанной биоэлектрической активности нейрон-глиальной сети глутаматом // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. 19-25 сентября 2010 г. Тезисы докладов. – М.–Калуга, 2010. – С. 300.
25. **Корягина Е.А.**, Мухина И.В., Казанцев В.Б., Ведунова М.В., Коротченко С.А., Пимашкин А.С. Обучение сети нейронов гиппокампа *in vitro* // XXI Съезд

Физиологического общества им. И.П. Павлова. 19-25 сентября 2010 г. Тезисы докладов. – М.–Калуга, 2010. – С. 302.
26. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Ведунова М.В., Захаров Ю.Н., Хаспеков Л.Г., Коротченко С.А., **Корягина Е.А.**, Пимашкин А.С. Закономерности развития нейрон-глиальных сетей гиппокампа *in vitro* // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. 19-25 сентября 2010 г. Тезисы докладов. – М.–Калуга, 2010. – С. 426.
27. **Корягина Е.А.**, Мухина И.В., Казанцев В.Б. Динамика биоэлектрической активности диссоциированных культур гиппокампа, длительно культивируемых на мультиэлектродной матрице MED64 // Сборник докладов Всероссийской молодежной школы «Нейротехнологии 2010. Биоэкономика, основанная на знаниях: политика инновационного пути развития биотехнологии». 24 — 29 сентября 2010. Бекасово, Московская область. С. 13.
28. **Корягина Е.А.** Обучение нейронных сетей *in vitro* посредством внеклеточной электрической стимуляции // Ломоносов — 2011: XVIII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 11–15 апреля 2011 г.; Москва, МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. – С. 206.
29. **Корягина Е.А.**, Пимашкин А.С., Казанцев В.Б., Мухина И.В. Изменение функционального состояния сетей культуры нейронов при длительной электрической стимуляции // Биология — наука 21 века: 15-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых (Пущино, 18–22 апреля 2011 года). Сборник тезисов. – С. 167.
30. **Корягина Е.А.**, Пимашкин А.С., Казанцев В.Б., Мухина И.В. Обучение нейронных сетей культур гиппокампа при внеклеточной электрической стимуляции // XVI Нижегородская сессия молодых ученых. Естественные науки. Нижний Новгород. 18-21 апреля 2011 года. – С. 191-193.
31. Khaspekov L.G., Korotchenko S.A., Vedunova M.V., **Koryagina E.A.**, Bobrov M.Yu., Genrikhs E.E., and Mukhina I.V. Modulation of spontaneous network activity in hippocampal cell culture by glutamate and N-arachidonoyl dopamine // Proceeding «Topical Problems of Biophotonics — 2011», St. Peterburg – Nizhny Novgorod, Russia, 16–22 July, 2011. – P. 232-233.
32. **Koriagina E.A.**, Pimashkin A.S., Kazantsev V.B., Mukhina I.V. Dynamics of neural network bioelectrical activity caused by periodic local extracellular electrical stimulation // Proceeding «Topical Problems of Biophotonics — 2011», St. Peterburg – Nizhny Novgorod, Russia, 16–22 July, 2011. – P. 236-237.
33. Mukhina I.V., Pimashkin A.S., **Koriagina E.A.**, Mitroshina E.V., Kalintseva Ya.I., Zakharov Yu.N., and Kazantsev V.B. Monitoring of function network activity *in vitro* // Proceeding «Topical Problems of Biophotonics — 2011», St. Peterburg – Nizhny Novgorod, Russia, 16–22 July, 2011. – P. 242-243.
34. I.V. Mukhina, Yu.N. Zakharov, V.V. Lobyntseva, M.S. Murav'yeva, **E.A. Koryagina**. Investigation of neuronal culture cell membrane mobility and cytoplasm density with the help of holographic interferometry // 8-th International Conference «Holoexpo-2011. Holography. Science and practice». 29th September - 1st October, 2011. – Minsk, Republic of Belarus. – P.240-241.
35. **Корягина Е.А.**, Пимашкин А.С., Казанцев В.Б., Мухина И.В. Изменение биоэлектрической активности нейронных сетей *in vitro* при повторяющейся стимуляции // Сборник докладов международной научной конференции и

молодежной школы «На пути к нейроморфному интеллекту: эксперименты, модели и технологии». 3–7 октября 2011. – Нижний Новгород. – С. 15-16.

36. **Корягина Е.А.**, Пимашкин А.С., Казанцев В.Б., Мухина И.В. Исследование вызванной биоэлектрической активности нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа // XVI научная школа «Нелинейные волны — 2012». 29 февраля –6 марта 2012 года. Тезисы докладов молодых ученых. – Нижний Новгород. – 2012. – С. 75–76.

37. **Корягина Е.А.**, Большакова А.В., Мухина И.В. Селективность нейронной сети первичной культуры гиппокампа к электрической стимуляции // XVII Нижегородская сессия молодых ученых (естественные, математические науки). – Нижний Новгород. 28-31 мая 2012 года.

38. **Корягина Е.А.**, Большакова А.В., Мухина И.В. Оценка селективных свойств нейронной сети первичной культуры гиппокампа на предъявление стимуляции // IV Съезд биофизиков России. Симпозиум II «Физические основы физиологических процессов». Материалы докладов. – Нижний Новгород. – 2012. – С. 79.

39. Gladkov A., Pimashkin A., Mukhina I., **Koryagina E.**, Kazantsev V. Adaptive learning protocol in cultured networks // Conference Proceedings of the 8th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays. Reutlingen, Germany. – 2012. – P. 55–56.

40. **Агрба Е.А.**, Муржухина А.В., Мухина И.В. Исследование селективных свойств нейронных сетей *in vitro* на предъявление электрической стимуляции // Форум молодых учёных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. – Нижний Новгород. – 2013. – Т. 1. – С. 13–15.

41. Широкова О.М., **Корягина Е.А.**, Фрумкина Л.Е., Ведунова М.В., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В. Динамика нейросетевой активности и морфологических закономерностей развития диссоциированной культуры гиппокампа *in vitro* // Форум молодых учёных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Нижний Новгород. – 2013. – Т. 1. – С. 43–46.

42. **Agrba E.A.**, Murzhukhina A.V., Pimashkin A.S., Mukhina I.V. Selectivity of the neural network of the primary hippocampal culture to the electrical stimulation // Proceedings of IV International Symposium «Topical Problems of Biophotonics — 2013». – Nizhny Novgorod, Russia, 2013. – P. 217–218.

Учебно-методические работы

43. Исследование биоэлектрической активности нейронных сетей в культурах гиппокампа: стимуляция, регистрация и анализ. Авторы: Пимашкин А.С., **Корягина Е.А.**, Гладков А.А., Симонов А.Ю., Мухина И.В., Казанцев В. Б.: Электронное методическое пособие / Нижний Новгород, 2011. 26 с.

44. Адаптация активности нейронных сетей к электрической стимуляции. Авторы: Пимашкин А.С., **Корягина Е.А.**, Гладков А.А., Симонов А.Ю., Мухина И.В., Казанцев В.Б.: Учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2011. 16с.

45. Мухина И. В., **Корягина Е.А.**, Коротченко С. А. Культивирование клеток гиппокампа на мультиэлектродных матрицах: Учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2011. 27 с.

Охраняемые РИД

46. Пимашкин А.С., **Корягина Е.А.**, Гладков А.А., Мухина И.В., Казанцев В.Б. Программа автоматической регистрации сигналов (NLearn). Свидетельство о государственной регистрации ЭВМ № 2012611934 от 20.02.2012.