Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского"

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

# ГЛАДКОВ АРСЕНИЙ АНДРЕЕВИЧ

# ДИНАМИКА ВЫЗВАННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОННОЙ СЕТИ КУЛЬТУРЫ ДИССОЦИИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГИППОКАМПА МЫШЕЙ ПРИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Специальность - 03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., проф. И.В. Мухина

Нижний Новгород – 2018

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	13
1.1. Культуры диссоциированных нервных клеток для изучения плас	тичности
в нейронной сети	13
1.2. Детектирование изменений в функционировании нейронной сет	и15
1.2.1. Информационные составляющие нейронной импульсной актиг	зности.15
1.2.2. Индикаторы функционального состояния культивируемой ней	ронной
сети	17
1.2.3. Детектирование функциональных связей в культуре диссоции	ованных
клеток мозга	19
1.3. Индукция пластичности в нейронной сети культур диссоциирова	анных
клеток с использованием электрической стимуляции	22
1.3.1 Посттетаническая потенциация в нейронной сети	22
1.3.2. Зависящая от времени импульсов пластичность	24
1.3.3. Ассоциативная стимуляция	26
1.3.4. Стимуляция с обратной связью	27
1.3.5. Влияние низкочастотных стимулов на активность нейронной с	ети28
1.4. Управление архитектурой культивируемой нейронной сети	
1.5. Конструирование направленной связи между популяциями нерв	ных
клеток <i>in vitro</i>	
ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования	37
2.1. Объект исследования	37
2.2. Культивирование нервных клеток	37
2.3. Культивирование диссоциированных нервных клеток с направле	нной
связью	
2.4. Морфологические методы исследования	42
2.5. Регистрация и анализ биоэлектрической активности	43
2.5.1 Регистрация биоэлектрической активности нейронной сети	43
2.5.2 Анализ биоэлектрической активности нейронной сети	45

2.5.2.1. Детектирование импульсов	.45
2.5.2.2. Детектирование сетевых пачек	46
2.5.2.3. Оценка спонтанной пачечной активности в нейронной сети	
диссоциированных клеток гиппокампа	.48
2.5.2.4 Анализ распространения пачечной активности в нейронной сети с	
направленной архитектурой морфофункциональных связей	56
2.6. Протоколы электрической стимуляции	59
2.6.1 Характеристики стимулов	59
2.6.2. Стимуляция с обратной связью	60
2.6.3. Оценка стабильности ответов зрелой нейронной сети на стимуляции	0
различных участков	62
2.6.4. Оценка влияния низкочастотной и высокочастотной электрической	
стимуляции на спонтанную активность	63
2.6.5. Оценка влияния высокочастотной стимуляции нейронной сети с	
направленной связью с задержкой 10 мс для двух субпопуляций	66
2.7. Статистическая обработка экспериментальных данных	68
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	69
3.1 Влияние электрической стимуляции на функциональную сетевую	
активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа со случайной	[
архитектурой морфофункциональных связей	69
3.1.1 Влияние низкочастотной стимуляции на функциональную сетевую	
активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа	69
3.1.2 Влияние высокочастотной стимуляции на функциональную сетевую	
активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа	75
3.1.3 Обсуждение полученных результатов	79
3.2 Индукция заданного уровня активности в нейронных сетях первичных	K
культур гиппокампа при применении протокола стимуляции с обратной	
связью	82
3.2.1 Достижение заданной активности в нейронной сети in vitro при разн	ОМ
исходном уровне активности	82

3.2.2 Обсуждение полученных результатов	90
3.3 Разработка метода изучения пластичности в сети культивируемых	
нервных клеток с направленной архитектурой морфофункциональных свя	зей
между двумя подсетями	91
3.3.1 Моделирование направленной архитектуры морфофункциональной	
связи между двумя подсетями первичной культуры гиппокампа	91
3.3.2 Разработка способа индукции пластичности в нейронной сети с	
направленной архитектурой морфофункциональных связей	96
3.3.3 Вызванная стимулом пластичность сети нейронов с направленной	
архитектурой морфофункциональных связей связи между популяциями	
нейронов <i>in vitro</i>	99
3.3.4 Обсуждение полученных результатов	.105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	113
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	.114
Приложение	.139

#### введение

#### 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 Постсинаптические постсинаптических потенциалов. 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 пространственновременного 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, открывая 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 параллельнопоследовательной системой обработки информации (Hikosaka et al., 1999; Bottjer, Altenau, 2010; Kim, Hikosaka, 2015). Она способна организовать нейроны таким образом, чтобы реализовать восприятие и распознание 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 2015). уровне (Мухина, Казанцев, Пимашкин, С этой целью В нейрофизиологии используется культивирование диссоциированных нервных клеток на мультиэлектродных матрицах (Thomas, Loeb, Okunj, 1972; Gross et al., 1977; Wagenaar, Pine, Potter, 2006а; 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, Tateno, 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, Tateno, Robinson, 1999a; Tateno, Jimbo, 1999; Wagenaar, Pine, Potter, 2006b; Veenendaal, Witteveen, Feber, 2013; Witteveen, Veenendaal, Feber le, 2013), c 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 іп 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, Дитятьев, Мухина, 2013) и сложности выбора параметров адекватной оценки этой динамики. Кроме того, в культуре диссоциированных нервных клеток случайно co сформированными связями трудно выявить пути распространения сигнала и, определить следовательно, оптимальные участки для электрической стимуляции.

В индикаторов связи С ЭТИМ, актуальным является поиск функционального состояния сети для оценки изменений, вызванных стимуляцией. Для решения проблемы электрической 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:

- Исследовать влияние низкочастотной и высокочастотной стимуляции на функциональную сетевую активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа со случайной архитектурой морфофункциональных связей;
- Изучить возможность достижения заданного уровня активности в нейронной сети первичных культур гиппокампа при применении протокола стимуляции с обратной связью *in vitro*;
- 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 связей, исчезновения которые рассчитывались на основе метода кросскорреляции, применительно для последовательностей импульсов в различных пространственных участках нейронной сети. Подтверждена эффективность применения данных критериев детектирования для вызванной стимуляцией пластичности в нейронной сети.

С использованием метода кросскорреляции 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 достижения заданного уровня активности нейронных сетях первичных культур гиппокампа при применении В протокола стимуляции с обратной связью. Впервые установлено, что эффективность данного протокола зависит от исходного уровня активности на выбранном для одратной связи участке нейронной сети. Зависимость от исходного уровня, а также высокая длительность и низкая эффективность протокола (около 50% экспериментов с успешным достижением заданного уровня активности), высокий уровень спонтанных изменений в нейронной сети не позволяют использовать протокол стимуляции с обратной связью для изучения механизмов пластичности В сети культивируемых диссоциированных клеток гиппокампа со случайной структурой связей между элементами 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 индукции пластичности в 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 мультиэлектродных 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*.

 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 (≤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-Пущинской школе-конференции молодых ученых ой Международной «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2013); IV международном симпозиуме "Topical Problems of Biophotonics - 2013" (Н.Новгород, 2013); 9ом 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-Международной конференции «NETT International Петербург, 2015); 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 substrateintegrated microelectrode arrays» (Reutlingen, Germany, 2016); Международной «Volga Neuroscience Meeting 2016» (Санкт-Петербургконференции 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 substrateintegrated microelectrode arrays» (Reutlingen, Germany, 2018); 11-ом Международном Европейском форуме нейронаук «11th FENS forum of neuroscience» (Berlin, Germany, 2018).

### ГЛАВА 1. Обзор литературы

# 1.1 Культуры диссоциированных нервных клеток для изучения пластичности в нейронной сети

Молекулярно-клеточной основой информационных функций мозга, в частности обучения и памяти, считают свойство пластичности передачи импульсного сигнала между нервными клетками. Пластичность или изменения функциональных свойств нервных клеток, происходящие при обучении, традиционно связывают с усилением (LTP long term potentiation) или ослаблением (LTD long term depression) синаптических контактов между И изменением возбудимости нейронов нервными клетками (Bliss, Collingridge, 1993; Bolshakov, Siegelbaum, 1994; Linden, Connor, 1995; Николлс и др., 2003; Lynch, 2004). LTP в синапсе может быть вызвана с помощью различных химических агентов (повышающих концентрацию цАМ $\Phi$ , глутоматом, глицином, повышением концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> и др.) (Neveu, Zucker, 1996; Molnár, 2011; Otmakhov, Lisman, 2014) или за счёт свойства гомеостатической пластичности при временном блокировании активности (Балашова, Дитятьев, Мухина, 2013). Критерием пластичности передачи сигнала от одного нейрона на второй часто служит изменение амплитуды постсинаптических потенциалов или угла фазы нарастания (Bliss, Collingridge, 1993). Нейронная пластичность подразумевает изменение эффективности передачи биоэлектрических импульсов между нейронами, что приводит к изменению частоты генерации потенциалов действия (ПД) на постсинаптическом нейроне, и зависит от внутренних свойств самих нейронов (динамики активации ионных каналов) (Debanne, 2003) и свойств синаптических контактов (включая глию и внеклеточный матрикс) (Николлс и др., 2003; Wlodarczyk et al., 2011; Pittà De, Brunel, Volterra, 2016).

К настоящему времени сложилось понимание, что информационные функции мозга определяются свойствами нейронной сети, а не отдельных клеток (Garner et al., 2012; Liu et al., 2012; Aoki et al., 2013). Синаптическая пластичность приводит к изменению путей распространения импульсных сигналов в нейронной сети и, следовательно, к изменению информационной функции этой нейронной сети.

В настоящее время ведётся поиск эффективных и физиологичных (адекватных) способов индукции активность-зависимой пластичности в нейронной сети, a также критериев детектирования изменений функционирования нейронной сети. С этой целью широко используется культивирование диссоциированных нервных клеток на микроэлектродных матрицах (Chao, Bakkum, Potter, 2007; Madhavan, Chao, Potter, 2008). Активность в культивируемых нейронных сетях характеризуется спонтанно генерируемыми сигналами в виде пачек биоэлектрических импульсов (Huettner, Baughman, 1986; Habets et al., 1987; Maeda, Robinson, Kawana, 1995; Jimbo, Robinson, Kawana, 1998; Weliky, Katz, 1999; Wagenaar, Pine, Potter, 2006а). Данная экспериментальная модель предназначена для выявления базовых принципов работы нейронной сети не обусловленных морфологией отделов мозга. Культивирование на микроэлектродных матрицах позволяет длительное время (до нескольких месяцев) регистрировать и стимулировать активность одновременно в различных участках нейронной сети. Методы индукции пластичности в сети культивируемых нервных клеток большей частью основаны на протоколах стимуляции, которые приводят к LTP/LTD на синаптическом уровне. Можно выделить несколько групп методов активность-зависимой культурах индукции пластичности В сети диссоциированных нервных клеток:

1. Индукция пластичности в нейронной сети в результате усиления части синаптических связей («Обучение по Хеббу»), с применением тетанической стимуляции, соответствующей по частоте  $\theta$  – (тета) ритму активности мозга (Jimbo, Robinson, Kawana, 1998; Jimbo, Tateno, Robinson, 1999b; Tateno, Jimbo, 1999; Wagenaar, Pine, Potter, 2006b; Veenendaal, Witteveen, Feber, 2013; Witteveen, Veenendaal, Feber le, 2013).

2. Индукция пластичности в нейронной сети в результате усиления и ослабления части синаптических связей на основе правила синаптической пластичности, зависящей от времени импульса (STDP *spike time dependent plasticity*) (Wagenaar, Pine, Potter, 2006b; Chao, Bakkum, Potter, 2007).

3. Индукция пластичности в нейронной сети в результате гипервозбуждения нервных клеток тетанусом (стимуляцией с частотой порядка 250 Гц) (Ruaro et al., 2005).

4. Индукция пластичности в нейронной сети с применением стимулов с отличающимися характеристиками (частотой, временем). Ассоциативная стимуляция (Eytan, Brenner, Marom, 2003; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008; Stegenga et al., 2010).

5. Индукция заданного уровня активности в нейронной сети при использовании стимуляции с обратной связью (Shahaf, Marom, 2001; Marom, Eytan, 2005; Li et al., 2007; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010).

6. Длительное воздействие на нейронную сеть низкочастотными входными электрическими стимулами (Maeda et al., 1998; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008; Vajda et al., 2008; Brewer et al., 2009; Bologna et al., 2010; Ide et al., 2010).

# 1.2 Детектирование изменений в функционировании нейронной сети

# 1.2.1 Информационные составляющие нейронной импульсной активности

Сегодня выделяют несколько критериев нейроимпульсной активности, изменение которых служит информационной составляющей в нервной системе для управления поведением: частота импульсов, пространственное расположение активированных клеток и временные характеристики импульсных последовательностей. Ещё в 1926 году Адриан и Зотерман установили, что с усилением воздействия на рецепторы увеличивается частота импульсов на чувствительном нейроне (Adrian, Zotterman, 1926).

Увеличение частоты импульсов на определённых клетках в гиппокампе и участвует энторинальной коре В кодировании пространственной информации. Найдены клетки, активирующиеся в момент нахождения животного в определённом месте (O'Keefe, Nadel, 1978; Nakazawa et al., 2004; Buzsáki, 2006), при повороте головы (Taube, Muller, Ranck, 1990) и движении в определённом направлении (Hafting et al., 2005; Yartsev, Witter, Ulanovsky, 2011). Определённые клетки в сенсомоторной коре грызунов собраны в колонки, в которых обрабатывается информация от определенных вибрис (Николлс и др., 2003). Кроме частотной и пространственной модальностей нейронной активности информационную функцию может выполнять точное время появления вызванных импульсов, особенно время первого импульса (Birznieks et al., 2001; Cariani, 2001; Johansson, Birznieks, 2004; Shahaf et al., 2008). Существуют свидетельства того, что время генерации потенциала действия (ПД) на нейроне может контролироваться до субмиллисекундной точности (Mainen, Sejnowski, 1995). О важности временной компоненты нейронного кода свидетельствует индукция LTP или LTD в зависимости от времени возникновения импульсов на пре- и пост- синапсах (STDP) (Bi, Poo, 1998), а также синхронизация ритмической активности при обучении (tetagamma coupling) (Axmacher et al., 2006; Osipova, Takashima, Oostenveld, 2006; Tort et al., 2009; Fell, Axmacher, 2011).

В *in vivo* экспериментах с использованием методов оптической генетики было показано, что активация набора пространственно удаленных друг от друга нейронов, которые были активны во время обучения, приводила к воспроизведению памяти, что проявлялось в соответствующих поведенческих реакциях (Garner et al., 2012; Aoki et al., 2013). Это свидетельствует о том, что в процессе обучения задействованы механизмы пластичности на сетевом уровне.

# 1.2.2 Индикаторы функционального состояния культивируемой нейронной сети

Нервные клетки в нейронной сети *in vitro* изолированы от внешних входных сигналов и демонстрируют собственную динамику спонтанной активности (Wagenaar, Pine, Potter, 2006b). Характерная особенность спонтанной активности заключается в наличии сетевых пачек импульсов, происходящих в результате относительно синхронной активации большого количества нейронов в сети.

Таким образом, выделяют понятие *сетевая пачка импульсов (англ. -Network Burst)* - пачка импульсов, регистрируемых в нескольких пространственных участках нейронной сети с перекрытием во времени, характеризующаяся следующими признаками: интервал между импульсами не более 100 мс, количество импульсов в пачке не менее 10 (Chiappalone et al., 2004; Chiappalone et al., 2005; Wagenaar, Pine, Potter, 2006a; Wagenaar, Nadasdy, Potter, 2006). Пачка импульсов, регистрируемая на одном электроде (т.е. участке сети), была названа *мини-пачка (англ. - Burstlet) (*Wagenaar, Pine, Potter, 2006a).

Длительность сетевых пачек варьирует в пределах нескольких десятков миллисекунд (Maeda, Robinson, Kawana, 1995; Pelt Van et al., 2004; Wagenaar, Pine, Potter, 2006а).

Структура спонтанной сетевой активности изменяется в процессе развития связей в нейронной сети (Maeda, Robinson, Kawana, 1995; Pelt van et al., 2005; Ito et al., 2010; Корягина и др., 2011; Широкова и др., 2013), при воздействии химическими агентами на синаптическую передачу (Eytan et al., 2004; Chiappalone et al., 2007; Vedunova et al., 2013) и в результате повреждений (Ведунова и др., 2011).

Функциональное состояние нейронной сети определяется динамикой и балансом процессов возбуждения и торможения, а также особенностями архитектуры функциональных связей внутри сети. Под функциональными связями понимается динамическая взаимосвязь между биоэлектрической

активностью элементов сети нервных клеток. Группы функционально связанных нервных клеток образуют функциональные сети (Chiappalone et al., 2006; Chiappalone et al., 2007; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008).

Добавление блокаторов синаптической передачи в тормозных синапсах приводит к увеличению длительности сетевых пачек (Ramakers, Corner, Habets, 1991; Corner et al., 2002). При этом увеличиваются межпачечные интервалы в спонтанной сетевой активности (Chiappalone et al., 2007). Частичное блокирование возбуждающих глутаматных рецепторов, наоборот, уменьшает интенсивность и частоту импульсов в нейронной сети (Corner et al., 2002).

Об изменении баланса возбуждения и торможения можно судить не только на основе частотных характеристик пачечной активности, но и на основе частотно-временного паттерна (рисунка) сетевых пачек. Было показано, что при подавлении тормозной синаптической передачи, кроме увеличения длительности сетевых пачек, увеличивалось число пиков частоты импульсов или число ревербераций в течение одной пачки (Huang et al., 2012).

В экспериментах in vivo известно, что тета ритм в гиппокампе может формироваться за счет тета частотных входов из энториальной коры, либо генерироваться в САЗ области в результате активации ацетилхолин чувствительных клеток (Fischer, Beat, Thompson, 1999; Traub et al., 2004; Andersen et al., 2007). Аналогичные результаты наблюдались в экспериментах *in vitro*: активация ацетилхолиновых рецепторов как в органотипических (Fischer, Beat, Thompson, 1999), культурах так И В культурах диссоциированных клеток гиппокампа (Chiappalone et al., 2007), изменяла частотный спектр спонтанной активности нейронной сети.

Таким образом, на основе частотных пространственных и временных особенностей активности нейронной сети можно судить о пластичности определённых типов взаимосвязей между нейронами (глутаматэргических, холинэргических, ГАМК-эргических) (Corner, 2008). В современных литературных данных можно выделить три вида эффектов изменения активности культур диссоциированных нервных клеток, происходящих в результате пластичности в нейронной сети.

Во-первых, пластичность в нейронной сети предполагает изменение во многих синапсах, которые в совокупности приводят к потенцированию либо к подавлению общей сетевой активности как спонтанной (Maeda et al., 1998; Bologna et al., 2010), так и вызванной электрическими стимулами (Jimbo, Robinson, Kawana, 1998; Eytan, Brenner, Marom, 2003). Для детектирования таких изменений достаточно оценить суммарную частоту импульсов на разных участках сети.

Во-вторых, пластичность предполагает разнонаправленное изменение синаптических связей, в результате которого не происходит увеличения (потенциации) или уменьшения (депрессии) общего уровня частоты импульсов в сетевой активности. Пластические изменения проявляются в изменениях показателей сетевой активности, рассчитанных с помощью кросскорреляционного анализа (Chiappalone et al., 2006; Feber le, Pelt van, Rutten, 2007), пространственного изменения пейсмекера активности и паттерна активации различных участков сети (Shahaf et al., 2008; Pimashkin et al., 2011), центра активности и распределения частоты импульсов на разных участках сети (Pelt van et al., 2005; Chao, Bakkum, Potter, 2007).

В-третьих, пластичность в нейронной сети может затрагивать изменения скорости распространения биоэлектрических сигналов, связанной с морфофункциональными свойствами отростков и наличием электрических контактов между нейронами (Bakkum, Chao, Potter, 2008; Dranias et al., 2013).

# 1.2.3 Детектирование функциональных связей в культуре диссоциированных клеток мозга

Как правило, участки сети диссоциированных нервных клеток считаются функционально связанными, если выявляется распространение импульсной активности от одного участка сети ко второму или обнаруживается кросс-корреляция во временных последовательностях импульсов на этих участках.

Пространственно-временной патерн импульсов. Время первого импульса в сетевой пачке или время задержки между импульсами, возникающими на разных нейронах, могут принимать участие в кодировании информации. Например, первый импульс тактильных афферентов человека кодирует пространственную информацию от кончиков пальцев (Johansson, Birznieks, 2004). Информация о местах источников звука кодируется временем первых импульсов в паттерне, а не временной структурой паттерна, при этом время появления первого вызванного импульса обычно уменьшается с увеличением интенсивности сигнала (Peter, 1997; Cariani, 2001). Повторяющиеся пространственно-временные мотивы импульсов, длящиеся порядка нескольких секунд с миллисекундной точностью, были обнаружены в нейронных сетях зрительной коры, как в срезах *in vitro*, в культурах диссоциированных клеток коры (Rolston, Wagenaar, Potter, 2007), так и *in vivo* (Ikegaya et al., 2007).

Временная последовательность первых импульсов в пачке для различных участков сети диссоциированных нервных клеток, называется паттерном активации (Shahaf et al., 2008). Паттерн активации отражает динамику возникновения реверберирующей импульсной активности в сети (Gandolfo et al., 2010). В начальной стадии сетевой пачки пространственно временные паттерны более повторяемы, чем во время деактивации (Pimashkin et al., 2011; Maccione et al., 2012).

Таким образом, паттерн активации сетевой пачечной активности даёт информацию о связанности и пейсмекере или инициаторе активности, но не информацию, кодируемую внутри последовательностей учитывает импульсов (в сетевой пачке). Паттерн активации вызванной активности нейронной стабилен, культивируемой сети что можно объяснить стабильностью морфологической архитектуры сети (Shahaf et al., 2008). Несмотря на проводимые исследования сетевой пластичности, сегодня нет

свидетельств того, что протоколы электрической стимуляции одного нейрона в составе сети, вызывающие LTP на постсинаптической мембране, могут изменить паттерн активации всей культивируемой нейронной сети.

*Кросскорреляционный анализ.* Для выявления функциональных связей во временных последовательностях импульсов часто применяется метод кросскорреляционного анализа как в экспериментах *in vivo* (Kohn, Zandvakili, Smith, 2009; Bogdanov, Galashina, Karamysheva, 2010; Cohen, Kohn, 2011), так и в культурах диссоциированных клеток (Chiappalone et al., 2006; Feber le et al., 2007; Prokin et al., 2012; Lorente, Manuel, Fernández, 2013).

Установлено, что в течение первых 3-4 недель развития первичной нейронной культуры увеличивались показатели, количественно характеризующие кросс-корреляцию временных последовательностей импульсов регистрируемых В различных участках сети, разными электродами (задержка функциональных связей, И сила уровень синхронизации последовательностей импульсов) (Chiappalone et al., 2006; Feber le, VanPelt, Rutten, 2009). На более поздних этапах развития культуры эти показатели кросс-корреляции оставалась относительно одинаковыми (Chiappalone et al.. 2006; Feber le, VanPelt, Rutten, 2009), что свидетельствовало о стабильности функциональных взаимосвязей между участками сети в зрелой нейронной культуре.

При добавлении в культуральную среду нейромедиатора дофамина значительно изменялись характеристики кросскорреляционной функции двух временных рядов импульсных последовательностей (Eytan et al., 2004). Также при воздействии высокочастотной стимуляции было выявлено изменение показателей кросскорреляционного анализа временных последовательностей импульсов нейронов в культурах диссоциированных клеток (Lorente, Manuel, Fernández, 2013; Veenendaal, Witteveen, Feber, 2013; Witteveen, Veenendaal, Feber le, 2013).

Таким образом, относительная стабильность в отсутствии раздражителей и чувствительность к воздействиям делают метод

кросскорреляционного анализа временных последовательностей импульсов в сетевой пачке привлекательным для изучения сетевой пластичности в нейронной сети.

Вызванный ответ на стимуляцию различных участков сети. Для выявления функциональной связи между двумя участками нейронной сети можно использовать особенности отклика на низкочастотные электрические стимулы. При стимуляции единичным коротким электрическим импульсом формируется сетевой реверберирующей ответ В виде пачки биоэлектрических импульсов длительностью до 500 мс, как в культурах диссоциированных нервных клеток (Jimbo, Robinson, Kawana, 1998; Maeda et al., 1998), так и в органотипических культурах (Stepan et al., 2012). Оценивая эффективность вызова сетевого ответа при стимуляции определённого участка сети, можно судить о силе исходящих функциональных связей для этого участка (Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008).

Таким образом, стимулируя культуру нервных клеток через различные электроды микроэлектродной матрицы, можно получить представление о связанности участков нейронной сети, соответствующих этим электродам. Существенным недостатком такого метода выявления функциональных связей является то, что на сегодня остается не выясненным: влияет ли сама низкочастотная стимуляция на силу функциональных связей. Кроме того, сетевой отклик сильно зависит от предшествующей спонтанной активности, что приводит к высокой вариабельности ответов и поэтому требует длительных серий стимуляции сети для достоверной оценки.

## 1.3 Индукция пластичности в нейронной сети культур

## диссоциированных клеток с использованием электрической стимуляции

## 1.3.1 Посттетаническая потенциация в нейронной сети

Наиболее часто для индукции синаптической пластичности используется протокол стимуляции сериями высокочастотных электрических импульсов (*teta-burst stimulation*, TBS) (Larson, Wong, Lynch, 1986; Hawasli et

al, 2007; Yang et al, 2016). Последовательности стимулов, подаваемых с частотой близкой к тета ритму, с большей вероятностью вызывали LTP в нейроне, чем такие же стимулы с другой частотой (Larson, Wong, Lynch, 1986; Hyman et al., 2003). Основным индикатором LTP служит увеличение амплитуды или угла нарастания постсинаптических потенциалов на постсинаптической мембране. В модели культуры диссоциированных клеток коры мозга крыс использованием метода патч-кламп была С продемонстрирована возможность индукции LTP нейрона при TBS через один из электродов матрицы, при этом увеличивалась длительность и амплитуда поздней фазы постсинаптических токов в ответ на тестовый стимул, сокращалась задержка нарастания постсинаптических токов и увеличивалась вероятность генерации потенциалов действия (ПД) в корренткламп клетке (Jimbo, Robinson, Kawana, 1998). Также было показано изменение числа импульсов, регистрируемых внеклеточными электродами в каждой пачке, вызванной тестовым стимулом (Jimbo, Robinson, Kawana, 1998; Maeda et al., 1998). При этом в ответах на тестовые стимулы с определенных участков изменения происходили в одном направлении (увеличивались или уменьшались) для всех регистрируемых участков нейронной сети (Jimbo, Tateno, Robinson, 1999а). В других работах было найдено, что TBS не изменяла числа импульсов в сетевых ответах, вызванных тестовым стимулом (Wagenaar, Pine, Potter, 2006b; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008).

Было показано изменение функциональных связей (на основе кросскорреляционного анализа) в спонтанной активности различных участков нейронной сети при TBS (Veenendaal, Witteveen, Feber, 2013; Witteveen, Veenendaal, Feber le, 2013). Таким образом, не исключено, что TBS приводит к пластичности в нейронной сети, но для её детектирования необходимы более чувствительные методы.

## 1.3.2 Зависящая от времени импульсов пластичность

Показано, что индукция долговременной синаптической пластичности в различных *in vivo* и *in vitro* экспериментальных моделях зависит от порядка следования импульсов на пре- и постсинапсе во времени. Такую форму пластичности называют пластичностью, зависящей от времени импульса dependent (STDP, spike time plasticity). Зависимость изменения эффективности синаптической передачи от интервала между импульсами на постсинапсе отличается для разных типов нейронов пре-И И экспериментальных моделей (см. обзоры (Dan, Poo, 2006; Caporale, Dan, 2008)). Для возбуждающих нейронов гиппокампа LTP вызывалась, если пресинаптический импульс предшествовал постсинаптическому («пре-пост») в интервале 0 - 40 мс (рис. 1). Повторяющаяся пара импульсов с такими же интервалами, но в противоположном порядке («пост-пре») приводила к LTD (Ві, Роо, 1998). Для тормозных нейронов гиппокампа было найдено повышение эффективности синаптической передачи при небольших до 30 мс интервалах между препостсинаптическими стимулирующими И импульсами, а при интервалах порядка 50 мс наблюдалась депрессия (Woodin, Ganguly, Poo, 2003) (рис. 1). Данное свойство зависящей от активности синаптической пластичности используется некоторыми авторами для индукции изменений сетевой активности при стимуляции культуры диссоциированных клеток на микроэлектродной матрице через пару или группу электродов. STDP-протокол привлекателен тем, что позволяет направленно воздействовать на определённые связи в нейронной сети. Через плоские электроды микроэлектродных матриц стимулируется группа клеток как возбуждающих, так и тормозных, со случайной топологией связей, что, вероятно, приводит к изменениям эффективности связей между многими клетками. Для детектирования таких изменений показана эффективность методов: оценки центра сетевой активности (Chao, Bakkum, Potter, 2007), частотно-пространственно-временного паттерна спонтанной активности

(Madhavan, Chao, Potter, 2007) и кросс-корреляции в импульсной активности в различных участках сети (Lorente, Manuel, Fernández, 2013).



Рисунок 1. Синаптические изменения вызванные парной стимуляцией пре- и постсинаптических нейронов в культуре диссоциированных клеток гиппокампа. Каждая точка соответствует одному эксперименту.

А) Зависимость амплитуды возбуждающих постсинаптических потенциалов (EPSP) глутаматэргических нейронов от интервала между стимулирующими импульсами на пре- и пост- синапсах (60 пар импульсов, 1Гц) (Bi, Poo, 1998).

Б) Зависимость амплитуды ГАМК-эргических постсинаптических токов (GPSC) тормозных нейронов от интервала между стимулирующими импульсами на пре- и пост- синапсах (5Гц в течение 30 секунд) (Woodin, Ganguly, Poo, 2003).

В одном из исследований показано, что стимуляция пачками электрических стимулов согласно STDP протоколам приводила к большим изменениям показателей кросс-корреляции последовательностей импульсов в вызванной активности, чем TBS с одного входа (Tateno, Jimbo, 1999). В продемонстрирована возможность исследовании формирования другом функциональной выбранными СВЯЗИ между участками сети при одновременной стимуляции двух входов (Lorente, Manuel, Fernández, 2013).

Хотя, эти открытия сделаны с использованием собственных способов анализа и уникальных протоколов стимуляции, вместе они свидетельствуют об эффективности правила STDP для изменения функционирования сети.

### 1.3.3 Ассоциативная стимуляция

В экспериментах in vivo было замечено, что TBS более эффективно вызывает LTP, если она подаётся в положительную фазу тета ритма в различных областях гиппокампа (CA1, gyrus dentatus) (Pavlides et al., 1988; Holscher, Roger, Rowan, 1997). Более того, Hyman с коллегами показали, что при подаче TBS в отрицательную или нулевую фазу тета ритма наблюдалось уменьшение амплитуды вызванных потенциалов, говорящее об LTD (Hyman et al., 2003). На основе этих результатов были разработаны протоколы индукции пластичности в культурах сетей диссоциированных нервных клеток, при этом тета ритм симулировался с помощью стимуляции с синусоидально меняющейся частотой через входов ОДИН ИЗ (микроэлектродов) культивируемой нейронной сети (Stegenga et al., 2010). Показано, что при подаче стимула в положительную фазу тета стимуляции происходило увеличение сетевых ответов на тестовые низкочастотные стимулы, что интерпретировалось как потенцирование возбуждающих связей в сети (Stegenga et al., 2010). При подаче TBS в отрицательную (нулевую) фазу тета стимуляции изменений в сетевых ответах не наблюдалось (Stegenga et al., 2010).

Аналогичные результаты получены в более простой модели ассоциативной стимуляции, где стимулы предъявлялись или во время, или между пачками стимулов с другого входа (Cohen, Kohn, 2011). Все эти данные свидетельствуют о том, что приуроченность активности клеток к фазе ритмической сетевой активности является важным фактором в обработке сигналов в нейронных сетях.

Другой протокол ассоциативной стимуляции основан на явлении, названном «негативность рассогласования» (англ. mismatch negativity)

(Naatanen et al., 1993) и заключающемся в усилении ответа на редкий стимул с особенными характеристиками, предъявляемый на фоне стандартных стимулов. На сегодняшний день это явление описано для сенсорных систем, в основном, слуховой и зрительной (см. обзор (Pazo-Alvarez, Cadaveira, Amenedo, 2003)). Применительно к культурам диссоциированных нервных клеток было показано, что при стимуляции одного входа с низкой частотой 0,2-1 Гц, а другого с ещё более низкой 1/50-1/60Гц увеличивается число импульсов в ответе на более редкие стимулы и уменьшается на более частые (Eytan, Brenner, Marom, 2003; Wagenaar, Pine, Potter, 2006b). Эти результаты свидетельствуют о негативности рассогласования, как об одном из базовых феноменов пластичности нейронной сети, характерного даже ДЛЯ диссоциированных нервных клеток in vitro. Факт присутствия этого интересного явления в диссоциированных культурах требует проверки другими лабораториями и дальнейших исследований.

## 1.3.4 Стимуляция с обратной связью

Большой интерес вызывает проблема обучения возможности культивируемой нейронной сети с использованием протокола С подкреплением по типу условного рефлекса. В 2001 году была предложена экспериментальная модель индукции заданной активности в культуре диссоциированных нервных клеток, которая основывалась на низкочастотной стимуляции (1-0,3 Гц) с подкреплением на основе обратной связи (Shahaf, Marom, 2001). Низкочастотная стимуляция (индифферентный сигнал) постоянно подавалась на культуру клеток, регистрировались сетевые ответы на стимулы. Обратная связь заключалась в том, что протокол стимуляции изменялся в зависимости от ответов нейронной сети на стимулы. Подкрепление обеспечивалось тем, что при достижении заданного уровня активности определённого числа импульсов В виде В ответе на низкочастотные стимулы, стимуляция на время отключалась, т.е. нейронной подавалась информация 0 достижении требуемого состояния сети

активности. Серии стимуляции до достижения заданного уровня активности повторялись несколько раз. Время, требуемое для достижения заданного числа импульсов в ответе на низкочастотные стимулы, уменьшалось в 50% экспериментов, что служило индикатором достижения заданного уровня 10 активности. Низкочастотная стимуляция сериями ПО МИНУТ без отключения в зависимости от уровня активности не вызывала подобный эффект. Данный протокол без дополнительных модификаций был воспроизведён в ряде работ (Marom, Eytan, 2005; Li et al., 2007; Feber, Stegenga, Rutten, 2008; Stegenga et al., 2009; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010). Для индукции заданного уровня активности в нейронной сети выбирался слабоактивный электрод, на котором в заданном временном интервале после стимула регистрировался в среднем один импульс на десять стимулов (отношение количества импульсов в ответе к количеству стимулов (response/stimulus) R/S = 0,1). Порогом для обратной связи использовался порог, соответствующий двум импульсам за десять стимулов (R/S = 0,2). В другой работе (Staveren van et al., 2005) был приведён пример одного эксперимента, в котором для обратной связи использовался электрод со средним значением R/S = 0.5. В этом случае наблюдалось уменьшение времени достижения порогового ответа в течение первых шести циклов стимуляции, затем увеличивалось снова.

# 1.3.5 Влияние низкочастотных стимулов на активность нейронной

сети

Особенности сетевых ответов на низкочастотные электрические стимулы часто используются в качестве индикаторов функционального состояния сети. Низкочастотная стимуляция считается тестовой, не оказывающей существенного воздействия. Было продемонстрировано, что низкочастотная стимуляция в течение 30-40 минут последовательно с нескольких электродов не приводила к каким-либо изменениям частотновременных характеристик ответов сети на эти стимулы (Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008).

В то же время известно, что *in vivo* низкочастотная стимуляция 1-5 Гц может вызвать LTD в гиппокампе (Linden, Connor, 1995; Николлс и др., 2003). Кроме того, было показано, что относительно длительная низкочастотная стимуляция последовательно с нескольких входов может приводить к изменениям таких частотно-временных показателей спонтанной активности, как длительность пачек, средняя частота импульсов и др. (Vajda et al., 2008; Bologna et al., 2010).

Было установлено различие, как спонтанной, так и вызванной стимулами активности в нейронных культурах, подверженных хронической стимуляции (несколько часов в сутки) и в не стимулируемых культурах (Ide et al., 2010). С использованием метода кросскорреляционного анализа научной группой профессора Ле Фебера университета Твенте (Нидерланды) было установлено изменение функциональных связей в нейронной сети после низкочастотной стимуляции (0,2 Гц, длительностью около часа) (Feber, Stegenga, Rutten, 2010).

Автоы предположили, что к изменениям приводили скорее пачки импульсов, вызванные после стимула, чем сами стимулы. В этой же лаборатории было найдено, что первое применение стимуляции оказывало большее воздействие на изменение функциональных связей в нейронной сети, чем последущие аналогичные серии стимулов (0,2 Гц, в течение 15 мин, n = 4 культуры) (Feber et al, 2015а). Метод предложенный группой профессора Ле Фебера был эффективным для выявления факта изменений функциональных связей в нейронной сети. В то же время этот метод не даёт информации о том, какие связи изменялись, и какие были изменения (усиление или ослабление).

Таким образом, влияние низкочастотных стимулов на функциональную активность нейронной сети остаётся недостаточно понятым и требует

исследований с использованием различных методов оценки функциональных изменений (пластичности) в нейронной сети.

Исходя из анализа литературных данных, для индукции пластичности в нейронной сети наиболее эффективны те протоколы стимуляции, которые основаны на свойстве синаптической пластичности, зависящей от времени импульсов (Таблица 1 в приложении). Кроме того, довольно эффективными оказывались протоколы ассоциативной стимуляции. Но результаты экспериментов с ассоциативной стимуляцией получены в единичных лабораториях и требуют проверки воспроизводимости. Влияние внешних стимулов на развитие нейронной сети сегодня полностью не изучено и также требует дополнительных исследований.

### 1.4 Управление архитектурой культивируемой нейронной сети

Управление природным миром посредством инженерного искусства является основой для технического прогресса (Гладков, 2010). Развитие методов биоинженерии в последние годы позволило разработать нейронные культуры с определенной архитектурой сети, которые используются для широкого спектра научных исследований и прикладных задач.

Культуры с изменённой архитектурой в виде связанных популяций клеток позволяют изучать взаимодействие не только нервных сетей (Wyart et al., 2002; Brewer et al., 2013; Bisio et al., 2014), но и взаимодействия нейронов с другими типами клеток, например, нейромышечные (Southam et al., 2015), нейроглиальные (Park et al., 2015), взаимодействия сенсорных нейронов и остеобластов (Neto et al., 2014), зрелых и не дифференцированных клеток (Kilic et al., 2016). Методы микрофлюидики в культивировании нервных клеток представляет собой новый способ изучения функций аксонов, так как позволяют изолировать отростки от тел клеток, направить их в нужном направлении и проводить биохимический анализ аксонов независимо от тел нейронов и дендритов (Taylor et al., 2006; Pan et al., 2012; Pan et al., 2014; Siddique, Thakor, 2014; Yap, Dickson, 2014). Также создаются модели,

позволяющие управлять физико-химическими условиями в различных участках одной нейронной сети и проводить селективные локальные фармакологические манипуляции (Biffi et al., 2012; Kim et al., 2012; Petrelli et al., 2013; Saito et al., 2013; Marom et al., 2015). Изоляция и навигация аксонов используется для изучения развития мозга (Roth et al., 2012) и развития методов лечения повреждённых нервов (Taylor et al., 2005; Habibey et al., 2015). Также, *in vitro* реконструирование связей отделов мозга и сложных нейронных схем может использоваться для изучения процессов передачи и обработки информации в мозге, разработки интерфейсов мозг-компьютер (Peyrin et al., 2011; Wang, 2011; Brewer et al., 2013; Shimba et al., 2014; Shimba et al., 2015).

Модели культур, организованных в связанные между собой нейронные субпопуляции, можно классифицировать на несколько типов.

Наиболее простая модель – кластеры нервных клеток, связанные между собой одним или несколькими тяжами аксонов и дендритов, с высокой степенью самоорганизации (Segev et al., 2003; Idelson, Ben-Jacob, Hanein, 2010; Averna et al., 2014; Teller et al., 2014). Диаметр тяжей порядка 10 мкм (диаметр аксона около 1 мкм) (Segev et al., 2003). Интересно, что в таких самоорганизующихся кластерных культурах часть кластеров функционально сильно связаны друг с другом, между другими кластерами связь слабее, предполагается, что такая звёздчатая топология способствует обработке информации в сети (Teller et al., 2014). За счёт высокой степени самоорганизации данная модель приближена к нейронным сетям со случайной архитектурой связей, так как заранее неизвестно, где будут располагаться кластеры, как они будут связаны и, главное, нельзя искусственно задать направление передачи биоэлектрической активности по связям между кластерами.

Второй тип культур с заданной архитектурой – заданный геометрический микропаттерн (micro-pattern), чаще всего в виде сетки, в углах которой находятся небольшие кластеры из нескольких нервных клеток,

соединённые между собой одним волокном, с распространением сигнала в двух (Levy, Ziv, Marom, 2012; Zhou et al., 2015) или в одном направлении (Huang et al., 2015). В таких моделях контролируется большое количество связей в сети, поэтому они очень перспективны для исследования сетевых эффектов при воздействии на отдельные функциональные связи.

Третий тип культур с заданной архитектурой представляет собой субпопуляции гомогенных нейронных сетей, соединённые одним или несколькими волокнами (Brewer et al., 2013; Bisio et al., 2014; Habibey, Golabchi, Blau, 2015). Для таких моделей используют силиконовые конструкты с микроканалами высотой около 3 мкм, в которые могут прорастать отростки, но не проходят тела нервных клеток (Campenot, 1979; Brewer et al., 2013; Habibey, Golabchi, Blau, 2015). Такие микрофлюидные с микроканалами) чипы (структуры изготавливаются ИЗ (ПДМС). ПДМС биосовместим, полидиметилсилоксана прозрачен И проницаем для газов, поэтому широко используется в биомедицинских исследованиях (Kanner 2015).

Субпопуляции нейронов различаются по частоте импульсов. При двунаправленной связи, как правило, одно из направлений доминирует и это не зависит от частоты импульсов в субпопуляции (Bisio et al., 2014) Показано, что задержка распространения пачечной активности между субпопуляциями на ранних этапах (до 25 дня *in vitro*) была порядка 50-200 мс, к 46-55 дню она сокращалась до 25-55 мс (Berdichevsky, Staley, Yarmush, 2010; Bisio et al., 2014). Также установлено, что с возрастом культуры увеличивается скорость распространения импульсов по аксонам в микроканалах (Hong, Joo, Nam, 2016).

Чем больше число аксонов между субпопуляциями нейронов, тем больше вероятность и меньше задержка распространения сетевых пачек импульсов, для такой передачи требуется минимум 100 аксонов (Pan et al., 2015).

Однонаправленные синаптические пути играют важную роль в гиппокампе, колонках коры и в других областях мозга, обеспечивая передачу и обработку информационных биоэлектрических сигналов. Одним из ключевых методов разработки искусственных нейронных сетей *in vitro* является навигация нейритов для формирования заданной синаптической связи между изолированными группами клеток (Campenot, 1979; Feber et al., 2015b; Renault et al., 2015).

В первичной культуре диссоциированные нервные клетки сначала формируют несколько небольших отростков, которые конкурируют между собой за аксональную поляризацию (Bradke, Dotti, 2000). На 3 день развития in vitro (DIV) скорость роста одного из отростков быстро увеличивается, а рост остальных подавляется, длинный отросток становится аксоном (Dotti, Sullivan, Banker, 1988; Roth et al., 2012). На скорость роста нейритов и поляризацию аксонов *in vitro* оказывают влияние химические факторы, например, NGF фактор роста нервов (Gomez et al., 2007), молекулы внеклеточного матрикса (Dertinger et al., 2002; Turney, Bridgman, 2005; Gomez, Chen, Schmidt, 2007), а также топография поверхности (Dowell-Mesfin et al., 2004; Gomez et al., 2007). При топографии поверхности в виде прямых щелей с глубиной около 1 мкм и шириной до 1,5 мкм отростки растут вдоль этих щелей и с большей скоростью, чем на гладкой поверхности (Gomez et al., 2007). Длинный аксональный отросток на таких поверхностях выделяется уже на 1 DIV (Dowell-Mesfin et al., 2004). Отросток, направленный по узкой прямой линии растёт быстрее, чем по изогнутой линии (Roth et al., 2012) или в расширенном пространстве (Withers et al., 2006). Эта особенность используется для разработки дизайна микроканалов способствующих или микропечати адгезивного материала однонаправленному росту аксонов.

Для конструирования направленной связи между несколькими (чаще двумя) подсетями можно использовать несколько подходов:

а) технология микропаттернов (micropatterning) обычно с использованием микроконтактной печати адгезионного белка (Wheeler et al., 1999; Oliva et al., 2003; Albers, Toma, Offenhausser, 2015) или с помощью ультрабыстрого лазера (Scott, Wissner-Gross, Yanik, 2012);

б) управление ростом аксонов с помощью микроканалов (Campenot, 1979; Feber et al., 2015b; Malishev et al., 2015; Pan et al., 2015; DeMarse et al., 2016; Pigareva et al., 2016);

в) создание постоянного потока среды для культивирования (Takayama et al., 2012);

г) применение высокочастотного электрического поля к аксонам в микроканалах и в коллагеновом скаффолде (Honegger et al., 2013; Honegger et al., 2016).

Навигация аксонов в культуре может осуществляться созданием градиента трофических (Huang et al., 2014) и ростовых (Taylor, Menon, Gupton, 2015) факторов или внеклеточного матрикса (Dertinger et al., 2002). Для навигации И поляризации аксона применяется модификация микрорельефа поверхности в виде бороздок или столбиков микро и нано размера (Dowell-Mesfin et al., 2004; Gomez, Chen, Schmidt, 2007; Gomez et al., 2007). С целью обеспечения однонаправленного роста аксонов был разработан специальный скаффолд с асимметричной поверхностью, но он лишь частично увеличивал рост аксонов в заданном направлении (Hattori et al., 2010).

При использовании технологии микропаттернов (Wheeler et al., 1999) конструирование направленной связи основано на том, что границы геометрических структур влияют на рост нейритов (Turney, Bridgman, 2005; Feinerman, Rotem, Moses, 2008). Направленность роста аксонов на микрооттисках обеспечивается за счёт дизайна границ, как правило, треугольной формы (Feinerman, Rotem, Moses, 2008; Scott, Wissner-Gross,

Yanik, 2012; Albers, Toma, Offenhausser, 2015). Было найдено, ЧТО направленный рост лучше в паттернах, имеющих форму треугольников с вогнутыми внутрь сторонами (Albers, Toma, Offenhausser, 2015; Tihaa, Albers, Offenhausser, 2016). Было отмечено, самый что длинный нейрит (соответствующий аксону) прорастал в противоположном направлении у 25% эффективном нейронов, В наиболее дизайне микропаттернов треугольной формы (Scott, Wissner-Gross, Yanik, 2012). Также было показано, что 15% осцилляций Ca<sup>2+</sup> активности нейронов распространялись между двумя треугольными микропаттернами в направлении противоположном заданному (Feinerman, Rotem, Moses, 2008). В микропаттернах клетки расположены случайным образом, отростки и тела клеток не разделены, что ограничивает возможность контролировать связанность в многослойных сетях. Кроме того, на более поздних стадиях развития культуры рост аксонов нервных клеток в противоположном направлении довольно вероятен, особенно вдоль уже проросших отростков других клеток, так как отсутствуют ограничения в вертикальной плоскости.

Подход на основе методов микрофюидики позволяет культивировать клетки в небольших камерах, соединенных микроканалами, в которых растут аксоны, синаптически связывая популяции клеток. Однонаправленный рост аксонов в такой сети может быть достигнут путем культивирования клеток только в одной камере, из которой аксоны растут через микроканалы в другую камеру. Затем, подсадка клеток в камеру с аксонами приводит к формированию синапсов только в этой камере, что обеспечивает высокую эффективность односторонней связи за счёт блокирования микроканалов проросшими аксонами (DeMarse et al., 2016).

Но при данном подходе ограничено выращивание длинных направленных цепей и сложных нейронных схем. Поэтому в нашей работе мы сфокусировались на изучении прорастания нейритов в микроканалах со специфическим дизайном для создания однонаправленной связи между двумя подсетями гомологичными по плотности и времени культивирования.

Известно, что длина микроканалов 200 мкм предотвращает прорастание дендритов, так как длина дендритов не превышает 75 микрометров, даже после 7 дней развития in vitro (DIV) (Dotti, Sullivan, Banker, 1988). В зрелой нейрональной культуре длина дендритов в микроканалах не превышает 150 мкм (Taylor et al., 2005; Taylor et al., 2010). Рост аксона в одном направлении может обеспечиваться за счёт ловушек (преград) (Feber et al., 2015b) или воронковидной формы канала (Peyrin et al., 2011; Brewer et al., 2013; Malishev et al., 2015; Renault et al., 2015). Было показано, что аксон преодолевает не более двух ловушек при росте в обратном направлении (Feber et al., 2015b). Тем не менее, в данном дизайне нет ограничивающих узких мест, и неизвестно, как эти ловушки препятствуют обратному росту аксонов после прорастания аксона по направлению. В другом дизайне каналов, В коряговидных каналах, по заданному направлению росло 2/3ЛИШЬ проросших отростков (Pirlo et al., 2011; Huang et al., 2015). Интересно, что интенсивность роста отростков в таких структурах была меньше, чем в стандартных культурах (Pirlo et al., 2011). Воронковидные каналы ограничивали, полностью предотвращали но не рост аксонов В противоположном направлении (Peyrin et al., 2011; Renault et al., 2015).

Таким образом, абсолютная однонаправленная связь между популяциями нейронов получалась только при посадке клеток в камеры, связанные микроканалами, с задержкой в несколько дней. Проблема прорастания аксонов в направлении противоположном заданному при одновременной посадке двух и более популяций нейронов может быть решена в будущем за счёт разработки оптимального дизайна микроканалов.

В гомогенной нейронной сети in vitro основная сложность при изучении пластичности на сетевом уровне связана с тем, что практически невозможно точно выделить и селективно воздействовать на определённую функциональную связь (т.е. на характерный путь распространения сигнала).
#### ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

#### 2.1. Объект исследования

В исследовании использовались культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученных от 18-дневных (Е18) эмбрионов мышей (белых беспородных, а также линий CBA и C56BL/6). Беременные мыши умерщвлялись путем дислокации шейных позвонков, эмбрионы были Bce немедленно удалены кесаревым сечением. 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 НижГМА Минздрава России.

#### 2.2. Культивирование нервных клеток

Ткань гиппокампа эмбрионов мышей (E18) иссекалась из головного мозга в забуференном физиологическом растворе (PBS, phosphate buffered saline). Ткань гиппокампа измельчалась скальпелем и обрабатывалась 0,25% трипсином (Invitrogen 25200-056) в течение 20 минут при 35,5°С. После отмывки трипсина раствором PBS ткань гиппокампа механически диссоциировали с помощью узкого кончика стеклянной пипетки Пастера. Полученную ткань суспендировали в нейробазальной среде NeurobasalTM (Invitrogen 21103-049) с эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко К055) 5%, биоактивной добавкой B27 (Invitrogen 17504-044) 1%, и глутамином

(Invitrogen 25030-024) 0,25%. Клетки затем высевали на 60-канальные микроэлектродные матрицы (MEA, microelectrode array) и покровные стёкла, предварительно покрытые полиэтиленимином (Sigma P 3143) для содействия адгезии клеток. Приготовленную суспензию раскапывали по 25 мкл на предварительно обработанные микроэлектродные матрицы И стекла, полиэтиленимином (Sigma P 3143), необходимым для адгезии клеток. В течение 90 минут клетки оседали и прикреплялись к адгезивной поверхности в условиях увлажнённого воздуха CO<sub>2</sub> инкубатора (MCO-18AIC, SANYO) при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. После этого в чашки добавляли по 1 мл среды. Исходная плотность клеточной культуры составляла около 9000 клеток/мм<sup>2</sup> (рис. 2).



Рисунок 2. Культуры диссоциированных клеток гиппокампа на микроэлектродных матрицах: микрофотографии клеток гиппокампа на микроэлектродных матрицах MEA (А) и MED64 (Б). Масштаб 50 мкм.

Поддержание жизнеспособности культуры осуществлялось в условиях  $CO_2$  инкубатора при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5%  $CO_2$ . Антибиотики и противогрибковые препараты не использовались. Развитие глии не подавлялось, поскольку глиальные клетки необходимы для длительного сохранения жизнеспособности культуры в условиях *in vitro*. Смена половины объема среды на среду NeurobasalTM (Invitrogen 21103-049) с эмбриональной телячьей сывороткой 0,4%, биоактивной добавкой B27 1%, и глутамином 0,5% проводилась на следующие сутки и дальше по мере изменения кислотности среды.

В экспериментах с электрической стимуляцией использовали культуры после 3-4 недель развития *in vitro*, что определялось задачей исследования зрелых в функциональном и структурном отношении нейронных сетей (Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008; Гладков и др., 2011; Широкова и др., 2013).

#### 2.3 Культивирование диссоциированных нервных клеток с направленной связью

Система микроканалов выполняется в ПДМС оттиске методом «мягкой литографии» с применением кремниевого штампа. Рельеф самого штампа формируется помощью фотолитографии, фоторезисте SU-8 с В (светочувствительный полимер), нанесённом на кремниевую подложку. Изготовление фотошаблона осуществлялось травления путем предварительно напылённого хрома толщиной 100 нм, в окнах резиста AZ1505. Травление хрома проводилось в растворе  $\{10,9\%$  Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>, 4.25% HCl<sub>4</sub>, 84,85% H<sub>2</sub>O}, взаимодействующим с хромом согласно уравнению (1):

$$Ce(NH_4)_2(NO_3)_6 + Cr \rightarrow 3 Cr(NO_3)_3 + 3Ce(NH_4)_2(NO_3)_5....(1)$$

Для приготовления ПДМС конструкций использовался «Sylgard 184 silicone elastomer base» и «Sylgard 184 silicone elastomer curing agent» (DowCorning, США) в пропорции 10:1. После тщательного перемешивания и дегазации в течение 30 минут, смесь заливалась на изготовленный штамп и  $70^{\circ}C$ выдерживалась температуре В 120 при течение МИНУТ. Полимеризовавашийся ПДМС оттиск отделяли от штампа. В полученном чипе вырезали сквозные отверстия для камер, в которых в дальнейшем культивировались клетки (рис. 3 А, Б, Г, Д). При вырезании отверстий неизбежно происходило загрязнение чипа мелкими частичками ПДМС. Для отчистки чипов использовался скотч 3M, не оставляющий следов после снятия. Чистые чипы аккуратно приклеивали на чистые покровные стёкла или микроэлектродные матрицы.

Между двумя камерами было 8 микроканалов. Каждый микроканал состоял из трёх треугольных секций, направленных своей вершиной в сторону камеры приёмника (камеры Б). Высота микроканалов была 7 мкм, ширина узких мест – 7 мкм, длина микроканалов (расстояние между камерами) – 600 мкм. Было показано, что длина дендритов не превышает 100 мкм после 7 дней развития в первичной культуре, в то время как длина аксонов может достигать нескольких миллиметров (Dotti, Sullivan, Banker, 1988). Форма микроканалов (рис. 3 В, Г, Д) обеспечивала преимущественный рост аксонов из одной камеры, *камеры источника* (или *камеры А*), в *камеру приёмник* (или *камеру Б*). Микроканалы и электроды матрицы выравнивались с помощью механического микроманипулятора так, чтобы электроды располагались в области узких мест микроканалов (рис. 3 Б, Е). Это способствовало оптимальной регистрации биоэлектрических потенциалов аксонов в микроканалах.



Рисунок 3. Чип с микроканалами для направленного роста аксонов. А – микрожлектродная 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 наравленной 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.

Прикреплённые чипы заливали дистиллированной водой. Воздух из микроканалов удалялся механическими нажатиями на чип и вакуумной помпой. После удаления всех пузырьков воздуха чипы заливались водным раствором гентамицина 1 мг/мл и оставлялись в ламинарном шкафу под кварцевой лампой на 120 минут. После этого матрицы промывали от гентамицина стерильной деионизованной водой 3 раза и покрывали полиэтиленимином. Исходная плотность клеток в камерах была такой же как клеток/мм<sup>2</sup>. 9000 В гомогенных культурах И составляла около Микрофотография культуры клеток гиппокампа на микроэлектродной матрице, интегрированной с ПДМС чипом с микроканалами, приведена на рисунке 4.



Рисунок 4. Диссоциированные клетки гиппокампа на микроэлектродной матрице с ПДМС чипом с микроканалами. Масштаб 200 мкм.

#### 2.4 Морфологические методы исследования

Микрофотографии культуры диссоциированных клеток гиппокампа получали с помощью светового инвертированного микроскопа Leica DMIL HC (Германия). Результаты иммуноцитохимического анализа оценивались с использованием конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 710 (Германия).

Иммуноцитохимическое исследование проводили на 6-й день развития нервных клеток *in vitro*. Культуры сначала промывались теплым (35°C) PBS. Затем  $(35^{\circ}C)$ раствором клетки фиксировались теплым свежеприготовленным раствором 4% параформальдегида (Sigma 30525-89-4) в течение 15 мин при комнатной температуре, а затем промывались три раза PBS в течение 5 мин. ПДМС чип аккуратно удалялся, чтобы обеспечить доступ растворов антител к отросткам в микроканалах. Для обеспечения проницаемости антител к внутренним структурам клеток производилась обработка раствором Тритон X-100 0,1% в PBS с бычим сывороточным альбумином 2% (BSA) в течение 20 мин при комнатной температуре. Для маркирования нейронов и их аксонов использовались антитела морской свинки для β3-тубулина (SYSY, 302 304) и тау мыши (SYSY, 314 011), соответственно. Клетки инкубировали с первичными антителами, при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем промывали раствором PBS три раза в течение 5 мин. Антитела козы к антигенам морской свинки, меченные флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) использовали для визуализации β3-тубулина. Антимышиные антитела козы, меченные флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific) использовали для визуализации белка микротрубочек Tau. Клетки инкубировали в темноте с вторичными антителами, при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем промывали PBS и в деионизированной воде для очистки от солей. После этого клетки фиксировали в специальной твердеющей среде Fluoromount<sup>™</sup> (Sigma F4680).

Результаты оценивались с использованием конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 710. Изображения были сделаны с точечным отверстием 3,15 мкм на четырёх уровнях фокусировки, глубина Z-стека составила 5 мкм. В дальнейшем изображения для разных слоёв усреднялись в программе ImageJ.

## 2.5 Регистрация и анализ биоэлектрической активности нейронной сети

#### 2.5.1 Регистрация биоэлектрической активности нейронной сети

Для записи спонтанной биоэлектрической активности использовали микроэлектродные многоканальные системы MED64 (Alpha MED Sciences, Japan) и MEA120 (Multichannel systems, Germany), имеющие 64 и 59 каналов регистрации, соответственно. Основными независимых являлись: компонентами этих систем усилитель, ЗОНД с матрицей микроэлектродов, коннектор, и набор программного обеспечения (рис. 5).



Рисунок 5. Микроэлектродная многоканальная система MED64. Справа увеличенная область регистрирующих микроэлектродов зонда.

Использовали зонд, основание которого представляет собой стеклянную подложку, в центре которой на площади 1 мм<sup>2</sup> расположена матрица плоских регистрирующих электродов размером 30мкм (MEA120) или 50мкм (MED64). Один или несколько электродов сравнения имеют больший размер, чем регистрирующие электроды и располагаются на расстоянии нескольких сотен микрометров от центра матрицы. Проводящие дорожки к местам соединения с коннектором покрыты изолирующим слоем. Стеклянный цилиндр, прикреплённый в центре основания зонда, образует камеру объёмом 2мл для культивирования клеток.

Плоские микроэлектроды регистрируют изменение потенциала внешней среды вблизи электрода, возникающее в результате тока ионов через мембрану при импульсной активности клеток. Запись данных происходит с частотой дискретизации 20 кГц, при этом длительность регистрируемого внеклеточного импульса составляет около 1 мс.

Эксперименты с использованием системы МЕD64 проводились в условиях увлажнённого CO<sub>2</sub> инкубатора при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% СО2. Коннектор системы МЕА120 содержит интегрированные предусилители, что не позволяет использовать его в условиях высокой влажности. Поэтому нами была изготовлена крышка, позволяющая подведение газовой смеси (5% СО2, 95% воздух) и предотвращающая испарение. Поддержание температуры среды 35,5°С осуществлялось счёт подогрева матрицы за дна нагревателем, интегрированным В коннектор. Схема крышки поддержания ДЛЯ необходимых условий культивирования вне инкубатора изображена на рисунке 6. Поток газовой смеси составлял порядка 10 – 20 мл/мин.



Рисунок 6. Схема крышки для поддержания необходимых условий культивирования вне инкубатора. 1 – нагревательная пластина коннектора. 2 – плёнка позволяющая подведение газовой смеси (5% CO<sub>2</sub>, 95% воздух) и предотвращающая испарение. 3 –крышка из мягкого пластика, герметично надевающаяся на цилиндр зонда. 43 – источник газовой смеси (5% CO<sub>2</sub>, 95% воздух).

#### 2.5.2 Анализ биоэлектрической активности нейронной сети

#### 2.5.2.1 Детектирование импульсов

Пороговое детектирование внеклеточных импульсов было основано на вычислении медианы регистрируемого сигнала (2):

$$T = N_s \sigma, \sigma = median\left(\frac{|x|}{0.6745}\right), \qquad (2)$$

где х – сигнал с фильтрованной полосой частот (0,3-8 кГц);

σ – оценка медианы, нормированная на стандартное отклонение
 сигнала с нулевым числом импульсов (Pimashkin et al., 2011);

N<sub>S</sub> – коэффициент детектирования импульсов, определяющий порог детектирования (Quiroga, Nadasdy, Ben-Shaul, 2004).

Стандартное отклонение сигнала равно медиане абсолютных значений этого сигнала, делённых на 0,6745. Таким образом, значение 0,6745 – это

значение нормирования медианы на стандартное отклонение сигнала (Пимашкин, 2010; Pimashkin et al., 2011). Пример регистрируемого биоэлектрического импульса, представленного в виде фильтрованного сигнала и в виде детектированного момента времени приведён на рисунке 7 А. Амплитуда найденных импульсов находились в диапазоне 10-100 мВ.



Рисунок 7. Детектирование биоэлектрических импульсов. А - Импульс (внеклеточный потенциал), представленный в виде фильтрованного сигнала и в виде детектированного момента времени (красная точка\*), Б – Ответ на единичный электрический стимул (±800 мВ и 260 мкс на фазу, первая положительная) в виде пачки импульсов. Время предъявления стимула отмечено стрелкой.

#### 2.5.2.2 Детектирование сетевых пачек

Сетевая пачка импульсов (англ. - Network Burst) - пачка импульсов, регистрируемых в нескольких пространственных участках нейронной сети с перекрытием во времени и характеризующаяся следующими признаками: интервал между импульсами не более 100 мс, количество импульсов в пачке не менее 10 (Chiappalone et al., 2004; Chiappalone et al., 2005; Wagenaar, Pine, Potter, 2006a; Wagenaar, Nadasdy, Potter, 2006). В данной работе сетевой пачкой было принято считать перекрывающиеся во времени пачки импульсов, регистрируемые не менее, чем в 4-х различных участках сети (электродах).

Применялся детектирования метод спонтанных сетевых пачек активности (рис. 8) с возможностью определения моментов возникновения и разработанный Пимашкиным A.C завершения пачечного разряда, (Пимашкин, 2010; Pimashkin et al., 2011). Запись функциональной активности разделяли на интервалы длительностью 10-2 мс. Чем меньше интервал, тем точнее определяется время начала и конца пачки. В каждом интервале подсчитывали суммарное количество импульсов, регистрируемое на всех электродах матрицы с помощью описанного выше метода.

Значение порога детектирования сетевых пачек (T<sub>Burst</sub>) рассчитывали по следующей формуле (3):

$$T_{Burst} = C_B \times \sigma(F(t)), \tag{3}$$

где Св - коэффициент чувствительности, который был выбран равным 0,1 экспериментально;

F(t) - функция зависимости суммарной частоты импульсов от времени;  $\sigma$  – оценка среднего квадратичного отклонения (Pimashkin et al., 2011);

Время начала пачки (T<sub>x</sub>), определялось как момент, в который суммарное количество импульсов в заданном интервале достигает определённого порогового значения T<sub>Burst</sub> (рис. 8 Б), а завершением – то время когда данный показатель спускается до этого порога. Другими словами, времена начала и конца пачки соответствовали моментам времени, в которые порог детектирования пачек T<sub>Burst</sub> пересекался с функцией суммарной частоты импульсов F(t).



Рисунок 8. Сетевые пачки спонтанной биоэлектрической активности культуры диссоциированных клеток. А – Пример регистрируемого сигнала многоканальной системой MEA120. Б – Схема детектирования сетевых пачек спонтанной биоэлектрической активности.

#### 2.5.2.3 Оценка спонтанной пачечной активности в нейронной сети диссоциированных клеток гиппокампа

Анализ спонтанной пачечной активности в нейронной сети диссоциированных клеток гиппокампа проводился по следующим характеристикам, перечисленным ниже.

Частотно-временные характеристики сетевой активности: частота импульсов, частота сетевых пачек, длительность сетевых пачек, межпачечный интервал, число импульсов в сетевой пачке, паттерн активации сетевой пачки, разница паттернов активации сетевых пачек, разница паттернов частоты импульсов сетевых пачек.

Характеристики кросс-корреляции последовательностей импульсов: число связей, коэффициент новых связей, коэффициент исчезновения связей, коэффициент изменения архитектуры связей, коэффициент изменения силы стабильных связей.

#### Частотно-временные характеристики сетевой активности.

*Частота импульсов (имп/с)* рассчитывалась как среднее значений количества импульсов спонтанной активности в секунду, зарегистрированных всеми электродами матрицы. Время регистрации 20 мин.;

Частота пачек (пач/мин) рассчитывалась как среднее значений количества сетевых пачек импульсов спонтанной активности в минуту, зарегистрированных всеми электродами матрицы. Время регистрации 20 мин;

Длительность пачек (мс) рассчитывалась как медиана значений длительности всех пачек (интервал между временем начала и конца пачки, см. раздел «Детектирование сетевых пачек», глава 2), зарегистрированных в течение 20 мин;

Межпачечный интервал (мс) рассчитывался как медиана значений времени между всеми соседними пачками (между временем конца одной пачки и временем начала следующей пачки, см. раздел «Детектирование сетевых пачек» глава 2), зарегистрированных в течение 20 мин;

*Число импульсов в пачке (имп/пачка)* рассчитывалось как медиана значений количества импульсов, зарегистрированных на всех электродах матрицы в течение каждой сетевой пачки. Время регистрации 20 мин;

Паттерн активации сетевой пачки представляет собой математический вектор средних значений времён первых импульсов от момента начала пачек импульсов, регистрируемых в течение записи спонтанной сетевой активности (20 мин) каждым регистрирующим электродом матрицы.

Для количественной оценки сетевой активности использовался ранее разработанный метод выделения *паттерна активации сетевой пачки* т.е. паттерна времен первых импульсов в сетевой пачке (Shahaf et al., 2008; Pimashkin et al., 2011). Согласно этому методу время первого импульса в сетевой пачке (t<sub>i</sub>) для каждого регистрирующего электрода определяется как

временная задержка от момента начала пачки (T<sub>x</sub>, см. рис.8) до первого импульса на данном регистрирующем электроде (рис. 9).



Рисунок 9. Схематическое изображение определения паттерна активации для двух разных сетевых пачек импульсов (p, q). Паттерн формируется из времён возникновения первых импульсов в пачке.

С позиций описания математического объекта - матрицы, патерн собой активации сетевой пачки представляет вектор-столбец **(**B последующем просто вектор) значений времён первых импульсов от момента начала пачки (T<sub>x</sub>) для каждого регистрирующего электрода матрицы (Pimashkin et al., 2011). Размер вектора-столбца равен количеству регистрирующих электродов матрицы.

Для оценки динамики спонтанной и вызванной активности использовали показатели, рассчитанные по параметрам сетевой пачки.

*Разница паттернов активации сетевых пачек* представляет собой разницу между векторами средних значений времён первых импульсов сетевых пачек (S<sub>act</sub>) и рассчитывается по формуле (3):

$$S_{\rm act}(p,q) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \left(t_i^p - t_i^q\right)^2},$$
(4)

где t<sup>p</sup><sub>i</sub> и t<sup>q</sup><sub>i</sub> – вектора средних значений времён импульсов для р-ой и qой записи спонтанной активности,

N – количество электродов матрицы (Pimashkin et al., 2011).

Другими словами S<sub>act</sub>(p,q) определяет минимальное евклидово расстояние между двумя векторами средних времён первых импульсов в N-мерном метрическом пространстве, N = 59 это число электродов.

*Разница паттернов частоты импульсов сетевых пачек* представляет собой вектор средних значений частот импульсов в течение записи спонтанной активности (20 мин) для каждого регистрирующего электрода (S<sub>sr</sub>) и рассчитывается по формуле:

$$S_{\rm sr}(p,q) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \left(f_i^p - f_i^q\right)^2},\tag{5}$$

где f<sup>p</sup><sub>i</sub> и f<sup>q</sup><sub>i</sub> - вектора средних значений частот импульсов для р-ой и qой записи спонтанной активности,

N – количество электродов матрицы (Pimashkin et al., 2011).

Показатель S<sub>sr</sub>(p,q) определяет минимальное евклидово расстояние между двумя векторами средних частот импульсов для p-ой и q-ой записи в N-мерном метрическом пространстве, N = 59 это число электродов.

#### Характеристики кросс-корреляции последовательностей импульсов нейронов

При математическом анализе динамики физиологических величин часто имеет место взаимное влияние процессов при условии сдвига временных серий друг относительно друга на некоторый временной промежуток. Кросскорреляционный анализ позволяет объективно выявить величину и направление скрытой шумом или сложностью процесса причинно-следственной связи между физиологическими функциями. В связи с чем, для выявления причинно-следственной связи между активностью различных участков нейронной сети, объединяющих несколько нейронов, активность которых регистрируется электродом микроэлектродной матрицы, был проведен кросскорреляционный анализ последовательностей импульсов, отражающих активность сети в разных ее участках.

Кросскорреляционный анализ последовательностей импульсов нейронов двух участков нейронной сети проводился для каждой пары электродов матрицы. Кросскорреляционная функция ( $C_{i,j[\tau]}$ ) рассчитывалась как отношение количества импульсов, переданных от первого электрода и полученных вторым электродом ј к количеству импульсов на электроде i (%) с временными задержками от 3 до 500 мс (t = [ $\tau$ ,  $\tau$  + 0,5] (0 <  $\tau$  < 500 ms)) (3):

Ci,j 
$$[\tau] = (N_{i,i}/N_i) \times 100\% = (\Sigma_t X_i [t] \cdot X_i [t + \tau]/\Sigma_t X_i [t]) \times 100\%$$
,

$$3 < \tau < 500 \text{ ms},\tag{6}$$

где N<sub>i</sub> – число импульсов на электроде i;

N <sub>i,j</sub> – число импульсов, переданных от первого электрода і и найденных на втором электроде j;

 $X_i$  и  $X_j \in \{0, 1\}$  – зарегистрированные импульсы (Le Feber et al., 2007).

Согласно методу, предложенному Le Feber, было принято, что между последовательностью импульсов на двух участках сети есть связь, если кросскорреляционная функция была не плоской (Feber le et al., 2007; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010).

Значение максимума кросскорреляционной функции ( $M_{ij}$ ), выраженное в количестве переданных импульсов (%), характеризовало *силу связи*, временная задержка между последовательностью импульсов на двух электродах, которая соответствует максимуму кросскорреляционной функции, характеризовала *задержку связи* ( $T_{ij}$ , мс) (Feber le et al., 2007) (рис. 10).



Рисунок 10. Кросскорреляционный анализ последовательностей импульсов, регистрируемых в различных участках сети. А - схема передачи импульсов между двумя участками сети і и j; Б - пример кросскорреляционной функции последовательностей импульсов между двумя электродами і и j (Feber le et

al., 2007).

Таким образом, кросскорреляционный анализ позволяет выявить функциональную связь между двумя активными участками сети. В нашей работе функциональная связь считалась существующей, если кросскорреляционная функция не была плоской и значение временной задержки, на котором наблюдался максимум кросскорреляционной функции, было больше 3 мс ( $T_{ii}$ >3мс).

Как и в методе le Feber было принято, что значение *максимума кросскорреляционной функции* ( $M_{ij}$ ), выраженное в количестве переданных импульсов (%), характеризовало силу функциональной связи, задержка (мс), которая соответствует *максимуму кросскорреляционной функции* ( $T_{ij}$ ), характеризовала задержку функциональной связи (Feber le et al., 2007). Значения  $M_{ij}$  и  $T_{ij}$  определяли для каждой пары электродов. В результате можно было построить матрицы силы связи и матрицу задержек связи (рис. 11).



Рисунок 11. Пример мартицы силы связей *M*<sub>ij</sub> (A) и мартицы задержек связей *T*<sub>ij</sub> (Б) для активности культуры нервных клеток, регистрируемой 59 микроэлектродами матрицы.

Мы разработали новые критерии для детальной оценки изменений архитектуры функциональных связей в нейронной сети, основанные на выделении появления новых и исчезновения старых связей (рис. 12). При этом показателями сила связи и задержка связи пренебрегали. Во внимание брали только факт наличия или отсутствия функциональной связи между друмя электродами.

Среди функциональных связей, определяемых кросс-корреляцией последовательностей импульсов на двух электродах среди всех электродов матрицы, выделяли:

- Стабильные связи (сохраняющиеся длительный период во время спонтанной активности или после электрической стимуляции);
- *Новые связи* (появляющиеся вновь с течением времени спонтанной активности или после электрической стимуляции);
- Исчезнувшие связи (исчезающие с течением времени спонтанной активности или после электрической стимуляции).



Рисунок 12. Схема изменения архитектуры связей. Стрелками обозначены связи между участками сети, выявленные при кросскорреляционном анализе.

Красным отмечены новые связи, зелёным – стабильные связи, синим

(пунктиром) – исчезнувшие связи.

Для количественной оценки вызванных функциональных изменений (т.е. сетевой пластичности) нейронной сети после электрической стимуляции были выбраны следующие коэффициенты, определяемые через вычисление кросскорреляционной функции:

- *число связей* расчитывалось как количество функциональных связей, найденных при кросскорреляционном анализе последовательностей импульсов всех возможных пар регистрирующих электродов (3422 для матрицы с 59 электродами);

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

- коэффициент исчезновения связей вычислялся как 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. Вычисляется как 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 вычислялся как изменение (%) значения максимума кросскорреляционной функции только для стабильных связей.

Преимуществом разработанных нами параметров является возможность количественной оценки изменений архитектуры связей. Кроме того, данные параметры характеризуют не состояние связей в определённый момент времени, а изменения, происходящие спонтанно или после воздействия электрической стимуляции. Другими словами, разработанные параметры позволяют эффективно выявить достоверный эффект от воздействия раздражителя на фоне спонтанных сетевых изменений.

## 2.5.2.4 Анализ распространения пачечной активности в нейронной сети с направленной связью

Некоторые из пачек импульсов в камере-источнике вызывали всплески в камере-приёмнике с небольшой задержкой. Мы детектировали пачки импульсов в записях спонтанной активности отдельно в каждой камере согласно алгоритму, опубликованному в наших предыдущих исследованиях (Pimashkin et al., 2011). Затем мы оценивали, сколько из пачек импульсов в камере источнике вызывало пачку импульсов в камере приёмнике и наоборот.

Было принято, что пачка импульсов в одной камере вызывает пачку импульсов в другой, если выполняются два условия. Во-первых, временной интервал между моментами начала (Tx) двух пачек импульсов (в камерах A и Б) составлял от - 500 мс до 500 мс. Во-вторых, момент начала пачки, возникающей позднее среди рассматриваемых двух, не должен быть позже времени завершения пачки, возникшей раньше в другой камере. Другими словами, пачка импульсов в одной камере не могла быть вызвана пачкой импульсов в другой камере, если между этими пачками не было импульсной оценивали распространение сетевой активности. Таким образом, МЫ непрерывный динамический процесс, который активности как

инициировался в одной камере, затем распространялся по аксонам и вызывал отклик в другой камере, в то время как исходный процесс (в первой камере) ещё не завершился.

Затем, чтобы проверить гипотезу о том, что наблюдаемые временные интервалы между моментами начала двух пачек импульсов (в камерах А и Б) отражали истинное распространение сетевой активности по направленной связи, а не случайное появление двух пачек импульсов, проводили анализ с использованием суррогатных данных. Суррогатные данные генерировались из исходной последовательности пачек импульсов путем изменения времени начала пачек импульсов со случайными интервалами между пачками с распределением соответствующим исходным данным. Такую процедуру перетасовки повторяли 1000 раз, и на каждой итерации временные интервалы между моментами начала двух пачек импульсов (в камерах А и Б) собирались так же, как это делалось для исходных данных. Основываясь на суррогатных данных, мы оценили вероятность случайного появления двух пачек импульсов в разных камерах с небольшими задержками (от -500 до 500 мс). Вероятность случайного появления двух пачек импульсов в разных камерах рассчитывалась для каждого 2-10 мс интервала (соответственно временному интервалу при детектировании пачек импульсов, см. раздел Детектирование сетевых пачек) от -500 до 500 мс между моментами начала двух пачек импульсов в разных камерах. Временные интервалы между моментами начала (Tx) двух пачек импульсов (в камерах А и Б), на которых вероятность появления пачки в другой камере в исходных данных была выше, чем 5 Х Среднеквадратическое отклонение в суррогатных данных, считались физиологически релевантными и использовались в дальнейшем анализе.

Рассчитывали *вероятность распространения* сетевых пачек из камеры А в камеру Б (ВР<sub>АБ</sub>) как процент спонтанных пачек в камере А, вызвавших пачку импульсов в камере Б. *Вероятность распространения* сетевых пачек из камеры Б в камеру A (BP<sub>БА</sub>) рассчитывали как процент спонтанных пачек в камере Б, вызвавших пачку импульсов в камере А.

Для оценки распространения пачек импульсов, вызванных стимулами (± 800 мВ, 260 мкс на фазу, первая электрическими положительная, интервалы между стимулами 3с), подавали серию из 60 стимулов через один электрод, выбранный в камере источнике или приёмнике. Ответ сети регистрировался в диапазоне 10-600 мс после стимула. Вероятность распространения сетевых пачек из камеры А в камеру Б, вызванных стимулами через электрод в камере А (ВР<sub>АБ</sub>) оценивали как процент пачек импульсов, вызванных в камере источнике, и вызвавших пачку импульсов в камере приёмнике, от общего количества вызванных стимулом пачек в камере источнике. Аналогично рассчитывали вероятность распространения сетевых пачек из камеры Б в камеру А, вызванных стимулами через электрод в камере Б (ВР<sub>БА)</sub>. Спонтанно генерируемые пачки импульсов в не стимулируемой камере могут случайно попадать в интервал времени, соответствующий ответу на стимул. Поэтому мы проводили анализ с использованием суррогатных данных.

Чтобы проверить гипотезу о том, что наблюдаемые после стимула пачки импульсов в камере Б отражали истинное распространение сетевой активности по направленной связи, а не случайное появление спонтанно генерируемых пачек импульсов в не стимулируемой камере, проводили анализ с использованием суррогатных данных. Генерировались суррогатные данные пачек в камере Б, в которых сохранялось число пачек, их длительности и интервалы между пачками, как в исходных данных. Затем, вычисляли количество импульсов после стимула (от 10 до 600 мс) в 20 мс интервалах. Если в исходных данных количество импульсов в камере Б после стимула в 20 мс интервалах было выше, чем 5 Х Среднеквадратическое наблюдается отклонение В суррогатных данных, считалось что распространение сетевой активности по направленной связи.

Для дальнейшего анализа отбирались только такие эксперименты, в которых исходные значения ВР<sub>АБ</sub> или ВР<sub>БА</sub> превышали значения, рассчитанные по суррогатным данным. Другими словами отбирались только такие культуры, в которых наблюдалось распространение пачек импульсов между двумя подсетями.

## 2.6 Протоколы электрической стимуляции2.6.1 Характеристики стимулов

Стимулы генерировались с использованием четырёхканального стимулятора напряжением и током (модель STG4004, Multichannel systems, Германия).

Использовали матрицы MED64, плоские микроэлектроды которых покрыты чёрной платиной и имеют квадратную форму размером 50х50 мкм. Было экспериментально рассчитано, что для вызова сетевого ответа оптимально использовать двухфазные прямоугольные стимулы напряжения амплитудой ±600 мВ и длительностью 300 мкс на одну фазу, первая положительная. Эти параметры стимулов использовались в экспериментах с матрицами MED64.

Также использовали матрицы MEA120, плоские микроэлектроды которых покрыты титан нитридом (TiN) и имеют круглую форму с диаметром 30 мкм. Было экспериментально установлено, что для вызова сетевого ответа оптимально использовать двухфазные прямоугольные стимулы напряжения амплитудой ±800 мВ и длительностью 260 мкс на одну фазу, первая положительная. Эти параметры стимулов использовались в экспериментах с матрицами MEA 120.

Для выявления природы вызванных потенциалов после стимула применяли антагонисты глутаматных рецепторов CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), 10 мкМ (Sigma) и CPP (3-(2-Carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid), 10 мкМ (Sigma), подавляющих возбуждающую синаптическую передачу, и блокатор ионных каналов тетродотоксин (TTX) в

концентрации 1 мкМ (Sigma). Вещества добавляли в культуральную среду в указанной конечной концентрации в объеме 10 мкл.

#### 2.6.2 Стимуляция с обратной связью

Протокол индукции заданного уровня активности в диссоциированных нейронных сетях на основе стимуляции с обратной связью был предложен профессором Маром из Израильского Технологического Института (Shahaf, Marom, 2001), в котором для обратной связи выбирались только слабо активные участки сети. Мы адаптировали предложенный протокол для активных участков нейронной сети.

Эксперименты со стимуляцией с обратной связью осуществлялись с использованием многоканальной системы регистрации MED64. Регистрация и стимуляция активности культур проводилась в условиях увлажнённого CO<sub>2</sub> инкубатора при температуре 35,5°C и воздушной смеси, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Электрическая стимуляция заключалась в предъявлении последовательности коротких бифазных стимулов напряжения (±600 мВ, 300мкс на фазу, первая положительная) с низкой частотой (0,05–0,06 Гц). Стимул, поданный через один из электродов матрицы, вызывал сетевой ответ, который регистрировался на остальных электродах. После каждого стимула считали количество импульсов, зарегистрированных во временном окне от 40 до 80 мс после стимула для каждого электрода матрицы. Текущий уровень вызванной активности для каждого стимула на заданном электроде вычислялся как среднее число вызванных импульсов в ответ на 10 предшествующих стимулов (R/S).

До стимуляции с обратной связью проводилась контрольная, тестовая стимуляция в течение 80 минут (10 минут – стимуляция, 5 минут – без стимуляции). Значения R/S вычислялось в течение стимуляции после каждого стимула для всех регистрирующих электродов.

В резульате анализа записи тестовой стимуляции вычислялся Средний ответ M(R/S) и среднеквадратичное отклонение от Среднего ответа σ(R/S) для всей записи для каждого электрода.

До начала индукции заданного уровня активности с помощью стимуляции с обратной связью культивируемые нейронные сети не стимулировались в теечение одного часа. Для оценки ответов И использования их в обратной связи выбирался один из регистрирующих электродов матрицы, имеющей значение M(R/S) в интервале от 0,1 до 0,6, а также стандартное отклонение 0,1M(R/S)<σ(R/S)<2M(R/S) в тестовой стимуляции. Другим условием для выбора электрода было отсутствие значительных изменений значений R/S в ответах в течение тестовой стимуляции.

Основным показателем протокола являлось пороговое значение ответа (R/S<sub>Tr</sub>), которое вычислялось на основе значений R/S в ответах в тестовой стимуляции. Пороговое значение R/S<sub>Tr</sub> выбиралось как граница 20%, 15%, 10% и 5% наибольших значений R/S на выбранном электроде, которые наблюдались в тестовой стимуляции. Расчитанные значения порога для отключения стимуляции (обратной связи) варьировались В разных экспериментах. Если в течение стимуляции значение R/S на выбранном электроде достигало порогового значения R/S<sub>Tr</sub>, стимуляция автоматически прекращалась на 5 минут за счёт обратной связи. Если в течение 10 минут цикла пороговое значение R/S<sub>Tr</sub> не достигалось, стимуляция также отключалась на 5 минут, после чего цикл повторялся снова.

Для каждого цикла стимуляции с обратной связью расчитывался показатель  $T_{R/S}$  - время достижения порогового значения  $R/S_{Tr}$  от начала цикла стимуляции. Для оценки эффективности достижения заданного уровня активности 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 достижение заданного уровня активности считалось успешным. Таким образом, заданный уровень

активности представлял собой достаточно быстрое появление высокого уровня активности на выбранном участке сети в определённом интервале времени после стимула.

#### 2.6.3 Оценка стабильности ответов нейронной сети на стимуляцию различных участков

Эксперименты по оценке стабильности синапс-зависимых ответов нейронной сети на стимуляцию различных участков проводились с использованием матриц MEA120. В эксперименте использовались зрелые культуры клеток гиппокампа после четырёх недель развития *in vitro* (Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008; Гладков и др., 2011; Широкова и др., 2013). Низкочастотные стимулы (0,2 Гц) подавились через один выбранный электрод, ответ нейронной сети регистрировался с помощью других электродов матрицы. Применяли протокол с автоматическим переключением между стимулирующими электродами матрицы.

Мы использовали параметр «вероятность вызова сетевого ответа», который рассчитывался как отношение стимулов вызвавших синапсзависимый ответ нейронной сети к общему количеству стимулов для выбранного стимулирующего электрода. Было принято, что электрический стимул вызывает синапс-зависимый ответ нейронной сети, если в интервале от 10 до 50 мс после стимула регистрировалось более трёх импульсов. Изменение параметра «вероятность вызова сетевого ответа» определяли как разницу значений данного параметра в первой и последующих сериях стимуляции. Протокол эксперимента состоял из следующих процедур:

1. Запись спонтанной биоэлектрической активности сети (10 мин);

Запись сетевой активности во время низкочастотной стимуляции (0,2 Гц) сериями по 30 стимулов последовательно через 12 выбранных электродов (всего 50 мин);

Повторная запись сетевой активности во время низкочастотной стимуляции (0,2 Гц) сериями по 30 стимулов через те же электроды (всего 50 мин);

4. Запись спонтанной биоэлектрической активности сети (10 мин).

Данный протокол повторялся на следующие, третие, четвертые и пятые сутки.

## 2.6.4 Оценка влияния низкочастотной и высокочастотной электрической стимуляции на спонтанную активность

В исследовании влияния **низкочастотной** электрической стимуляции (HЧС) на спонтанную активность нейронной использовались зрелые культуры диссоциированных клеток гиппокампа после трёх недель развития *in vitro*, n = 7 культур. Клетки культивировались на матрицах системы MEA120.

Низкочастотная электрическая стимуляция осуществлялась через 8 – 12 30 стимулов на электрод. последовательно ПО Частота электродов стимуляции выбиралась в зависимости от частоты пачек в спонтанной активности и находилась в диапозоне от 0,03 до 0,2 Гц (межстимульный интервал от 3 до 5 с). Протокол эксперимента включал запись спонтанной биоэлектрической активности сети В течение одного часа перед низкочастотной стимудяцией И одного часа после стимуляции. Экспериментальный протокол состоял из 1 часа записи спонтанной активности до и после низкочастотной стимуляции. Этот час разделялся на 20 минутные интервалы для анализа (рис. 13). Три записи до стимуляции были приняты в качестве контроля: контроль 1 (К1), контроль 2 (К2), (КЗ), три последовательные записи после контроль 3 стимуляции обозначались ПС1, ПС2, ПС3.

Контроль					После стимуляции			٨
	К1	К2	К3		ПC1		ПСЗ	
	20 мин	20 мин	20 мин		20 мин	20 мин	20 мин	
	Запись активности, 1 час НЧС Запись активности, 1 ч						ти, 1 час	
								V

Рисунок 13. Схема протокола низкочастотной стимуляции 12 электродов. Вверху – последовательность проведенного эксперимента. Внизу – матрица с электродами (красный электрод - стимулируемый). Красная молния – подача низкочастотной серии импульсов.

В исследовании влияния **высокочастотной** электрической стимуляции (ВЧС) на спонтанную активность нейронной использовались зрелые культуры диссоциированных клеток гиппокампа после трёх недель развития *in vitro*, n = 6 культур. Клетки культивировались на матрицах системы MEA120.

Протокол ВЧС был основан на известном ранее (Wagenaar, Pine, Potter, 2006b) и заключался в стимуляции через два канала с задержкой между каналами 10 мс и включала 150 серий из 20 стимулов с частотой 10 Гц и интервалом 6 с между сериями. Наш протокол отличался тем, что стимуляция через два канала подавалась на 8 электродов, по 4 электрода на Стимулирующие канал. электроды располагались В два ряда В противоположных частях одной половины культуры. Другая половина культуры не стимулировалась (рис. 14). Такое расположение должно было усилить эффект от стимуляции.

Как и для НЧС, экспериментальный протокол ВЧС состоял из 1 часа записи спонтанной активности до и после стимуляции. Этот час разделялся на 20 минутные интервалы для анализа (рис. 14). Три записи до стимуляции были приняты в качестве контроля: контроль 1 (К1), контроль 2 (К2), контроль 3 (КЗ), три последовательные записи после стимуляции обозначались ПС1, ПС2, ПС3.



Рисунок 14. Схема протокола высокочастотной стимуляции (ВЧС) культивируемой нейронной сети со случайной архитектурой связей. ВЧС стимуляция подаваласьчерез два канала с задержкой между каналами 10 мс и включала 150 серий из 20 стимулов с частотой 10 Гц и интервалом 6 с между сериями (Wagenaar, 2003) (характеристики стимулов см. раздел методы). Вверху – последовательность проведенного эксперимента. Внизу справа – схема микроэлектродной матрицы. Красная и синяя молнии – серии высокочастотных стимулов через два канала.

При анализе изменений биоэлектрической активности нейронной сети после НЧС и ВЧС оценивали следующие параметры: частота импульсов, частота пачек, длительность пачек, межпачечный интервал, число импульсов в пачке, число связей в 20 мин записях до стимуляции (КЗ) и после стимуляции (ПС1). Данные параметры часто используются для оценки

функционального состояния нейронных сетей *in vitro* (Ведунова и др., 2011; Vedunova et al., 2013; Мищенко и др., 2015).

Параметры: разница паттернов активации, разница паттернов коэффициент частот импульсов, изменения архитектуры связей, коэффициент коэффициент новых связей, исчезновения связей, коэффициент изменения силы стабильных связей вычислялись в результате оценки двух записей спонтанной активности (см. раздел «Анализ спонтанной пачечной активности В нейронной сети диссоциированных клеток гиппокампа», глава 2). данные параметры рассчитывались исходя из анализа активности сети в двух контрольных записях до стимуляции (К2 и К3) и второй контрольной записи и первой записи после стимуляции (К2 и ПС1). Выбранные параметры активности позволяли сравнивать спонтанные изменения активности сети и изменения, вызванные НЧС и ВЧС.

## 2.6.5 Оценка влияния высокочастотной стимуляции нейронной сети с направленной связью с задержкой 10 мс для двух субпопуляций

Электрофизиологические исследования на культурах с направленной связью проводились с использованием матриц MEA120. Электроды и изоляционный слой матриц MEA120 более прочный, чем MED64, позволяющий без повреждения откреплять силиконовый чип и использовать матрицы многократно.

Проведено две серии экспериментов: 1) оценка влияния высокочастотной стимуляции с 10 мс задержкой на показатели активности, вызванной тестовыми низкочастотными стимулами (5 культур) и 2) оценка влияния высокочастотной стимуляции с 10 мс задержкой на показатели спонтанной активности (9 культур).

Электрическая стимуляция состояла из двухфазных импульсов напряжения 800 мВ с длительностью 260 мкс на каждую фазу. Высокочастотная стимуляция была применена к двум наборам электродов - 4

"пресинаптические" электроды в камере А и 4 "постсинаптических" электродов в камере В. Протокол стимуляции был похож на разработанный ранее протокол для индукции пластичности в нейронных сетях со случайной архитектурой связей и состоял из 150 серий по 20 стимулов с 100 мс межстимульный интервалом и интервалом между сериями 6 сек (Jimbo, Tateno, Robinson, 1999a; Wagenaar, Pine, Potter, 2006b). Стимулы подавались через два различных канала с задержкой между каналами 10 мс. Первыми стимулировались электроды в камере А, затем в камере Б. Такая задержка соответствует потенциации синаптических связей возбуждающих нейронов гиппокампа по правилу STDP (Debanne, Gähwiler, Thompson, 1994; Bi, Poo, 1998; Shouval, Wang, Wittenberg, 2010).

Для оценки влияния высокочастотной стимуляции с 10 мс задержкой на показатели спонтанной активности непрерывно записывали сигналы биоэлектрической активности культур течение В часа ДО И после высокочастотной стимуляции. Часовая запись разделялась 20 минутные интервалы для анализа. Оценивали показатели распространения спонтанных сетевых пачек импульсов между связанными популяциями. Рассчитывали вероятность распространения сетевых пачек из камеры А в камеру Б, как процент спонтанных пачек в камере А, вызвавших пачку импульсов в камере Б. Для этого проводили процедуру детектирования спонтанных сетевых пачек камер. Считали, отдельно для двух ЧТО пачка импульсов распространяется из одной популяции в другую, если задержка между пачками в этих популяциях была меньше 500 мс.

Для оценки влияния высокочастотной стимуляции с 10 мс задержкой на показатели вызванной активности стимуляция включала контрольную серию низкочастотными стимулами для проверки сетевых ответов и высокочастотную стимуляцию, чтобы вызвать синаптическую пластичность. В контрольной стимуляции последовательно подавались серии стимулов через три различных электрода матрицы, расположенных в камере А. На каждый электрод подавалось по 60 стимулов с интервалом 5 секунд.

Стимулы, подаваемые через каждый из выбранных электродов в контрольной стимуляции, вызывали ответ сети в виде сетевой пачки импульсов. Для характеристики вызванных сетевых пачек мы использовали так называемые гистограммы сетевой активности после стимула (post stimulus time histogram, PSTH) (Marom, Shahaf, 2002; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008). В сетевых ответах от 10 до 400 мс после стимула в пределах каждого 20 мс интервала времени мы рассчитали общее число импульсов, детектированных каждом ИЗ электродов. Мы проанализировали на суммарные PSTH от электродов в микроканалах ((PSTHCh), в камере А (PSTHA) и камере В (PSTHB).

#### 2.7 Статистическая обработка экспериментальных данных

Полученные данные обрабатывались статистическими методами с MatLab. программного пакета Поскольку помощью количество экспериментальных данных в выборках было менее 30, использовали непараметрические критерии, позволяющие сравнивать малые выборки. наборами Различия между ДВУМЯ данных, оценивали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при значении р < 0,05

Большинство данных представлено в виде среднего значения  $\pm$  среднеквадратическое отклонение. Данные по влиянию низкочастотной стимуляции на активность диссоциированной культуры и влиянию стимуляции двух связанных клеточных популяций по правилу STDP на распространение сигнала между этими популяциями, приведены в виде медианы  $\pm$  25-й и 75-й процентиль.

#### ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

# 3.1 Влияние электрической стимуляции на функциональную сетевую активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа со случайной архитектурой связей 3.1.1 Влияние низкочастотной стимуляции на функциональную сетевую активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа

Отдельные короткие электрические стимулы (100-1000 мВ, 200-400 мкс) могут вызывать в культуре диссоциированных нервных клеток всплеск электрофизиологической активности в виде пачки импульсов, реверберирующей в сети (Maeda et al., 1998; Maeda, Robinson, Kawana, 1995). Ответ нервных клеток на электрический стимул часто используется для оценки их функционального состояния (Feber le, Stegenga, Rutten, 2010; Jimbo, Tateno, Robinson, 1999; Shahaf et al., 2008; Shahaf, Marom, 2001; Wagenaar et al., 2005; Wagenaar, Pine, Potter, 2006b).

Природа импульсов в ответе культивируемой нейронной сети на электрический стимул неоднородна. Подавление синаптической передачи возбуждающих нейронов гиппокампа с применением антагонистов глутаматных рецепторов АМРА и NMDA (CNQX, 10 мкМ и СРР, 10 мкМ, соответственно) и блокирование натриевых каналов тетродотоксином (TTX, 10 мкМ) выявило три принципиально отличающиеся стадии сетевого ответа на электрический стимул (рис. 15):

- Артефакт раздражения. Регистрировался в течение первых 2-3 мс после стимула;
- Вызванные распространяющиеся потенциалы действия, т.е. импульсы, которые распространяются в нейронной сети по отросткам нейронов и через электрические контакты. Регистрировался в течение интервала от 3 до 10 мс после стимула;

3. Вызванный синапс-зависимый ответ нейронной сети, т.е. импульсы, распространяющиеся через химические синапсы. Регистрировался в течение интервала от 10 до 50-500 мс после стимула. Таким образом, только на основе характеристик сетевого синапс-зависимого ответа можно судить о состоянии синаптических связей в культивируемой нейронной сети.



Рисунок 15. Гистограммы сетевой активности после стимула (PSTH, см. методы) до и после применения блокаторов передачи сигналов в химических синапсах. А. Ответ нейронной сети в стандартных условиях in vitro. Б. Ответ нейронной сети в условиях блокирования глутаматэргической синаптической передачи (CNQX и CPP, 10мкМ). В. Ответ нейронной сети в условиях

блокирования натриевых каналов (ТТХ, 10 мкМ).

В функциональных поисках критерия изменений оценки В культивируемой нейронной сети, используя вызванную стимулом синапсзависимую активность мы использовали параметр «вероятность вызова сетевого ответа». Было принято, что электрический стимул вызывает синапс-зависимый ответ нейронной сети, если в интервале от 10 до 50 мс после стимула регистрировалось более трёх ИМПУЛЬСОВ. Изменение параметра «вероятность вызова сетевого ответа» свидетельствует об изменениях синаптических связей в нейронной сети, поскольку, для того, чтобы сигнал, поданный на группу нервных клеток, вызвал синапсзависимый ответ нейронной сети, он должен пройти через химические синапсы с определенной синаптической задержкой.

Значение параметра «*вероятность вызова сетевого ответа*» зависело от участка сети, на который подавался входной сигнал. Ответы нейронной сети при стимуляции различных участков оценивались, используя протокол с переключением стимулирующих электродов в автоматическом режиме. Изменение параметра «*вероятность вызова сетевого ответа*» определялось как разница его значений в исходной и последующих сериях стимуляции отдельно для каждого стимулируемого участка сети.

Изменение параметра *«вероятность вызова сетевого ответа»* было равно нулю ±1% для 50% стимулируемых участков как в течение часа (рис. 16), так и в последующие 1-5 суток. То есть данный параметр был стабилен лишь в половине случаев даже на масштабе одного часа. В то же время изменения в течение последующих 1-5 дней были соразмерны с изменениями в течение часа.



Рисунок 16. Диаграмма распределения количества стимулируемых участков нейронной сети (%) в зависимости от изменения параметра *«вероятность вызова сетевого ответа»* при стимуляции этих участков через 1 час и через

1-5 дней. Снизу - увеличенные фрагменты диаграммы в верхней части

рисунка, n = 5 культур.

Таким образом, динамика изменений параметра «вероятность вызова сетевого ответа» при стимуляции различных участков нейронной сети указывала на наличие обратимых периодических спонтанных флуктуаций в функциональной организации нейронной сети, как на масштабе времени 1 часа, так и в течение 1-5 суток. Такие периодические спонтанные изменения функционального состояния нейронной сети приводили к наблюдаемой высокой вариабельности характеристик вызванной сетевой активности. Это препятствовало использованию вызванных сетевых ответов на низкочастотную стимуляцию для детектирования функциональных изменений (пластичности) в диссоциированных клетках мозга, длительно То культивируемых микроэлектродных матрицах. на есть нельзя параметр «вероятность использовать вызова сетевого ответа» на низкочастотные стимулы в качестве индикатора пластичности в нейронной сети со случайной архитектурой связей.

Протокол низкочастотной стимуляции (HYC) состоял ИЗ последовательности бифазных стимулов, по 30 стимулов на каждый из 12 выбранных электродов последовательно с межстимульным интервалом 5 с (характеристики стимулов CM. разделе «Материалы В И методы исследования»). До и после стимуляции регистрировали спонтанную активность сети. С целью оценки вызванных изменений и выбора достоверного критерия для оценки изменения функционального состояния нейронной сети после низкочастотной стимуляции, оценивали следующие спонтанной активности нейронной Частота характеристики сети: импульсов, Частота пачек, Длительность пачек, Межпачечный интервал, Число импульсов в пачке, Разница паттернов активации, Разница паттернов частоты импульсов, Характеристики кросскорреляции последовательностей импульсов: Число кросскорреляционных связей,
Коэффициент изменения архитектуры связей, Коэффициент новых связей, Коэффициент исчезновения связей, Коэффициент изменения силы стабильных связей (см. раздел «Материалы и методы исследования»). Эксперименты были проведены на семи культурах.

Было найдено, что после проведения низкочастотной стимуляции показатели сетевой активности Частота импульсов, Частота пачек, Длительность пачек, Межпачечный интервал, Число импульсов в пачке не изменялись (см. Приложение. Таблица 2). Затем мы сравнили спонтанные и вызванные низкочастотной стимуляцией изменения паттернов активации пачек и паттернов частоты импульсов. Было найдено, что Разница *паттернов активации* была больше после стимуляции (p<0.05). Другими словами, изменения паттерна активации пачек после стимуляции были больше, чем спонтанные изменения. В то же время Разница паттернов частоты импульсов не изменялась после низкочастотной стимуляции (рис. 17). Следовательно, рассмотренных частотно-временных среди характеристик сетевой активности только параметр «Разница патернов активации» мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений в нейронной сети.





и запись после стимуляции 1, К2-ПС1), n = 7 культур, \* - p<0.05, тест Манна-Уитни.

Далее мы оценили Характеристики кросс-корреляции последовательностей импульсов для разных участков нейронной сети (электродов матрицы). Было показано, что после проведения низкочастотной стимуляции Число связей не отличалось от значений до стимуляции (рис. 18 А). Следовательно, параметр «Число связей» не мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений в нейронной сети.



Рисунок 18. Сравнение характеристик кросс-корреляции последовательностей импульсов до и после низкочастотной стимуляции: Число связей (А), Коэффициент новых связей (Б), Коэффициент исчезновения связей (В), Коэффициент изменения архитектуры связей (Г). Сравнивали число кросскорреляционных связей найденных при анализе 20 минутной записи спонтанной активности перед стимуляцией (контроль3, К3) и 20 минутной записью после стимуляции (ПС1). Коэффициент новых связей, Коэффициент исчезновения связей и Коэффициент изменения архитектуры связей до и после стимуляции оценивали относительно второй контрольной записи спонтанной активности 20 мин. (К2), n = 7 культур, \* p<0.05, тест Манна-Уитни.

Было выявлено. что низкочастотная стимуляция приводила к изменению Коэффициента изменения архитектуры связей и Коэффициента исчезновения связей (p<0,05) (рис. 18). В то же время Коэффициент новых связей изменялся после низкочастотной стимуляции. После не низкочастотной стимуляции не наблюдалось изменений Коэффициента изменения силы стабильных связей. Следовательно, этот параметр не мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений в нейронной сети.

Таким образом, низкочастотная стимуляция вызывала изменение путей распространения импульсов в нейронной сети при активации сетевых пачек. В то же время низкочастотная стимуляция не изменяла частоту импульсов и частотно-временные характеристики сетевых пачек. Было выявлено, что при отсутствии изменений в числе связей между различными участками нейронной сети, архитектура связей в сети менялась. Одни связи могли появляться, а другие исчезать. Изменения архитектуры связей в большей степени были связаны с исчезновением связей после стимуляции.

## 3.1.2 Влияние высокочастотной стимуляции на функциональную сетевую активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа

Протокол высокочастотной стимуляции заключался в стимуляции через два канала по 4 электрода на канал и включал 150 серий из 20 стимулов, интервал между стимулами - 100 мс, между сериями 6 с, задержка между стимулами первого и второго каналов была равной 10 мс (см. раздел

«Материалы и методы исследования»). С целью оценки вызванных изменений и выбора достоверного критерия для оценки изменения функционального состояния нейронной сети после высокочастотной стимуляции, оценивали те же характеристики спонтанной активности нейронной сети, как и в эксперименте с низкочастотной стимуляцией.

Было выявлено, что 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 (Таблица 3 в приложении). В отличие от низкочастотной стимуляции *Разница паттернов активации* не изменялась. В то же время *Разница паттернов частоты импульсов* была больше после стимуляции (p<0.05). Другими словами, изменения *паттерна частоты импульсов* после стимуляции были больше, чем спонтанные изменения (рис. 19).



Рисунок 19. Сравнение параметров *Разница паттернов активации* (А) и *Разница паттернов частоты импульсов* (Б) до и после высокочастотной стимуляции. До стимуляции оценивали разницы паттернов активности для

двух контрольных записей спонтанной активности нейронной сети (контроль2 и 3, К2-К3) и контрольной записи и после стимуляции (контроль2 и запись после стимуляции 1, К2-ПС1), n = 6 культур, \* - p<0.05, тест Манна-Уитни.

После проведения высокочастотной стимуляции Число

кросскорреляционных связей не отличалось от значений до стимуляции (рис. 20). Было выявлено, что высокочастотная стимуляция приводила к изменению Коэффициента изменения архитектуры связей и Коэффициента новых связей (p<0,05) (рис. 20). В то же время Коэффициент исчезновения связей не изменялся после высокочастотной стимуляции. Как и после низкочастотной стимуляции после высокочастотной стимуляции не наблюдалось изменений Коэффициента изменения силы стабильных связей, этот параметр не мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений в нейронной сети.



Рисунок 20. Сравнение характеристик кросс-корреляции последовательностей импульсов до и после высокочастотной стимуляции: Число кросскорреляционных связей (А), Коэффициент новых связей (Б),

Коэффициент исчезновения связей (В), Коэффициент изменения архитектуры связей (Г). Сравнивали число кросскорреляционных связей найденных при анализе 20 минутной записи спонтанной активности перед стимуляцией (контроль3, К3) и 20 минутной записью после стимуляции (ПС1). Коэффициент новых связей, Коэффициент исчезновения связей и Коэффициент изменения архитектуры связей до и после стимуляции оценивали относительно второй контрольной записи спонтанной активности

20 мин. (К2), n = 6 культур, \* - p<0.05, тест Манна-Уитни.

Таким образом, высокочастотная стимуляция не вызывала изменение рассмотренных частотно-временных характеристик сетевой активности, кроме параметра «*Разница паттернов частоты импульсов*». Следовательно, этот параметр мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений в нейронной сети.

высокочастотной Было выявлено, ЧТО после стимуляции не наблюдалось изменений числа связей между различными участками нейронной сети, как и после низкочастотной стимуляции. Следовательно, параметр «Число кросскорреляционных связей» не мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений нейронной В сети. Низкочастотная высокочастотная стимуляции И вызывали изменения активности нейронной сети. Как и после низкочастотной стимуляции после высокочастотной стимуляции изменялась архитектура связей в сети. В отличие от низкочастотной стимуляции изменения архитектуры связей после высокочастотной стимуляции в большей степени были связаны с появлением новых связей после стимуляции. Существенные изменения «Коэффициента изменения архитектуры связей» как после низкочастотной, так и после высокочастотной стимуляции доказывали эффективность применения данного параметра как критерия оценки функциональных изменений в нейронной сети.

Тем не менее, в культуре со случайной архитектурой связей невозможно направленно воздействовать электрическими стимулами на определённые нейроны и отдельные связи. Вызванный стимуляцией эффект изменения архитектуры связей невозможно заранее прогнозировать. Это затрудняет использование данной экспериментальной модели для изучения

пластичности в нейронной сети.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статьях 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. — ТЗ, №1. — С. 57 – 64; 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; 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.

### 3.1.3 Обсуждение полученных результатов

Экспериментальные условия в исследованиях зависящей от активности пластичности в нейронной сети *in vitro* отличаются в различных научных группах протоколами стимуляции, используемыми типами клеток и способами оценки изменений работы нейронной сети после электрической стимуляции (Таблица 1 в приложении). Это затрудняет сравнение эффектов стимуляции и эффективности используемых параметров для оценки пластичности в нейронной сети. Поэтому мы оценивали изменения различных параметров активности нейронной сети после высокочастотной и низкочастотной стимуляции, используя одну экспериментальную модель – диссоциированные клетки гиппокампа мышей (Е18) после 3 недель развития *in vitro*.

Ответ нейронной сети на низкочастотные стимулы часто использовалась для оценки функционального состояния нейронной сети (Jimbo, Tateno, Robinson, 1999a; Maeda et al., 1998; Shahaf, Marom, 2001;

Wagenaar, Pine, Potter, 2006b; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010). Стабильность ответов анализировалась в течение длительной низкочастотной стимуляции. Установлено, что даже в течение 4-5 часов не наблюдалось значимых изменений (Marom, Shahaf, 2002; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010). Это согласуется с полученными нами результатами (Pimashkin et al., 2013). В то же время мы нашли, что показатель вероятность вызова сетевого ответа был вариабельным даже на масштабе времени 1 час (изменений не наблюдалось только для 50% стимулируемых участков). Поэтому показатели вызванных низкочастотными стимулами ответов сложно использовать для оценки изменений в нейронной сети. С высокой вариабельностью характеристик вызванных ответов могло быть связано отсутствие значимых изменений этих характеристик после низкочастотной стимуляции, показанное в предыдущих работах (Shahaf, Marom, 2001; Chiappalone, Massobrio, Martinoia, 2008). Поэтому для оценки изменений активности ΜЫ использовали характеристики спонтанной активности.

Мы частотно-временные характеристики спонтанной оценивали активности эффективные для оценки функционального состояния нейронной сети при различных воздействиях: добавлении химических факторов (блокаторы ионных каналов, специфические агонисты и антагонисты рецепторов), моделировании гипоксии, разрушении внеклеточного матрикса (Chiappalone et al., 2003; Ведунова и др., 2011; Vedunova et al., 2013). Частота Выбранные характеристики импульсов, Частота пачек, Длительность пачек, Межпачечный интервал, Число импульсов в пачке не изменялись после низкочастотной стимуляции и после высокочастотной стимуляции. Мы предполагаем, что воздействие использованных протоколов стимуляции было не достаточно сильное, чтобы вызвать изменение баланса возбуждения и торможения или для смещения гомеостатического уровня активности. Мы нашли, что низкочастотная стимуляция приводила к изменению паттерна активации спонтанных сетевых пачек импульсов. В

отличие от низкочастотной стимуляции высокочастотная стимуляция приводила к изменению *паттерна частоты импульсов*, то есть частоты импульсов в различных участках сети. Это согласуется с результатами, полученными группой Madhaven, выявившей изменение соотношения типов пачек, отличающихся по частоте и времени импульсов в различных участках сети, после высокочастотной стимуляции (Madhavan, Chao, Potter, 2008). Выявленные эффекты низкочастотной стимуляции и высокочастотной стимуляции лишь косвенно свидетельствуют об изменении функциональных связей в нейронной сети. Для оценки функциональных связей между участками сети применяли метод кросскорреляционного анализа.

В работе le Feber оценивался интегральный показатель изменения рассчитанный в нейронной сети, основе связанности на метода кросскорреляционного анализа – эвклидово расстояние между матрицами силы связей для всех пар регистрирующих электродов до и после стимуляции (Feber et al., 2015a). Было выявлено изменение этого показателя как после низкочастотной стимуляции, так и после высокочастотной стимуляции (Feber et al., 2015a). На основе метода кросскорреляционного анализа нами были разработаны следующие показатели измения нейросетевой активности: Коэффициент Коэффициент связей, исчезновения новых связей, Коэффициент изменения архитектуры связей, Коэффициент изменения силы стабильных связей, позволяющие более детально оценить изменение Коэффициент архитектуры связей. изменения архитектуры связей изменялся как после низкочастотной стимуляции, так И после высокочастотной стимуляции. В то же время Коэффициент изменения силы стабильных связей после стимуляции значимо не отличался от контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что, изменения вызванные электрической стимуляцией заключаются не столько в изменении силы связей, сколько в появлении одних и исчезновении других связей. Поэтому мы считаем, что параметр Коэффициент изменения архитектуры связей является чувствительным индикатором активность-зависимой пластичности в нейронной сети.

## 3.2 Индукция заданного уровня активности в нейронных сетях первичных культур гиппокампа при применении протокола стимуляции с обратной связью

# 3.2.1 Достижение заданной активности в нейронной сети *in vitro* при разном исходном уровне активности

Согласно одной из задач данной работы - изучить возможность достижения заданного уровня активности в нейронной сети первичных культур гиппокампа при применении протокола стимуляции с обратной связью, в котором временное отключение стимуляции используется в качестве подкрепления - был воспроизведён и улучшен ранее разработанный (Shahaf, Morom, 2001) метод индукции заданной активности в первичной культуре клеток коры головного мозга на основе применения низкочастотной стимуляции (1-0,3 Гц) с обратной связью. Прямая связь заключалась в способности нейронной сети реагировать на единичный электрический импульс, генерируя ответ в виде пачки биоэлектрических импульсов. Обратная связь заключалась в том, что подача стимулов зависела от ответа нейронной сети на эти стимулы, а именно от наличия импульса на определённом участке нейронной сети (электроде) в определённом интервале времени после стимула.

Протокол индукции заданного уровня активности заключался в том, что на культуру клеток непрерывно подавалась низкочастотная стимуляция и при достижении желаемого ответа в виде определённого числа импульсов в заданном временном интервале после стимула на заданном электроде, стимуляция отключалась на время (5 минут). Предполагалось, что временное отключение стимуляции (аналог безусловного подкрепления) может служить «положительным подкреплением» для достижения заданного уровня активности в нейронной сети. Затем цикл стимуляции до достижения

желаемого ответа повторялся. Нейронная сеть «обучалась» давать заранее заданные ответы на стимуляцию (электрические стимулы представляли некоторое подобие «индифферентных стимулов», или «условных стимулов») (Shahaf, Morom, 2001).

Изменение импульсной активности на выбранном участке сети в ответе на стимул другого участка сети свидетельствовало об изменении функциональной связи между этими участками. Возможность направленного воздействия функциональную данный на СВЯЗЬ делало подход привлекательным для использования в качестве экспериментальной модели индукции пластичности в нейронной сети со случайной архитектурой морфофункциональных связей, вызванной электрической стимуляцией.

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 индукции заданного уровня активности 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. Условием для прекращения стимуляции на 5 минут ("подкрепления") было достижение значения  $R/S_{Tr}$ , равное 0,2. В наших экспериментах было установлено, что  $38,2\pm8,4\%$  электродов в течение тестовой стимуляции (стимуляция с частотой 0,05 Гц пятью сериями по 10 минут с отключением стимуляции на 5 минут) имели  $0 < M(R/S) \le 0,1$  (n = 5 культур). Количество электродов с  $0 < M(R/S) \le 0,5$  было  $67,3\pm11,4\%$  от общего числа электродов матрицы (рис. 21А).

Для оценки эффективности достижения заданного уровня активности 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 достижение заданного уровня активности считалось успешным.



Рисунок 21. Показатель R/S. А. Распределение значений среднего отношения импульсов в ответе к количеству стимулов R/S (число вызванных импульсов в интервале 40-80 мс за каждые 10 стимулов, см. методы) по количеству

электродов в тестовой стимуляции (n = 5 культур, среднее ± среднеквадратичное отклонение); Б. Динамика значений R/S в ответах на стимулы для выбранного регистрирующего электрода в течение тестовой стимуляции. Синими пунктирными стрелками указаны моменты отключения стимуляции на 5 минут. В каждой новой серии стимуляции вычисление значения R/S начиналось заново (от нуля). Красной горизонтальной линией отмечено пороговое значение R/S<sub>Tr</sub>, которое вдальнейшем выбиралось для стимуляции с обратной связью; В. Пример распределения значений R/S в контрольной стимуляции для выбранного электрода для одной культуры. Красной вертикальной линией отмечено пороговое значение R/S<sub>Tr</sub>, которое значение R/S в контрольной стимуляции для выбранного электрода для одной культуры. Красной вертикальной линией отмечено пороговое значение R/S в контрольной стимуляции для выбранного электрода для одной культуры. Красной вертикальной линией отмечено пороговое значение R/S в контрольной стимуляции для выбранного электрода для одной культуры. Красной вертикальной линией отмечено пороговое значение R/S стимуляции с обратной связью; Г. Кривые динамики времени достижения порогового значения R/S связи для значений порога

R/S<sub>Tr</sub>, вычисленных как 5%, 10%, 15% и 20% максимальных значений R/S (n=14). Планками погрешностей обозначено стандартное отклонение.

На рисунке 21Б изображена динамика значений R/S в ответах на одном выбранном электроде в течение нескольких циклов тестовой стимуляции. Пунктирными стрелками указаны моменты отключения стимуляции на 5 минут, разделяющие циклы тестовой стимуляции. Количество импульсов, возникающих в ответ на стимул, обладает некоторой вариабельностью, в результате чего иногда регистрируются относительно высокие значения R/S. В ходе исследования было показано, что пороговое значение R/Str может быть автоматически установлено для выбранного электрода в зависимости от наблюдаемой активности В контрольной стимуляции. Распределение значений ответов для выбранного электрода изображено на рисунке 21В. Установлено, что наиболее эффективно заданный уровень активности достигался при использовании порога для отключения стимуляции, соответствующего высоким значениям R/S (с вероятностью повторения 10%) (рис. 21В). Для индукции заданной активности с помощью стимуляции с обратной связью выбирался электрод, для которого 0<M(R/S)≤0,6 в контрольной стимуляции стандартное И отклонение  $0,1M(R/S) \le \sigma(R/S) \le 2M(R/S)$ .

Протокол индукции заданного уровня активности 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 T<sub>R/S</sub> выбиралось как граница 20%, 15%, 10% и 5% наибольших значений R/S на выбранном электроде, которые наблюдались в контрольной стимуляции (рис. 21Г).

Низкий порог проще достигался в результате спонтанных флуктуаций числа импульсов в ответе на стимул, поэтому при низком значении порога время его достижения было меньше (рис. 21Г). Таким образом, изменение значения порога качественно изменяет динамику адаптации. Эффект уменьшения времени достижения порога ( $T_{R/S}$ , см. методы) наблюдался 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). Таким образом, эффективность протокола была такая же, как и в прежних исследованиях (Shahaf, Marom, 2001; Marom, Shahaf, 2002; Marom, Eytan, 2005; Stegenga et al., 2009; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010). График динамики времени стимуляции, требуемого для достижения заданного ответа, для успешных экспериментов изображён на рисунке 22.



Рисунок 22. Динамика времени стимуляции, требуемого для достижения заданного ответа (T<sub>R/S</sub>, см. методы) при стимуляции с обратной связью. А. Кривая динамики времени стимуляции, требуемого для достижения заданного ответа, усреднённая по шести экспериментам с успешным достижением заданного уровня активности; Б. Пример кривой динамики времени стимуляции, требуемого для достижения заданного ответа, полученной в одном из успешных экспериментов и отсутствие достижения заданного уровня активности.

Следует отметить, что адаптивный результат успешно достигался лишь при использовании в модели индуции заданного уровня активности участков нейронной сети с относительно низкой исходной активностью, среднее значение R/S не более 0,5. При выборе более активных участков нейронной сети уменьшение времени достижения порога не наблюдалось в данных условиях стимуляции с обратной связью (рис. 23), что может быть связано с особенностями пластичности на уровне нейронных сетей, а также с особенностями выбранной экспериментальной модели.

Далее мы исследовали, изменяются ли особенности вызванных сетевых ответов, регистрируемых в различных участках нейронной сети при достижении заданного ответа на выбранном электроде. Мы оценили изменения количества импульсов в ответе на стимул.



Рисунок 23. 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. Желаемый результат наблюдался при использовании 10% значений R/S для вычисления порога для прекращения стимуляции в 6 экспериментах из 13 и из 24 экспериментов с разными способами вычисления порога.

На рисунке 24А проиллюстрировано увеличение числа импульсов на выбранном для индукции заданного уровня активности электроде (участке нейронной сети) в ответе на низкочастотные стимулы. В то же время увеличение числа импульсов наблюдалось в ответах на стимулы, регистрируемых на всех электродах матрицы (рис. 24 Б).

Таким образом, при успешном достижении заданного ответа увеличивалась активность всей нейронной сети со случайной архитектурой морфофункциональных связей.



Рисунок 24. Количество вызванных импульсов в интервале 40-80 мс после стимула, регистрируемых на выбранном электроде для обратной связи (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. Сравнивались 6 экспериментов, в которых наблюдался эффект уменьшения времени вызова заданного ответа. \* - p<0.05, тест

Манна-Уитни (Среднее ± Среднеквадратическое отклонение).

Несмотря на воспроизводимость феномена достижения заданного уровня активности на основе стимуляции с обратной связью нейронных сетей первичной культуры гиппокампа в результате работы были выявлены следующие проблемы:

- (1) эксперименты по индукции заданного уровня активности *in vitro* требовали длительной проверки стабильности вызванного стимулом ответа сетевой активности;
- (2) достижение заданного уровня активности происходило лишь в 50% случаев;
- (3) Заданного уровня активности успешно достигали лишь участки нейронной сети с относительно низкой исходной активностью, которая была более стабильной. Для таких участков время достижения заданного порога становилось очень чувствительным индикатором ответа на стимул (разница в один биоэлектрический импульс в нейронной активности отражался в двукратном различии оцениваемого индикатора этой активности);
- (4) Поскольку выбирались участки со стабильными ответами в контроле из большого количества нестабильных участков, трудно было судить, являлись ли изменения спонтанными или вызванными стимуляцией с обратной связью.
- (5) Вызванный электрической стимуляцией эффект изменения импульсной активности наблюдался на всей сети, а не только на выбранном участке сети.

Все эти выявленные недостатки протокола индукции заданного уровня активности не позволяли использовать данный протокол в качестве надёжной экспериментальной модели изучения вызванной стимуляцией пластичности в нейронной сети со случайной архитектурой связей *in vitro*.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статьях: 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; 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.

### 3.2.2 Обсуждение полученных результатов

По сравнению с предыдущими исследованиями (Shahaf, Marom, 2001; Marom, Shahaf, 2002; Li et al., 2007; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010) в разработанном нами подходе было возможно использовать для достижения заданного уровня активности электроды (участки сети) с относительно высоким исходным уровнем активности (в ответах на стимулы в течение тестовой стимуляции), среднее значение R/S до 0,5. Общее число таких электродов было достаточно большим 67±11%.

Таким образом, при применении разработанного нами подхода вычисления порогового значения R/S протокол индукции заданного уровня активности мог применяться для большинства электродов. В 50% экспериментов наблюдалось успешное достижение заданного уровня активности, что сопоставимо с предыдущими исследованиями (Shahaf, Marom, 2001; Marom, Shahaf, 2002; Li et al., 2007; Feber le, Stegenga, Rutten, 2010).

Однако было выявлено, что вызванный электрической стимуляцией эффект изменения импульсной активности наблюдался на всей сети, а не выбранном участке сети. Нейронная сеть со случайной только на морфофункциональных связей демонстрировала архитектурой низкую эффективность протокола (50%), зависимость 0T исходного уровня необходимость предварительного отбора активности, участков сети (электродов) co стабильными показателями выбранного показателя активности (R/S), что затрудняло использование протокола стимуляции с обратной связью для изучения пластичности в нейронной сети.

## 3.3 Разработка метода изучения пластичности в сети культивируемых нервных клеток с направленной морфофункциональной связью между двумя подсетями

В культурах со случайной архитектурой воздействие электрической стимуляции (низкочастотной и высокочастотной) приводило к изменениям функциональных связей в нейронной сети, выявленных с помощью кросскорреляционного анализа последовательностей импульсов спонтанной активности. Стимуляция могла вызывать как появление новых, так и исчезновение старых связей. При этом не возможно было заранее знать какие нейронной подвергались воздействию СВЯЗИ В сети стимуляции, следовательно не возможно было прогнозировать изменения связей в сети. Для изучения пластичности на сетевом необходима уровне экспериментальная модель, позволяющая направленно воздействовать на определённую функциональную связь в нейронной сети. Направленное воздействие стимуляции с обратной связью, разработанное группой Morom, характеризовалось низкой эффективностью (около 50%). Кроме того, в нашей работе было установлено, что эффективность данного протокола зависела от исходного уровня активности и вызванные изменения не были селективными, то есть изменения происходили во всей сети. Поэтому следующим шагом исследования бала разработка экспериментальной модели для изучения пластичности на сетевом уровне, с помощью создания культуры нервных клеток с заданной архитектурой связей.

## 3.3.1 Моделирование направленной морфофункциональной связи между двумя подсетями первичной культуры гиппокампа

Для моделирования направленной морфофункциональной связи между двумя подсетями диссоциированных клеток мозга в первичной культуре использовали микрофлюидный чип с каналами определенной геометрии. Треугольная форма микроканалов способствовала росту аксонов из

популяции клеток в камере источнике (Камера А) в популяцию клеток в камере приёмнике (Камера Б) и препятствовала росту аксонов в противоположном направлении (см. методы).

Морфологическая связь между двумя подсетями 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 - β3-тубулина и Тау специфическими антителами на 6 DIV (рис. 25).



Рисунок 25. Флуоресцентные изображения двух нейронных субкультур,
 соединенных друг с другом с помощью микроканалов микрофлюидного биочипа. Нейроны и их аксоны в микроканалах визуализированы
 маркированием β3-тубулина (зеленый) и тау (красный) специфическими антителами, соответственно. Масштаб 100 мкм.

Положительное окрашивание аксонов наблюдалось на протяжении всего микроканала. Результаты показали, что аксоны формировали морфологическую связь между двумя субпопуляциями культивируемых нервных клеток. Таким образом, был разработан метод культивирования двух подсетей нервных клеток, соединённых аксонами в микроканалах.

Функционально связанными считали две популяции нервных клеток, в которых функциональная активность в виде сетевых пачечек импульсов

распространялась от одной популяции к другой. Для оценки направления распространения сетевой активности по заданной связи рассчитывали *вероятность распространения* сетевых пачек из камеры А в камеру Б (ВР<sub>АБ</sub>) и наоборот, из камеры Б в камеру А (ВР<sub>БА</sub>) (см. методы).

На рисунке 26 А изображён пример растра спонтанной сетевой пачки импульсов, возникшей в нейронной сети в камере А, распространившейся в микроканалы и вызвавшей пачку импульсов в камере Б. На рисунке 26 Б приведён профиль сетевых пачек импульсов спонтанной активности для той же культуры усреднённый по всем пачкам в записи длительностью 10 минут. Интересно отметить, что увеличение частоты импульсов в микроканалах наблюдается почти одновременно с увеличением частоты импульсов в камере А, в то время как в камере Б пачка импульсов возникает с задержкой до нескольких десятков мс. В зрелых культурах (на 20 DIV) спонтанные пачки импульсов распространялись преимущественно в одном направлении из камеры А в камеру Б (рис. 26 В). В направлении из камеры Б в А распространялось в среднем менее 20% сетевых пачек импульсов спонтанной активности.



Рисунок 26. Распространение пачки импульсов спонтанной активности по направленной связи от популяции источника в популяцию приёмник. А.

Растровая диаграмма спонтанной электрической активности нейронной сети.
Б. профиль возникновения спонтанной пачки последовательно от популяции клеток в камере источнике (камера А) (синяя линия), через аксон (красная линия) к популяции в камере приёмнике (камера В) (зелёная линия). В.
Вероятность распространения спонтанных сетевых пачек из камеры А в камеру Б (ВР<sub>АБ</sub>) и. Вероятность распространения спонтанных сетевых пачек из камеры Б в камеру А (ВР<sub>БА</sub>) (см. методы) для культур 20 DIV, р = 0,0008 тест Манна-Уитни, n = 9 культур (Среднее ± Среднеквадратическое отклонение).

Кроме того, оценивали показатель Вероятность распространения сетевых пачек импульсов из популяции нейронов в камере А в популяцию нейронов в камере Б ( $BP_{A5}$ ), вызванных в ответ на электрический стимул через электрод в камере А и Вероятность распространения сетевых пачек импульсов из популяции нейронов в камере Б в популяцию нейронов в камере А ( $BP_{5A}$ ), вызванных в ответ на электрический стимул через электрод в камере Б (см. раздел методы). Стимуляция электрода в камере А могла вызывать сетевую пачку импульсов в популяции нейронов только в камере А и в двух камерах А и Б. При этом пачки импульсов в популяции нейронов в камере Б вызывались с задержкой 50-100 мс после стимула. Стимул, поданный через электрод в камере Б, как правило, вызывал пачки импульсов лишь в популяции нейронов в камере Б (рис. 27). В зрелой культуре (20 DIV) для вызванных короткими низкочастотными стимулами сетевых пачек импульсов BP<sub>A5</sub> была больше, чем BP<sub>5A</sub>. В среднем BP<sub>A5</sub> была около 28%, BP<sub>5A</sub>– около 10%.

Таким образом, по аксонам в микроканалах треугольной формы высотой 7 мкм и размером узкого места 7 мкм (см. методы) сетевые пачки импульсов, как спонтанной активности, так и вызванные стимулом, распространялись преимущественно в одном направлении от подсети в камере А к подсети в камере Б.



Рисунок 27. Ответ на низкочастотную электрическую стимуляцию в нейронной сети с направленной связью. (А) Растровая диаграмма импульсной активности нейронной сети вызванной стимулом через электрод в камере А (слева) и через электрод в камере Б (справа). Каждой чёрной точке соответствует один зарегистрированный импульс. (Б) Усреднённый профиль частоты импульсов (см. методы) вызванной сетевой пачки от популяции клеток в камере источнике (камера А) (синяя линия), аксонов (красная линия) и популяции в камере приёмнике (камера Б) (зелёная линия) при стимуляции электрода в камере А. В. *Вероятность распространения* сетевых пачек импульсов из популяции нейронов в камере А в популяцию нейронов в камере Б (ВР<sub>АБ</sub>), вызванных в ответ на электрический стимул через электрод в камере А и *Вероятность распространения* сетевых пачек

импульсов из популяции нейронов в камере Б в популяцию нейронов в камере А (ВР<sub>БА</sub>), вызванных в ответ на электрический стимул через электрод в камере Б (см. методы) для культур 20 DIV, р =0,002 тест Манна-Уитни, n =

6 культур (Среднее ± Среднеквадратическое отклонение).

# 3.3.2 Разработка способа индукции пластичности в нейронной сети с направленной архитектурой морфофункциональных связей

Разработана новая экспериментальная модель активность зависимой пластичности в нейронной сети *in vitro*, основанную на электрической стимуляции двух клеточных популяций, связанных направленной связью. Направленная связь создаётся искусственно и служит мишенью для воздействия электрических стимулов.

Разработанная модель отличатается от прежних подходов (Jimbo, Robinson, Kawana, 1998; Jimbo, Tateno, Robinson, 1999b; Wagenaar, Pine, Potter, 2006b) тем, что электрический стимул подаётся через электроды на нервные клетки и направляется по аксонам в микроканалах от одной популяции клеток (от популяции-источника) в другую (в популяцию-приёмник), при этом, стимулируются пространственные области нейронной сети, в корорых находятся пре- и пост- синаптические нейроны для заданной направленной связи.

Реализация этой модели требует изготовления силиконового чипа с камерами для тел клеток, соединённых микроканалами для аксонов. Чип должень быть совмещён с микроэлектродной матрицей и выровнен так, чтобы микроэлектроды располагались вдоль микроканалов, в то же время, часть электродов должна располагаться в камерах чипа в непосредственной близости к выходам микроканалов.

Индукция пластичности осуществляется в зрелой культуре нервных клеток после трёх недель развития. Для стимуляции применяются единичных импульсы, вызывающие ответ нейронной сети в виде сетевой пачки импульсов.

Стимуляция осуществляется через два отдельных канала. Для первого стимулирующего канала выбираются электроды, расположенные в камереисточнике близко к микроканалам или непосредственнов микроканалах (стимуляция пресинаптических нейронов для заданной связи). Электроды для второго канала стимуляции должны находиться в непосредственной близости к местам выходов тех же микроканалов в камеру-приёмник, в соответствии с расположением электродов, выбранных для первого канала стимуляции (стимуляция постсинаптических нейронов для заданной связи).

Стимулы со второго канала следуют с задержкой соответствующей правилу STDP для используемого типа нервных клеток. Для потенциации синаптических связей между возбуждающими нейронами гиппокампа используется задержка 10 мс первые пресинаптические нейроны (камераисточник). Большинство клеток в культурах гиппокампа возбуждаюшие (около 80-90%), тогда как тормозных нейронов около 10-20% (Yamada et al., 2002; Chen, Dzakpasu, 2010). Такое же соотношение наблюдалось и в нашей лаборатории. Поэтому для гиппокампальных культур применяли правило STDP для возбуждающих клеток гиппокампа (задержка 10 мс).

Применявшийся протокол высокочастотной стимуляции (ВЧС) через два канала включал 150 серий по 20 стимулов с частотой 10 Гц с интервалом 6 секунд между сериями (Wagenaar, 2003) (рис. 28). Первому каналу стимуляции соответствовали электроды популяции-источнике В нейроны связи), (пресинаптические заданной второму для каналу стимуляции соответствовали электроды В популяции-приёмнике нейроны). Предполагалось (постсинаптические вызвать потенциацию синаптической связи по правилу STDP в нейронной сети. Схема протокола показана на рисунке 28 А.



Рисунок 28. Схема эксперимента с применением протокола высокочастотной стимуляции (ВЧС) через два канала с задержкой 10 мс, включающего 150 серий по 20 стимулов с частотой 10 Гц с интервалом 6 с между сериями (Wagenaar, 2003). А. Вверху – последовательность проведенного эксперимента. К1, 2, 3, - контрольные записи, ПС1, 2, 3 – записи после стимуляции. Характеристики стимулов см. раздел методы. Внизу справа – схема микроэлектродной матрицы с микрофлюидным чипом. Красная и синяя молнии – серии высокочастотных стимулов через два канала. Б. Схема эксперимента по исследованию влияния высокочастотной стимуляции через два канала с задержкой 10 мс с использованием тестовых низкочастотных серий стимуляции (НЧС) по 60 стимулов с имтерввалом 3 с.

В первой серии экспериментов для оценки функционального состояния связи между двумя популыциями нервных клеток использовали параметр

*вероятность распространения* сетевых пачек импульсов спонтанной активности. Регистрация спонтанной активности проводилась в течение часа до и после ВЧС. Часовая запись разделялась на интервалы по 20 минут. Второй 20 минутный интервал использовался в качестве контроля для сравнения изменений до и после ВЧС.

Также были проведены эксперименты, в которых для оценки функционального состояния связи между двумя популяциями нервных использовали параметр вероятность распространения клеток пачек низкочастотными стимулами. Низкочастотная импульсов, вызванных стимуляция (НЧС) включала последовательности из 60 стимулов с интервалом 3 секунды на каждый из трёх выбранных электродов в камереисточнике. Протокол эксперимента включал две тестовых серии НЧС до ВЧС и одну серию НЧС после ВЧС (рис. 28 Б). Для НЧС выбирались электроды, стимуляция которых вызывала сетевую пачку импульсов в камере-источнике.

# 3.3.3 Вызванная стимулом пластичность направленной связи между популяциями нейронов *in vitro*

Для того чтобы оценить функциональное состояние заданной связи между двумя подсетями нервных клеток, анализировали особенности распространения спонтанно генерируемых импульсных пачек между двумя подсетями. Рассчитывали *вероятность распространения* спонтанных пачек импульсов из популяции клеток в камере А а популяцию клеток в камере Б и наоборот (ВР<sub>АБ</sub> и ВР<sub>БА</sub>, см. методы). Предполагали, что *вероятность распространения* спонтанных сетевых пачек из одной популяции в другую свидетельствует о силе этой связи.

Значения  $BP_{Ab}$  и  $BP_{bA}$  были стабильны в течение часа регистрации спонтанной активности.  $BP_{Ab}$  и  $BP_{bA}$  не изменялись и после примения протокола высокочастотной стимуляции культур клеток гиппокампа в камерах A и Б с задержкой равной 10 мс (рис. 29).



Рисунок 29. *Вероятность распространения* спонтанных сетевых пачек импульсов из популяции клеток гиппокампа в камере A а популяцию клеток в камере Б по заданной связи и наоборот (ВР<sub>АБ</sub> и ВР<sub>БА</sub> см. методы). А. ВР<sub>АБ</sub> для 6 культур (отмечены цветом). Пунктирными линиями отмечен период высокочастотной стимуляции, чёрной линией показано среднее значение. Б. ВР<sub>БА</sub> для тех же 6 культур (отмечены цветом). В и Г. Медианы ± 25-й и 75-й процентиль для данных, представленных на рисунках A и Б соответственно.

Следующим этапом работы была оценка эффекта высокочастотной стимуляции на *вероятность распространения* импульсных пачек из популяции клеток в камере A а популяцию клеток в камере Б, возникающих в ответ на низкочастотные электрические стимулы, применяемые через один из электродов к камере A.

Количество биоэлектрических импульсов, зарегистрированных от 5 до 600 мс после стимула через электрод в камере А, было рассчитано отдельно для камер А и Б. *Вероятность распространения* сетевых пачек из камеры А в камеру Б, вызванных стимулами через электрод в камере А (ВР<sub>АБ</sub>) оценивали как процент пачек импульсов, вызванных в камере источнике, и вызвавших пачку импульсов в камере приёмнике, от общего количества вызванных стимулом пачек в камере источнике (см. методы). Предполагали,

что этот показатель характеризует прочность пути, по которому распространяется сигнал от «пресинаптической» к «постсинаптической» популяции культивируемых нервных клеток.

Значения  $BP_{AE}$  для вызванных сетевых пачек рассчитывались отдельно для каждого стимулирующего электрода. Мы исключали из анализа данные, если низкочастотные стимулы через отдельный электрод не вызывали ответа сети в камере A в виде пачки импульсов или ответ был не стабильным. Для оценки стабильности показателя  $BP_{AE}$  для вызванных сетевых пачек расчитывали спонтанные флуктуации  $BP_{AE}$  как разницу этого показателя для второй и первой контрольной серии стимулов ( $BP_{AE}$  (контороль 2) -  $BP_{AE}$ (контроль 1)). Индуцированное изменение  $BP_{AE}$  расчитывали как разницу этого показателя после высокочастотной стимуляции и до высокочастотной стимуляции ( $BP_{AE}$  (после стимуляции) -  $BP_{AE}$  (контроль 2)).

Увеличение значений показателя  $BP_{Ab}$  для вызванных сетевых пачек было зарегистрировано на 1 из 5 культур, что свидетельствовало о потенциации заданной связи между двумя подсетями (рис. 30). В 3 из 5 культур значения показателя  $BP_{Ab}$  уменьшались, что свидетельствовало о депрессии связи между двумя подсетями. В другой культуре (1 из 5) изменения показателя  $BP_{Ab}$  после высокочастотной стимуляции были соизмеримы со спонтанными флуктуациями.



ВРаб (контороль 2) - ВРаб (контроль 1)

Рисунок 30. Сравнение спонтанных флуктуаций (ВР<sub>АБ</sub> (контороль 2) -ВР<sub>АБ</sub> (контроль 1)) и вызванных изменений (ВР<sub>АБ</sub> (после стимуляции) - ВР<sub>АБ</sub> (контроль 2)) показателя *вероятность распространения (*ВР<sub>АБ</sub>.) для вызванных низкочастотными стимулами сетевых пачек (см. методы). Линии красного цвета соответствуют координаты, при которых спонтанные флуктуации равны вызванным изменениям. Каждая точка синего цвета соотностися со значениями для одного электрода, через который подавались низкочастотные стимулы, инициирущие ответ нейронной сети. (n = 5 культур, 11 электродов).

В эксперименте, в котором наблюдалось потенцирование связи между двумя популяциями клеток, значения показателя  $BP_{AE}$  для вызванных низкочастотными стимулами сетевых пачек в контрольных стимулирующих сериях были равны 90,2% и 83,7%, тогда как после высокочастотной стимуляции  $BP_{AE}$  увеличилось до 96,7%. То есть, спонтанные флуктуации составили 7,3% ( $BP_{AE}$  (контороль 2) -  $BP_{AE}$  (контроль 1)). Вызванные изменения составили 15,5% ( $BP_{AE}$  (после стимуляции) -  $BP_{AE}$  (контроль 2)).

Профили частоты импульсов в ответах на низкочастотные стимулы для этого примера приведены на рис 31.



Рисунок 31. Профили частоты импуьсов после стимула (PSTH, см. методы), зарегистрированных электродами в камере А (синий) и в камере Б (зеленый). А. Профили ответов на низкочастотные стимулы в перной контрольной стимулирующей серии (Контроль 1). Б. Профили ответов на стимулы серии Контроль 2. В. Профили ответов на низкочастотные стимулы после высокочастотной стимуляции. ВРАБ - вероятность распространения вызванных низкочастотными стимулами сетевых пачек из камеры А в камеру Б (см. методы). Здесь наблюдалось потенцирование связи между двумя после высокочастотной стимуляции, подсетями ЧТО ожидалось В соответствии с потенцированием при STDP (Bi, Poo, 1998).

В эксперименте, в котором наблюдалась депрессия связи между двумя популяциями клеток, значения показателя  $BP_{AE}$  для вызванных низкочастотными стимулами сетевых пачек в контрольных стимулирующих сериях были равны 47,37% и 49,21%, тогда как после высокочастотной стимуляции  $BP_{AE}$  уменьшалось до 29,51%. То есть, спонтанные флуктуации составили 3,9% ( $BP_{AE}$  (контороль 2) -  $BP_{AE}$  (контроль 1)). Вызванные изменения составили 40,0% ( $BP_{AE}$  (после стимуляции) -  $BP_{AE}$  (контроль 2)). Профили частоты импульсов в ответах на низкочастотные стимулы для этого примера приведены на рис 32.



Рисунок 32. Пример депрессии связи между двумя подсетями после высокочастотной стимуляции. А. Профили частоты импуьсов после стимула (PSTH, см. методы), зарегистрированных электродами в камере А (синий) и в камере Б (зеленый) в перной контрольной стимулирующей серии (Контроль 1). Б. Профили ответов на стимулы серии Контроль 2. В. Профили ответов на низкочастотные стимулы после высокочастотной стимуляции. ВР<sub>АБ</sub> *вероятность распространения* вызванных низкочастотными стимулами сетевых пачек из камеры А в камеру Б (см. методы).

Таким образом, после воздействия высокочастотной стимуляции двух популяций культактреумых клеток гиппокампа через два входа с 10 мс задержкой первая популяция источник (камера А) изменялся показатель ВР<sub>АБ</sub> для вызванных низкочастотными стимулами сетевых пачек, в отличие от показателя ВР<sub>АБ</sub> для импульсных сетевых пачек спонтанной активности. Изменения вероятности распространения сигнала между двуми связанными популяциями нервных клеток были разнонаправленными. Несмотря на разнонаправленность вызванных эффектов, результаты свидетельствуют об эффективности применения разработанной экспериментальной модели для индукции функциональных изменений в культивируемой нейронной сети.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статьях: 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; 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. — Р. 1–6; 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. — Р. 1–6; 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.

#### 3.3.4 Обсуждение полученных результатов

В данной работе мы предложили новую экспериментальную модель *in* vitro для изучения синаптической пластичности на уровне нейронной сети. Разработанная модель представляет собой нейронную сеть, культивируемую внутри камер силиконового микрофлюидного чипа, совмещённого с микроэлектродной матрицей. В чипе имеется две камеры для тел клеток и микроканалы между камерами, в которые прорастают аксоны. За счёт специального дизайна микроканалов достигается преимущественный рост аксонов в одном направлении, что позволяет контролировать формирование синаптических связей между двумя популяциями культивируемых нервных выделенной однонаправленной клеток. При наличии связи можно приблизительно определить области, где находятся пресинаптические и постсинаптические нейроны для этой связи. В данной работе мы впервые представили метод изучения синаптической пластичности в нейронной сети с архитектурой заданной гетерогенной связей, В которой известно приблизительное пространисвенное расположение пре и постсинаптических

нейронов. В культурах клеток гиппокампа применялся протокол высокочастотной стимуляции через два входа с задержкой 10 мс через несколько электродов в камере А и в камере Б, расположенных в области пре и постсинаптических нейронов соответственно. Стимуляция пре- затем 10 постсинаптических нейронов с задержкой мс соответствовала потенциации синаптических связей, согласно протоколу STDP ДЛЯ возбуждающих нейронов гиппокампа (Debanne, Gähwiler, Thompson, 1994; Bi, Poo, 1998).

Показатель распространения вызванных стимулом сетевых пачек импульсов изменялся после высокочастотной стимуляции через два входа с задержкой 10 мс. В одной из пяти культур стимуляция вызывала увеличение вероятности распространения вызванной низкочастотными стимулами пачки импульсов, этот эффект ассоциировался с потенциацией заданной связи. В других трёх культурах наблюдалась депрессия связи. Поскольку первой стимулировалась популяция с пресинаптическими нейронами для связи между популяциями, то согласно STDP предполагалась потенциоция связи и, следовательно, увеличения вероятности распространения биохлектрической активности между двумя связанными подсетями. Случаи, в которых наблюдался эффект уменьшения вероятности распространения сетевых пачек импульсов между двумя популяциями, можно объяснить тем, что часть нейронов в культуре клеток гиппокампа тормозные (около 10-20%). Применение STDP проткола стимуляции с задержкой ±10 мс приводит к потенциации связей тормозных нейронов, что увеличивает тормозный эффект в нейронной сети (Woodin, Ganguly, Poo, 2003). Кроме того, продолжительная (20 мин) высокочастотная стимуляция предположительно могла привести к истощению медиаторов или гомеостатическим изменениям.

Несмотря на разнонаправленный эффект (потенциации и депрессии), полученные экспериментальные данные свидетельствуют об эффективности применения предложенной экспериментальной модели для индукции функциональных изменений в определённой связи в нейронной сети *in vitro*. Предложенный метод позволяет контролировать морфологические особенности нейронной сети и применять стимуляцию для индукции STDP. В результате будущих исследований на основе разработанного способа индукции функциональных изменений в нейронной сети *in vitro* могут изучаться механизмы пластичности в нейронной сети и разрабатываться способы направленного уиления и ослабления сетевых связей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вероятность вызова сетевого ответа на низкочастотную стимуляцию для разных участков нейронной сети довольно стабильна, её изменения в течение 5 дней соразмерны изменениям в течение часа. Динамика вызванной активности нейронных сетей при стимуляции различных входов указывала наличие периодических обратимых спонтанных флуктуаций на В функциональной организации нейронной сети, как в течение часа, так и при более длительном периоде наблюдения. Такие периодические спонтанные изменения функционального состояния нейронной сети приводили к наблюдаемой высокой вариабельности характеристик вызванной сетевой активности. Это препятствовало использованию вызванных сетевых ответов на низкочастотную стимуляцию для детектирования функциональных изменений (пластичности) в диссоциированных клетках мозга, длительно культивируемых на микроэлектродных матрицах. Т.е. нельзя использовать вероятность вызова сетевого ответа нейронной сети на низкочастотные стимулы в качестве индикатора пластичности в нейронной сети со случайно сформированной архитектурой связей.

Низкочастотная стимуляция путей вызывала изменение распространения импульсов в нейронной сети при активации сетевых пачек. В то же время низкочастотная стимуляция не изменяла частоту импульсов и частотно-временные характеристики сетевых пачек, такие как Частота пачек, Длительность пачек, Межпачечный интервал, Число импульсов в Следовательно, рассмотренных пачке. среди частотно-временных характеристик сетевой активности только параметр «Разница паттернов активации» мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений в нейронной сети. Высокочастотная стимуляция не вызывала рассмотренных частотно-временных характеристик сетевой изменение активности, кроме параметра «Разница паттернов частоты импульсов». Следовательно, этот параметр мог быть рассмотрен как критерий оценки
функциональных изменений в нейронной сети. После высокочастотной стимуляции и после низкочастотной стимуляции не наблюдалось изменений числа связей между активностью различных участков нейронной сети. Следовательно, параметр «Число связей» не мог быть рассмотрен как критерий оценки функциональных изменений В нейронной сети. Низкочастотная И высокочастотная стимуляции вызывали изменения активности нейронной сети. Как и после низкочастотной стимуляции после высокочастотной стимуляции изменялась архитектура связей в сети. После низкочастотной стимуляции изменения архитектуры связей в большей степени были связаны с исчезновением связей после стимуляции. В отличие ОТ низкочастотной стимуляции изменения архитектуры связей после высокочастотной стимуляции в большей степени были связаны с появлением новых связей после стимуляции. Существенные изменения «Коэффициента изменения архитектуры связей» как после низкочастотной, так и после высокочастотной стимуляции доказывали эффективность применения данного параметра как критерия оценки функциональных изменений в нейронной сети.

В культуре случайной архитектурой связей невозможно co направленно воздействовать электрическими стимулами на определённые нейроны и отдельные связи. Вызванный стимуляцией эффект изменения архитектуры связей невозможно заранее прогнозировать. Это затрудняет экспериментальной использование данной модели для изучения пластичности в нейронной сети.

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. Эти особенности, а также высокая длительность и низкая эффективность протокола (около 50% экспериментов с успешным достижением заданного уровня активности) не позволяют использовать протокол стимуляции с обратной связью для изучения механизмов пластичности *in vitro* в сети со случайной архитектурой морфофункциональных связей.

Разработан способ индукции пластичности в сети культивируемых диссоциированных клеток гиппокампа с направленной связью с помощью 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.

## 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.

двухфазными 2. Электрическая стимуляция короткими прямоугольными импульсами (±800 мВ, 260 мс/фаза, первая положительная) с низкой частотой (0,20-0,33 Гц) в течение 20 минут вызывает изменение паттернов «Разница показателя активации», также изменение a 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 направленной культуры диссоциированных клеток гиппокампа с архитектурой морфофункциональных связей с помощью электрической стимуляции основе правила STDP. Эффективным на индикатором функциональных изменений нейронной сети в данной модели является показатель «вероятность распространения вызванной сетевой пачки импульсов» по направленной связи между двумя подсетями.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВЧС высокочастотная стимуляция
- ВРАБ вероятность распространения пачки импульсов от клеток в популяции

А в популяцию Б

К1-К3 – контрольные записи 1-3

НЧС - низкочастотная стимуляция

ПС1-ПС3 – записи после стимуляции 1-3

ПД - потенциал действия

ПДМС - полидиметилсилоксан

цАМФ – циклический аденозин монофосфат

CNQX - 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CPP - 3-(2-Carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid

LTP - long term potentiation, долговременная потенциация

LTD - long term depression, долговременная депрессия

MEA - microelectrode array, микроэлектродная матрица

PBS - *phosphate buffered saline*, фосфатный забуференный физиологический раствор

PSTH - post stimulus time histogram, гистограмма сетевой активности после стимула

R/S - response/stimulus, отношение количества импульсов в ответе к

количеству стимулов

STDP - *spike time dependent plasticity*, пластичность, зависящая от времени импульса

TBS - *teta-burst stimulation*, стимуляции сериями высокочастотных электрических импульсов.

TTX – tetrodotoxin, тетродотоксин

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балашова, А.Н. Формы и механизмы гомеостатической синаптической пластичности / А.Н. Балашова, А.Э. Дитятьев, И.В. Мухина // Современные технологии в медицине. — 2013. — Т. 5, № 2. — С. 98–107.

2. Ведунова, М.В. Влияние кратковременной глюкозной депривации на функционирование нейронной сети первичной культуры гиппокампа на мультиэлектродной матрице / М.В. Ведунова, С.А. Коротченко, А.Н. Балашова, А.О. Исакова, Л.Г. Хаспеков, В.Б. Казанцев, И.В. Мухина. // Современные технологии в медицине. — 2011. — Т. 8, № 831. — С. 7–13.

 Гладков, А. Развитие пространственно-временной структуры нейронной сети гиппокампа in vitro / А. Гладков, М. Ведунова, С. Коротченко, Ю.
 Захаров, А. Балашова, И. Мухина // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. — 2011. — Т. 2, № 2. — С. 243–248.

4. Гладков, И.А. Естественнонаучные основы техники / И.А. Гладков // Вестник Удмуртского университета. Серия 3. Философия. Социология. Психология. Педагогика. — 2010. — Т. 1. — С. 103-107.

 Корягина, Е.А. Динамика вызванной биоэлектрической активности нейронных сетей in vitro / Е.А. Корягина, А.С. Пимашкин, В.Б. Казанцев, И.В. Мухина // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. — 2011. — Т. 2, № 2. — С. 254–261.

6. Мищенко, Т.А. Нейротропное действие нейротрофического фактора BDNF на разных этапах развития культур диссоциированных клеток гиппокампа in vitro / Т.А. Мищенко, М.В. Ведунова, Е.В. Митрошина, А.С. Пимашкин, И.В. Мухина // Современные технологии в медицине. — 2015. — Т. 7, № 3. — С. 47–53.

7. Мухина, И.В. Мультиэлектродные матрицы – новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети / И.В. Мухина, В.Б., Казанцев, Л.Г. Хаспеков, Ю.Н. Захаров, М.В. Ведунова, Е.В. Митрошина,

С.А. Коротченко, Е.А. Корягина // Современные технологии в медицине. — 2009. — №1. — С. 8-15.

 Мухина, И.В. Новые технологии в экспериментальной нейробиологии: нейронные сети на мультиэлектродной матрице / И.В. Мухина, Л.Г. Хаспеков
 // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. — 2010. — №2.
 — С. 44-51.

Мухина, И.В. Аниматы: от нейробиологии до робототехники / И.В. Мухина, А.С. Пимашкин, В.Б. Казанцев // Природа. — 2015. — № 6. — С. 37-45.

 Николлс, Д. От нейрона к мозгу / Д. Николлс, Р. Мартин, Б. Валлас, П. Фукс / Пер. с англ. П.М. Балабана, А.В. Галкина, Р.А. Гиниатуллина, Р.Н. Хазипова, Л.С. Хируга. — Москва, Россия: Едиториал УРСС, 2003. — 672 с.

11. Пимашкин А.С. Фазовая динамика импульсных сигналов активности в моделях обработки информации в нейрональных и глиальных сетях мозга: диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук: 01.04.03, 03.01.02 / Пимашкин Алексей Сергеевич. — Н.Новгород, 2010 — 129 с.

12. Широкова, О.М. Морфофункциональные закономерности развития нейронных сетей в диссоциированных культурах клеток гиппокампа / О.М. Широкова, Л.Е. Фрумкина, М.В. Ведунова, Е.В. Митрошина, Ю.Н. Захаров, Л.Г. Хаспеков, И.В. Мухина // Современные технологии в медицине. — 2013. — Т. 5, № 2. — С. 6–12.

13. Adrian, E.D. The impulses produced by sensory nerve-endings: Part II. The response of a Single End-Organ / E.D. Adrian, Y. Zotterman // J. Physiology. — 1926. — Vol. 61,  $N_{2}$  2. — P. 151–171.

14. Albers, J. Engineering connectivity by multiscale micropatterning of individual populations of neurons / J. Albers, K. Toma, A. Offenhausser // Biotechnology Journal. — 2015. — Vol. 10, № 2. — P. 332–338.

Andersen, P. The hippocampus book / P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, J. O'Keefe. — Oxford: Oxford University Press, 2007. — 832 p.

16. Aoki, T. Imaging of Neural Ensemble for the Retrieval of a Learned Behavioral Program / T. Aoki, M. Kinoshita, R. Aoki, M. Agetsuma, H. Aizawa, M. Yamazaki, M. Takahoko, R. Amo, A. Arata, S. Higashijima, T. Tsuboi, H. Okamoto // Neuron. — 2013. — Vol. 78, № 5. — P. 881–894.

17. Averna, A. Selective Laser Ablation of Interconnections Between Neuronal Sub-Populations: A Test-Bed for Novel Neuroprosthetic Applications / A. Averna, M. Bisio, V. Pasquale, P. Bonifazi, F. Difato, M. Chiappalone // 9th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays: Proceedings — Reutlingen, Germany, 2014. — P. 216–217.

18. Axmacher, N. Memory formation by neuronal synchronization / N. Axmacher,
F. Mormann, G. Fernández, C.E. Elger, J. Fell // Brain research reviews. — 2006.
— Vol. 52. — P. 170–182.

Bakkum, D.J. Long-term activity-dependent plasticity of action potential propagation delay and amplitude in cortical networks / D.J. Bakkum, Z.C. Chao, S.M. Potter // PLoS ONE. — 2008. — Vol. 3, № 5. — P. 1–10, e2088.

20. Berdichevsky, Y. Building and manipulating neural pathways with microfluidics / Y. Berdichevsky, K.J. Staley, M.L. Yarmush // Lab on a chip. — 2010. — Vol. 10,  $N_{2}$  8. — P. 999–1004.

21. Bi, G.Q. Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type / G.Q. Bi, M.M. Poo // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. — 1998. — Vol. 18,  $N_{2}$  24. — P. 10464–72.

21. Biffi, E. A microfluidic platform for controlled biochemical stimulation of twin neuronal networks / E. Biffi, F. Piraino, A. Pedrocchi, G.B. Fiore, G. Ferrigno, A. Redaelli, A. Menegon, M. Rasponi // Biomicrofluidics. — 2012. — Vol. 6, № 2. — P. 1–10, e024106.

23. Birznieks, I. Encoding of direction of fingertip forces by human tactile afferents / I. Birznieks, P. Jenmalm, W. Goodwin, R.S. Johansson // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. — 2001. — Vol. 21,  $N_{2}$  20. — P. 8222–8237.

24. Bisio, M. Emergence of Bursting Activity in Connected Neuronal Sub-Populations / M. Bisio, A. Bosca, V. Pasquale, L. Berdondini, M. Chiappalone // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9, № 9. — P. 1–14, e107400.

25. Bliss, T.V. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus / T.V. Bliss, G.L. Collingridge // Nature. — 1993. — Vol. 361,  $N_{\odot}$  6407. — P. 31–39.

26. Bogdanov, A.V. Correlations between neuron activity in the sensorimotor cortex of the right and left hemispheres in rabbits during a defensive dominant and «animal hypnosis» / A.V. Bogdanov, A.G. Galashina, N.N. Karamysheva // Neuroscience and behavioral physiology. — 2010. — Vol. 40,  $N_{\rm P}$  7. — P. 801–6.

27. Bologna, L.L. Low-frequency stimulation enhances burst activity in cortical cultures during development / L.L. Bologna, T. Nieus, M. Tedesco, M. Chiappalone, F. Benfenati, S. Martinoia // Neuroscience. — 2010. — Vol. 165,  $\mathbb{N}_{2}$  3. — P. 692–704.

28. Bolshakov, V.Y. Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression / V.Y. Bolshakov, S.A. Siegelbaum // Science. — 1994. — Vol. 264, № 5162. — P. 1148–1152.

29. Bottjer, S.W. Parallel pathways for vocal learning in basal ganglia of songbirds / S.W. Bottjer, B. Altenau // Nature neuroscience. — 2010. — Vol. 13, № 2. — P. 153–155.

30. Bradke, F. Establishment of neuronal polarity: Lessons from cultured hippocampal neurons / F. Bradke, C.G. Dotti // Current Opinion in Neurobiology. — 2000. — Vol. 10, № 5. — P. 574–581.

31. Brewer, G.J. Chronic electrical stimulation of cultured hippocampal networks increases spontaneous spike rates / G.J. Brewer, M.D. Boehler, A.N. Ide, B.C. Wheeler // Journal of neuroscience methods. — 2009. — Vol. 184,  $N_{\rm P}$  1. — P. 104–109.

32. Brewer, G.J. Toward a self-wired active reconstruction of the hippocampal trisynaptic loop: DG-CA3 / G.J. Brewer, M.D. Boehler, S. Leondopulos, L. Pan, S.

Alagapan, T.B. DeMarse, B.C. Wheeler // Frontiers in neural circuits. — 2013. — Vol. 7, № October. — P. 1–8, article 165.

33. Buzsáki, G. Rhythms of the Brain / G. Buzsáki. — Oxford: Oxford University Press, 2006. — 448 p.

34. Buzsáki, G. What does gamma coherence tell us about inter-regional neural communication? / G. Buzsáki // Nature Neuroscience. — 2015. — Vol. 18, № 4. — P. 1–6.

35. Campenot, R.B. Independent control of the local environment of somas and neurites / R.B. Campenot // Methods in enzymology. — 1979. — Vol. 58. — P. 302–307.

36. Caporale, N. Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule / N. Caporale, Y. Dan // Annual review of neuroscience. — 2008. — Vol. 31. — P. 25–46.

37. Cariani, P.A. Temporal coding of sensory information in the brain / P.A.
Cariani // Acoustical Science and Technology. — 2001. — Vol. 22, № 2. — P. 77–
84.

38. Chao, Z.C. Region-specific network plasticity in simulated and living cortical networks: comparison of the center of activity trajectory (CAT) with other statistics / Z.C. Chao, D.J. Bakkum, S.M. Potter // Journal of neural engineering. — 2007. — Vol. 4. — P. 294–308.

39. Chen, X. Observed network dynamics from altering the balance between excitatory and inhibitory neurons in cultured networks / X. Chen, R. Dzakpasu // Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics. — 2010. — Vol. 82,  $N_{2}$  3. — P. 1–8.

40. Chiappalone, M. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development / M. Chiappalone, M. Bove, A. Vato, M. Tedesco, S. Martinoia // Brain research. — 2006. — Vol. 1093, № 1. — P. 41–53.

41. Chiappalone, M. Network plasticity in cortical assemblies / M. Chiappalone, P. Massobrio, S. Martinoia // European Journal of Neuroscience. — 2008. — Vol. 28, № 04. — P. 221–237.

42. Chiappalone, M. Burst detection algorithms for the analysis of spatio-temporal patterns in cortical networks of neurons / M. Chiappalone, A. Novellino, I. Vajda, A. Vato, S. Martinoia, J. van Pelt // Neurocomputing. — 2005. — Vol. 65-66. — P. 653–662.

43. Chiappalone, M. Analysis of the bursting behavior in developing neural networks / M. Chiappalone, A. Novellino, A. Vato, S. Martinoia, I. Vajda, J. Van Pelt // Proceedings of the 2nd Symposium on Measurement, Analysis and Modeling of Human Functions and 1st Mediterranean Conference on Measurement — Genova, Italy, 2004. — P. 15–20.

44. Chiappalone, M. Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons / M. Chiappalone, A. Vato, L. Berdondini, M. Koudelka-hep, S. Martinoia // International Journal of Neural Systems. — 2007. — Vol. 17, № 2. — P. 87–103.

45. Chiappalone, M. Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications / M. Chiappalone, A. Vato, M.B. Tedesco, M. Marcoli, F. Da // Biosensors and Bioelectronics. — 2003. — Vol. 18. — P. 627–634.

46. Cohen, M.R. Measuring and interpreting neuronal correlations / M.R. Cohen,
A. Kohn // Nature neuroscience. — 2011. — Vol. 14, № 7. — P. 811–819.

47. Corner, M. Spontaneous neuronal burst discharges as dependent and independent variables in the maturation of cerebral cortex tissue cultured in vitro: a review of activity-dependent studies in live «model» systems for the development of intrinsically generated bioel / M. Corner // Brain research reviews. — 2008. — Vol. 59,  $N_{\rm P}$  1. — P. 221–244.

48. Corner, M. Physiological effects of sustained blockade of excitatory synaptic transmission on spontaneously active developing neuronal networks--an inquiry into the reciprocal linkage between intrinsic biorhythms and neuroplasticity in

early ontogeny / M. Corner, J. van Pelt, P.S. Wolters, R.E. Baker, R.H. Nuytinck // Neuroscience and biobehavioral reviews. — 2002. — Vol. 26, № 2. — P. 127– 185.

49. Dan, Y. Spike timing-dependent plasticity: from synapse to perception / Y. Dan, M.-M. Poo // Physiological reviews. — 2006. — Vol. 86, № 3. — P. 1033–1048.

50. Debanne, D. Long-Term Plasticity of Intrinsic Excitability : Learning Rules and Mechanisms / D. Debanne // Learning and Memory. — 2003. — Vol. 10. — P. 456–465.

51. Debanne, D., Gähwiler B.H., Thompson S.M. Asynchronous pre- and postsynaptic activity induces associative long-term depression in area CA1 of the rat hippocampus in vitro / D. Debanne, B.H. Gähwiler, S.M. Thompson // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1994. — Vol. 91, № 3. — P. 1148–1152.

52. DeMarse, T.B. Feed-Forward Propagation of Temporal and Rate Information between Cortical Populations during Coherent Activation in Engineered In Vitro Networks / T.B. DeMarse, L. Pan, S. Alagapan, G.J. Brewer, B.C. Wheeler // Frontiers in Neural Circuits. — 2016. — Vol. 10,  $N_{2}$  4. — P. 1–21.

53. Dertinger, S.K.W. Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons / S.K.W. Dertinger, X. Jiang, Z. Li, V.N. Murthy, G.M. Whitesides // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2002. — Vol. 99, № 20. — P. 12542–12547.

54. Dotti, C.G. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture / C.G. Dotti, C.A. Sullivan, G.A. Banker // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. — 1988. — Vol. 8,  $N_{2}$  4. — P. 1454–1468.

55. Dowell-Mesfin, N.M. Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons / N.M. Dowell-Mesfin, M. Abdul-Karim, A.M.P. Turner, S. Schanz, H.G. Craighead, B. Roysam, J.N. Turner, W. Shain // Journal of neural engineering. — 2004. — Vol. 1, № 2. — P. 78–90.

56. Dranias, M.R. Short-term memory in networks of dissociated cortical neurons / M.R. Dranias, H. Ju, E. Rajaram, A.M.J. VanDongen // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. — 2013. — Vol. 33,  $N_{2}$  5. — P. 1940–1953.

57. Eytan, D. Selective adaptation in networks of cortical neurons / D. Eytan, N. Brenner, S. Marom // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. — 2003. — Vol. 23, № 28. — P. 9349–9356.

58. Eytan, D. Dopamine-induced Dispersion of Correlations Between Action Potentials in Networks of Cortical Neurons / D. Eytan, A. Minerbi, N. Ziv, S. Marom // J Neurophysiol. — 2004. — Vol. 92. — P. 1817–1824.

59. Feber, J. le. Latency dependent development of related firing patterns of cultured cortical neurons / J. le Feber, J. van Pelt, W. Rutten // Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. C. 3000–3003.

60. Feber, J. le. Conditional firing probabilities in cultured neuronal networks: a stable underlying structure in widely varying spontaneous activity patterns / J. le Feber, W.L.C. Rutten, J. Stegenga, P.S. Wolters, G.J.A. Ramakers, J. van Pelt // Journal of neural engineering. — 2007. — Vol. 4,  $N_{2}$  2. — P. 54–67.

61. Feber, J. Do external stimuli, applied to train cultured cortical networks, disturb the balance between activity and connectivity? / J. Feber, J. Stegenga, W. Rutten //
30th Annual international IEEE EMBS Conference — Vancouver, British Columbia, Canada, 2008. — P. 24–27.

62. Feber, J. le. Latency-Related Development of Functional Connections in Cultured Cortical Networks / J. le Feber, J. VanPelt, W.L.C. Rutten // Biophysical journal. — 2009. — Vol. 96, № 8. — P. 3443–3450.

63. Feber, J. le. The effect of slow electrical stimuli to achieve learning in cultured networks of rat cortical neurons / J. le Feber, J. Stegenga, W.L.C. Rutten // PloS one. — 2010. — Vol. 5,  $N_{2}$  1. — P. 1–8, e8871.

64. Feber, J. Repeated stimulation of cultured networks of rat cortical neurons induces parallel memory traces / J. Feber, T. Witteveen, T.M. Van Veenendaal, J. Dijkstra // Learning & Memory. — 2015a. — Vol. 22. — P. 594–604.

65. Feber, J. Le. Barbed channels enhance unidirectional connectivity between neuronal networks cultured on multi electrode arrays / J. Le Feber, W. Postma, E. de Weerd, M. Weusthof, W.L.C. Rutten // Frontiers in Neuroscience. — 2015b. — Vol. 9. — P. 1–10.

66. Feinerman, O. Reliable neuronal logic devices from patterned hippocampal cultures / O. Feinerman, A. Rotem, E. Moses // Nature Physics. — 2008. — Vol. 4, № 12. — P. 967–973.

67. Fell, J. The role of phase synchronization in memory processes / J. Fell, N. Axmacher // Nature reviews. Neuroscience. — 2011. — Vol. 12. — P. 105–118.

68. Fischer, Y. Rapid Report Activation of intrinsic hippocampal theta oscillations by acetylcholine in rat septo-hippocampal cocultures / Y. Fischer, H.G. Beat, S.M. Thompson // Journal of Physiology. — 1999. — Vol. 519, № 2. — P. 405–413.

69. Gandolfo, M. Tracking burst patterns in hippocampal cultures with highdensity CMOS-MEAs / M.Gandolfo, A. Maccione, M. Tedesco, S. Martinoia, L. Berdondini // Journal of neural engineering. — 2010. — Vol. 7. — P. 1–16, e056001.

70. Garner, A.R. Generation of a synthetic memory trace / A.R. Garner, D.C.
Rowland, S.Y. Hwang, K. Baumgaertel, B.L. Roth, C. Kentros, M. Mayford //
Science. — 2012. — Vol. 335, № 6075. — P. 1513–1516.

71. Gomez, N. Polarization of hippocampal neurons with competitive surface stimuli: contact guidance cues are preferred over chemical ligands / N. Gomez, S. Chen, C.E. Schmidt // Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society. -2007. - Vol. 4, No 13. - P. 223-233.

72. Gomez, N. Immobilized nerve growth factor and microtopography have distinct effects on polarization versus axon elongation in hippocampal cells in culture / N. Gomez, Y. Lu, S. Chen, C.E. Schmidt // Biomaterials. — 2007. — Vol. 28,  $N_{2}$  2. — P. 271–284.

73. Habets, A.M. Spontaneous neuronal firing patterns in fetal rat cortical networks during development in vitro: a quantitative analysis / A.M. Habets, A.M. Van Dongen, F. Van Huizen, M.A. Corner // Experimental brain research. — 1987. — Vol. 69,  $N_{2}$  1. — P. 43–52.

74. Habibey, R. Microchannel Scaffolds for Neural Signal Acquisition and Analysis / R. Habibey, A. Golabchi, A. Blau // Neurotechnology, Electronics, and Informatics, Springer Series in Computational Neuroscience. — 2015. — Vol. 13. — P. 47–64.

75. Habibey, R. A microchannel device tailored to laser axotomy and long-term microelectrode array electrophysiology of functional regeneration / R. Habibey, A. Golabchi, S. Latifi, F. Difato, A. Blau // Lab on a Chip. — 2015. — Vol. 15, № 24. — P. 4578–4590.

76. Hafting, T. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex / T. Hafting, M. Fyhn, S. Molden, M.B. Moser, E.I. Moser // Nature. — 2005. — Vol. 436, № 7052. — P. 801–806.

77. Hattori, S. Direction control of information transfer between neuronal populations with asymmetric three-dimensional microstructure / S. Hattori, J. Suzurikawa, R. Kanzaki, Y. Jimbo, T. Hamaguchi, H. Takahashi, M. Nakao // Electronics and Communications in Japan. — 2010. — Vol. 93, № 12. — P. 17–25.

78. Hawasli, A. Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation / A.H. Hawasli, D.R. Benavides, C. Nguyen, J. W. Kansy, K. Hayashi, P. Chambon, P. Greengard, C.M. Powell, D.C. Cooper, J.A. Bibb // Nature Neuroscience. — 2007. — Vol. 10, № 7. — P. 880–886.

79. Hikosaka, O. Parallel neural networks for learning sequential procedures / O. Hikosaka, K. Sakai, X. Lu, H. Nakahara, M.K. Rand, K. Nakamura, S. Miyachi, K. Doya // Trends in Neurosciences. — 1999. — Vol. 22, № 10. — P. 464–471.

80. Holscher, C. Stimulation on the Positive Phase of Hippocampal Theta Rhythm Induces Long-Term Potentiation That Can Be Depotentiated by Stimulation on the Negative Phase in Area CA1 In Vivo / C. Holscher, A. Roger, M.J. Rowan // The Journal of Neuroscience. — 1997. — Vol. 17, № 16. — P. 6470–6477.

81. Honegger, T. Electrokinetic confinement of axonal growth for dynamically configurable neural networks / T. Honegger, M.A. Scott, M.F. Yanik, J. Voldman // Lab on a chip. — 2013. — Vol. 13, № 4. — P. 589–598.

82. Honegger, T. Microfluidic neurite guidance to study structure-function relationships in topologically-complex population-based neural networks / T. Honegger, M.I. Thielen, S. Feizi, N.E. Sanjana, J. Voldman // Scientific reports. — 2016. — Vol. 6. — P. 1–10.

83. Hong, N. Characterization of axonal spikes in cultured neuronal networks using microelectrode arrays and microchannel devices / N. Hong, S. Joo, Y. Nam // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. — 2016. — Vol. 9294. — P. 1–8.
84. Huang, H. Using microfluidic chip to form brain-derived neurotrophic factor concentration gradient for studying neuron axon guidance / H. Huang, L. Jiang, S. Li, J. Deng, Y. Li, J. Yao, B. Li, J. Zheng // Biomicrofluidics. — 2014. — Vol. 8. — P. 1–8.

85. Huang, T. Development of a Compartmentalized Biochip for Axonal Isolation and Neuronal-Circuit Formation at the Single-Cell Level / T. Huang, R.K. Pirlo, W. Qin, Y. Lin, L. Wei, L. Schmidt, N. Erdman, T. Xi, M.N. DeSilva, B.Z. Gao // Neuromethods. — 2015, № 01. — P. 83–104.

86. Huang, Y.T. Spontaneous reverberation in developing neuronal culture networks / Y.T. Huang, Y.L. Cheung, H. Song, P.Y. Lai, C.K. Chan // 8th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays: Proceedings — Reutlingen, Germany, 2012. — P. 86–87.

87. Huettner, J.E. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats / J.E. Huettner, R.W. Baughman // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. — 1986. — Vol. 6, N 10. — P. 3044–3060.

88. Hyman, J.M. Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term

depression when delivered to the trough / J.M. Hyman, B.P. Wyble, V.R. Goyal, C.A. Rossi, M.E. Hasselmo // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. — 2003. — Vol. 23, № 37. — P. 11725–11731.

89. Ide, N. Chronic network stimulation enhances evoked action potentials / N. Ide,
A. Andruska, M. Boehler, B.C. Wheeler, G.J. Brewer // Journal of neural engineering. — 2010. — Vol. 7. — P. 1–15.

90. Idelson, M.S. Innate Synchronous Oscillations in Freely-Organized Small Neuronal Circuits / M.S. Idelson, E. Ben-Jacob, Y. Hanein // PLoS ONE. 2010. — Vol. 5, № 12. — P. 1–9.

91. Ikegaya, Y. Synfire Chains and Cortical Songs : Temporal Modules of Cortical Activity / Y. Ikegaya, G. Aaron, R. Cossart, D. Aronov, I. Lampl, D. Ferster, R. Yuste // Science. — 2007. — Vol. 559, № 2004. — P. 559–564.

92. Ito, D. Minimum neuron density for synchronized bursts in a rat cortical culture on multi-electrode arrays / D. Ito, H. Tamate, M. Nagayama, T. Uchida, S.N. Kudoh, K. Gohara // Neuroscience. — 2010. — Vol. 171, № 1. — P. 50–61.

93. Jäckel, D. Combination of High-density Microelectrode Array and Patch Clamp Recordings to Enable Studies of Multisynaptic Integration / D. Jäckel, D. J. Bakkum, T. L. Russell, J. Müller, M. Radivojevic, U. Frey, F. Franke, A. Hierlemann // Scientific Reports. — 2017. — Vol.7, № 978. — P. 1–17.

94. Jimbo, Y. Strengthening of synchronized activity by tetanic stimulation in cortical cultures: application of planar electrode arrays / Y. Jimbo, H.P. Robinson, A. Kawana // IEEE transactions on bio-medical engineering. — 1998. — Vol. 45,  $N_{\rm P}$  11. — P. 1297–304.

95. Jimbo, Y. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons / Y. Jimbo, T. Tateno, H.P. Robinson // Biophysical journal. — 1999a. — Vol. 76, № 2. — P. 670–678.

96. Jimbo, Y. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons / Y. Jimbo, T. Tateno, H.P. Robinson // Biophysical journal. — 1999b. — Vol. 76, № 2. — P. 670–8.

97. Johansson, R.S. First spikes in ensembles of human tactile afferents code complex spatial fingertip events / R.S. Johansson, I. Birznieks // Nature neuroscience. — 2004. — Vol. 7, № 2. — P. 170–177.

98. Kilic, O. Brain-on-a-chip model enables analysis of human neuronal differentiation and chemotaxis / O. Kilic, D. Pamies, E. Lavell, P. Schiapparelli, Y. Feng, T. Hartung, A. Price, H. Hogberg, A. Quinones-Hinojosa, H. Guerrero-Cazares, A. Levchenko // Lab on a Chip. — 2016. — Vol. 16. — P. 4152–4162.

99. Kim, H.F. Parallel basal ganglia circuits for voluntary and automatic behaviour to reach rewards / H.F. Kim, O. Hikosaka // Brain. — 2015. — Vol. 138, № 7. — P. 1776–1800.

100. Kim, H.J. Integrated microfluidics platforms for investigating injury and regeneration of CNS axons / H.J. Kim, J.W. Park, J.W. Park, J.H. Byun, B. Vahidi, S.W. Rhee, N.L. Jeon // Annals of Biomedical Engineering. — 2012. — Vol. 40,  $N_{2}$  6. — P. 1268–1276.

101. Ko, H. The emergence of functional microcircuits in visual cortex / H. Ko, L.
Cossell, C. Baragli, J. Antolik, C. Clopath, S.B. Hofer, T.D. Mrsic-Flogel //
Nature. — 2013. — Vol. 496, № 7443. — P. 96–100.

102. Ko, H. Functional specificity of local synaptic connections in neocortical networks / H. Ko, S.B. Hofer, B. Pichler, K.A. Buchanan, P.J. Sjöström, T.D. Mrsic-Flogel // Nature. — 2011. — Vol. 473, № 7345. — P. 87–91.

103. Kohn, A. Correlations and brain states: from electrophysiology to functional imaging / A. Kohn, A. Zandvakili, M.A.Smith // Current opinion in neurobiology.
2009. — Vol. 19, № 4. — P. 434–438.

104. Larson, J. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation / J. Larson, D. Wong, G. Lynch // Brain Research . — 1986. — Vol. 368. — P. 347-350.

105. LeCun, Y. Deep learning / Y. LeCun, Y. Bengio, G. Hinton // Nature. — 2015. — Vol. 521, № 7553. — P. 436–444.

106. Levy, O. Enhancement of neural representation capacity by modular architecture in networks of cortical neurons / O. Levy, N.E. Ziv, S. Marom // European Journal of Neuroscience. — 2012. — Vol. 35, № 11. — P. 1753–1760.

107. Li, Y. Dynamics of learning in cultured neuronal networks with antagonists of glutamate receptors / Y. Li, W. Zhou, X. Li, S. Zeng, Q. Luo // Biophysical journal. — 2007. — Vol. 93, № 12. — P. 4151–4158.

108. Linden, D.J. Long-term synaptic depression / D.J. Linden, J.A. Connor // Annual review of neuroscience. — 1995. — Vol. 18. — P. 319–357.

109. Liu, X. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall / X. Liu, S. Ramirez, P.T. Pang, C.B. Puryear, A. Govindarajan, K. Deisseroth, S. Tonegawa // Nature. — 2012. — Vol. 484, № 7394. — P. 381–385.

110. Lorente, V. Enhancing Hebbian Learning in Biological Neural Cultures Through Electrical Stimulation / V. Lorente, J. Manuel, E. Fernández // FUTURE COMPUTING 2013: The Fifth International Conference on Future Computational Technologies and Applications — Valencia, Spain, 2013. — P. 20–25.

111. Lynch, M.A. Long-Term Potentiation and Memory / M.A. Lynch // Physiol
Rev. — 2004. — Vol. 84. — P. 87–136.

112. Maccione, A. Multiscale functional connectivity estimation on low-density neuronal cultures recorded by high-density CMOS Micro Electrode Arrays / A. Maccione, M. Garofalo, T. Nieus, M. Tedesco, L. Berdondini, S. Martinoia // Journal of neuroscience methods. — 2012. — Vol. 207,  $N_{2}$  2. — P. 161–71.

113. Madhavan, R. Plasticity of recurring spatiotemporal activity patterns in cortical networks / R. Madhavan, Z.C. Chao, S.M. Potter // Physical biology. — 2007. — Vol. 4,  $N_{2}$  3. — P. 181–193.

114. Madhavan, R. Plasticity of recurring spatiotemporal activity patterns in cortical networks / R. Madhavan, Z.C. Chao, S.M. Potter // Physical biology. — 2008. — Vol. 4,  $N_{2}$  3. — P. 181–193.

115. Maeda, E. Modification of parallel activity elicited by propagating bursts in developing networks of rat cortical neurones / E. Maeda, Y. Kuroda, H.P.

Robinson, A. Kawana // The European journal of neuroscience. — 1998. — Vol. 10, № 2. — P. 488–496.

116. Maeda, E. The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons / E. Maeda, H.P. Robinson, A. Kawana // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. — 1995. — Vol. 15, N 10. — P. 6834–6845.

117. Mainen, Z.F. Reliability of spike timing in neocortical neurons / Z.F. Mainen,
T.J. Sejnowski // Science. — 1995. — Vol. 268, № 5216. — P. 1503–1506.

118. 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.

119. Massobrio, P. In Vitro Studies of Neuronal Networks and Synaptic Plasticity in Invertebrates and in Mammals Using Multielectrode Arrays / P. Massobrio, J. Tessadori, M. Chiappalone, M. Ghirardi // Neural Plasticity. — 2015. —№ 196195. — P. 1–18.

120. Marom, A. Microfluidic chip for site-specific neuropharmacological treatment and activity probing of 3D neuronal "optonet" cultures / A. Marom, S. Kumar Mahto, E. Shor, J. Tenenbaum-Katan, J. Sznitman, S. Shoham // Advanced Healthcare Materials. — 2015. — Vol. 4, № 10. — P. 1478–1483.

121. Marom, S. Learning in ex-vivo developing networks of cortical neurons / S.
Marom, D. Eytan // Progress in brain research. — 2005. — Vol. 147. — P. 189– 99.

122. Marom, S. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy / S. Marom, G. Shahaf // Quarterly reviews of biophysics. — 2002. — Vol. 35, № 1. — P. 63–87.

123. Molnár, E. Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons / E.
Molnár // Seminars in cell & developmental biology. — 2011. — Vol. 22, № 5. —
P. 506–13.

124. Moxon, K. Brain-machine interfaces beyond neuroprosthetics / K. Moxon, G.
Foffani // Neuron. — 2015. — Vol. 86, № 1. — P. 55–67.

125. Naatanen, R. Attention and mismatch negativity / R. Naatanen, P. Paavilainen, H. Tiitinen, D. Jiang, K. Alho // Psychophysiology. — 1993. — Vol. 30. — P. 436–450.

126. Nakazawa, K., McHugh T.J., Wilson M.A., Tonegawa S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory / K. Nakazawa, T.J. McHugh, M.A. Wilson, S. Tonegawa // Nature reviews. Neuroscience. — 2004. — Vol. 5, № 5. — P. 361–72.

127. Neto, E. Sensory neurons and osteoblasts: close partners in a microfluidic platform / E. Neto, C.J. Alves, D.M. Sousa, I.S. Alencastre, A.H. Lourenço, L. Leitão, H.R. Ryu, N.L. Jeon, R. Fernandes, P. Aguiar, R.D. Almeida, M. Lamghari // Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro. — 2014. — Vol. 6,  $N_{2}$  6. — P. 586–95.

128. Neveu, D. Postsynaptic levels of  $(Ca^{2+})$  is needed to trigger LTD and LTP / D. Neveu, R.S. Zucker // Neuron. — 1996. — Vol. 16, No 3. — P. 619–629.

129. O'Keefe, J. The Hippocampus as a Cognitive Map / J. O'Keefe, L. Nadel. — Oxford: Clarendon Press, 1978. — 570 p.

130. Okun, M. Diverse coupling of neurons to populations in sensory cortex / M.
Okun, N. a. Steinmetz, L. Cossell, M.F. Iacaruso, H. Ko, P. Barthó, T. Moore, S.B.
Hofer, T.D. Mrsic-Flogel, M. Carandini, K.D. Harris // Nature. — 2015. — Vol.
521, № 7553. — P. 511–515.

131. Oliva, A.A. Patterning Axonal Guidance Molecules Using a Novel Strategy for Microcontact Printing / A.A. Oliva, C.D. James, C.E. Kingman, H.G. Craighead, G.A. Banker // Neurochemical Research. — 2003. — Vol. 28, № 11. — P. 1639–1648.

132. Osipova, D. Theta and Gamma Oscillations Predict Encoding and Retrieval of Declarative Memory / D. Osipova, A. Takashima, R. Oostenveld // Journal of Neuroscience. — 2006. — Vol. 26, № 28. — P. 7523–7531.

133. Otmakhov, N. Postsynaptic Application of a cAMP Analogue Reverses Long-Term Potentiation in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons Postsynaptic Application of a cAMP Analogue Reverses Long-Term Potentiation in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons / N. Otmakhov, J.E. Lisman // J. Neurophysiol. — 2014. — Vol. 87. — P. 3018–3032.

134. Pan, L. Propagation of action potential activity in a predefined microtunnel neural network / L. Pan, S. Alagapan, E. Franca, G.J. Brewer, B.C. Wheeler // J Neural Eng. — 2012. — Vol. 29, № 6. — P. 997–1003.

135. Pan, L. Large extracellular spikes recordable from axons in microtunnels / L. Pan, S. Alagapan, E. Franca, T. Demarse, G.J. Brewer, B.C. Wheeler // IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering. — 2014. — Vol. 22,  $N_{2}$  3. — P. 453–459.

136. Pan, L. An in vitro method to manipulate the direction and functional strength between neural populations / L. Pan, S. Alagapan, E. Franca, S.S. Leondopulos, T.B. DeMarse, G.J. Brewer, B.C. Wheeler // Frontiers in Neural Circuits. — 2015. — Vol. 9. — P. 1–14.

137. Park, J. Multi-compartment neuron–glia coculture microsystem / J. Park, S. Kim, J. Li, A. Han // Neuromethods. — 2015. — Vol. 108. — P. 149–159.

138. Pavlides, C. Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm / C. Pavlides, Y.J. Greenstein, M. Grudman, J. Winson // Brain research. — 1988. — Vol. 439. — P. 383–387.

139. Pazo-Alvarez, P. MMN in the visual modality: a review / P. Pazo-Alvarez, F. Cadaveira, E. Amenedo // Biological Psychology. — 2003. — Vol. 63, № 3. — P. 199–236.

140. Pelt, J. Van. Longterm stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays / J. Van Pelt, M.A. Corner, P.S. Wolters, W.L.C. Rutten, G.J.A. Ramakers // Neuroscience Letters. — 2004. — Vol. 361, № 1-3. — P. 86–89.

141. Pelt, J. van. Dynamics and plasticity in developing neuronal networks in vitro
/ J. van Pelt, I. Vajda, P.S. Wolters, M.A. Corner, G.J.A. Ramakers // Progress in
Brain Research. — 2005. C. 171–188.

142. Penn, Y. Network synchronization in hippocampal neurons / Y. Penn, M. Segal, E. Moses // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2016. — Vol. 113, № 12. — P. 3341–3346.

143. Peter, H. Auditory Cortical Onset Responses Revisited . I . First-Spike Timing / H. Peter // Journal of Neurophysiology. — 1997. — Vol. 77, № 5. — P. 2616–2641.

144. Petrelli, A. Nano-volume drop patterning for rapid on-chip neuronal connectability assays / A. Petrelli, E. Marconi, M. Salerno, D. De Pietri Tonelli, L. Berdondini, S. Dante // Lab on a chip. — 2013. — Vol. 13, № 22. — P. 4419–4429.

145. Peyrin, J.-M. Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers / J.-M. Peyrin, B. Deleglise, L. Saias, M. Vignes, P. Gougis, S. Magnifico, S. Betuing, M. Pietri, J. Caboche, P. Vanhoutte, J.-L. Viovy, B. Brugg // Lab on a chip. — 2011. — Vol. 11, № 21. — P. 3663–3673.

146. 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.

147. 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.

148. Pimashkin, A. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures / A. Pimashkin, I. Kastalskiy, A. Simonov, E. Koryagina, I. Mukhina, V. Kazantsev // Frontiers in computational neuroscience. — 2011. — Vol. 5,  $N_{2}$  46. — P. 1–12.

149. Pirlo, R.K. Biochip/laser cell deposition system to assess polarized axonal growth from single neurons and neuron/glia pairs in microchannels with novel asymmetrical geometries / R.K. Pirlo, A.J. Sweeney, B.R. Ringeisen, M. Kindy, B.Z. Gao // Biomicrofluidics. — 2011. — Vol. 5. — P. 1–11.

150. Pittà, M. De. Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? / M. De Pittà, N. Brunel, A. Volterra // Neuroscience. — 2016. — Vol. 323. — P. 43–61.

151. Prokin, I. Detection of multiple spike transmission pathways in neuronal networks based on multichannel recordings / I. Prokin, A. Gladkov, I. Mukhina, V. Kazantsev // 8th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays: Proceedings — Reutlingen, Germany, 2012. — P. 226–227.

152. Quiroga, R.Q. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering / R.Q. Quiroga, Z. Nadasdy, Y. Ben-Shaul // Neural computation. — 2004. — Vol. 16, № 8. — P. 1661–1687.

153. Ramakers, G.J. Abnormalities in the spontaneous firing patterns of cultured rat neocortical neurons after chronic exposure to picrotoxin during development in vitro / G.J. Ramakers, M.A. Corner, A.M. Habets // Brain Res Bull. — 1991. — Vol. 26,  $N_{2}$  3. — P. 429–432.

154. Renault, R. Combining microfluidics, optogenetics and calcium imaging to study neuronal communication in vitro / R. Renault, N. Sukenik, S. Descroix, L. Malaquin, J.L. Viovy, J.M. Peyrin, S. Bottani, P. Monceau, E. Moses, M. Vignes // PLoS ONE. — 2015. — Vol. 10,  $N_{2}$  4. — P. 1–15.

155. Rolston, J.D. Precisely timed spatiotemporal patterns of neural activity in dissociated cortical cultures / J.D. Rolston, D.A. Wagenaar, S.M. Potter // Neuroscience. — 2007. — Vol. 148, № 1. — P. 294–303.

156. Roth, S. Neuronal architectures with axo-dendritic polarity above silicon nanowires / S. Roth, G. Bugnicourt, M. Bisbal, S. Gory-Fauré, J. Brocard, C. Villard // Small. — 2012. — Vol. 8, № 5. — P. 671–675.

157. Rothschild, G. Functional organization and population dynamics in the mouse primary auditory cortex / G. Rothschild, I. Nelken, A. Mizrahi // Nat Neurosci. — 2010. — Vol. 13, № 3. — P. 353–360.

158. Ruaro, M.E. Toward the Neurocomputer : Image Processing and Pattern Recognition With Neuronal Cultures / M.E. Ruaro, P. Bonifazi, V. Torre, A. Media // IEEE transactions on bio-medical engineering. — 2005. — Vol. 52,  $N_{2}$  3. — P. 371–383.

159. Saito, A. Induced Current-Pharmacological Split Stimulation System for Neuronal Networks / A. Saito, Y. Takayama, H. Moriguchi, K. Kotani, Y. Jimbo // IEEE transactions on bio-medical engineering. — 2013. — Vol. 61, № 2. — P. 463–472.

160. Scott, M.A. Ultra-rapid laser protein micropatterning: screening for directed polarization of single neurons / M.A. Scott, Z.D. Wissner-Gross, M.F. Yanik // Lab on a Chip. — 2012. — Vol. 12, № 12. — P. 2265–2276.

161. Segev, R. Formation of electrically active clusterized neural networks / R.
Segev, M. Benveniste, Y. Shapira, E. Ben-Jacob // Physical review letters. —
2003. — Vol. 90, № 16. — P. 1–4.

162. Shahaf, G. Order-based representation in random networks of cortical neurons
/ G. Shahaf, D. Eytan, A. Gal, E. Kermany, V. Lyakhov, C. Zrenner, S. Marom //
PLoS computational biology. — 2008. — Vol. 4, № 11. — P. 1–11, e1000228.

163. Shahaf, G. Learning in networks of cortical neurons / G. Shahaf, S. Marom // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.
2001. — Vol. 21, № 22. — P. 8782–8788.

164. Shanechi, M.M. Neural population partitioning and a concurrent brainmachine interface for sequential motor function / M.M. Shanechi, R.C. Hu, M. Powers, G.W. Wornell, E.N. Brown, Z.M // Nature neuroscience. — 2012. — Vol. 15,  $N_{2}$  12. — P. 1715–1722.

165. Shimba, K. Neural Transplantation Model Using Integration Co-Culture Chamber / K. Shimba, A. Saito, A. Takeuchi, Y. Takayama, K. Kotani, Y. Jimbo // Electronics and Communications in Japan. — 2014. — Vol. 97, № 2. — P. 36–43.
166. Shimba, K. Axonal conduction slowing induced by spontaneous bursting activity in cortical neurons cultured in a microtunnel device / K. Shimba, K. Sakai,

T. Isomura, K. Kotani, Y. Jimbo // Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro. -2015. -Vol. 7,  $N \ge 1$ . -P. 64-72.

167. Shine, J.M. The Dynamics of Functional Brain Networks: Integrated Network States during Cognitive Function / J.M. Shine, P.G. Bissett, P.T. Bell, O. Koyejo, J.H. Balsters, K.J. Gorgolewski, C.A. Moodie, R.A. Poldrack // Neuron. — 2015. — Vol. 92, № 19. — P. 1–11.

168. Shouval, H.Z. Spike timing dependent plasticity: a consequence of more fundamental learning rules / H.Z. Shouval, S.S.-H. Wang, G.M. Wittenberg // Frontiers in computational neuroscience. — 2010. — Vol. 4, № July. — P. 1–13.

169. Siddique, R. Investigation of nerve injury through microfluidic devices / R. Siddique, N. Thakor // Journal of the Royal Society, Interface. — 2014. — Vol. 11,  $N_{2}$  90. — P. 1–13, e20130676.

170. Southam, K. A Novel In Vitro Primary Culture Model of the Lower Motor Neuron–Neuromuscular Junction Circuit / Southam K., A.E. King, C.A. Blizzard, C.H. McCormack, T.C. Dickson // Microfluidic and Compartmentalized Platforms for Neurobiological Series Editor. — 2015. — Vol. 108. — P. 181–195.

171. Staveren, G.W. van. The effect of training of cultured neuronal networks, can they learn? / G.W. van Staveren, J.R. Buitenweg, E. Marani, W.L.C. Rutten // 2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering: Conference Proceedings — Arlington, VA, USA, 2005. — P. 328–331.

172. Stegenga, J. The effect of learning on bursting / J. Stegenga, J. Le Feber, E.
Marani, W.L.C. Rutten // IEEE transactions on bio-medical engineering. — 2009.
— Vol. 56, № 4. — P. 1220–1227.

173. Stegenga, J. Phase-dependent effects of stimuli locked to oscillatory activity in cultured cortical networks / J. Stegenga, J. le Feber, E. Marani, W.L.C. Rutten // Biophysical journal. — 2010. — Vol. 98, № 11. — P. 2452–2458.

174. Stepan, J. Entorhinal theta-frequency input to the dentate gyrus trisynaptically evokes hippocampal CA1 LTP / J. Stepan, J. Dine, T. Fenzl, S. Polta, G. von Wolff, C. Wotjak, M. Eder. // Frontiers in neural circuits. — 2012. — Vol. 6,  $N^{\circ}$  64. — P. 1–13.

175. Takayama, Y. Formation of one-way-structured cultured neuronal networks in microfluidic devices combining with micropatterning techniques / Y. Takayama, N. Kotake, T. Haga, T. Suzuki, K. Mabuchi // Journal of Bioscience and Bioengineering. — 2012. — Vol. 114, № 1. — P. 92–95.

176. Tateno, T. Activity-dependent enhancement in the reliability of correlated spike timings in cultured cortical neurons / T. Tateno, Y. Jimbo // Biological cybernetics. — 1999. — Vol. 80,  $N_{2}$  1. — P. 45–55.

177. Taube, J.S. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis / J.S. Taube, R.U. Muller, J.B. Ranck // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. — 1990. — Vol. 10,  $N_{2}$  2. — P. 420–435.

178. Taylor, A.M. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and Transport / A.M. Taylor, M. Blurton-jones, S.W. Rhee, D.H. Cribbs, W. Carl // Nat Methods. — 2006. — Vol. 2, № 8. — P. 599–605.

179. Taylor, A.M. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport / A.M. Taylor, M. Blurton-Jones, S.W. Rhee, D.H. Cribbs, C.W. Cotman, N.L. Jeon // Nature methods. — 2005. — Vol. 2,  $N_{2}$  8. — P. 599–605.

180. Taylor, A.M. Microfluidic Local Perfusion Chambers for the Visualization and Manipulation of Synapses / A.M. Taylor, D.C. Dieterich, H.T. Ito, S.A. Kim, E.M. Schuman // Neuron. — 2010. — Vol. 66, № 1. — P. 57–68.

181. Taylor, A.M. Passive microfluidic chamber for long-term imaging of axon guidance in response to soluble gradients / A.M. Taylor, S. Menon, S.L. Gupton // Lab on a Chip. — 2015. — Vol. 15, № 13. — P. 2781–2789.

182. Teller, S. Emergence of assortative mixing between clusters of cultured neurons / S. Teller, C. Granell, M. De Domenico, J. Soriano, S. Gomez, A. Arenas // PLoS computational biology. — 2014. — Vol. 10, № 9. — P. 1–17, e1003796.

183. Tihaa, I. Neuronal guiding: Designing In Vitro Networks On MEA / I. Tihaa,J. Albers, A. Offenhausser // 10th International Meeting on Substrate-Integrated

Electrode Arrays MEA Meeting 2016: Front. Neurosci. Conference Abstract — Reutlingen, Germany, 2016. — P. 1–2.

184. Tort, A. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations / A. Tort, R.W. Komorowski, J.R. Manns, N.J. Kopell, H. Eichenbaum // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2009. — Vol. 106,  $N_{2}$  49. — P. 20942–20947.

185. Traub, R.D. Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro / R.D. Traub, A. Bibbig, F.E.N. LeBeau, E.H. Buhl, M.A. Whittington // Annual review of neuroscience. — 2004. — Vol. 27. — P. 247– 278.

186. Turney, S.G. Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via growth cone myosin II activity / S.G. Turney, P.C. Bridgman // Nature neuroscience. —
2005. — Vol. 8, № 6. — P. 717–719.

187. Vajda, I. Low-frequency stimulation induces stable transitions in stereotypical activity in cortical networks / I. Vajda, J. van Pelt, P. Wolters, M. Chiappalone, S. Martinoia, E. van Someren, A. van Ooyen // Biophysical journal. — 2008. — Vol. 94. — P. 5028–5039.

188. Vedunova, M. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures / M. Vedunova, T. Sakharnova, E. Mitroshina, M. Perminova, A. Pimashkin, Y. Zakharov, A. Dityatev, I. Mukhina // Frontiers in cellular neuroscience. — 2013. — Vol. 7. — P. 1–10, article 149.

189. Veenendaal, T. van. Tetanic stimulation of cortical networks induces parallel memory traces in experimental cultures and computer models / T. van Veenendaal, T. Witteveen, J. le Feber // 6th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER): Proceedings — San Diego, CA, USA, 2013. — P. 211–214.

190. Wagenaar, D.A. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures / D.A. Wagenaar, J. Pine, S.M. Potter // BMC neuroscience. — 2006a. — Vol. 7. — P. 11.

191. Wagenaar, D.A. Searching for plasticity in dissociated cortical cultures on multi-electrode arrays / D.A. Wagenaar, J. Pine, S.M. Potter // Journal of negative results in biomedicine. — 2006b. — Vol. 5. — P. 16.

192. Wagenaar, D.A. Persistent dynamic attractors in activity patterns of cultured neuronal networks / D.A. Wagenaar, Z. Nadasdy, S.M. Potter // Physical Review E
Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics. — 2006. — Vol. 73, № 5. — P. 1–17.

193. Wang, L. Microchannel enhanced neuron-computer interface: design, fabrication, biophysics of signal generation, signal strength optimization, and its applications to ion-channel screening and basic neuroscience research: A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy / Ling Wang. — Barcelona, 2011 — 183 p. http://www.tdx.cat/handle/10803/52810

194. Weliky, M. Correlational structure of spontaneous neuronal activity in the developing lateral geniculate nucleus in vivo / M. Weliky, L.C. Katz // Science. — 1999. — Vol. 285. — P. 599–604.

195. Wessberg, J. Real-time prediction of hand trajectory by ensembles of cortical neurons in primates / J. Wessberg, C.R. Stambaugh, J.D. Kralik, P.D. Beck, M. Laubach, J.K. Chapin, J. Kim, S.J. Biggs, M.A. Srinivasan, M.A. Nicolelis // Nature. — 2000. — Vol. 408, № 6810. — P. 361–365.

196. Wheeler, B.C. Microcontact printing for precise control of nerve cell growth in culture / B.C. Wheeler, J.M. Corey, G.J. Brewer, D.W. Branch // Journal of biomechanical engineering. — 1999. — Vol. 121, № 1. — P. 73–78.

197. Withers, G.S. Effects of Substrate Geometry on Growth Cone Behavior and Axon Branching / G.S. Withers, C.D. James, C.E. Kingman, H.G. Craighead, G.A. Banker // Journal of Neurobiology. — 2006. — Vol. 66, № 11. — P. 1183–1194.

198. Witteveen, T. Memory in cultured cortical networks: experiment and modeling / T. Witteveen, T. Veenendaal, J. le Feber // Topical Problems of Biophotonics International Symposium, TPB. — Nizhny Novgorod, Russia, 2013. — P. 225–226. 199. Wlodarczyk, J. Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity / J. Wlodarczyk, I. Mukhina, L. Kaczmarek, A. Dityatev // Developmental Neurobiology. — 2011. — Vol. 71, № 11. — P. 1040–1053.

200. Woodin, M. Coincident pre- and postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in Cl- transporter activity / M. Woodin, K. Ganguly, M.-M. Poo // Neuron. — 2003. — Vol. 39, № 5. — P. 807–820.

201. Wyart, C. Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces / C. Wyart, C. Ybert, L. Bourdieu, C. Herr, C. Prinz, D. Chatenay // Journal of Neuroscience Methods. — 2002. — Vol. 117,  $N_{2}$  2. — P. 123–131.

202. Yamada, M.K. Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons / M.K. Yamada, K. Nakanishi, S. Ohba, T. Nakamura, Y. Ikegaya, N. Nishiyama, N. Matsuki // The Journal of Neuroscience. — 2002. — Vol. 22, № 17. — P. 7580–7585.

203. Yang, Y-J. Glun2b-containing nmda receptors contribute to the beneficial effects of hydrogen sulfide on cognitive and synaptic plasticity deficits in APP/PS1 transgenic mice / Y-J. Yang, Y. Zhao, B. Yu, G-G. Xu, W. Wang, J-Q. Zhan, Z-Y. Tang, T. Wang, B. Wei // Neuroscience . — 2016. — Vol. 335. — P. 170–183

204. Yap, Y. Microfluidic culture platform for studying neuronal response to axonal stretch injury / Y. Yap, T. Dickson // Biomicrofluidics. — 2014. — Vol. 8. — P. 1–12, e044110.

205. Yartsev, M.M. Grid cells without theta oscillations in the entorhinal cortex of bats / M.M. Yartsev, M.P. Witter, N. Ulanovsky // Nature. — 2011. — Vol. 479, № 7371. — P. 103–107.

206. Zhou, T. Multi-electrode array capable of supporting precisely patterned hippocampal neuronal networks / T. Zhou, S.F. Perry, Y. Berdichevsky, S. Petryna, V. Fluck, S. Tatic-Lucic // Biomedical Microdevices. — 2015. — Vol. 17,  $N_{2}$  2. — P. 1–12.

## Приложение

Таблица 1. Исследования зависящей от активности пластичности в сетях первичных культур нервных клеток

Ссылка	Стимуляция с целью индукции пластичност и	Тестовая стимуля ция	DIV	Тип клет ок	Основные результаты			
тета бёрст стимуляция с одного входа (через 1 электрод)								
(Jimbo, Robinson, Kawana, 1998)	11имп. 20Гц, 10серий 0,2Гц	0.1 Гц	12	кора крыс E18	Увеличение числа импульсов в ответ на тестовый стимул. Увеличение амплитуды и длительности постсинаптических токов в коррент- кламп клетке в ответ на тестовый стимул.			
(Jimbo, Tateno, Robinson, 1999)	10имп. 20Гц, 20серий 0,2Гц	1/3 Гц, последова -тельно 64 электрода	30- 50	кора крыс E18	Увеличение поздней фазы постсинаптических токов в 50% выбранных клеток. Как увеличение, так и уменьшение числа импульсов в ответ на тестовый стимул в зависимости от стимулируемого входа (« <i>путь-специфичная пластичность</i> »).			
(Tateno, Jimbo, 1999)-	10имп. 20Гц, 20серий 0,2Гц	0,05 Гц	40- 50	кора крыс Е18	Увеличение числа вызванных импульсов лишь на нескольких нейронах. Время первого вызванного импульса и PSTH значимо не изменялись.			
(Wagenaar, Pine, Potter, 2006b)	20имп. 20Гц, 20серий 0,5Гц	1/3 Гц, последова -тельно 59 эл-ов	17- 32	кора крыс Е18	Изменения числа вызванных импульсов соразмерны со спонтанными изменениями как в культурах с нормальной пачечной активностью, так и при её подавлении.			
(Chiappalon e, Massobrio, Martinoia, 2008)	11имп. 20Гц, 20серий 0,2Гц	0,2 Гц 6-8 пробных электродо в по 5мин каждый	~21- 35	кора крыс Е18	В 61,29% экспериментов PSTH не изменялась, значимо увеличивалась в 12,9%, уменьшалась в 25,81% экспериментов.			
(Witteveen, Veenendaal, Feber le, 2013); (Veenendaal , Witteveen, Feber, 2013)	10имп. 100Гц, 120 серий 0,2Гц	Нет	16- 28	кора крыс Р1	Изменение функциональных связей (на основе кросскорреляционного анализа) не на нулевых задержках в спонтанной активности различных участков нейронной сети			

тета бёрст стимуляция с двух или нескольких входов								
(Maeda et al., 1998)	20 имп. 20Гц, 5-10сер 0,1- 0,07Гц, 5 входов с задержкой 0мс	1/15- 1/3Гц	9-35	кора крыс Е18	Увеличение вероятности вызова пачки импульсов, частоты спонтанных пачек и частоты импульсов в вызванных пачках не во всех культурах			
(Tateno, Jimbo, 1999)	10 имп. 20Гц, 20серий 0,2Гц, 2 входа с задержкой 0 мс	0,05 Hz последова -тельно те же 2 входа	40- 50	кора крыс Е18	Изменение числа спонтанных импульсов в 54% нейронов. Изменение PSTH. В некоторых случаях уменьшалось время первого вызванного импульса. Изменение кросскорреляции последовательностей импульсов в вызванной активности в различных участках нейронной сети большие, чем после высокочастотной (тетанической) стимуляции 1 электрода.			
(Wagenaar, Pine, Potter, 2006b)	20 имп. 20Гц, 20 серий 0,5Гц, 2 входа с задержкой 5мс	0,2Гц	13- 28	кора крыс Е18	Изменения числа вызванных импульсов соразмерны со спонтанными изменениями как в культурах с нормальной пачечной активностью, так и при её подавлении.			
(Wagenaar, Pine, Potter, 2006b)	20 имп. 10Гц, 150серий 1/6Гц 2 входа с задержкой 10мс	1Гц	20- 23	кора крыс Е18	Пачечная активность подавлялась непрерывной стимуляцией. Наблюдались значимые изменения числа вызванных импульсов при тестовой стимуляции электродов, на которые подавалась высокочастотная (тетаническая) стимуляция согласно правилу STDP. При стимуляции контрольных участков изменения были соразмерны со спонтанными.			
(Madhavan, Chao, Potter, 2007)	20 Гц в течение 15 минут, 2 входа с задержкой Омс	Нет	~14-28	кора крыс Е18	В спонтанной активности было выделено несколько типов пачек импульсов по профилю: время-число импульсов-регистрируемый участок сети. Около 25 типов для больших пачек и около 8 для маленьких. Стимуляция приводила к значимому изменению соотношения типов спонтанных пачек в сравнении со спонтанными изменениями.			
(Chao, Bakkum, Potter, 2007b)	20 имп. 20Гц, 150 серий 1/6Гц, 2 входа с задержкой 10мс	0,5 Гц 6 пробных электродо в в случайно м порядке	~30- 90	кора крыс E18	Значимые изменения PSTH, кросс- корреляции последовательностей импульсов в вызванной активности в различных участках и изменение центра активности. Изменения общей частоты импульсов в ответ на тестовые стимулы соразмерны со спонтанными.			

(Lorente, Manuel, Fernández, 2013)	5 имп. 20Гц, 160-200серий 1/3Гц, 2 соседних входа с задержкой 0мс, в течение10-16 дней	Нет	~14- 21	Гипп о- камп мыше й E18	В спонтанной активности двух участков, соответствующих стимулируемым электродам, появлялась функциональная связь (на основе кросскорреляционного анализа) при предъявлении стимулов в течение 16 дней.
стимуля	нция с двух вхо	дов разныл	ии па	ттерн	ами "ассоциативная стимуляция"
(Eytan, Brenner, Marom, 2003)	Вход 1: 1/5Гц, Вход 2: 1/50Гц		~21- 28	кора крыс Р1	Уменьшалось число импульсов вызванных стимулами с большей частотой, и увеличивалось на стимулы с меньшей частотой.
(Wagenaar, Pine, Potter, 2006b)	Вход 1: 1Гц, 1/60Г	Вход 2: ц	10- 32	кора крыс Е18	Уменьшалось число импульсов вызванных стимулами с большей частотой, и увеличивалось на стимулы с меньшей частотой.
(Chiappalon e, Massobrio, Martinoia, 2008)	Вход 1: 11имп. 20Гц, 20серий 0,2Гц, Вход 2: 1Гц или 1/5Гц	0,2 Гц в течение 5 мин. 6-8 пробных эл-ов	~21- 35	кора крыс Е18	При ассоциативной стимуляции 1/5Гц только во время пачки стимулов с другого входа наблюдались изменения только в сторону увеличения PSTH (60% экспериментов). Предъявление ассоциативных стимулов только в промежутках между пачками стимулов с другого входа или ассоциативных стимулов 1Гц могло приводить как к увеличению, так и уменьшению PSTH. В 40-60% экспериментов значимых изменений не наблюдалось.
(Stegenga et al., 2010)	Вход 1: случайные электроды с частотой симулирующе й тета ритм (4Гц) со средней частотой импульсов 10Гц и нормальным распределени ем времени стимула. Вход 2: 4имп. 200Гц, приуроченных к	0,2 Гц 10- 13 эл-ов	20- 89	кора крыс Р1	Когда стимуляция со второго входа подавалась в моменты стимуляции первого с наибольшей частотой, увеличивалось количество вызванных импульсов на тестовую стимуляцию и изменялось вовлечение в ответ различных участков сети. При стимуляции второго входа в моменты минимальной стимуляции первого входа - значимых изменений не наблюдалось.

	о <del>п</del> олод <sup>3</sup> <sup>2</sup>				
	определенной				
	фазе				
	стимуляции с				
	первого				
	входа.	111111	1011A	cm om u	
	100иля	івния высо	KO4U	CMOMA	ая стимуляция (тетанус)
	100имп. 250Гн. 40				
	2301 Ц, 40 сорий 0 5Ги	0.5 Γτ. 15			
	серии 0,51 ц, 15 рудлов с	0,51Ц,15		Гинн	
(Duara at	15 влодов с	влодов	21		VDATHUAUNA UNCTA UMINIU COD D OTDAT UA
(10000)	Задержкой	пространс	Q0	KDI IC	у величение числа импульсов в ответ на
al., 2003)		DOLLOTON	70	рз	Тестовый стимул.
		располож		15	
	HU L-	СННЫХ			
	расположени				
	ЫЛ	11112120110	cmon		MUMNTALLIA
		пизкочи		іпия сп	иимуляция Ураницация рародиности визова пашки
	5 имп 3-5				у величение вероятности вызова пачки импуль сов в $62\%$ культур. Уредицение
(Maeda et	Вольт, 0,1Гц с	1/15-		кора	импульсов в $0270$ культур. у величение изстоти спонтании у панек в $510\%$
(101acta ct)	5 входов с	1/15- 1/3Ги	9-35	крыс	
ui., 1990)	задержкой 0	тлагц		E18	$\mu$ MITVILCOB B BLIZBAHHLIY HAUKAY B 23%
	мс				KVIILTVD
					Частота спонтанных импульсов по всей
	02Ги40			кора крыс Е18	сети не изменялась В отлельных
	импульсов		10-		участках наблюдалось как увеличение.
(Vajda et	последователь	Нет			так и уменьшение частоты спонтанных
al., 2008)	но с 6-и		54		импульсов. Изменение длительности и
	электродов.	ОДОВ.			временной структуры спонтанных
	-				пачек.
(Chiappalon		DOTOTI UO C			
е,	0,2 I ц последо 6-8 пробщих р		~21_	кора	
Massobrio,	в тецецие 30-	Ломицит	~21- 35	крыс E18	Нет значимых изменений в PSTH.
Martinoia,	б течение 30-	чо минут сампый)			
2008)	(no Sminyi i	(алсдын)			
	Два входа 0,2				
	Гцс				Число импульсов в спонтанной пачке.
	интервалом				число пачек в минуту, число электролов
	50мс, 1-3 часа			Гипп	с пачечной активностью увеличивались
(Brewer et	в день на 7,	TT	7	окамп	при стимуляции 1ч в день.
al., 2009)	11, 12, 14, 18,	Нет	1-22	крыс	Длительность пачки при стимуляции 1ч
, ,	19 й 21 DIV.			Ė18	в день увеличивалась, при 3ч в день –
	30 входов с				уменьшалась по сравнению с
	однои				контролем.
	стороны				
	матрицы				
	0.21Ц				у величение частоты спонтанных
(Bologna et				кора	импульсов и начек после стимуляции в
		Нет	1-50	крыс E18	культурах старше то DTV. ИЗМЕНЕНИЯ
ai., 2010)					частоты импульсов и пачек в
					спонтанной активности в течение
	начиная с 1				развития не отличались у

	DIV				стимулируемых и контрольных
					культур.
(Ide et al., 2010)	Два входа 0,2 Гц с интервалом 50мс, 1-3 часа в день на 7, 11, 12, 14, 18, 19 и 21 DIV. 30 входов с одной стороны матрицы	Два входа с интервало м 50мс 0,2 Гц. 30 входов с одной стороны матрицы	7-21	Гипп окамп крыс E18	Увеличение числа вызванных импульсов (10-40мс после стимула) на участках сети, расположенных близко к стимулируемым.
(Feber et al., 2010)	0,2–0,33 Гц около часа через один электрод и 0,2–0,33 Гц около часа случайно изменяя локализацию стимулирующ его электрода	Нет	25- 29 и 14- 64	кора крыс Р0	Изменения функциональной связанности (на основе кросскорреляционного анализа) различных участков сети после стимуляции больше, чем спонтанные изменения как при стимуляции через один электрод, так и при случайном изменении локализации электорода.
(Feber et al., 2015a)	0,2 Гц с 1 входа в течение 15 мин с интервалом без стимуляции 1 час	Нет	18- 53	кора крыс Р0	Изменения функциональной связанности (на основе кросскорреляционного анализа) различных участков сети после стимуляции первых серий стимуляции больше, чем после последующих.

Таблица 2. Вызванные низкочастотной электрической стимуляцией изменения функциональной активности нейронных сетей диссоциированных клеток гиппокампа со случайной архитектурой связей

Низкочастотная	до стиму	ляции		после сти	Значение		
стимуляция					р (М-У)		
Параметры	Медиа	75-й	25-й	Медиана	75-й	25-й	
активности	на	процен	процен		процен	процен	
нейронной сети		тиль	тиль		тиль	тиль	
Частота	1249,9	1956,1	915,52	1333,445	1828,0	882,52	0,18
импульсов в	98	82	6		58	3	
секунду, Гц							
Частота пачек в	28,3	47,888	12,313	27,8	47,375	11,425	0,9375
минуту,							
пачек/мин							

143

Длительность	184,69	220,79	164,92	186,41	213,01	167,29	0,6402
пачек, мс							
Межпачечный	6,353	15,087	3,76	6,472	17	3,853	0,375
интервал, мс							
Число	1925,4	3243,2	1315,8	2156	3319,4	1271,6	0,756
импульсов в							
пачке							
Число связей	447	561,5	177	442	523,75	182	0,5578
Процент новых	22,222	26,748	19,877	39,923	41,433	35,039	0,0156
и исчезнувших				-	ŕ	·	-
связей							
относительно							
первой записи							
(см. методы), %							
Процент новых	11,806	15,24	8,351	16,331	21,340	13,814	0,0865
связей							
относительно							
первой записи							
(см. методы), %							
Процент	-11,453	-8,667	-12,779	-19,927	-16,691	-22,817	0,0313
исчезнувших							
связей							
относительно							
первой записи							
(см. методы), %							
Разница силы	0,5439	0,9977	0,373	0,735	1,29	0,5316	0,2187
стабильных							
связей							
относительно							
первой записи							
(см. методы), %	10.054	10 505	0.004	20.205	20.070	10.000	0.000
Расстояние	10,874	18,797	8,334	28,295	29,979	13,833	0,0209
между							
центройдами							
паттернов							
активации							
относительно							
первои записи							
См. методы)	8 7/83	22 128	6 2311	10 2000	3/ 070	15 706	0.375
Гасстоянис	0,7405	22,120 8	0,2311	19,2909	7	0	0,375
мсжду центрой цами		0			/	9	
паттернов							
частоты							
импульсов на							
кажлом							
электроле							
относительно							
первой записи							
(см. методы)							
Таблица 3. Вызванные высокочастотной электрической стимуляцией изменения функциональной активности нейронных сетей диссоциированных клеток гиппокампа со случайной архитектурой связей

Высокочастотна	до стимуляции			после стимуляции			Значение
я стимуляция	5				2		р (М-У)
Параметры	Медиа	75-й	25-й	Медиана	75-й	25-й	
активности	на	процен	процен		процен	процен	
нейронной сети		тиль	тиль		тиль	тиль	
Среднее число	771,39	1003,6	236,90	821,319	974,92	301,66	0,5836
импульсов в	8	38	1			9	
секунду							
Частота пачек в	6,625	10,5	4	6,775	9,5	2,55	0,5768
минуту,							
пачек/мин							
Длительность	249,65	263,71	185,75	255,56	266,79	193,24	0,6875
пачек, мс							
Межпачечный	9,196	14,765	5,599	9,323	15,028	6,306	0,5625
интервал, мс							
Число	3680,2	5056,8	1320,2	3713,1	5162,7	1148,2	0,9983
импульсов в							
пачке							
Число связей	220,5	355	18	263	449	41	0,1123
Процент новых	26,022	36,842	20,274	66,017	150	24,936	0,0313
и исчезнувших							
связей							
относительно							
первой записи							
(см. методы), %							
Процент новых	15,212	16,279	13,973	36,966	138,88	23,380	0,0313
связей					9		
относительно							
первой записи							
(см. методы), %							
Процент	-11,074	-6,402	-21,053	-6,828	-1,409	-56,489	0,5625
исчезнувших							
связей							
относительно							
первой записи							
(см. методы), %							
Разница силы	0,3623	0,7686	0,3067	1,0112	1,2086	0,3911	0,0901
стабильных							
связей							
относительно							
первой записи							
(см. методы), %							
Расстояние	14,031	27,55	6,632	22,881	67,58	5,099	0,3125
между							
центройдами							

паттернов							
активации							
относительно							
первой записи							
(см. методы)							
Расстояние	4,9147	9,3949	3,4154	17,0655	19,792	16,237	0,0313
между					5	9	
центройдами							
паттернов							
частоты							
импульсов на							
каждом							
электроде							
относительно							
первой записи							
(см. методы)							