

На правах рукописи



ПИГАРЕВА ЯНА ИГОРЕВНА

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ МЕЖСЕТЕВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В
НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ОДНОНАПРАВЛЕННО
СВЯЗАННЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ *IN VITRO***

1.5.5 – физиология человека и животных

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2025

Работа выполнена на базе кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный руководитель: **Мухина Ирина Васильевна**,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой нормальной
физиологии им. Н.Ю. Беленкова ФГБОУ ВО
«ПИМУ» Минздрава России

Официальные оппоненты: **Салмина Алла Борисовна**,
доктор медицинских наук, профессор,
главный научный сотрудник и заведующий
лабораторией нейробиологии и тканевой
инженерии, заместитель директора
Института мозга ФГБНУ «Научный центр
неврологии»

Караваяев Анатолий Сергеевич,
доктор физико-математических наук, доцент,
заведующий кафедрой динамического
моделирования и биомедицинской
инженерии Саратовского национального
исследовательского государственного
университета имени Н.Г. Чернышевского

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Федеральный центр мозга и
нейротехнологий» Федерального медико-
биологического агентства

Защита состоится: 03 апреля 2025 года в 13.00 часов на заседании
диссертационного совета 24.2.340.06 при ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.
Лобачевского» по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23,
корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке
Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на
сайте: <https://diss.unn.ru/files/2025/1522/diss-Pigareva-1522.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук



Черкасова Е.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Исследование процессов хранения и обработки информации мозгом является одной из главных задач физиологии текущего столетия, решение которой даст ключ к пониманию механизмов высших функций мозга, причин возникновения нейродегенеративных заболеваний, обеспечит развитие интерфейсов мозг-компьютер и машинного обучения (Lynn, 2019; Hramov, 2021).

Известно, что многие функции мозга осуществляются на уровне нейронных сетей. Несмотря на множество исследований, направленных на изучение нейронных сетей на всех уровнях организации мозга, все еще мало известно о том, каким образом ими реализуется функция обработки информации на клеточном уровне. Известно, что биологические нейронные сети мозга обладают свойствами модульности и иерархичности. В целом мозге модульность выражается в топологии сети, включающей последовательно связанные подсети, внутренняя связность которых значительно выше, чем связность межсетевая. Высокая кластеризация связей между нейронами в подсети способствует локальной обработке специализированных функций в ее пределах, в то время как межсетевая связь позволяет поддерживать глобально интегрированную обработку более общих функций мозга, таких как, например, память (Farahani, 2019; Edde, 2021). В тоже время, иерархичность определяет последовательность обработки информации между локальными нейронными сетями мозга от более простого уровня обработки к более сложному.

В связи со сложностью доступа нейронных сетей мозга для изучения их функций на клеточном уровне используют упрощённые экспериментальные модели, такие как культуры нейрональных клеток *in vitro*. Развитие технологий в последнее десятилетие привело к появлению ряда методов, предназначенных для формирования нейронных сетей *in vitro* со структурой, обеспечивающей свойства модульности и направленного распространения активности (Yamamoto et al., 2018; Wang et al., 2021). В контексте нейронных сетей *in vitro* модульность достигается разделением сложной сети на несколько подсетей с ограниченным числом связей между ними. Таким образом, модульные нейронные сети *in vitro* включают две или более элементарные локальные подсети (модули), связность между которыми значительно меньше связности внутри модулей. Возникающая в таких сетях активность представляет собой сочетание локальной активности в подсетях и интегральной активности, вовлекающей несколько подсетей (Marc Montalà-Flaquer et al., 2022).

Известные методы создания модульных сетей включают модификацию подложки для культивирования клеток (Habibey et al., 2022; Luttge, 2022), создание физических ограничительных конструкций (Kamudzandu et al., 2019; Bang et al., 2021) и применения вязких сред (Sharma et al., 2021). В некоторых исследованиях было показано, что между связанными сетями могли спонтанно устанавливаться направленные взаимодействия (Brofiga et al., 2021).

В мозге основным процессом, контролирующим формирование направленных связей, является рост аксона от тела клетки к целевым нейронам следующего уровня, который управляется стимулами окружающей среды, такими как межклеточные взаимодействия, биохимические сигналы, а также механические и геометрические свойства субстрата роста. Разработка экспериментальной модели нейронных сетей с направленными связями требует управления ростом аксонов. В последние десятилетия были разработаны различные методы контроля навигации аксонов, включающие технологию нанесения микропаттернов (Behm et al., 2019; Yurchenko et al., 2021), создание микроканалов для аксонов методами микрофлюидики (Takemuro et al., 2020; Luo et al., 2021; Holloway et al., 2021), приложение высокочастотного электрического поля к аксонам (Buentello et al., 2022) и другие. Такие подходы позволяют не только исследовать принципы направления роста аксонов, но и создавать нейронные сети с заданной топологией связей, которые служат удобной моделью для изучения фундаментальных принципов обработки информации в сетях мозга.

Наиболее подходящим для конструирования направленно связанных сетей представляется метод микрофлюидики, позволяющий культивировать клетки в камерах, соединенных микроканалами, форма которых должна обеспечивать направленную передачу активности между нейронными сетями (Brofiga et al., 2021; Ming et al., 2021; Xu et al., 2023). Способность контролировать и направлять рост нейронов *in vitro* имеет важные последствия в тканевой инженерии, например при восстановлении периферических нервов.

Малоизученным является также вопрос влияния внутрисетевой активности на межсетевое взаимодействие, а также нейрофизиологические механизмы длительного функционального межсетевого взаимодействия однонаправленно связанных локальных нейронных сетей. Выявление механизмов эффективной связности нейронных подсетей в составе модульной нейронной сети позволит расширить наше понимание физиологических принципов обработки информации в нейронных сетях мозга.

Цель работы

Целью работы явилось выявление закономерностей распространения спонтанной сетевой биоэлектрической активности и ее обработки в нейрофизиологической модели однонаправленно связанных нейронных сетей *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние структуры направляющих путей на функции роста и навигацию аксонов при формировании однонаправленно связанных нейронных сетей в первичной культуре гиппокампа;
2. Изучить влияние внутрисетевой биоэлектрической активности на межсетевое взаимодействие однонаправленно связанных нейронных сетей в первичной культуре гиппокампа;
3. Выявить морфологические и функциональные изменения в принимающей сети, входящей в состав модульной нейронной сети с однонаправленной межмодульной связью в первичной культуре гиппокампа.

Научная новизна работы

Разработан экспериментальный метод *in vitro* для изучения нейрофизиологических механизмов обработки информации в модульных нейронных сетях, основанный на долговременном культивировании нескольких однонаправленно связанных локальных нейронных сетей в составе первичных культур клеток гиппокампа в микрофлюидном чипе, совмещенном с микроэлектродной матрицей, позволяющей регистрировать электрическую активность нейронов в составе отдельных нейронных сетей. Особенностью данной модели является наличие однонаправленной синаптической связи между нейронами локальных нейронных сетей, сформированной за счет особой формы связывающих сети микроканалов.

Для оценки направленного роста нейритов, обеспечивающих однонаправленность передачи сигналов между двумя локальными сетями, были разработаны критерии: скорость роста аксона от нейросети Источника к Приемнику (в прямом направлении) и от нейросети Приемника к Источнику (в обратном направлении) и максимальное расстояние, на которое может прорасти аксон в обратном направлении. На основании разработанных критериев выявлены морфофункциональные особенности навигации и скорости роста аксонов в экспериментальной модели однонаправленно связанных нейронных сетей *in vitro*: управление навигацией аксона возможно в пределах угла 45 градусов относительно оси роста, что может быть обеспечено особой треугольной формой канала в экспериментах *in vitro*.

С использованием метода кросс корреляции разработан коэффициент направленности связи $R(\tau)$, с помощью которого было определено, что для создания однонаправленной морфофункциональной связи между

локальными нейронными сетями в модели *in vitro* наиболее эффективной является асимметричная форма каналов, обеспечивающая быстрый рост аксонов нейронов нейросети-Источника и препятствующая росту аксонов нейронов нейросети-Приемника.

При исследовании нейрофизиологических механизмов взаимодействия однонаправленно связанных локальных сетей в составе модульной сети впервые выявлены следующие закономерности: (1) в процессе развития модульной сети *in vitro* формируются 2 типа спонтанной активности, определяющие характер связности между локальными сетями; (2) наличие в спонтанной активности нейросети-Источника кластера крупных сетевых пачек импульсов является фактором, определяющим эффективное межсетевое взаимодействие, и, наоборот, отсутствие крупных сетевых пачек снижает межсетевую связность в сложной модульной сети, что может привести к нарушению передачи информации между локальными сетями; (3) длительное поступление спонтанных сигналов из нейросети-Источника при наличии однонаправленной межсетевой связи изменяет структуру связей в сети-Приемнике за счет снижения количества тормозных ГАМК-эргических синапсов при отсутствии изменения в клеточном составе сети независимо от типа сети.

Научно-практическая значимость

Научно-практическая значимость проведенного исследования заключается в полученных в работе данных об особенностях навигации аксонов и проведения сигнала между двумя однонаправленно связанными локальными сетями. Разработаны критерии эффективности морфологической и функциональной связности между локальными сетями в общей нейросети, которые могут быть применены для изучения физиологических механизмов обработки информации мозгом на сетевом уровне.

Выявлены характеристики спонтанной активности локальных нейронных сетей, влияющие на функциональное взаимодействие в модульной сети. Доказано, что воздействие одной сети на другую формирует не только вызванный ответ, но и изменяет функциональный паттерн спонтанной активности принимающей сети. Одним из нейрофизиологических механизмов вовлечения подчиненной сети к ответу на постоянное воздействие от другой локальной сети является снижение количества тормозных ГАМК-эргических синапсов в нейронной сети, активно принимающей сигналы.

Разработанная нейрофизиологическая модель модульной нейронной сети с направленными межмодульными связями может быть использована нейробиологами для изучения механизмов взаимодействия многослойных однонаправленно связанных нейронных сетей различных отделов мозга на

клеточном уровне в норме и патологии, а также при проведении доклинических исследований безопасности и фармакологического действия нейротропных лекарственных средств.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено на экспериментальной модели нейронных сетей первичных культур клеток гиппокампа эмбрионов мышей (E18) линии C57BL/6. Экспериментальная модель формирования однонаправленно связанных нейронных сетей разработана с использованием методов микрофлюидики и мягкой литографии. В электрофизиологических экспериментах спонтанную нейросетевую активность регистрировали с помощью микроэлектродных матриц. Функциональная связность нейронных сетей и ансамблей нейронов оценивалась с помощью математических методов кросскорреляции и фармакологического подхода с использованием блокаторов глутаматных рецепторов, обеспечивающих проведение возбуждения в нейросети-Источнике. Для выявления вклада в работу нейронных сетей возбуждающих и тормозных синапсов, нейронов, клеток глии применяли методы иммуоцитохимии. Визуализация иммуоцитохимических маркеров осуществлялась с помощью метода лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Управление ростом и навигацией аксона в экспериментах *in vitro* возможно в пределах угла 45 градусов относительно оси роста, что может быть обеспечено особой треугольной формой канала в составе микрочипа;
2. Эффективность межсетевых взаимодействий в однонаправленно связанных нейронных сетях первичной культуры гиппокампа определяется не только наличием морфологической связи, но и типом спонтанной сетевой биоэлектрической активности в виде крупных сетевых пачек в локальной сети-источнике;
3. Локальная нейронная сеть, принимающая паттерны сигналов в составе модульной сети с направленными межмодульными связями *in vitro*, содержит меньшее количество тормозных синапсов по сравнению с сетью-источником.

Личный вклад автора

При непосредственном участии автора был разработан дизайн диссертационного исследования, проведены эксперименты, обработка и интерпретация исходных данных, были выполнены статистический анализ и сравнительное описание результатов. Автором была проведена подготовка публикаций результатов проведенного исследования и их представление на научных конференциях. Выбор темы исследования, постановка задач и обсуждение полученных результатов проводились совместно с научным

руководителем.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена надёжностью использования комплекса современных экспериментальных методов исследования, а также согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Апробация работы

Основные положения работы представлялись на Международной конференции «NETT International Conference on System Level Approaches to Neural Engineering» (Barcelona, Spain, 2015); Международной конференции «Frontiers in biomedicine» (Н.Новгород, 2015); Международной конференции «Volga Neuroscience Meeting 2016» (Санкт-Петербург-Н.Новгород, 2016); III Всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Нижний Новгород, Россия, 2017); IV Всероссийской конференции «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пушино, 2018); 12-ой Международной конференции по разработкам в области электронных систем (DeSE) (Казань, 2019); Международной школе и конференции «Saint-Petersburg OPEN 2020» (Санкт-Петербург, 2020); 3-й международной конференции по Нейротехнологиям и Нейроинтерфейсам «Third International Conference Neurotechnologies and Neurointerfaces» (Калининград, 2021); Международной школе и конференции «Saint-Petersburg OPEN 2021»; VII съезде биофизиков России (Краснодар, 2023).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях (Web of Science, Scopus), в том числе 1 входящая в перечень ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, главы описания и обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Работа изложена на 152 страницах, содержит 45 рисунков. Список литературы содержит 169 источников.

Благодарность

Автор благодарит к.ф.-м.н. Пимашкина А.С. за консультации и сотрудничество на этапе обработки экспериментальных данных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Схема исследования. Для создания нейрофизиологической модели однонаправленно связанных нейронных сетей *in vitro* был разработан

микрофлюидный чип, структура которого включала две камеры для нейросетей Источник и Приемник и соединяющие их микроканалы, формирующие направленные связи. Первая часть исследования посвящена поиску оптимальных структурных параметров микроканалов (размеры, форма), обеспечивающих функцию направленного роста аксонов между подсетями. Сформированные в результате межсетевые синаптические связи должны были создать условия для формирования направленного взаимодействия в сложной нейронной сети так, чтобы активность подсети-Источника распространяясь по аксонам в микроканалах и вызывала ответную активность в подсети-Приемнике, но не наоборот. Для оценки эффективности однонаправленной связи приводили сравнение морфо-функциональных характеристик роста аксонов в симметричных (10 видов микроканалов) и асимметричных микроканалах. Исследование функциональных связей нейросетей в чипах с оптимальными симметричными и асимметричными каналами осуществляли электрофизиологическими и математическими методами. Во второй части исследования оценивали временно-частотные характеристики биоэлектрической активности модульной нейронной сети с направленными связями между локальными подсетями, и изучали их влияние на функциональную межсетевую связность или способность нейросети-Приемника отвечать на поступающий сигнал из нейросети-Источника. Для выяснения нейрофизиологических механизмов длительного функционального межсетевого взаимодействия исследовали соотношение тормозных и возбуждающих нейронов, нейронов и глии, а также тормозных и возбуждающих синапсов в структуре модульной нейронной сети с направленными межмодульными связями, а также применяли фармакологический подход с использованием блокаторов глутаматных рецепторов.

Разработка конфигураций микрофлюидных чипов. Конфигурация микрофлюидных чипов включала две камеры для культивирования первичных культур клеток мозга и соединяющие их микроканалы (рис.1). В соответствии с направлением роста аксонов локальные нейросети определяли, как «нейросеть-Источник» и «нейросеть-Приемник». Было разработано 10 типов симметричных микроканалов, каждый из которых состоял из последовательности одинаковых сегментов и моделировал условия для направленной навигации аксонов для формирования межсетевого взаимодействия (рис.1, А, Б). Стенки сегментов сужались в сторону нейросети-Приемника под углом не более 45° , что облегчало направленный рост аксонов в ее сторону. Вероятность обратного роста аксонов уменьшалась благодаря наличию узких мест и специальных

сегментов-ловушек. Также на основе исследования 10 типов симметричных микроканалов был разработан асимметричный вариант микроканала, состоящий из двух видов секций (рис. 1, В).

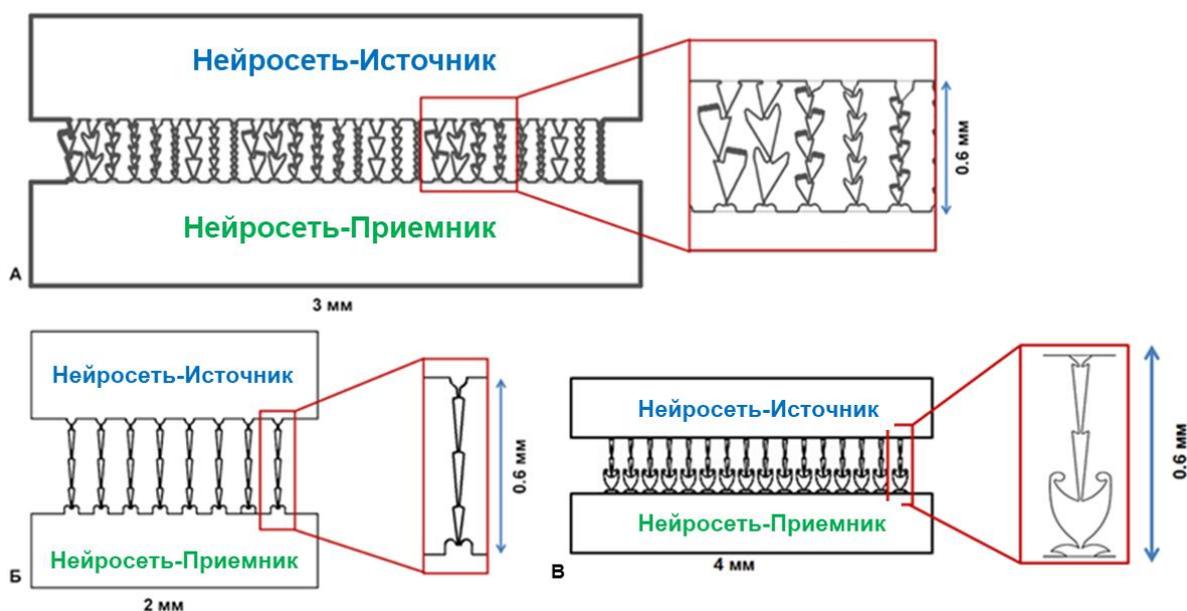


Рисунок 1 - Схема строения микрофлюидных чипов. А - микрофлюидный чип с 9 типами симметричных каналов; Б - микрофлюидный чип с симметричными микроканалами, состоящими из длинных узких секций; В - чип с асимметричными микроканалами

Регистрация и анализ внеклеточных потенциалов нейронов в первичной культуре гиппокампа. Биоэлектрическая активность нейрональных культур записывалась с помощью электродов микроэлектродной матрицы (МЕА, электроды TiN, диаметр 30 мкм, расстояние между электродами 200 мкм, MultichannelSystems, Германия) и системы регистрации USB-MEA120-Inv-2-BC-System (Multichannel system, Германия) с частотой дискретизации 20 кГц. Спонтанная активность нейрональных культур в микрофлюидных чипах регистрировалась каждые 5 дней с 10 до 25 дня развития *in vitro*. Детектирование внеклеточных импульсов проводилось путем вычисления порога амплитуды регистрируемого сигнала (Pimashkin, 2011). В каждой записи спонтанной активности культур были определены один или два типа пачек импульсов с помощью алгоритма кластеризации К-средних. С целью исследования однонаправленного функционального взаимодействия между модулями сложной сети определяли коэффициент направленности связи $R(\tau)$, который выражался в проценте коррелированных сетевых пачек импульсов относительно исходного числа пачек в одной из локальных нейросетей. Для подтверждения того, что наблюдаемые задержки отражают взаимодействие

локальных сетей, а не случайное наложение двух пачек импульсов, был проведен анализ суррогатных данных.

Характеристики кросс-корреляции последовательностей импульсов. Кросскорреляционный анализ последовательностей импульсов группы нейронов проводился для импульсов, зарегистрированных каждой парой электродов матрицы. Взаимодействия нейронов внутри локальных нейронных сетей Источник и Приемник и между нейронами локальных сетей оценивались через значения силы связей и задержки распространения импульсов, которые определяли для каждой пары импульсов в каждой локальной сети и отдельно между импульсами, зарегистрированными электродами в разных локальных сетях.

Анализ активности модульной нейронной сети с однонаправленными межмодульными связями после блокады глутаматных рецепторов в нейросети-Источнике. Число импульсов в сетевой пачке, продолжительность спонтанных сетевых пачек импульсов и интервалы между сетевыми пачками оценивали в нейросети-Приемнике и нормировали на среднее значение соответствующих характеристик в исходном периоде. Крупные пачки нейросети-Приемника, инициированные активностью нейросети-Источника, были определены как «вызванные сетевые пачки». Остальные крупные сетевые пачки нейросети-Приемника были определены как «спонтанные сетевые пачки».

Функциональная связность в нейросети-Приемнике определялась через кросскорреляционную функцию для всех возможных пар импульсов, зарегистрированных на электродах данной локальной сети. Функциональные связи между нейронами в модульной сети характеризовались силой и задержками. Чтобы измерить разницу между связностью двух сигналов спонтанной активности, оценивали евклидово расстояние двух матриц связности в нейросети-Приемнике в контрольных условиях и после аппликации антагонистов глутаматных рецепторов (CPP + CNQX) к нейросети-Источника.

Методы исследования навигации аксонов в каналах. Анализ динамики роста нейритов проводили с помощью системы непрерывного прижизненного мониторинга клеточных культур и анализа изображений (Cell IQ, ChipManTechnologies, Финляндия). Количественная оценка эффективности микроканалов для направления роста аксонов проводилась по следующим критериям: (1) скорость роста аксона через сегмент микроканала в прямом и обратном направлении, (2) локализация в канале места встречи нейритов, растущих в прямом и в обратном направлении, (3) максимальное расстояние, на которое может прорасти аксон в обратном направлении.

Иммуноцитохимические методы исследования. Для оценки количества возбуждающих и тормозных нейронов, клеток глии и плотности синапсов использовали культуры 21-го дня развития. Маркирования нейронов и аксонов производилось антителами для β 3-тубулина (SYSY, 302 304, Германия) и тау (SYSY, 314 011, Германия), соответственно; для маркирования дендритов – антитела для MAP2 (Abcam, ab92434, Великобритания). Для оценки плотности синапсов маркировали везикулярный глутаматный и ГАМК-транспортер и дендриты антителами для VGluT1 (Abcam, ab180188, Великобритания), антителами для SLC32A1/VGAT (Abcam, ab211534, Великобритания), антителами для MAP2 (Abcam, ab5392, Великобритания), соответственно. Визуализацию проводили с помощью конфокального микроскопа (Zeiss LSM 710, Германия). В результате получали 4-20 z-стеков толщиной 2-5 мкм. Флуоресцентные изображения анализировались в программах Zen 2.1 (Carl Zeiss) и ImageJ.

Статистический анализ экспериментальных данных. Полученные данные обрабатывались статистическими методами с помощью программного пакета MatLab. Для проверки выборки на нормальность распределения использовался критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения эффективности роста аксонов в микроканалах разных типов по введенным критериям использовался односторонний анализ ANOVA с поправкой Данна. Для оценки влияния размера и формы сегментов на максимальную длину прорастания аксонов в обратном направлении был проведен двусторонний ANOVA. Для сравнения двух независимых выборок использовался критерий Манна-Уитни. Для сравнения двух зависимых выборок использовался критерий суммы рангов Уилкоксона. Для сравнения характеристик спонтанной активности модульной нейрональной сети после аппликации ТТХ в камеру с нейросетью-Источником использовался односторонний анализ ANOVA с поправкой Бонферрони. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. На рисунках данные представлены либо в виде среднего значения \pm среднеквадратическое отклонение, либо медианного значения \pm медианное отклонение.

Результаты и обсуждение

1. Регуляция функции направленного роста аксонов с помощью структуры микроканалов биочипа

В процессе развития нейронных сетей мозга *in vivo* связи формируются под влиянием биохимических сигналов, механических и структурных свойств субстрата роста, межклеточных взаимодействий. В частности, построение коры мозга и мозжечка происходит при участии радиальной глии, выступающей в качестве опоры для перемещения нейронов. В экспериментальной модели модульной нейронной сети с однонаправленной

связью *in vitro* роль направляющего структурного фактора для навигации нейритов выполняли микроканалы. Для обеспечения однонаправленной связности между двумя нейросетями («Источником» и «Приемником») в пределах пространства микроканала должны были выполнены условия быстрого роста аксонов нейросети-Источника к нейросети-Приемнику (прямое направление) и предотвращения роста аксонов нейросети-Приемника к нейросети-Источнику (обратное направление). При разработке микроканалов учитывались данные о минимальном числе аксонов, необходимых для возникновения функциональной связности между двумя нейросетями *in vitro* (Pan et al., 2015), а также стремление аксонов расти вдоль плотных структур (Yurchenko et al., 2021). Был произведен поиск структурных факторов, регулирующих функцию направленного роста аксонов. По критериям максимального роста аксона от нейросети-Приемника к нейросети-Источнику (рис. 2) и критерию скорости роста аксона в прямом и обратном направлении (рис. 3) были выявлены следующие особенности навигации аксонов: (1) управление навигацией аксона возможно в пределах угла 45 градусов относительно оси роста; (2) быстрый и направленный рост аксонов обеспечивается поверхностями, сужающимися по направлению к нейросети-Приемнику; (3) замедление роста аксонов определяется наличием сужений на пути роста и их числом, а так же наличием структур -ловушек.

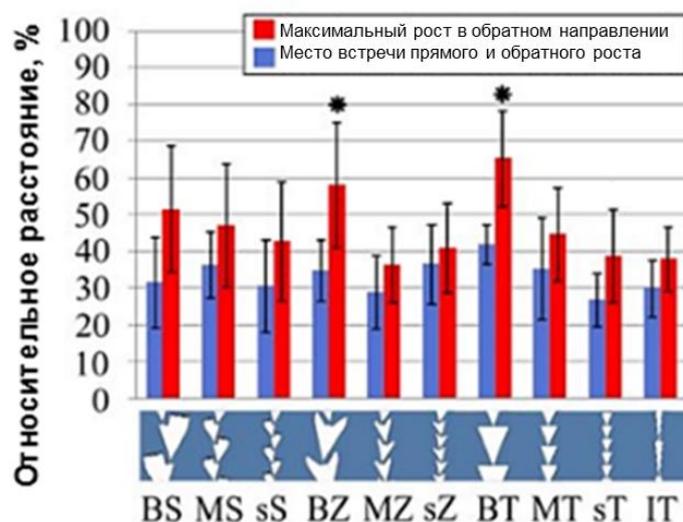


Рисунок 2 - Характеристики роста аксонов для различных типов микроканалов: максимальное расстояние, на которое прорастает аксон в направлении от нейросети-Приемника к нейросети-Источнику (красные столбцы; n = 6 культур, 138 микроканалов); место встречи прямого и обратного роста (синие столбцы; n = 6 культур, 138 микроканалов); * - наличие статистически значимых различий, выявленные односторонним анализом ANOVA ($p < 0,05$)

На основе полученных данных был разработан микроканал асимметричной формы, состоящий из двух типов сегментов: двух узких и одного широкого (рис. 3В).

В асимметричном канале аксоны нейронов нейросети-Источника быстро прорастали через первые два сегмента канала в течение первых 4 дней развития, практически полностью снижая вероятность прорастания аксонов из нейросети-Приемника в сторону нейросети-Источника. Аксоны нейронов нейросети-Приемника либо росли вдоль поверхности широкого сегмента и попадали в ловушки, либо медленно росли без опоры внутри широкого сегмента.

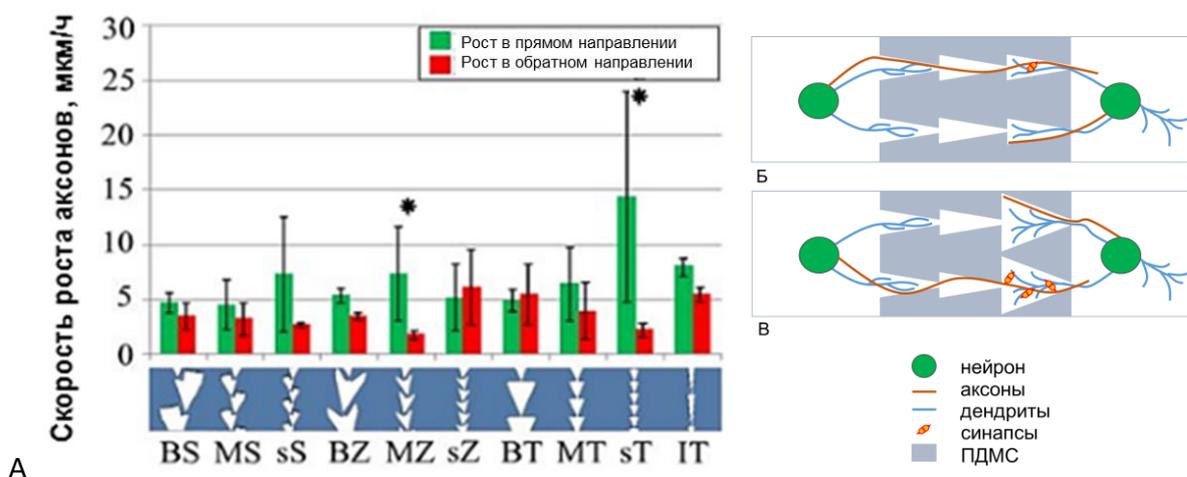


Рисунок 3 – А - характеристики роста аксонов для различных типов микроканалов: скорости роста в прямом и обратном направлении, измеренные при прорастании аксона через один сегмент ($n = 6$ культур, 121 сегмент); * - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$ (Среднее \pm Среднеквадратическое отклонение); Б - схема конфигурации микроканала, состоящего из нескольких одинаковых сегментов; В – схема «асимметричного» микроканала

Иммуноцитохимическое исследование отростков нейронов в каналах (рис. 4) выявило наличие аксонов на протяжении всей длины микроканала и дендритов преимущественно в первых сегментах микроканала (средняя длина дендритов 231 ± 76 мкм).

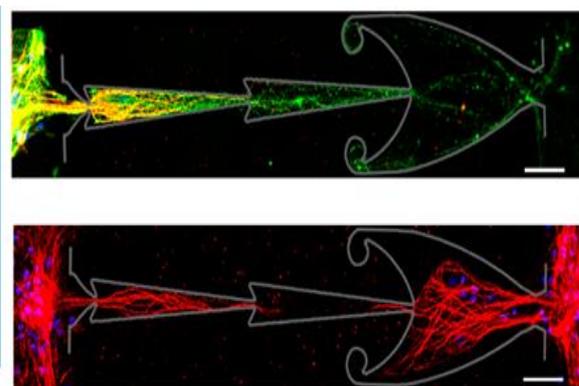


Рисунок 4 – Флуоресцентные изображения нейронов нейросети-Источника и нейритов в асимметричных микроканалах. Нейроны и их аксоны в микроканалах визуализированы маркированием $\beta 3$ -tubulin (зеленый), дендриты Map2 (красный) специфическими антителами, соответственно. Сомы клеток визуализированы ДНК-связывающим красителем DAPI. Масштаб 50 мкм

Как возбуждающие, так и тормозные синапсы формировались в местах соединения дендритов нейросети-Приемника и аксонов нейросети-Источника в сегменте микроканалов, примыкающих к камере нейросети-Приемника.

2. Оценка направленности функциональных связей между локальными сетями в модульной нейронной сети

Функциональные характеристики эффективности связи между локальными нейронными сетями оценивались через коэффициент направленности для сетевых пачек нейросети-Источника, инициирующих пачку в нейросети-Приемнике (R_{ST}) и коэффициент направленности для сетевых пачек нейросети-Приемника, инициирующих пачку в нейросети-Источнике (R_{TS}) (см. Методы). Высокие значения R_{ST} и низкие R_{TS} определяли структуру модульной сети с эффективной однонаправленной межмодульной связью.

Регистрация биоэлектрической активности культур с помощью МЭА проводилась с 10 по 25-й день развития каждые 5 дней. Характерная для первичных культур мозга спонтанная пачечная активность нейронных сетей наблюдалась в каждой локальной сети начиная с 10-го дня развития. Была проведена оценка процента сетевых пачек, генерируемых в нейросети-Источнике, которые распространялись по аксонам и вызывали пачку в нейросети-Приемнике (рис. 5), и наоборот – оценка процента пачек нейросети-Приемника, вызывающих пачки в нейросети-Источнике.

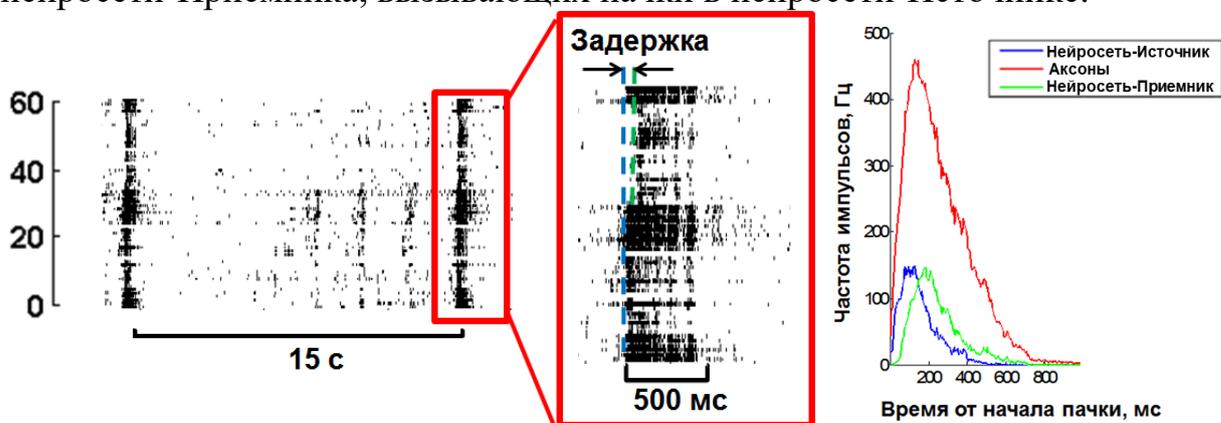


Рисунок 5 – Растровая диаграмма импульсной активности нейросети-Источника и Приемника в чипе с асимметричными каналами. Пачки, возникающие в нейросети-Источнике, распространяются через аксоны в микроканалах и вызывают пачку в нейросети-Приемнике

В нейронных сетях, сформированных как микроканалами симметричного, так и асимметричного типа коэффициент направленности прямой связи R_{ST} был выше, чем коэффициент направленности обратной связи R_{TS} . Значимых различий в коэффициенте R_{ST} для двух видов соединений не наблюдалось на все дни развития (рис. 6, А). Однако

коэффициент направленности связей от нейросети-Приемника к Источнику R_{TS} на 20 и 25 дни развития был достоверно меньше для локальных сетей, связанных посредством только асимметричных микроканалов (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$) (рис. 6, Б). Таким образом, эффективная однонаправленность функциональной связи между двумя локальными сетями обеспечивалась с помощью асимметричных микроканалов.

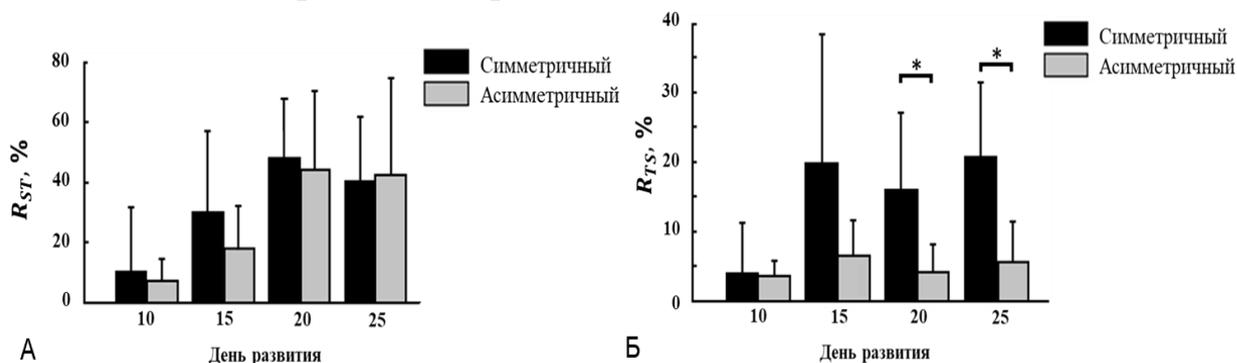


Рисунок 6 - Коэффициент направленности межсетевой связи для симметричных (черные столбцы) и асимметричных (серые столбцы) микроканалов: А - в направлении от нейросети-Источника к Приемнику; Б - в направлении от нейросети-Приемника к Источнику; * - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$)

3. Влияние спонтанной биоэлектрической активности в локальных нейросетях на межсетевое взаимодействие

При изучении биоэлектрической активности нейронов в локальных нейронных сетях первичных культур было выявлено два типа характерной спонтанной пачечной активности локальных сетей на основе распределения числа импульсов в сетевой пачке и длительности пачки. К 1-му типу была отнесена активность, содержащая кластер «крупных» пачек, ко 2-му типу - активность, не содержащая такого кластера. При наличии условий окружающей среды, обеспечивающих однонаправленность распространения импульсов из одной локальной сети в другую, в случае активности 1-типа коэффициент направленности связи R_{ST} составлял более 15% в 87% случаях. Напротив, в нейросетях с активностью 2-го типа, коэффициент направленности связи всегда был менее 15% (рис. 7, А). Медианное значение R_{ST} составило 27% ($n = 8$) для 1 типа активности и 7% ($n = 6$) для 2 типа активности (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) (рис. 7, Б).

Для каждого типа активности наблюдались различия во временных задержках внутри и между нейросетями (рис.6, Б), отражающие разделение внутри- и межсетевой обработки информации (Wang et al., 2021). Исследование связей между участками нейрональных сетей показало, что нейронные сети с активностью 1-го типа, содержащие крупные пачки, характеризуются более сильными связями (рис. 8, А) и взаимодействиями на

больших задержках, чем нейронные сети с активностью без крупных пачек (рис. 8, Б).

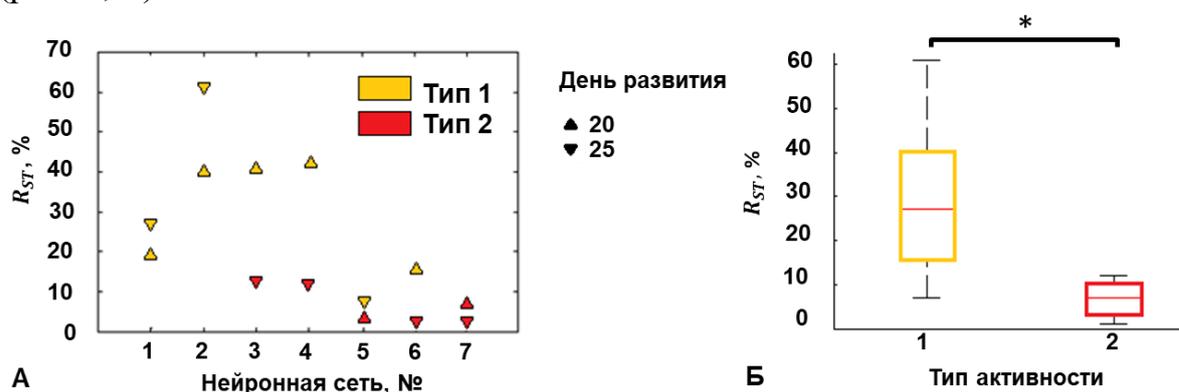


Рисунок 7 - Коэффициент направленности связи (R_{ST}) нейронных сетей различных типов *in vitro*: А – для отдельных нейронных сетей; Б – усредненный по всем нейронным сетям; * - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

Т.е., можно предположить, что модульные нейронные сети 1-го типа характеризуются множественными полисинаптическими связями, а 2 типа - связями с меньшим числом синапсов.

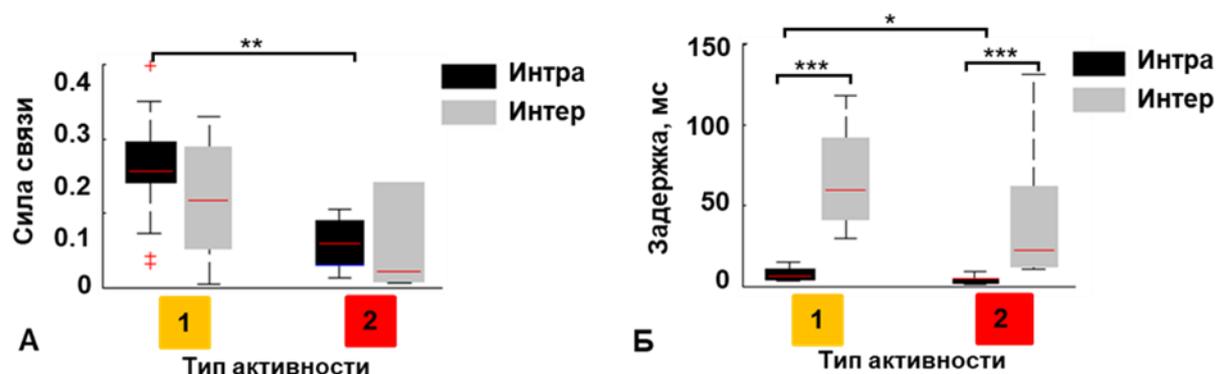


Рисунок 8 - Характеристика связей между участками нейронной сети *in vitro* для 1 и 2 типа активности: А – Сила связей внутри нейросетей и между нейросетями; Б – Задержка распространения импульсов внутри нейросетей и между нейросетями; * - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$; ** - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, $p < 0,01$; *** - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, $p < 0,001$

Таким образом, эффективность взаимодействий между локальными сетями в составе сложной модульной нейронной сети определялась не только морфологически сформированной однонаправленной связью, но и наличием биоэлектрической сложной активности локальных сетей в виде «крупных» пачек.

4. Функциональные изменения в нейросети-Приемнике, развивающейся под влиянием активности нейросети-Источника

Локальная аппликация антагонистов глутаматных рецепторов CPP и CNQX в камеру к нейросети-Источнику приводила к подавлению спонтанной пачечной активности в данной сети и к изменению спонтанной активности в нейросети-Приемнике, что выражалось в уменьшении продолжительности сетевых пачек (рис. 9, А) и числа импульсов в пачках (рис. 9, Б), а также уменьшении интервалов между пачками. Сравнение матрицы связности собственных сетевых пачек с пачками в двух последовательных записях активности после аппликации CPP + CNQX с помощью меры евклидова расстояния показало, что сила связи в нейросети-Приемнике значительно изменилась после подавления активности нейросети-Источника, что указывало на наличие функциональной реорганизации нейросети-Приемника под действием импульсов нейросети-Источника (рис. 9, В, Г).

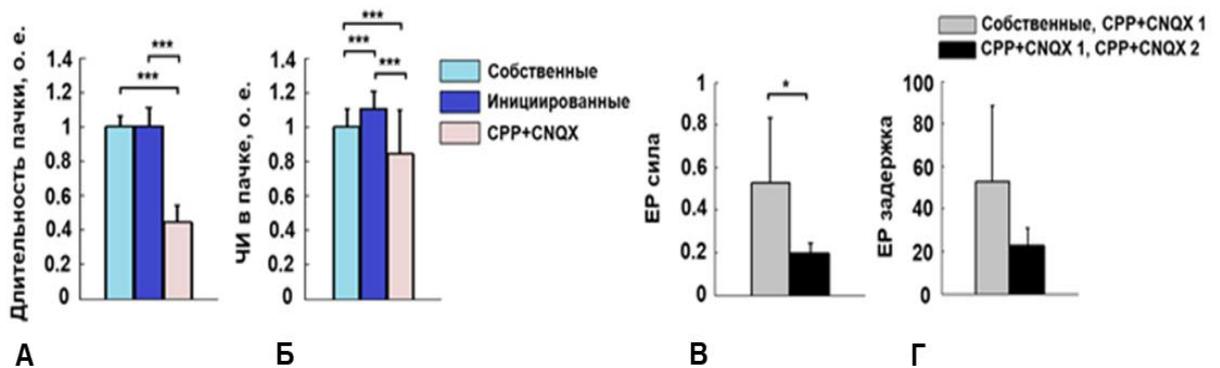


Рисунок 9 - Спонтанная активность в нейросети-Приемнике до и после подавления возбуждающей синаптической активности в нейросети-Источнике. А-Б – Длительность пачек и частота импульсов в собственных крупных пачках, инициированных крупных пачках в контрольных условиях и крупных пачках при подавлении возбуждающей синаптической активности в нейросети-Источнике (медиана \pm медианное отклонение, $n = 6$ экспериментов, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, *** $p < 0,001$). В, Г – Изменения функциональной связи, выраженные через евклидово расстояние в силе связи и задержках связи. Связность сравнивалась между двумя наборами крупных пачек (собственные, CPP + CNQX 1) и (CPP + CNQX 1, CPP + CNQX 2) (медиана \pm медианное отклонение, $n = 6$, критерий суммы рангов Уилкоксона, * $p < 0,05$)

Подтверждением гипотезы о функциональном изменении нейросети-Приемника при постоянной обработке информации, поступающей из нейросети-Источника, явились результаты иммуноцитохимического исследования клеточного состава сетей: соотношения различных типов нейронов и глии оставались неизменными, в тоже время было выявлено меньшее количество тормозных ГАМК-эргических синапсов в нейросети-Приемнике по сравнению с нейросетью-Источником независимо от типа биоэлектрической активности (рис. 10).

Таким образом, принимающая нейронная сеть в составе модульной сети независимо от типа биоэлектрической активности демонстрировала изменение своей функциональной активности при формировании вызванных ответов на импульсы, приходящие из нейросети-Источника за счет снижения количества тормозных синапсов. Вероятно, что подобные функциональные перестройки в нейронной сети Приемнике под влиянием внешней активности, способствовали оптимальному режиму взаимодействия однонаправленно связанных локальных сетей в модульной нейронной сети при обработке и передаче информации.

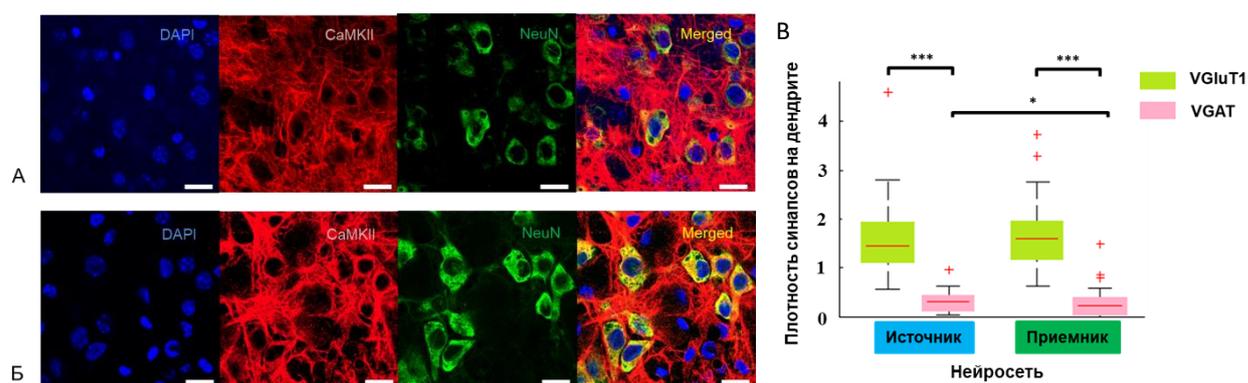


Рисунок 10 – Флуоресцентные изображения клеток в камере чипа. Нейроны визуализированы маркированием NeuN (зеленый), возбуждающие нейроны визуализированы маркированием ядер клеток NeuN (зеленый) и CaMKII (красный) специфическими антителами. Ядра всех клеток визуализированы ДНК-связывающим красителем DAPI. А – культура клеток в нейросети-Источнике; Б - культура клеток в нейросети-Приемнике. Масштаб 20 мкм; В - число VGluT1- и VGAT-терминалей на дендритах в нейросетях Источник и Приемник на 21 DIV (n = 7 сетей, 82 дендрита); * - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$; *** - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, $p < 0,001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе с использованием методов микрофлюидики и мультиэлектродной регистрации внеклеточных потенциалов был разработан экспериментальный метод изучения на клеточном уровне физиологических механизмов обработки информации в однонаправленно связанных нейронных сетях *in vitro*, исследованы морфологическая и функциональная связность между локальными сетями и влияние собственной биоэлектрической активности нейросети на силу межсетевое взаимодействие.

Было продемонстрировано, что при формировании модульных нейронных сетей с направленными межмодульными связями *in vitro* направленный рост аксонов мог регулироваться структурными параметрами

окружающей среды, которые обеспечивали быстрый и направленный рост аксонов за счет сужения направляющих поверхностей, замедления роста аксонов с помощью сужений на пути роста, а также наличием отводящих структур (ловушек). Управление навигацией аксона было возможно в пределах угла 45 градусов относительно оси роста.

С учетом оценки навигации аксонов по введенным критериям был создан микрофлюидный чип с микроканалами асимметричной формы, состоящими из двух типов сегментов, обеспечивающих быстрый рост аксонов в прямом направлении и ограничение роста аксонов в обратном направлении.

Морфологическая связность локальных сетей в составе модульной сети *in vitro* была подтверждена иммуноцитохимическими исследованиями отростков нейронов в каналах, которые показали наличие аксонов в канале на протяжении всей его длины, а дендритов преимущественно в первых сегментах микроканала. Синапсы формировались уже в местах соединения дендритов нейронов нейросети-Приемника и аксонов нейронов нейросети-Источника в сегментах микроканалов, примыкающих к камере нейросети-Приемника. Функциональная связность локальных нейросетей была подтверждена путем оценки коэффициента направленности связей от нейросети Источника к Приемнику и в направлении от нейросети Приемника к Источнику. Электрофизиологическими исследованиями было показано, что наличие в спонтанной биоэлектрической активности нейросети-Источника кластера крупных сетевых пачек (суперпачек) в первый месяц развития первичной культуры клеток гиппокампа мышей является важным фактором, повышающим межсетевую связность, и, наоборот, отсутствие крупных сетевых пачек снижает межсетевую функциональную связность в модульной сети, что может привести к нарушению передачи информации между локальными сетями.

Исследование внутренних функциональных связей между участками нейрональных сетей в локальных нейросетях показало, что нейронные сети с активностью 1-го типа, содержащей крупные сетевые пачки, характеризовались взаимодействиями большей силы и на больших задержках, чем нейронные сети с активностью 2-го типа без крупных пачек. Наличие однонаправленной связи между локальными сетями и сила связи внутри локальных сетей определяли эффективность их взаимодействия в модульной нейронной сети.

Применение фармакологического подхода с помощью антагонистов возбуждающих синапсов для изучения механизмов влияния импульсов одной локальной сети на активность другой локальной сети в составе общей модульной нейронной сети с направленными межмодульными связями

выявило, что постоянное воздействие спонтанных импульсов нейросети-Источника на нейросеть-Приемник вызывало не только появление вызванных пачек в нейросети-Приемнике, но и изменение функциональных характеристик за счет снижения количества тормозных синапсов в нейросети-Приемнике при отсутствии изменений в соотношении возбуждающих и тормозных нейронов, глиальных клеток и возбуждающих синапсов.

ВЫВОДЫ

1. Разработан экспериментальный метод для изучения механизмов работы модульной нейронной сети с направленными межмодульными связями *in vitro*, который состоит в использовании микрофлюидного чипа с системой мультиэлектродной регистрации биоэлектрической активности однонаправленно связанных нейронных сетей в составе первичных культур клеток гиппокампа;

2. Управление навигацией и скоростью роста аксона в эксперименте *in vitro* возможно с использованием направляющих структур, расположенных в пределах угла 45 градусов относительно оси роста;

3. Эффективность обработки и передачи импульсов в модульной нейронной сети *in vitro* обеспечивается не только морфологически сформированной однонаправленной связью, но и структурой паттерна биоэлектрической активности локальных сетей в виде крупных сетевых пачек;

4. Функциональные перестройки в нейросети-Приемнике в составе модульной нейронной сети с направленными межмодульными связями *in vitro* обусловлены снижением количества тормозных синапсов на 24% относительно количества тормозных синапсов в нейросети-Источнике при отсутствии изменений в соотношениях возбуждающих и тормозных нейронов, нейронов и глиальных клеток, а также в количестве возбуждающих синапсов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Gladkov, A. Investigating Mechanisms of Axon Navigation Using Microfluidic Methods / A. Gladkov, Y. Pigareva, O. Antipova, V. Kolpakov, V. Tarabykin, A. Pimashkin // OM&P. – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 1-6.

Статьи в журналах, индексируемые в Scopus и WoS:

1. Shimba, K. Functional Scaffolding for Brain Implants: Engineered Neuronal Network by Microfabrication and iPSC Technology / K. Shimba, C. Chang, T. Asahina, F. Moriya, K. Kotani, Y. Jimbo, A. Gladkov, O. Antipova, Y. Pigareva, V.N. Kolpakov, I. Mukhina, V.B. Kazantsev and A. Pimashkin // *Frontiers in neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 890.

2. **Pigareva, Y.** Experimental Platform to Study Spiking Pattern Propagation in Modular Networks In Vitro / **Y. Pigareva**, A. Gladkov, V. Kolpakov, I. Mukhina, A. Bukatin, V.B. Kazantsev, A. Pimashkin // *Brain Sci.* – 2021. – Vol. 11– P. 717.

Тезисы:

1. Pimashkin, A. Design of synaptic connectivity and cell patterns in dissociated neuronal cultures using microfluidics and microelectrode arrays / A. Pimashkin, **Y. Pigareva**, L. Lepekhina, E. Malishev, A. Bukatin, M. Dubina, V. Kazantsev, I. Mukhina / *ICSLANE15: NETT International Conference on System Level Approaches to Neural Engineering*. Barcelona, Spain, 21-23 September, 2015.

2. **Pigareva, Y.** Growing unidirectional synaptic architecture in dissociated neuronal cultures using microfluidic methods. / **Y. Pigareva**, A. Gladkov, V. Kolpakov, E. Malishev, V. Kazantsev, I. Mukhina, A. Pimashkin // *Frontiers in Biomedicine*. Nizhny Novgorod, Russia, 11–13 November. – P. 16.

3. **Pigareva, Y.** Unidirectional axon growth in microchannels of various shapes / **Y. Pigareva**, A. Gladkov, V. Kolpakov, A. Pimashkin, A. Bukatin, E. Malishev, I. Mukhina, V. Kazantsev // *Proceedings of Volga Neuroscience Meeting 2016*. Saint-Petersburg, 24-30 July, 2016. — P. 118-119.

4. **Пигарева, Я.И.** Микрофлюидные системы для доклинического тестирования ноотропных препаратов на нейрональных культурах / **Я.И. Пигарева** // III Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего – наука молодых». Нижний Новгород, 12 – 14 сентября 2017. — С. 270.

5. Пигарева Я.И. Формирование функциональных связей в нейрональной культуре под влиянием хронической электрической стимуляции/ Пигарева Я.И., Гладков А.А., Колпаков В.Н., Антипова О.О., Мухина И.В., Казанцев В.Б., Пимашкин А.С.// Конференция «Гиппокамп и память: норма и патология». Пущино, 25-29 июня, 2018. — С. 26 - 27

6. **Pigareva, Y.** Heterogeneous Architecture of Neural Networks in Vitro with Precise Unidirectional Synaptic Connectivity / **Y. Pigareva**, A. Bukatin, V. Kazantsev, A. Gladkov, V. Kolpakov, A. Pimashkin, O. Antipova, I. Mukhina // *12th International Conference on Developments in eSystems Engineering (DeSE)*. Kazan, Russia, 7–10 October, 2019. — P. 545-548.

7. **Pigareva Y.** Study of spontaneous bioelectrical activity of two hierarchically connected neural networks in vitro / **Y. Pigareva**, O. Grinchuk, A. Gladkov, V. Kolpakov, A. Bukatin, V. Kazantsev, I. Mukhina, A. Pimashkin// the 7th International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2020", 27-30 April, 2020. — P. 525-526.

8. Gladkov, A. Bursting activity interplay in modular neural networks in vitro / A. Gladkov, **Y. Pigareva**, V. Kolpakov, I. Mukhina, A. Bukatin, V. Kazantsev, A. Pimashkin // 2021 Third International Conference Neurotechnologies and Neurointerfaces (CNN). Kaliningrad, Russia, 13-15 September, 2021. — P. 23-25.

9. Пигарева, Я.И. Динамика импульсной активности определяет эффективность межмодульной связи в модульных сетях in vitro / Я.И. Пигарева, А.А. Гладков, В.Н. Колпаков, А.С. Букатин, М.С. Землянсков, В.Б. Казанцев, А.С. Пимашкин, И.В. Мухина // VII СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ. Краснодар, 17-23 апреля, 2023. — С. 171-172.

Охраняемые РИД:

Патент на изобретение RU 2729814 С1. Устройство для создания направленной связи между популяциями нейрональных клеток. А.С. Пимашкин, А.А. Гладков, Я.И. Пигарева, В.Н. Колпаков, О.О. Антипова, А.С. Букатин. Опубликовано: 12.08.2020 Бюл. №. 23. Заявка: №2019145459 от 27.12.2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BS - сегменты типа "Зазубрины" длиной 200 мкм

BSA – bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин

BT - сегменты типа "Треугольник" длиной 200 мкм

BZ - сегменты типа "Зигзаг" длиной 200 мкм

IT - узкие сегменты типа "Треугольник" длиной 200 мкм

MS - сегменты типа "Зазубрины" длиной 100 мкм

MT - сегменты типа "Треугольник" длиной 100 мкм

MZ - сегменты типа "Зигзаг" длиной 100 мкм

R_{ST} - коэффициент направленности связи от нейросети Источника к Приемнику

R_{TS} - коэффициент направленности связи от нейросети Приемника к Источнику

sS - сегменты типа "Зазубрины" длиной 70 мкм

sT - сегменты типа "Треугольник" длиной 66 мкм

sZ - сегменты типа "Зигзаг" длиной 70 мкм

MEA - микроэлектродная матрица

ПДМС - полидиметилсилоксан