

На правах рукописи

Гладков Арсений Андреевич

**ДИНАМИКА ВЫЗВАННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОННОЙ СЕТИ
КУЛЬТУРЫ ДИССОЦИИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГИППОКАМПА
МЫШЕЙ ПРИ 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 Центральной научно-исследовательской лаборатории 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

Шаронова Ирина Николаевна, 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: «20» декабря 2018 года в 15:00 часов 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/867>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Соколова Евгения Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Исследование закономерностей функционирования основных систем организма, в частности нервной системы, ее высших функций, таких как обучение, память, остается важной проблемой физиологии 21 века. На современном этапе развития нейрофизиологии известно, что механизмы обучения и памяти связаны с пластичности мозга, а именно с синаптической пластичностью, которая оценивается по изменению характеристик постсинаптических потенциалов. Постсинаптические потенциалы обеспечивают интеграцию входных сигналов к клетке, которые формируются в результате работы нейронной сети. Но, регистрируя интегральную сетевую активность лишь на отдельном нейроне, мы не получаем полной информации о работе всей нейронной сети. Кроме того, пластичность мозга зависит не только от физиологических свойств синапсов, но и от их пространственно-временного расположения в сети (Hikosaka et al., 1999; Bottjer, Altenau, 2010; Kim, Hikosaka, 2015; LeCun et al., 2015). Поэтому изучение принципов системной организации клеток, механизмов пластичности на сетевом уровне представляет сегодня особый интерес, поскольку открывает новый уровень познания в изучении функционирования мозга (Wessberg et al., 2000; Rothschild, Nelken, Mizrahi, 2010; Ko et al., 2011; Shanechi et al., 2012; Ko et al., 2013; Buzsáki, 2015; Okun et al., 2015; Moxon, Foffani, 2015; Penn, Segal, Moses, 2016).

Сеть нейронов, составляющая основу функциональной активности мозга, является высокоэффективной комплексной параллельно-последовательной системой обработки информации (Hikosaka et al., 1999; Bottjer, Altenau, 2010; Kim, Hikosaka, 2015). Она способна организовать нейроны таким образом, чтобы реализовать восприятие и распознавание образа во много раз быстрее, чем эти задачи будут решены самыми современными компьютерами (LeCun et al., 2015). Активно ведётся поиск сетевых механизмов высших функций центральной нервной системы, таких как обучение и память, в частности рассматриваются проблемы настройки нейронных сетей на исполнение функций (процессы обучения) (Garner et al., 2012; Aoki et al., 2013; Shine et al., 2015). При изучении функционирования нейронных сетей накопился ряд экспериментальных фактов, представляющих значительный интерес для технических приложений (Wessberg et al., 2000; Shanechi et al., 2012; Moxon, Foffani, 2015).

Для выявления сетевых механизмов пластичности мозга необходима разработка новых методов исследований, поиск эффективных и адекватных способов и критериев детектирования сетевых изменений на клеточном уровне (Мухина, Казанцев, Пимашкин, 2015). С этой целью в нейрофизиологии используется культивирование диссоциированных нервных клеток на

мультиэлектродных матрицах (Thomas, Loeb, Okunj, 1972; Gross et al., 1977; Wagenaar, Pine, Potter, 2006a; Мухина и др., 2009; Мухина, Хаспеков, 2010; Jäckel et al., 2017). Данная экспериментальная модель предназначена для выявления базовых принципов работы нейронной сети, не обусловленных морфологией отделов мозга, но зависящих от формирования и распространения сигнала. Культивирование клеток мозга на мультиэлектродных матрицах позволяет длительное время до нескольких месяцев регистрировать и стимулировать активность нейронов одновременно в различных участках нейронной сети (Chao, Bakkum, Potter, 2007; Madhavan, Chao, Potter, 2008).

Методы индукции пластичности в культивируемой нейронной сети большей частью основаны на протоколах стимуляции, которые приводят к долговременной потенциации или депрессии (LTP/LTD) на синаптическом уровне, например, согласно правилу пластичности, зависящей от времени импульса (STDP spike time dependent plasticity) (Bi, Poo, 1998; Jimbo, Tatenno, Robinson, 1999a; Woodin, Ganguly, Poo, 2003).

Вызванная стимуляцией пластичность в культивируемой нейронной сети изучалась с применением различных протоколов стимуляции: низкочастотной 0,5-1 Гц (Maeda et al., 1998; Vajda et al., 2008; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008; Brewer et al., 2009; Bologna et al., 2010; Ide et al., 2010;), высокочастотной 100-200 Гц (Jimbo, Robinson, Kawana, 1998; Jimbo, Tatenno, Robinson, 1999a; Tatenno, Jimbo, 1999; Wagenaar, Pine, Potter, 2006b; Veenendaal, Witteveen, Feber, 2013; Witteveen, Veenendaal, Feber le, 2013), с задержкой 10 мс, согласно правилу STDP (Wagenaar, Pine, Potter, 2006b; Chao, Bakkum, Potter, 2007), ассоциативной (Eytan, Brenner, Marom, 2003; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008; Stegenga et al., 2010) и с обратной связью, когда временное отключение стимуляции используется в качестве подкрепления (Shahaf, Marom, 2001; Marom, Eytan, 2005; Li et al., 2007; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010). Данные экспериментальные модели отличаются трудностью воспроизведения, слабо выраженным и трудно детектируемым эффектом, неубедительными доказательствами зависимости наблюдаемых эффектов от применяемой стимуляции и противоречивыми результатами (Wagenaar, Pine, Potter, 2006b; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008; Pimashkin et al., 2013). Основные проблемы моделирования пластичности в биологической нейронной сети *in vitro* заключаются в отсутствии направленной топологии связей, характерных для различных отделов мозга *in vivo*, что проявляется в нестабильности динамики сетевой активности в результате способности нейронных сетей к спонтанным функциональным перестройкам (Pelt van et al., 2005; Балашова, Дитятев, Мухина, 2013) и сложности выбора параметров адекватной оценки этой динамики. Кроме того, в культуре диссоциированных нервных клеток со случайно сформированными связями трудно выявить пути распространения

сигнала и, следовательно, определить оптимальные участки для электрической стимуляции.

В связи с этим, актуальным является поиск индикаторов функционального состояния сети для оценки изменений, вызванных электрической стимуляцией. Для решения проблемы детектирования функциональных связей в сети должна быть разработана принципиально новая экспериментальная модель нейронной сети с заданной направленной функциональной связью.

Цель работы

Целью работы явилось исследование закономерностей вызванной сетевой активности нейронов первичных культур гиппокампа при различных режимах электрической стимуляции и разработка экспериментальной модели нейронной сети и методов оценки активность-зависимой пластичности в условиях случайной и направленной архитектуры морфофункциональных связей.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние низкочастотной и высокочастотной стимуляции на функциональную сетевую активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа со случайной архитектурой морфофункциональных связей;
2. Изучить возможность достижения заданного уровня активности в нейронной сети первичных культур гиппокампа при применении протокола стимуляции с обратной связью *in vitro*;
3. Разработать экспериментальную модель *in vitro* для исследования сетевой пластичности в первичной культуре нервных клеток с направленной связью между двумя нейронными сетями.

Научная новизна

Впервые установлено, что вероятность вызова сетевого ответа в результате предъявления электрического стимула вариабельна на небольшом масштабе времени (1 час), поэтому ответы нейронной сети на стимулы сложно использовать в качестве индикаторов пластичности в нейронной сети.

Впервые разработаны критерии сетевой активности: коэффициент изменения архитектуры связей, коэффициент новых связей, коэффициент исчезновения связей, которые рассчитывались на основе метода кросс-корреляции, применительно для последовательностей импульсов в различных пространственных участках нейронной сети. Подтверждена эффективность применения данных критериев для детектирования вызванной стимуляцией пластичности в нейронной сети.

С использованием метода кросс-корреляции впервые показано, что низкочастотная стимуляция и высокочастотная стимуляция нейронной сети приводят к изменениям архитектуры функциональных связей в нейронной сети.

Кроме того, впервые выявлено, что низкочастотная стимуляция вызывает изменение паттерна активации спонтанных сетевых пачек.

Подтверждена возможность обучения нейронных сетей первичных культур гиппокампа генерировать заданную активность при применении протокола стимуляции с обратной связью. Впервые установлено, что эффективность данного протокола зависит от исходного уровня активности на выбранном для обучения участке нейронной сети.

Разработана экспериментальная модель для изучения вызванной стимуляцией пластичности в сети диссоциированных нервных клеток *in vitro*, основанная на длительном культивировании на микроэлектродной матрице двух и более субпопуляций первичных культур клеток мозга, связанных направленной морфофункциональной связью с помощью микрофлюидных чипов. Уникальность разработанной модели заключается в том, что стимуляция нервных клеток осуществляется путем направления электрического сигнала по аксонам в микроканалах от популяции-источника в популяцию-приёмник, при этом, стимулируются участки нейронной сети, соответствующие расположению пре- и постсинаптических нейронов в сконструированной связи. Стимулы подаются с задержкой, согласно правилу STDP. Оценка эффективности обучения биологической нейронной сети в этом случае проводится по показателю «Вероятность распространения сетевой пачки импульсов по направленной связи».

Научно-практическая значимость

Для фундаментальной нейрофизиологии представляются значимыми полученные в работе данные об эффектах электрической стимуляции на передачу сетевого сигнала в культуре нервных клеток. Разработаны индикаторы для оценки функциональных изменений в нейронной сети со случайной архитектурой связей. Установлена эффективность критерия «Коэффициент изменения архитектуры связей» для детектирования вызванной стимуляцией сетевых изменений активности, отражающего появление новых и исчезновение старых связей между различными участками нейронной сети.

Разработанная экспериментальная модель на основе микрофлюидных чипов и микроэлектродных матриц может широко использоваться в изучении синаптической пластичности на нейросетевом уровне, динамики нейронных сетей с реалистичной морфологией связей и межклеточных взаимодействий.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено на экспериментальной модели первичных культур диссоциированных клеток гиппокампа эмбрионов мышей. В электрофизиологических экспериментах использовались методы многоканальной регистрации и стимуляции нейросетевой активности с помощью микроэлектродных матриц. Методами иммуноцитохимии в работе

были специфически фенотипированы нейроны и их аксоны. Визуализация осуществлялась с помощью метода лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии. Способ индукции пластичности в нейронной сети был разработан на основе методики микрофлюидных чипов, формирующих направленную морфофункциональную связь между двумя первичными культурами нервных клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Изменение архитектуры связей между временными последовательностями импульсов различных участков нейронной сети, культивируемой *in vitro*, является чувствительным индикатором изменений активности нейронов в сети.

2. Электрическая стимуляция вызывает изменения функциональных связей в нейронной сети, культивируемой *in vitro*.

3. Получение заданной активности в культивируемой нейронной сети со случайной пространственной структурой связей возможно при применении протокола электрической стимуляции с обратной связью.

4. Для изучения сетевой пластичности *in vitro* необходимо формирование межсетевой направленной морфофункциональной связи, так как в простейшей сети нейронов со случайной пространственной структурой эффективность получения заданной активности очень низкая ($\leq 50\%$).

Апробация работы

Основные результаты исследования были доложены на международной научной конференции и молодёжной школе «На пути к нейроморфному интеллекту: эксперименты, модели и технологии» (Нижний Новгород, 2011); 8-ом международном симпозиуме по интегрированным микроэлектродным матрицам «The 8th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays» (Reutlingen, Germany, 2012); I Всероссийской XII научной сессии молодых учёных и студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Н.Новгород, 2013); 17-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2013); IV международном симпозиуме "Topical Problems of Biophotonics - 2013" (Н.Новгород, 2013); 9-ом международном симпозиуме по интегрированным микроэлектродным матрицам «The 9th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays» (Reutlingen, Germany, 2014); 9-ом Международном Европейском форуме нейронаук «9th FENS forum of neuroscience» (Milan, Italy, 2014); Международной школе и конференции "Saint-Petersburg OPEN 2015" (Санкт-Петербург, 2015); Международной конференции «NETT International Conference on System Level Approaches to Neural Engineering» (Barcelona, Spain, 2015); Международной конференции «Frontiers in biomedicine» (Н.Новгород, 2015); Международной

конференции «PhysicA.SPb» (Санкт-Петербург, 2015); 68-й областной научной конференции студентов и аспирантов «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Н.Новгород, 2015); 10-ом международном симпозиуме по интегрированным микроэлектродным матрицам «The 10th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays» (Reutlingen, Germany, 2016); Международной конференции «Volga Neuroscience Meeting 2016» (Санкт-Петербург-Н.Новгород, 2016); 10-ом Международном Европейском форуме нейронаук «10th FENS forum of neuroscience» (Copenhagen, Denmark, 2016); Международной школе и конференции "Saint-Petersburg OPEN 2016" (Санкт-Петербург, 2016), 11-ом международном симпозиуме по интегрированным микроэлектродным матрицам «The 11th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays» (Reutlingen, Germany, 2018); 11-ом Международном Европейском форуме нейронаук «11th FENS forum of neuroscience» (Berlin, Germany, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 40 работ, включая 8 публикаций в рецензируемых научных изданиях, включённых в перечень ВАК, 2 статьи в других изданиях, 25 тезисов конференций, 4 патента и 1 свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 146 листах, содержит 32 иллюстрации. Список литературы включает 206 источников.

Благодарность

Автор благодарит Пимашкина А.С. за консультации и результативное сотрудничество, а также Nabibey R. и Малышева Е.И. за помощь в оптимизации микрофлюидных методов. Работа выполнена при поддержке РФФ (14-19-01381) и грантов президента РФ (МК-4602.2013.4, МК-8731.2016.4).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования

Объект исследования. В исследовании использовались культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученных от 18-дневных (E18) эмбрионов аутбредных белых мышей. Все экспериментальные процедуры, основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»; Приказе 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 ВПО «ПИМУ» Минздрава России.

Регистрация и стимуляция сетевой биоэлектрической активности. Внеклеточные потенциалы регистрировались одновременно через плоские микроэлектроды системы MEA120 (Multichannel systems, Германия) и MED64 (Alpha Med Science, Япония). Запись происходила с частотой амплитудно-импульсного захвата данных 20 кГц/канал (59 регистрирующих электродов, с диаметром 30 мкм и расстоянием между электродами 200 мкм). Детектирование внеклеточных импульсов (внеклеточных потенциалов активности клеток), было основано на вычислении порога амплитуды регистрируемого сигнала (Pimashkin et al., 2011). Для стимуляции нейронных культур применяли последовательности бифазных прямоугольных импульсов напряжения ± 600 -800 мВ и 260 мкс на фазу, первая положительная. Для низкочастотной стимуляции (0,20-0,33 Гц) выбирались электроды матрицы, при стимуляции которых вызывался сетевой ответ в виде пачки биоэлектрических импульсов. Высокочастотная стимуляция (10 Гц) осуществлялась через два канала с задержкой 10 мс и включала 150 серий из 20 стимулов на канал, интервал между стимулами - 100 мс, между сериями 6 с (Wagenaar et al., 2006b).

Для оценки функциональных связей в нейронной сети рядом исследователей используется метод корреляционного анализа сетевой активности, регистрируемой в различных участках сети (Chiappalone et al., 2006; Feberle et al., 2007; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008). Меру передачи импульсов для каждой пары электродов (i , j) определяли, как процент импульсов от i -го электрода, найденных на j -ом электроде с различной задержкой по времени. Функция данной меры по времени является кросскорреляционной функцией. О силе связи судили по максимальному значению корреляционной функции, найденному на задержке от 0 до 150 мс. Было принято, что между активностью, регистрируемой i -м и j -м электродами есть корреляционная связь, если максимум корреляционной функции наблюдался на задержке больше нуля.

Чип с микроканалами для выращивания нейронных культур с направленной связью. Для приготовления микрочипов из полидиметилсилоксана (PDMS) использовался «Sylgard 184 silicone elastomer base» и «Sylgard 184 silicone elastomer curing agent» (DowCorning, США) в пропорции 10:1. Система микроканалов выполнялась в PDMS-оттиске методом «мягкой литографии» с применением кремниевого штампа. В полученном чипе вырезали сквозные отверстия для камер, в которых в дальнейшем культивировались клетки (рис.

1А, Б, Г, Д). Форма микроканалов обеспечивала преимущественный рост аксонов из одной камеры, камеры источника (или *камеры А*), в камеру приёмник (или *камеру Б*) (рис. 1В, Г, Д). Микроканалы и электроды матрицы выравнивались так, чтобы электроды располагались в области узких мест микроканалов (рис. 1 Е).

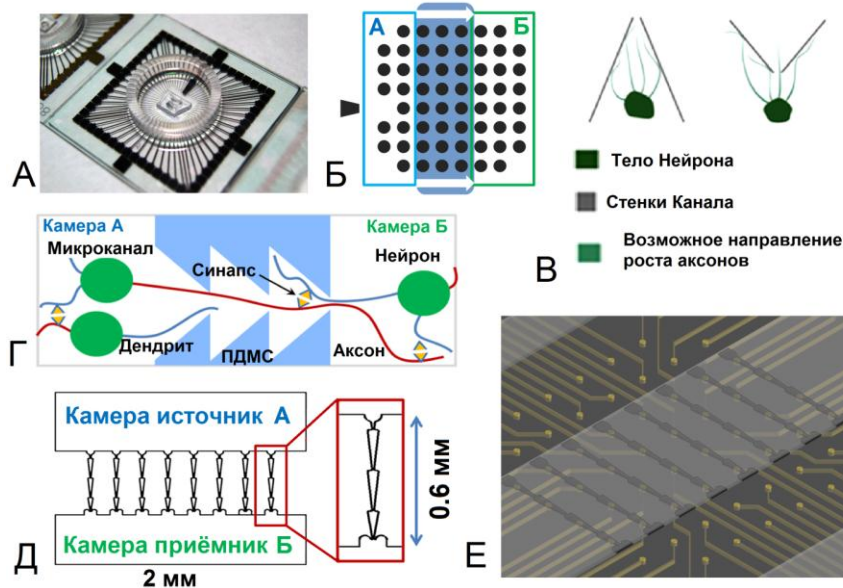


Рис. 1. Чип с микроканалами для направленного роста аксонов. А – микроэлектродная матрица с прикреплённым силиконовым чипом, Б – схема расположения камер для культивирования клеток и микроэлектродов

матрицы, В – схема препятствования росту аксонов в одном из направлений в микроканале, Г – Схематическое изображение формирования направленной связи между двумя популяциями нейронов, Д – Дизайн чипа с микроканалами, использованный в исследовании, Е – Трёхмерная схема микроканалов, образующихся при прикреплении силиконового чипа к поверхности микроэлектродной матрицы.

Характеристики сетевой активности. Традиционные характеристики включали: частоту импульсов (имп/с), частоту пачек (пачка/мин); длительность пачек (мс), межпачечный интервал (мс); число импульсов в пачке (имп/пачка);

Разработанные в исследовании характеристики включали:

- *разницу паттернов активации сетевых пачек* - разница между векторами средних значений времён первых импульсов сетевых пачек;
- *разницу паттернов частоты импульсов сетевых пачек* - разницу между векторами средних значений частот импульсов в течение записи спонтанной активности (20 минут) для каждого регистрирующего электрода;
- *число связей* - количество функциональных связей, найденных при кросскорреляционном анализе последовательностей импульсов всех возможных пар регистрирующих электродов (3422 для матрицы с 59 электродами);
- *коэффициент новых связей* - соотношение (%) новых функциональных связей, найденных при кросскорреляционном анализе последовательностей импульсов всех возможных пар регистрирующих электродов, относительно исходного числа связей;

- *коэффициент исчезновения связей* - соотношение (%) исчезнувших функциональных связей, найденных при кросскорреляционном анализе последовательностей импульсов всех возможных пар регистрирующих электродов, относительно исходного числа связей;

- *коэффициент изменения архитектуры связей* между различными участками нейронной сети - соотношение (%) новых и исчезнувших функциональных связей, найденных при кросскорреляционном анализе последовательностей импульсов всех возможных пар регистрирующих электродов, относительно исходного числа связей;

- *коэффициент изменения силы стабильных связей* - изменение (%) значения максимума кросскорреляционной функции только для стабильных связей.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Различия между двумя наборами данных в зависимых выборках, оценивали при помощи непараметрического критерия суммы рангов Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Данные представлены в виде среднего значения \pm среднееквадратическое отклонение или в виде медианы \pm 25-й и 75-й процентиля. Где это необходимо, приведены распределения значений для сравниваемых выборок.

Результаты и их обсуждение

Влияние низкочастотной стимуляции на функциональную сетевую активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа

В исследовании применяли протокол низкочастотной стимуляции, который состоял из последовательности бифазных стимулов, по 30 стимулов на каждый из 12 выбранных электродов последовательно с межстимульным интервалом 5 с. Экспериментальный протокол состоял из 1 часа записи спонтанной активности до и после низкочастотной стимуляции. Этот час разделялся на 20 минутные интервалы для анализа.

Три записи до стимуляции были приняты в качестве контроля: контроль 1 (K1), контроль 2 (K2), контроль 3 (K3), три последовательные записи после стимуляции обозначались ПС1, ПС2, ПС3.

Было найдено, что после проведения низкочастотной стимуляции показатели сетевой активности *Частота импульсов*, *Частота пачек*, *Длительность пачек*, *Межпачечный интервал*, *Число импульсов в пачке* не изменялись. *Разница паттернов активации* была больше после стимуляции ($p < 0,05$). Т.е, изменения паттерна активации пачек после стимуляции были достоверно больше, чем спонтанные изменения. В то же время *Разница паттернов частоты импульсов* не изменялась после низкочастотной

стимуляции (рис. 2). Следовательно, среди рассмотренных частотно-временных характеристик сетевой активности только показатель «*Разница паттернов активации*» мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений в нейронной сети.

После проведения низкочастотной стимуляции показатель *Число связей* не отличалось от значений до стимуляции. Следовательно, показатель *Число связей* не мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений в нейронной сети. Низкочастотная стимуляция приводила к достоверному изменению *Коэффициента изменения архитектуры связей* и *Коэффициента исчезновения связей* ($p < 0,05$) (рис. 2В-Е). В то же время показатель *Коэффициент новых связей* не изменялся после низкочастотной стимуляции.

После низкочастотной стимуляции не наблюдалось достоверных изменений показателя *Коэффициент изменения силы стабильных связей*. Следовательно, этот показатель не мог быть рассмотрен как индикатор функциональных изменений в нейронной сети *in vitro* со случайной архитектурой морфофункциональных связей.

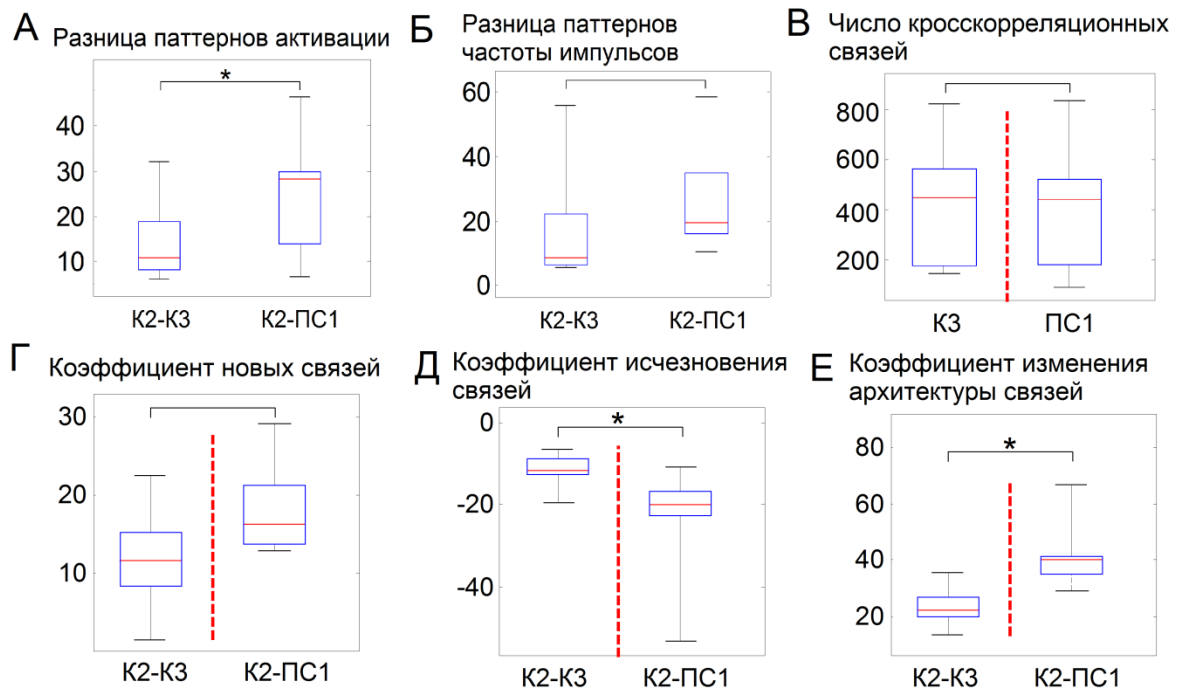


Рис. 2. Сравнение показателей *Разница паттернов активации* (А) и *Разница паттернов частоты импульсов* (Б) *Число связей* (В), *Коэффициент новых связей* (Г), *Коэффициент исчезновения связей* (Д), *Коэффициент изменения архитектуры связей* (Е) до и после низкочастотной стимуляции. До стимуляции оценивали показатели для двух контрольных записей спонтанной активности нейронной сети (контроль2 и 3, K2-K3) и контрольной записи и после стимуляции (контроль2 и запись после стимуляции 1, K2-PC1), $n = 7$ культур, * - $p < 0,05$, тест Вилкоксона.

Влияние высокочастотной стимуляции на функциональную сетевую активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа

Протокол высокочастотной стимуляции был основан на известном ранее (Wagenaar, Pine, Potter, 2006b)) и заключался в стимуляции через два канала, включал 150 серий из 20 стимулов, интервал между стимулами - 100 мс (10 Гц), между сериями 6 с, задержка между стимулами первого и второго каналов была равной 10 мс. Новизна заключалась в том, что стимуляция через два канала подавалась на 8 электродов, по 4 электрода на канал. Стимулирующие электроды располагались в два ряда в противоположных частях одной половины культуры. Другая половина культуры не стимулировалась. Предполагалось, что такое расположение должно было усилить эффект от стимуляции.

Экспериментальный протокол состоял из 1 часа записи спонтанной активности до и после высокочастотной стимуляции. Этот час разделялся на 20 минутные интервалы для анализа. Три записи до стимуляции были приняты в качестве контроля: контроль 1 (K1), контроль 2 (K2), контроль 3 (K3), три последовательные записи после стимуляции обозначались ПС1, ПС2, ПС3.

После проведения высокочастотной стимуляции показатели сетевой активности *Частота импульсов*, *Частота пачек*, *Длительность пачек*, *Межпачечный интервал*, *Число импульсов в пачке* не изменялись, как и после низкочастотной стимуляции. В отличие от низкочастотной стимуляции показатель *Разница паттернов активации* не изменялся. В то же время показатель *Разница паттернов частоты импульсов* был больше после стимуляции ($p < 0,05$). Другими словами, изменения *паттерна частоты импульсов* после стимуляции были больше, чем спонтанные изменения (рис. 3А, Б).

После высокочастотной стимуляции *Число кросскорреляционных связей* не отличалось от значений до стимуляции. Было выявлено, что высокочастотная стимуляция приводила к изменению *Коэффициента изменения архитектуры связей* и *Коэффициента новых связей* ($p < 0,05$). В то же время показатель *Коэффициент исчезновения связей* не изменялся после высокочастотной стимуляции (рис. 3В-Е). Как и после низкочастотной стимуляции после высокочастотной стимуляции не наблюдалось достоверных изменений показателя *Коэффициент изменения силы стабильных связей*, следовательно, этот показатель не мог быть рассмотрен как индикатор функциональных изменений в нейронной сети.

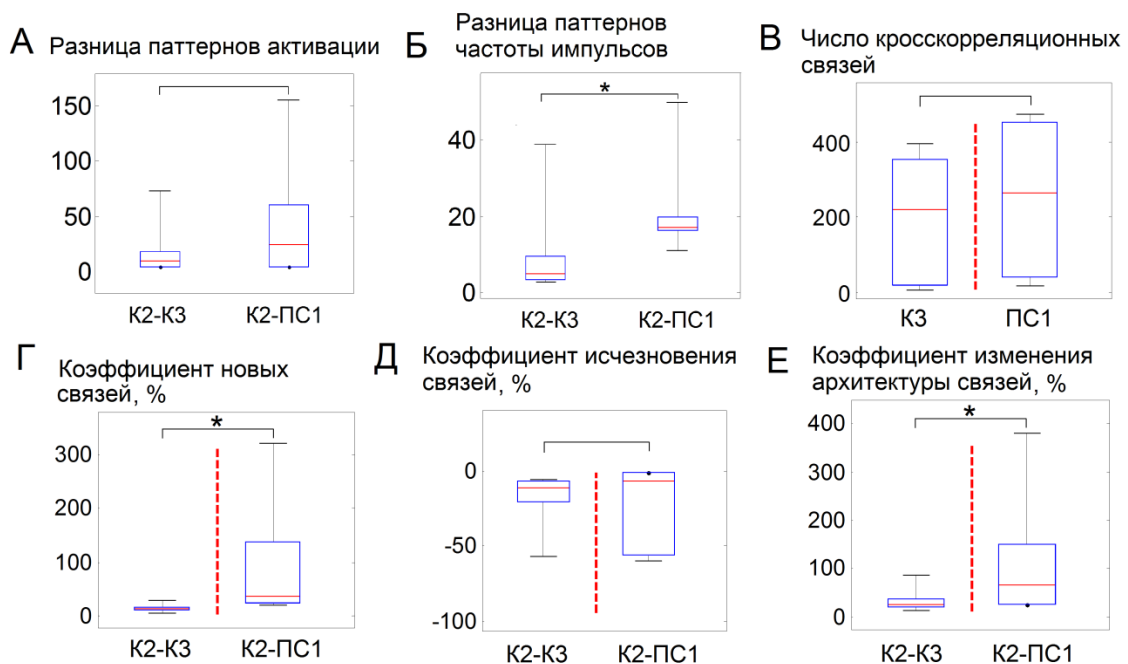


Рис. 3. Сравнение показателей *Разница паттернов активации* (А), *Разница паттернов частоты импульсов* (Б), *Число кросскорреляционных связей* (В), *Коэффициент новых связей* (Г), *Коэффициент исчезновения связей* (Д), *Коэффициент изменения архитектуры связей* (Е) до и после высокочастотной стимуляции. До стимуляции оценивали разницы паттернов активности для двух контрольных записей спонтанной активности нейронной сети (контроль2 и 3, K2-K3) и контрольной записи и после стимуляции (контроль2 и запись после стимуляции 1, K2-ПС1), $n = 6$ культур, * - $p < 0,05$, тест Вилкоксона.

Возможность обучения нейронных сетей *in vitro* генерировать заданную активность с помощью стимуляции с обратной связью при разном исходном уровне активности

Метод «обучения» нейронной сети генерировать заданную активность заключался в том, что на культуру клеток непрерывно подавалась низкочастотная стимуляция, при достижении желаемого ответа в виде определённого числа импульсов в заданном временном интервале после стимула на заданном электроде, стимуляция отключалась на время (5 минут). Затем цикл стимуляции до достижения желаемого ответа повторялся. Нейронная сеть обучалась давать заранее заданные ответы на стимуляцию (индифферентный стимул, или условный стимул) (Shahaf, Morom, 2001).

В предыдущих исследованиях (Shahaf, Marom, 2001; Marom, Shahaf, 2002; Marom, Eytan, 2005; Li et al., 2007; Stegenga et al., 2009; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010) для протокола обучения выбирались электроды с характерными значениями числа вызванных импульсов в заданном временном интервале после стимула: среднее отношение импульсов в ответе к количеству стимулов $M(R/S)$ равное 0,1. Значение R/S , равное 0,2, было порогом для прекращения

стимуляции на 5 минут ("подкрепления"). В наших экспериментах было установлено, что $38,2 \pm 8,4\%$ электродов в течение контрольной стимуляции (стимуляция с частотой 0,05 Гц пятью сериями по 10 минут с отключением стимуляции на 5 минут) имели $0 < M(R/S) \leq 0,1$ (5 культур). Количество электродов с $0 < M(R/S) \leq 0,5$ было $67,3 \pm 11,4\%$ от общего числа электродов. Для оценки эффективности обучения мы использовали отношение средних значений времени достижения порога ($K(T_{R/S})$) за первые и последние 10 циклов стимуляции. Если это отношение было меньше 0,6 ($K(T_{R/S}) < 0,6$), то обучение считалось успешным.

Протокол обучения с подкреплением на основе стимуляции с обратной связью был успешно применён для электродов с R/S равным 0,1-0,5 в контрольной стимуляции. Пороговое значение R/S выбиралось как граница 20%, 15%, 10% и 5% наибольших значений R/S на выбранном электроде, которые наблюдались в контрольной стимуляции. Эффект обучения достигался при использовании порога равного 10% наибольших значений R/S в тестовой стимуляции в 6 из 13 экспериментов (всего 24 эксперимента с использованием разных способов вычисления порога). График динамики времени стимуляции, требуемого для достижения заданного ответа (кривая обучения), для успешных экспериментов изображён на рисунке 4.

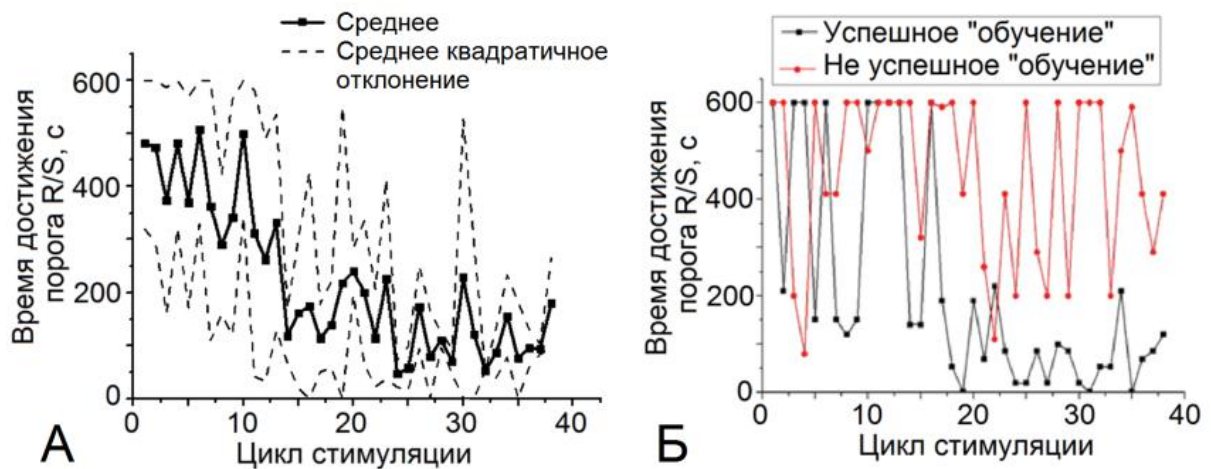


Рис. 4. Динамика времени стимуляции, требуемого для достижения заданного ответа (кривая обучения). А. Кривая обучения, усреднённая по шести экспериментам, при стимуляции с обратной связью; Б. Пример кривой обучения, полученной в одном из успешных экспериментов и отсутствие достижения эффекта обучения.

Следует отметить, что адаптивный результат успешно достигался лишь при использовании в модели обучения участков нейронной сети с относительно низкой исходной активностью, среднее значение R/S не более 0,5. Более активные участки нейронной сети не достигали критерия обучения в данных условиях стимуляции с обратной связью (рис. 5), что может быть связано либо с

особенностями пластичности на уровне нейронных сетей, либо с особенностями выбранной модели обучения.

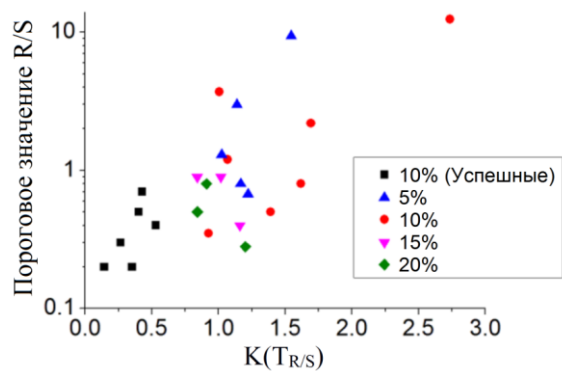


Рис. 5. Значения R/S для экспериментов, в которых наблюдался эффект уменьшения времени вызова заданного ответа (чёрные отметки) и для экспериментов, в которых желаемый эффект не наблюдался (цветные отметки). Цветом отображены соответствующие проценты (5%, 10%, 15% и 20%) значений R/S в выборке, полученной при контрольной стимуляции, которые использовались для вычисления порогового значения R/S, достижение которого приводило к отключению стимуляции для данного эксперимента.

15% и 20%) значений R/S в выборке, полученной при контрольной стимуляции, которые использовались для вычисления порогового значения R/S, достижение которого приводило к отключению стимуляции для данного эксперимента.

В случаях успешного обучения на выбранном электроде (участке нейронной сети) в ответе на низкочастотные стимулы наблюдалось увеличение числа импульсов. В то же время увеличение числа импульсов наблюдалось в ответах на стимулы, регистрируемых на всех электродах матрицы (рис. 6). Таким образом, при успешном достижении заданного ответа увеличивалась активность всей нейронной сети со случайной архитектурой морфофункциональных связей.

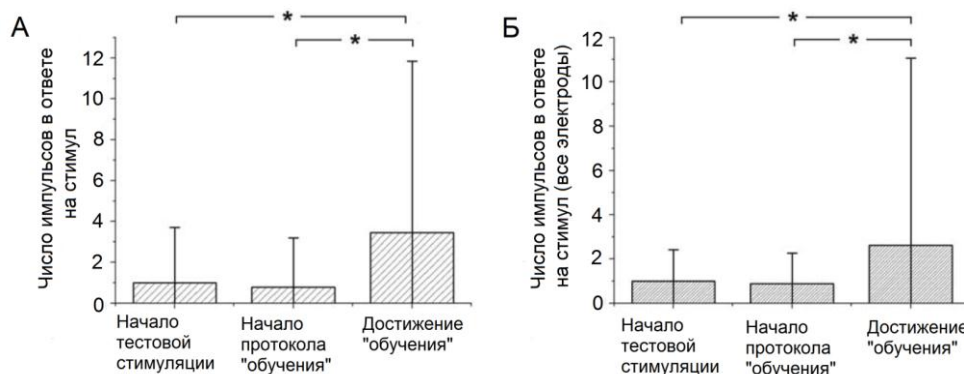


Рис. 6. Количество вызванных импульсов в интервале 40-80 мс после стимула, регистрируемых на выбранном для обучения электроде (А) и на всех электродах матрицы (Б). Анализировались ответы на 100 первых стимулов в начале тестовой стимуляции, в начале и в конце стимуляции с обратной связью (протокол обучения). Сравнивались 6 экспериментов, в которых наблюдался эффект уменьшения времени вызова заданного ответа. * - $p < 0,05$, тест Вилкоксона (Среднее \pm Среднеквадратическое отклонение).

Таким образом, при применении разработанного нами подхода вычисления порогового значения R/S протокол обучения мог применяться для

большинства электродов. Однако в результате обучения изменялась активность всей сети, а не отдельно взятых участков сети. В тоже время, нейронная сеть со случайной архитектурой морфофункциональных связей демонстрировала низкую эффективность протокола (50%), зависимость от исходного уровня активности. Всё это затрудняло использование протокола стимуляции с обратной связью для изучения пластичности в нейронной сети.

Моделирование направленной морфофункциональной связи между двумя подсетями первичной культуры гиппокампа

Морфологическая связь между субпопуляциями нервных клеток формировалась на 5-7 день развития, когда аксоны прорастали сквозь микроканалы. Морфология нейронов и их аксонов в микроканалах была визуализирована методом иммуноцитохимического окрашивания белков микротрубочек - $\beta 3$ -тубулина и Тау специфическими антителами на 6 DIV. Положительное окрашивание аксонов наблюдалось на протяжении всего микроканала.

Вероятность распространения сетевых пачек из камеры А в камеру В ($ВР_{AB}$, %) рассчитывали, как процент спонтанных пачек в камере А, вызвавших пачку импульсов в камере В. *Вероятность распространения сетевых пачек из камеры В в камеру А* ($ВР_{BA}$, %) рассчитывали, как процент спонтанных пачек в камере В, вызвавших пачку импульсов в камере А. Процент стимулов через электрод в камере А, которые вызвали ответы в обеих камерах, был определен как *вероятность распространения вызванной пачки* ($ВР_{AB}$). В зрелых культурах (на 20 DIV) спонтанные пачки импульсов распространялись преимущественно в одном направлении из камеры А в камеру В (рис. 7А).

В направлении из камеры В в А распространялось в среднем менее 20% спонтанных пачек импульсов. Стимуляция электрода в камере А могла вызывать ответы в виде пачек импульсов только в камере А или в двух камерах А и В. При этом пачки импульсов в камере В вызывались с задержкой 50-100 мс после стимула. Стимул, поданный через электрод в камере В, как правило вызывал пачки импульсов лишь в камере В (рис. 7Б). В зрелой культуре (20 DIV) для вызванных короткими низкочастотными стимулами пачек импульсов $ВР_{AB}$ была больше, чем $ВР_{BA}$. В среднем $ВР_{AB}$ была около 28%, $ВР_{BA}$ – около 10%.

Таким образом, по аксонам в микроканалах треугольной формы сетевые пачки импульсов, как спонтанной, так и вызванной стимулом активности, распространялись преимущественно в одном направлении от сети в камере А к сети в камере В.

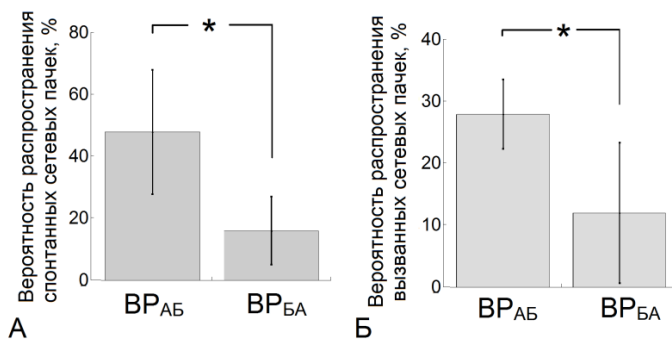


Рис. 7. Распространение спонтанной пачки импульсов по направленной связи А. *Вероятность распространения спонтанных сетевых пачек из камеры А в камеру Б (BP_{AB}) и. Вероятность распространения спонтанных сетевых пачек из*

камеры Б в камеру А (BP_{BA}) Б. *Вероятность распространения сетевых пачек из камеры А в камеру Б (BP_{AB}), вызванных стимулом через электрод в камере А и. Вероятность распространения сетевых пачек из камеры Б в камеру А (BP_{BA}), вызванных стимулом через электрод в камере Б, *p < 0,05 тест Вилкоксона, n = 6 культур 20 DIV (Среднее ± Среднеквадратическое отклонение).*

Разработка способа индукции пластичности в нейронной сети

Разработана новая модель для изучения пластичности в сети культивируемых диссоциированных клеток гиппокампа с направленной связью с помощью электрической стимуляции, в которой направленная связь между популяциями нейронов служит мишенью для воздействия электрических стимулов. Отличительная особенность разработанной модели от прежних подходов (Jimbo, Robinson, Kawana, 1998; Jimbo, Tateno, Robinson, 1999b; Wagenaar, Pine, Potter, 2006b) заключается в том, что стимуляция нервных клеток осуществляется путем направления электрического сигнала по аксонам в микроканалах от популяции-источника в популяцию-приёмник, при этом, стимулируются участки нейронной сети, соответствующие расположению пре- и постсинаптических нейронов в сконструированной направленной связи. Протокол высокочастотной стимуляции через два канала формируется таким образом, чтобы стимулы от второго стимулирующего канала подавались после стимулов с первого канала с задержкой, соответствующей правилу STDP.

Были проведены эксперименты, в которых функциональное состояние связей оценивали по показателю *Вероятность распространения (BP)* пачек импульсов, вызванных низкочастотными стимулами, после индуцирующей пластичность высокочастотной стимуляции по правилу STDP. Для вызванных сетевых пачек лишь в одной из 5 культур наблюдалось увеличение значения BP_{AB} после высокочастотной стимуляции, что говорило о потенциации связи. В других трёх культурах наблюдалось уменьшение значения BP_{AB} (депрессия). В одной культуре для всех стимулирующих электродов спонтанные колебания BP_{AB} были соразмерны с изменениями BP_{AB} после высокочастотной стимуляции (отсутствие эффекта пластичности).

Таким образом, в отличие от показателя BP_{AB} для спонтанных сетевых пачек импульсов, показатель BP_{AB} для вызванных сетевых пачек импульсов изменялся после высокочастотной стимуляции через два входа с задержкой 10 мс. Высокочастотная стимуляция двух связанных популяций нервных клеток с задержкой 10 мс (первая популяция-источник, *камера А*) приводила к разнонаправленным эффектам изменения вероятности распространения сигнала между этими популяциями. Несмотря на разнонаправленность вызванных эффектов (потенциация/депрессия), результаты свидетельствуют об эффективности применения разработанной экспериментальной модели для вызова функциональных изменений в культивируемой нейронной сети с направленной архитектурой морфофункциональных связей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вызванная стимуляцией пластичность в культивируемой нейронной сети изучалась с применением различных протоколов стимуляции: низкочастотной 0,20-0,33 Гц и высокочастотной 10 Гц, с задержкой 10 мс, согласно правилу STDP, и с обратной связью, когда временное отключение стимуляции используется в качестве подкрепления.

При исследовании эффекта электрической стимуляции нейронных сетей со случайной архитектурой морфофункциональных связей было выявлено, что как низкочастотная, так и высокочастотная стимуляция вызывали изменение путей распространения импульсов в нейронной сети при активации сетевых пачек. Индикаторами вызванной сетевой активности являлись показатели *«Разница паттернов активации»* при низкочастотной стимуляции и *«Разница паттернов частоты импульсов»* при высокочастотной стимуляции. По данным кросскорреляционного анализа как после высокочастотной стимуляции, так и после низкочастотной стимуляции не наблюдалось изменений числа связей между активностью различных участков нейронной сети, в тоже время изменялась архитектура связей в сети, для оценки которой был разработан критерий *Коэффициент изменения архитектуры связей*.

Подтверждена возможность достижения заданного уровня активности в нейронных сетях первичных культур гиппокампа со случайной архитектурой морфофункциональных связей при применении протокола стимуляции с обратной связью. Эффективность данного протокола зависит от исходного уровня активности на выбранном для обратной связи участке нейронной сети. Заданного уровня активности успешно достигали лишь участки нейронной сети с относительно низкой исходной активностью. В результате стимуляции с обратной связью изменялась активности всей сети, а не отдельно на выбранном участке нейронной сети.

Разработан способ индукции пластичности в сети культивируемых диссоциированных клеток гиппокампа с направленной связью с помощью высокочастотной электрической стимуляции. Отличительная особенность способа заключается в том, что стимулируются участки нейронной сети, соответствующие расположению пре- и постсинаптических нейронов в сконструированной связи с задержкой, соответствующей правилу STDP, соответствующему типу культивируемых нервных клеток. Полученные данные показали эффективность применения разработанной экспериментальной модели для вызова функциональных изменений в культивируемой нейронной сети.

ВЫВОДЫ

1. Эффективным индикатором функциональных изменений сетевой активности в простой нейронной сети является показатель «Коэффициент изменения архитектуры связей», отражающий динамику появления и исчезновения связей в сетевой активности.
2. Электрическая стимуляция короткими двухфазными прямоугольными импульсами (± 800 мВ, 260 мс/фаза, первая положительная) с низкой частотой (0,20-0,33 Гц) в течение 20 минут вызывает изменение показателя «Разница паттернов активации», а также изменение архитектуры связей в сетевой активности нейронов при стабильном общем количестве связей.
3. Электрическая стимуляция короткими двухфазными прямоугольными импульсами (± 800 мВ, 260 мс/фаза, первая положительная) с высокой частотой (10 Гц, 150 серий из 20 стимулов, интервал между стимулами - 100 мс, между сериями 6 с, через два канала стимуляции по 4 электрода на канал, задержка между каналами стимуляции 10 мс) вызывает изменение показателя «Разница паттернов частоты импульсов», а также изменение архитектуры связей в сетевой активности при стабильном общем количестве связей.
4. Эффективность протокола стимуляции с обратной связью для достижения заданного уровня активности в нейронных сетях первичных культур гиппокампа зависит от исходного уровня активности выбранного участка нейронной сети для обратной связи. Результатом достижения заданной активности в нейронных сетях *in vitro* является изменение активности всей сети, а не отдельно взятых участков сети;
5. Разработан способ индукции пластичности в нейронной сети культуры диссоциированных клеток гиппокампа с направленной архитектурой морфофункциональных связей с помощью электрической стимуляции на основе правила STDP. Эффективным индикатором функциональных изменений нейронной сети в данной модели является показатель «вероятность распространения вызванной сетевой пачки импульсов» по направленной связи между двумя подсетями.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Пимашкин, А.С. Модель обучения нейронных сетей в культурах клеток гиппокампа *in vitro* / А.С. Пимашкин, **А.А. Гладков**, И.В. Мухина, М.С. Бурцев, В.А. Ильин, В.Б. Казанцев // Математическая биология и биоинформатика. — 2012. — Т. 7, № 2. — С. 545–553.
2. Pimashkin, A. Adaptive enhancement of learning protocol in hippocampal cultured networks grown on multielectrode arrays / A. Pimashkin, **A. Gladkov**, I. Mukhina, V. Kazantsev // *Frontiers in Neural Circuits*. — 2013. — Vol. 7. — P. 1–9.
3. Malishev, E. Microfluidic device for unidirectional axon growth / E. Malishev, A. Pimashkin, **A. Gladkov**, Y. Pigareva, A. Bukatin, V. Kazantsev, I. Mukhina, M. Dubina // *Journal of Physics: Conference Series*. — 2015. — Vol. 643. — P. 1–6.
4. Pimashkin, A. Selectivity of stimulus induced responses in cultured hippocampal networks on microelectrode arrays / A. Pimashkin, **A. Gladkov**, E. Agrba, I. Mukhina, V. Kazantsev // *Cognitive Neurodynamics*. — 2016. — Vol.10, №4. — P. 287–299.
5. Pigareva, Y. Neural signal registration and analysis of axons grown in microchannels / Y. Pigareva, E. Malishev, **A. Gladkov**, V. Kolpakov, A. Bukatin, I. Mukhina, V. Kazantsev, A. Pimashkin // *Journal of Physics: Conference Series*. — 2016. — Vol. 741. — P. 1–6.
6. **Gladkov, A.** Design of Cultured Neuron Networks *in vitro* with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels / **A. Gladkov**, Y. Pigareva, D. Kutyina, V. Kolpakov, A. Bukatin, I. Mukhina, V. Kazantsev, A. Pimashkin // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 15, №7(1):15625. doi: 10.1038/s41598-017-15506-2.
7. **Гладков, А.А.** Функциональная структура связей в диссоциированной культуре гиппокампа, выращиваемой на микроэлектродной матрице / **А.А. Гладков**, В.Н. Колпаков, Я.И. Пигарева, И.В. Мухина, В.Б. Казанцев, А.С. Пимашкин // *Современные технологии в медицине*. — 2017. — Т.9, №2. — С. 61–67.
8. **Гладков, А.А.** Метод изучения вызванной стимулом пластичности в нейронных сетях на основе культивирования клеток мозга в микрофлюидных чипах / **А.А. Гладков**, В.Н. Колпаков, Я.И. Пигарева, А.С. Букатин, В.Б. Казанцев, И.В. Мухина, А.С. Пимашкин // *Современные технологии в медицине*. — 2017. — Т.9, №4. С.15–24.

Статьи в других изданиях:

1. **Гладков, А.А.** Развитие пространственно-временной структуры нейронной сети гиппокампа *in vitro* / **А.А. Гладков**, М.В. Ведунова, С.А. Коротченко, Ю.Н. Захаров, А.Н. Балашова, И.В. Мухина // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. — 2011. — Т. 2, №2. — С. 243 - 249.
2. **Гладков, А.А.** Особенности сетевого отклика на электрическую стимуляцию нейронной сети зрелой культуры клеток гиппокампа мышей / **А.А. Гладков**, А.С. Пимашкин, А.П. Лепина, В.Б. Казанцев, И.В. Мухина // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. — 2014. — Т3, №.1. — С. 57 - 64.

Тезисы конференций:

1. **Гладков, А.А.** Развитие функциональной сети диссоциированной культуры клеток гиппокампа мышей / **А.А. Гладков**, Т.А. Сахарнова, В.Б. Казанцев, И.В. Мухина // Сборник докладов международной научной конференции и молодежной школы «На пути к нейроморфному интеллекту: эксперименты, модели и технологии». Нижний Новгород, 3–7 октября 2011. — С. 8 – 9.

2. **Gladkov, A.A.** Adaptive learning protocol in cultured networks / **A.A. Gladkov**, A.S. Pimashkin, I.V. Muchina, V.B. Kazancev // Proceedings MEA meeting 2012. The 8th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays, Reutlingen, Germany, 10-13 July 2012. — P. 55-56.
3. Pimashkin, A.S. Selectivity of neural responses to electrical stimulus location in dissociated hippocampal cultures grown on multielectrode arrays / A.S. Pimashkin, **A.A. Gladkov**, I.V. Muchina, V.B. Kazancev // Proceedings MEA meeting 2012. The 8th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays, Reutlingen, Germany, 10-13 July 2012. — P. 61-62.
4. Procin, I.S. Detection of multiple spike transmission pathways in neuronal networks based on multichannel recordings / I.S. Procin, **A.A. Gladkov**, I.V. Muchina, V.B. Kazancev // Proceedings MEA meeting 2012. The 8th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays, Reutlingen, Germany, 10-13 July 2012. — P. 226-227.
5. **Гладков, А.А.** Динамика вызванной активности диссоциированных культур клеток гиппокампа мышей при электрической стимуляции / **А.А. Гладков**, А.С. Пимашкин, В.Б. Казанцев, И. В. Мухина // Материалы I Всероссийской XII научной сессии молодых учёных и студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине», Н.Новгород, 15 марта 2013. — С. 55-56.
6. **Гладков, А.А.** Модель обучения нейронных сетей в культурах клеток гиппокампа in vitro / **А.А. Гладков**, А.С. Пимашкин, В.Б. Казанцев, И. В. Мухина // Биология – наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов, Пущино. 21 – 26 апреля 2013. — С. 104-105.
7. Pimashkin, A.S. Learning and adaptation in dissociated neural cultures grown on multielectrode arrays / A.S. Pimashkin, **A.A. Gladkov**, I.V. Muchina, V.B. Kazancev // Proceedings of IV International Symposium "Topical Problems of Biophotonics 2013", Nizhny Novgorod, Russia, 21-27 July 2013. — P. 247-248.
8. **Gladkov, A.A.** Spontaneous and stimulus induced connectivity changes in cultured neural network / **A.A. Gladkov**, A.S. Pimashkin, A.P. Lepina, V.B. Kazancev, I.V. Muchina // The 9th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays, Reutlingen, Germany, 1 - 4 July 2014. — P. 228-229.
9. Pimashkin, A.S. Cross-correlation of neural culture spiking activity on multielectrode arrays is strongly dependent on bursting activity pattern / A.S. Pimashkin, **A.A. Gladkov**, A.P. Lepina, I.V. Muchina, V.B. Kazancev // The 9th international meeting on substrate-integrated microelectrode arrays, Reutlingen, Germany, 1 - 4 July 2014. — P. 226-227.
10. **Gladkov, A.A.** Plasticity of stimulus evoked response in closed-loop conditions in cultured dissociated networks / **A.A. Gladkov**, A.S. Pimashkin, A.P. Lepina, V.B. Kazancev, I.V. Muchina // Abstracts of 9th FENS forum of neuroscience, Milan, Italy, 5–9 July 2014. Abstract number FENS-3081.
11. Pimashkin, A.S. Different approaches of electrical stimulation to induce plasticity associated changes in activity pattern of cultured neural network / A.S. Pimashkin, **A.A. Gladkov**, A.P. Lepina, I.V. Muchina, V.B. Kazancev // Abstracts of 9th FENS forum of neuroscience, Milan, Italy, 5–9 July 2014. Abstract number FENS-3128.
12. **Gladkov, A.A.** Network synaptic plasticity in dissociated neuronal culture with directed connectivity / **A.A. Gladkov** // NETT International Conference on System Level Approaches to Neural Engineering, Barcelona, Spain, 21 – 23 September 2015. — P. 13.
13. Pigareva, Y. Growing unidirectional synaptic architecture in dissociated neuronal cultures using microfluidic methods / Y. Pigareva, **A. Gladkov**, V. Kolpakov, E.

- Malishev, V. Kazantsev, I. Mukhina, A. Pimashkin // Proceedings of the international conference “frontiers in biomedicine”, Nizhny Novgorod, Russia, 11 – 13 November 2015. — P. 31-33.
14. Pimashkin, A. Microfluidics applications in fundamental and medical studies in neuroscience / A. Pimashkin, **A. Gladkov**, V. Kolpakov, Y. Pigareva, E. Malishev, A. Bukatin, V. Kazantsev, I. Mukhina // Proceedings of the international conference “frontiers in biomedicine”, Nizhny Novgorod, Russia, 11 – 13 November 2015. — P. 33-35.
15. Malishev, E. Microelectrode array development for registration of electrophysiological activity in neuronal culture in vitro / E. Malishev, K. Frizyuk, A. Pimashkin, **A. Gladkov**, A. Bukatin, S. Vdovichev, V. Kazantsev, I. Mukhina, M. Dubina // Proceedings of International conference PhysicA. SPb 2015, Saint Petersburg, Russia, 26 - 29 October 2015. — P. 344.
16. Колпаков, В.Н. Методы формирования функциональной связи между нейрональными клетками в культуре гиппокампа / В.Н. Колпаков, **А.А. Гладков**, В.Б. Казанцев, Е.И. Малышев, И.В. Мухина, А.С. Пимашкин // 68-я областная научная конференция студентов и аспирантов «Биосистемы: организация, поведение, управление». Тезисы докладов, Нижний Новгород, 28 - 29 апреля 2015. — С. 31.
17. Pimashkin, A. Investigation Of Axon Growth In Asymmetric Microfluidic Channels / A. Pimashkin, E. Malishev, A. Bukatin, **A. Gladkov**, Y. Pigareva, V. Kazantsev, I. Mukhina // Front. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2016 10th International Meeting on Substrate-Integrated Electrode Arrays, Reutlingen, Germany, 28 Jun - 01 Jul 2016. doi: 10.3389/conf.fnins.2016.93.00106.
18. Malishev, E. Induction of localized synaptic plasticity in cultured neural network grown in microfluidic device / E. Malishev, **A. Gladkov**, A. Bukatin, Y. Pigareva, V. Kolpakov, V. Kazantsev, I. Mukhina, A. Pimashkin // Front. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2016 10th International Meeting on Substrate-Integrated Electrode Arrays, Reutlingen, Germany, 28 Jun - 01 Jul 2016. doi: 10.3389/conf.fnins.2016.93.00055.
19. **Gladkov, A.** Design in Neuronal Dissociated Cultures for Functional Integration of Cell Populations / **A. Gladkov**, Y. Pigareva, V. Kolpakov, E. Malishev, A. Bukatin, V. Kazantsev, I. Mukhina, A. Pimashkin // Front. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2016 10th International Meeting on Substrate-Integrated Electrode Arrays, Reutlingen, Germany, 28 Jun - 01 Jul 2016. doi: 10.3389/conf.fnins.2016.93.00084.
20. Pigareva, Y. Unidirectional axon growth in microchannels of various shapes / Y. Pigareva, **A. Gladkov**, V. Kolpakov, A. Pimashkin, A. Bukatin, E. Malishev, I. Mukhina, V. Kazantsev // Opera Medica et Physiologica. Proceedings of Volga Neuroscience Meeting 2016, St. Petersburg - N. Novgorod, 24–30 July 2016. — P. 118-119.
21. Kolpakov, V.N. Stimulus induced plasticity in dissociated neuronal network with direct connectivity / V. Kolpakov, Y. Pigareva, **A. Gladkov**, E. Malishev, A. Bukatin, A. Pimashkin, V. Kazantsev, I. Mukhina // Opera Medica et Physiologica. Proceedings of Volga Neuroscience Meeting 2016, St. Petersburg - N. Novgorod, 24–30 July 2016. — P. 117.
22. **Gladkov, A.** Stimulus induced plasticity in directly connected subpopulations of cultured hippocampal cells / **A. Gladkov**, A. Pimashkin, Y. Pigareva, V. Kolpakov, E. Malishev, A. Bukatin, V. Kazantsev, I. Mukhina // Abstracts of 10th FENS forum of neuroscience, Copenhagen, Denmark, 2 - 6 July 2016. Abstract number FENS – 3441.

23. Pimashkin, A. Microfluidic devices combined with multisite electrophysiology for functional connectivity monitoring in cultured neuronal networks / A. Pimashkin, **A. Gladkov**, Y. Pigareva, V. Kolpakov, E. Malishev, A. Bukatin, V. Kazantsev, I. Mukhina // Abstracts of 10th FENS forum of neuroscience, Copenhagen, Denmark, 2 - 6 July 2016 Abstract number FENS -1134.
24. **Gladkov, A.** Optimization of asymmetric microchannels for unidirectional synaptic coupling of neuronal cultures with high efficiency / **A. Gladkov**, Y. Pigareva, V. Kolpakov, A. Bukatin, V. Kazantsev, I. Mukhina and A. Pimashkin // Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting 2018 11th International Meeting on Substrate Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, Germany, 4 – 6 July 2018. doi: 10.3389/conf.fncel.2018.38.00005
25. **Gladkov, A.** Axon growth manipulation for unidirectional connectivity in cultured neuronal networks / **A. Gladkov**, Y. Pigareva, V. Kolpakov, O. Antipova, A. Bukatin, I. Mukhina, V. Kazantsev, A. Pimashkin // Abstracts of 11th FENS forum of neuroscience 2018, Berlin, Germany, 7 - 11 July 2018. Abstract number B070.

Охраняемые РИД

1. Патент RU 2553947 С2. Способ обучения биологической нейронной сети культуры, выращенной на мультиэлектродной матрице. Авторы: Пимашкин А.С., **Гладков А.А.**, Кастальский И.А., Мухина И.В., Казанцев В.Б. Опубликовано: 20.06.2015.
2. Свидетельство о государственной регистрации. Программа ЭВМ. Программа автоматической регистрации сигналов и управления электрической стимуляцией нервных клеток в экспериментах по обучению нейронных сетей на мультиэлектродных матрицах (NLearn). Авторы: Пимашкин А.С., Корягина Е.А., **Гладков А.А.**, Мухина И.В., Казанцев В.Б. 2012611934, 20.02.2012.
3. Патент RU 2 621 841 С1. Способ стимуляции электровозбудимых нейрональных клеток. Авторы: Пимашкин А.С., **Гладков А.А.**, Мухина И.В., Букатин А.Ю., Малышев Е.И., Казанцев В.Б., Пигарева Я.И., Колпаков В.Н. Опубликовано: 07.06.2017 Бюл. № 16
4. Патент RU 0002636890. Коннектор и установка с этим коннектором для хронической стимуляции электровозбудимых клеток. Авторы: Пимашкин А.С., **Гладков А.А.**, Букатин А.Ю., Малышев Е.И., Казанцев В.Б., Мухина И.В., Пигарева Я.И., Колпаков В.Н. Опубликовано: 10.08. 2017 .
5. Патент RU 2 637 391(13) С1 Способ обучения биологической нейронной сети (в эксперименте). Авторы: Пимашкин А.С., **Гладков А.А.**, Пигарева Я.И., Колпаков В.Н., Букатин А.Ю., Малышев Е.И., Мухина И.В., Казанцев В.Б. Опубликовано: 04.12.2017 Бюл. № 34.