

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО»

*На правах рукописи*

**ПИГАРЕВА ЯНА ИГОРЕВНА**

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

Специальность – 1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., проф. И.В. Мухина

Нижний Новгород – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	16
1.1 Нейронные сети первичной культуры клеток мозга как модель сетей мозга <i>in vitro</i> .....	16
1.1.1 Экспериментальные модели для изучения функциональных характеристик нейронных сетей .....	17
1.1.2 Нейронные сети <i>in vitro</i> .....	19
1.1.2 Общие принципы организации структуры функциональных нейронных сетей .....	20
1.2 Нейроинженерные подходы к конструированию сложных нейронных сетей <i>in vitro</i> .....	22
1.2.1 Литографические методы .....	23
1.2.2 Микроструктурные методы .....	24
1.2.3 Трехмерные конструкции .....	26
1.3 Модуляция направленного роста аксона в нейронных сетях.....	27
1.3.1 Конус роста и принципы навигации аксона.....	27
1.3.2 Сигналы, направляющие рост аксона <i>in vivo</i> .....	29
1.3.3 Модуляция навигации аксона <i>in vitro</i> .....	30
1.3.3.1 Физико-химические методы модуляции навигации аксонов.....	31
1.3.3.2 Электрические и оптические методы модуляции навигации аксонов .....	33
1.3.3.3 Микроструктурные методы модуляции навигации аксонов.....	34
1.4 Функциональные свойства сложных нейронных сетей <i>in vitro</i> .....	37
1.4.1 Интеграция и дифференциация активности.....	37
1.4.2 Направленность связей между нейронными сетями.....	39
1.4.3 Эффективность связности подсетей и общая динамика сети .....	40
1.4.4 Роль пачечной активности в эффективности передачи информации в нейронных сетях .....	41
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1 Объект исследования.....	44

2.2	Схема исследования.....	44
2.3	Культивирование диссоциированных нейрональных культур с направленной архитектурой связей .....	45
2.3.1	Разработка конфигураций микрофлюидных чипов .....	45
2.3.2	Изготовление микрофлюидных чипов .....	47
2.3.3	Изготовление двухслойных ПДМС чипов, разделяющих питательную среду в нейросетях .....	49
2.3.4	Культивирование диссоциированных клеток гиппокампа эмбрионов мышей .....	51
2.4	Протоколы экспериментов с фармакологической блокадой активности нейросети-Источника .....	53
2.5	Регистрация и анализ внеклеточных потенциалов нейронов в первичной культуре гиппокампа .....	54
2.5.1	Детектирование импульсов.....	55
2.5.2	Детектирование пачек импульсов .....	56
2.5.3	Кластеризация пачек импульсов .....	56
2.5.4	Функциональный показатель однонаправленности межмодульных связей.....	57
2.5.5	Сравнение временных задержек с набором суррогатных данных методом Монте-Карло .....	59
2.5.6	Характеристики кросс-корреляции последовательностей импульсов .....	60
2.5.7	Анализ активности модульной нейронной сети с однонаправленными межмодульными связями после блокады потенциал-зависимых натриевых каналов в нейросети-Источнике.....	61
2.5.8	Анализ активности модульной нейронной сети с однонаправленными межмодульными связями после блокады глутаматных рецепторов в нейросети-Источнике.....	61
2.6	Методы исследования навигации аксонов в каналах.....	63
2.7	Иммуноцитохимические методы исследования .....	64
2.8	Статистический анализ экспериментальных данных.....	66
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....		68

3.1 Конструирование однонаправленной связи между двумя нейронными сетями <i>in vitro</i> .....	68
3.1.1 Влияние структуры направляющих путей на функцию направленного роста аксонов .....	71
3.1.2 Анализ особенностей морфологии аксонов и дендритов, растущих в микрофлюидных каналах .....	79
3.1.3 Обсуждение полученных результатов .....	82
3.2 Оценка направленности функциональных связей между локальными сетями в модульных нейронных сетях .....	84
3.2.1 Эффективность однонаправленной функциональной связи между нейросетями Источник и Приемник в симметричных каналах .....	84
3.2.2 Эффективность однонаправленной функциональной связи между нейросетями Источник и Приемник в асимметричных каналах .....	89
3.2.3 Особенности распространения импульсов по аксонам в микрофлюидных микроканалах .....	92
3.2.3 Обсуждение полученных результатов .....	98
3.3 Влияние спонтанной активности в направленно связанных подсетях на их взаимодействие .....	101
3.3.1 Типы спонтанной активности в модели однонаправленно связанных нейронных сетей <i>in vitro</i> .....	102
3.3.2 Коэффициент эффективности межсетевой связи в зависимости от типа спонтанной активности нейронных сетей .....	107
3.3.3 Сила связей между нейронами внутри подсетей и между подсетями модульной сети в зависимости от типа активности .....	111
3.3.4 Обсуждение полученных результатов .....	113
3.4 Функциональные изменения в нейросети-Приемнике, развивающейся под влиянием активности нейросети-Источника .....	116
3.4.1 Оценка изолированности культуральной среды в двухслойном биочипе .....	116
3.4.2 Сетевая активность в нейросети-Приемнике при подавлении возбуждающей синаптической передачи в нейросети-Источнике .....	117
3.4.3 Соотношение возбуждающих/тормозных нейронов и синапсов в модульной нейронной сети с однонаправленными межмодульными связями .....	120

3.4.4 Обсуждение полученных результатов .....	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	127
ВЫВОДЫ.....	131
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	132

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- BDNF - brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга
- 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
- NGF - nerve growth factor, фактор роста нервов
- PBS - phosphate buffered saline, фосфатный забуференный физиологический раствор
- PLA - полилактидный пластик
- PLL-g-PEG - poly(L-lysine)-graft-poly(ethyleneglycol), поли-л-лизин-графт-полиэтилен гликоль
- $R_{ST}$  - 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
- TiN - нитрид титана
- TSR – total spike rate, совокупная частота импульсов
- TTX - тетродотоксин
- MEA - микроэлектродная матрица
- ПДМС - полидиметилсилоксан
- ПЛЛ - поли-л-лизин

УФ - ультрафиолет

Ф-ПЛЛ - изотиоцианатомфлуоресцеина поли-л-лизин

ЦНС - центральная нервная система

ЧИ - число импульсов

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 (Brofiğa 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*.

Данная цель исследования предполагала решение следующих задач:

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**

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.

### **Предмет исследования**

Локальные нейронные сети (подсети) первичных культур клеток эмбрионального гиппокампа мышей (E18), длительно в течение 1,5 месяцев культивируемых на микрофлюидных чипах, совмещенных с микроэлектродными матрицами.

### **Методы и методики 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.

#### **На защиту выносятся следующие положения**

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.

#### **Теоретическая значимость работы**

Для физиологии нейронных сетей мозга представляются значимыми полученные в работе данные 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.

### **Практическая значимость работы**

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.

### **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).

#### **Личный вклад автора в получении научных результатов.**

При непосредственном участии автора был разработан дизайн диссертационного исследования, проведены эксперименты, обработка и интерпретация исходных данных, были выполнены статистический анализ и сравнительное описание результатов. Также 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.

## ГЛАВА 1. Обзор литературы

### 1.1 Нейронные сети первичной культуры клеток мозга как модель сетей мозга *in vitro*

Понимание функций мозга, возникающих в результате взаимодействия большого числа нейрональных элементов, является одной из основных проблем современной нейробиологии (Voytek, 2015; Batista-García-Ramó et al., 2018; Vidaurre et al., 2018). Как и многие сложные системы, мозг демонстрирует широкий спектр моделей динамической активности и связности, которые способствуют интеграции и обработке информации в процессе поведения и познания. Несмотря на то, что множество работ было посвящено изучению сложной организации структурных и функциональных сетей мозга (Petersen, Sporns, 2015; Suárez et al, 2020; Ito et al, 2020) связь топологии и информационной обработки все еще недостаточно понятна.

Динамику взаимодействия элементов нейронных сетей можно представить в контексте структурных и функциональных связей. Структурные связи (коннектом) отражают анатомические отношения между нейрональными элементами, другими словами, синаптические связи и проекции межрегиональных связей. Функциональные связи представляет набор парных статистических зависимостей между нейрофизиологическими сигналами, зарегистрированными от отдельных нейрональных элементов. Хотя многочисленные исследования подтвердили сходство конфигурации структурных и функциональных связей, отношения между ними не тривиальны. Структурные связи образуют «скелет», который ограничивает поток нейронных сигналов. Те или иные подмножества структурных связей задействуются в зависимости от времени и состояния сети. Внешняя стимуляция или собственные спонтанные колебания активности приводят к активизации разнообразных подмножеств функциональных связей. Динамика взаимодействия объединяет структурные и функциональные связи и имеет

фундаментальное значение для исследований способностей мозга к эффективной интеграции и разделению информации (Kirst et al., 2017; Wang et al., 2021; Chang et al., 2023) устойчивости к повреждениям (Avena-Koenigsberger et al., 2017) способности к адаптации и самоорганизации под влиянием внешних факторов (Fong et al., 2019; Hilger et al., 2020; Harry et al., 2023).

Исследование взаимосвязи структуры и функции является сложной задачей, особенно в свете модульной и иерархической организации мозга (Puxeddu et al., 2020; Raut et al., 2020; Fan et al., 2023). Трудоемкость таких исследований неповрежденной нервной ткани связана с ее чрезвычайно сложной структурой. Нейронные сети *in vivo* сложно выделить из-за множественных путей активации. Несмотря на недавние достижения в электрофизиологии, визуализации и доставке химических веществ, доступность конкретных цепей *in vivo* для визуализации, записи и манипуляции все еще ограничена, а карты связности нейронов *in vivo* практически не отслеживаются в трехмерной архитектуре. В связи с этим необходимы альтернативные методы исследования взаимосвязи морфологии и активности нейронных сетей.

### **1.1.1 Экспериментальные модели для изучения функциональных характеристик нейронных сетей**

Существует три основных подхода к созданию моделей нейронных сетей *in vitro*. Первый основан на использовании срезов мозга, обычно получаемых от крыс или мышей. Преимущество его состоит в сохранении исходных морфологических связей внутри выбранного среза (например, между отделами гиппокампа или кортикально-гиппокампальные связи). Однако, потеря внешних нейронных связей приводит к изменению спонтанной активности изолированных тканей. Толщина среза ограничена необходимостью доставки питательных веществ к клеткам в глубине слоя,

обычно максимальная толщина составляет 500 мкм. Срезы большей толщины могут оставаться живыми только в течение нескольких часов.

Второй подход использует целостную ткань – так называемые органоиды головного мозга. Органоиды мозга, полученные из плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSC) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), представляют собой перспективный подход для изучения заболеваний человеческого мозга. Методы перепрограммирования hiPSC позволяют получать органоиды из клеток пациентов, благодаря чему органоиды являются доклинической платформой для преодоления трансляционного разрыва между моделями на животных и клиническими испытаниями на людях (Chiaradia, Lancaster, 2020). Органоиды головного мозга, однако, лучше подходят для использования в тканевой инженерии и фармакологических исследованиях, чем в исследовании сетевых свойств. Сложность структуры самоорганизующейся ткани не позволяет обеспечить повторяемость экспериментов. Кроме того, поддержание органоидов мозга в течение длительного времени – непростая задача вследствие апоптотических процессов с внутренней стороны органоида вследствие недостатка питательных веществ и кислорода (Jalink, Caiazzo, 2021).

Третий подход для создания моделей нейронных сетей использует диссоциированные нейроны, обычно извлекаемых из эмбрионального или постнатального мозга крыс или мышей или из дифференцированных hiPSC, культивируемых на чипах. Большим преимуществом подхода является возможность контролировать структуру нейронных сетей, регистрировать активность с высоким временным и пространственным разрешением в течение нескольких месяцев. Особенно ценным инструментом для исследования динамики таких сетей являются встроенные в подложку матрицы микроэлектродов (MEA) для двунаправленной записи и стимуляции нейронов (Massobrio et al., 2015; Obien et al., 2019; Hong et al., 2020).

### 1.1.2 Нейронные сети *in vitro*

Классическим решением проблемы доступности нейронных сетей для изучения является использование культур нейрональных клеток *in vitro*. Для их получения нервная ткань извлекается из мозга, диссоциируется, культивируется и детально изучается *in vitro*. В нейронных сетях *in vitro* образуются функциональные, спонтанно активные нейронные группы. Они широко используются для изучения основ нейронных вычислений, включая пластичность отдельных нейронов и нейронных сетей (Poli et al., 2018; Kronberg et al., 2020; Jenks et al., 2021), нейрофармакологию (Bruno et al., 2020; Pelkonen et al., 2020; Eaton et al., 2021), разработку биосенсоров (Yang et al., 2019; Tanwar et al., 2022; Cecen et al., 2023). До недавнего времени было невозможно заранее определять топологию нейронных сетей *in vitro*, чтобы конструировать экспериментальные модели с заданными функциональными связями, которыми можно манипулировать и изучать. В последние годы появилось множество технологий, основанных на микроэлектромеханических системах, позволяющих «проектировать» рост нейронов и создавать нейронные сети с различной топологией. Эти технологии привели к ряду достижений в направлении более совершенных моделей нейронных архитектур, воссозданных в системах *in vitro* (Hasan, Berdichevsky, 2016; Na et al., 2016; Forró et al., 2018; Pelkonen et al., 2020; Brofiga et al., 2021).

Синаптическую связность и силу обычно оценивают с помощью парной внутриклеточной регистрации потенциалов пре- и постсинаптических клеток, однако этот метод сложно использовать *in vivo*, особенно в глубоких структурах мозга. Альтернативный подход заключается в многоэлектродной внеклеточной регистрации, позволяющей одновременно записывать активность сотен нейронов.

Развивающиеся нейронные сети *in vitro* характеризуются спонтанной активностью, которая наблюдается в культурах нейронов коры, гиппокампа и

других областей мозга и регистрируется как электрофизическими, так и оптическими методами измерения. Параметры спонтанной активности зависят от возраста нейрональной культуры. На 4-7 дни развития активность представляет собой некоррелированные импульсы, регистрируемые с отдельных клеток, на более поздние дни активность включает как единичные импульсы, так и пачки импульсов (Cabrer-Garcia et al., 2021). Синхронная пачечная активность появляется на 9-12 день и к 22–33 дням представляет собой сложную непериодическую синхронизированную активность с включением единичных импульсов между пачками. Такая активность остается в культуре на протяжении месяцев и, таким образом, характеризует зрелое состояние сети. По мере развития нейронной сети частота и скорость распространения пачек импульсов возрастает (от 0,01 до 0,5 Гц и от 5 до 100 мм/с соответственно (Maeda et al., 1995)). Спонтанная активность сети, включающая как единичные импульсы, так и пачки импульсов, коррелирует с развитием синаптических связей (Reinartz, 2019). С помощью электронной микроскопии было показано увеличение числа зрелых синапсов примерно в период с 5 до 25 дня развития. Это отражается в увеличении частоты пачечной активности сети. Начиная с четвертой недели развития и на протяжении примерно 40 дней происходит общее снижение числа синапсов, а функциональная структура сети характеризуется сложной непериодической синхронизированной пачечной активностью.

### **1.1.2 Общие принципы организации структуры функциональных нейронных сетей**

Применение теории сложных сетей позволяет исследовать общие принципы организации, характерные для нервных систем. Некоторые особенности организации нейронных сетей мозга обнаружены в множестве небиологических сложных сетей. К таким свойствам относятся относительно малая длина соединений, высокий коэффициент кластеризации и

модульность. Общие свойства архитектуры таких сетей говорят о наличии неких универсальных критериев отбора при формировании, таких как высокая эффективность передачи информации и малые затраты на формирование соединений.

В общем смысле модульность – это подразделение сложного объекта на более простые объекты, которое определяется структурой или функцией объекта и его частей. В рамках сетевой теории модульность описывает такую структуру сети, которая включает плотно связанные между собой подмножества узлов, которые слабо связаны с узлами в других модулях.

Нейронные сети модульного типа могут развиваться в условиях изменяющейся внешней среды путем изменения отдельных подсетей без риска потери функций в остальных, уже адаптированных, подсетях. Надежность нейронных сетей, состоящих из нескольких подсетей, представляет важное преимущество и это может объяснить широкое распространение модульных архитектур в очень широком диапазоне систем обработки информации.

Считается, что такая сложная организация сети влияет на динамические и функциональные свойства нейронной активности и является критичной для когнитивных способностей. Высокая кластеризация связей между нейронами в одной подсети способствует локальной обработке специализированных функций, таких как визуальное обнаружение движения, в то время как короткая длина связей позволяет поддерживать глобально интегрированную обработку более общих функций, таких как рабочая память (Wang et al., 2021).

В таких системах существуют быстрые внутрисетевые и медленные межсетевые временные процессы (Liang, 2022), высокая динамическая сложность (Badcock et al., 2019) из-за сосуществования сегрегированной и интегрированной активности (Puxeddu et al., 2020; Wang et al., 2021) и переходные «химерные» состояния (Chouzouris et al., 2018; Liu et al., 2022), при которых синхронизация и десинхронизация сосуществуют в сети.

Теоретические исследования показали, что модульная архитектура обеспечивает эффективность обработки информации в сети (Toker et al., 2019). Во-первых, благодаря разделению во времени быстрой внутрисетевой и медленной межсетевой обработки (Forró et al., 2018), во-вторых, благодаря поддержке баланса интегрированной и сегрегированной активности (Wang et al., 2021; Chang et al., 2023). Указанные функции влияют на синхронизацию сети во времени и пространстве и способствуют динамической сложности активности сети (Okujeni S. et al., 2019). Кроме того, локальные сети характеризуются короткими расстояниями между нейронами в сети, и, как следствие, низкими затратами на создание связей.

## **1.2 Нейроинженерные подходы к конструированию сложных нейронных сетей *in vitro***

Приближение нейронных сетей к реальным биологическим сетям в мозге требует контроля топологии сети. Применительно к изучению мозга такой подход называется восходящим и состоит в экстраполяции элементарных функций отдельных нейронов и малых сетей к системам более высокого уровня.

Было показано, что нейронные сети малых размеров проявляют свойства, подобные свойствам аналогичных сетей в масштабе мозга (Poli et al., 2015), в этом отношении конструируемые нейронные сети являются действенным инструментом для изучения основных механизмов работы мозга. Стимуляция отдельных нейронов в пределах определенной сети позволяет получить информацию о локальных вызванных клеточных и молекулярных изменениях и оценить взаимное влияние стимулируемой и связанных с ней нейронных сетей.

По аналогии с математическими графами нейронная культура с контролируемой топологией может быть представлена как совокупность узлов и ребер, которые соответствуют совокупности сом нейронов и

нейритам. Нейроны разных узлов соединены друг с другом посредством нейритов, причем направление и ввод информационного потока определяется синаптическими связями. Эта поляризация, характерная для нейронных сетей критична для понимания работы мозга, и поэтому необходимы методы, позволяющие создавать и управлять направлением связи.

Формирование топологии нейронных сетей *in vitro* может производиться различными способами, которые можно разделить на три основные группы: литографические методы, методы микроструктурирования поверхности и трехмерные конструкции.

### **1.2.1 Литографические методы**

Методы получили развитие после представления Кляйнфельдом использования технологии фоторезиста для моделирования гидрофобных и гидрофильных материалов с целью контролирования прикрепления нейрональных клеток (Guillaume-Gentil et al., 2014) и применения способа УФ-фотоабляции (Sitti et al., 2015). В дальнейшем были внедрены разнообразные технологии, позволяющие сформировать на поверхности, используемой для культивирования клеток, геометрическую структуру из материалов, способствующих структурированию клеточной культуры. В том числе известны методы фотолитографии (Ginestra et al., 2019; Vinje et al., 2020), «мягкой» литографии (Ginestra et al., 2019; Vinje et al., 2020), микроконтактная печать (Yalcintas et al., 2019; Hondrich et al., 2019; Yu et al., 2021), наноимпринт (Shrirao et al., 2017; Yu et al., 2021) и микрообработка поверхности (Li et al., 2014; Li et al., 2015; Mateus et al., 2022). Материалы для создания отпечатков включают гидрофобные алкил- и гидрофильные аminosиланы на стекле (и их тиоловые эквиваленты на золоте), устойчивый к белкам полиэтиленгликоль, белки, биологические макромолекулы и критические пептидные последовательности. В качестве подложек для культивирования используются изоляторы из стекла, кремния и различных

пластиковых полимеров. Для формирования отпечатков могут быть использованы материалы, повышающие либо ограничивающие адгезию и рост клеток на поверхности. Большинство материалов совместимы с несколькими методами нанесения отпечатков.

Было показано, что гидрофильные материалы способствуют прикреплению и росту клеток (цитотфильность), чем цитотфобные гидрофобные материалы, а также что положительно заряженные материалы предпочтительнее отрицательно заряженных молекул (Hur et al., 2021) и клеточный рост коррелирует с плотностью аминокрупп (Takayama et al., 2012). Для усиления адгезии успешно используются такие сложные материалы, как ламинин и фибронектин и полиэтиленгликоль, ограничивающие рост нейритов (Qiu et al., 2020; Bang et al., 2021 A). Другие материалы усиливают разрастание аксонов, например, смесь ламинина и полилизина (Hong et al., 2020).

Таким образом, способствуют росту клеток полилизин, ламинин и различные аminosиланы, а непермиссивные материалы включают полиэтиленгликоль, альбумин и сульфат хондроитина. Кроме того, исследуется возможность использования нейронных факторов роста для обеспечения точного наведения аксонов (Fornaro et al., 2020).

### **1.2.2 Микроструктурные методы**

Другой подход состоит в создании платформ, состоящих из небольших камер для культивирования нейронов, которые помещаются в них с помощью микропипетки. В стенках камер находятся отверстия размером порядка до 10 мкм, которые предназначаются для нейритов и соединяют камеры между собой.

Подобный принцип использовался в камерах Кампенот, предназначенных для изучения периферической нервной системы. Они состоят из тефлонового разделителя прикрепленного с помощью силикона к

покрытой коллагеном чашке Петри. Аксоны расположенных в одной из камер нейронов прорастают по канавкам в коллагене в соседнюю камеру и таким образом остаются изолированными от сом нейронов. Обычно для способствования росту аксонов используют фактор роста нервов (NGF) либо нейротрофический фактор головного мозга (BDNF). Однако, применение камер Кампенот для нейрональных культур ЦНС не дало положительных результатов ввиду сложности культивирования нейронов ЦНС.

В 2005 году была предложена альтернатива, состоящая в использовании силикона полидиметилсилоксана (ПДМС), прикрепленного к подложке, для формирования каналов для роста аксонов. Аксоны нейронов, культивируемых в камере, прорастали через каналы в ПДМС в соседнюю камеру и использовались для исследований (Taylor et al., 2005).

Структуры, включающие камеры соединенные микроканалами, образуются в слое ПДМС с помощью литографических методов. ПДМС является силиконом оптически прозрачным, инертным, нетоксичным, проницаемым для газов и поэтому часто используется для культивирования клеточных культур. Благодаря его полимерной структуре и реологическим свойствам (вязкоупругости), ПДМС может использоваться для формирования сложных микроструктур. Жидкий ПДМС изливается на мастер форму, представляющую собой трехмерную структуру, отвердевает, отделяется от мастер-формы и крепится на стекло или MEA. Получившееся устройство включает камеры для культивирования клеток и соединяющие их микроканалы, предназначенные для нейритов. В такой конструкции нейроны не могут мигрировать в соседнюю камеру в виду малых поперечных размеров каналов, в которые могут проникнуть только отростки клеток. Достаточно длинные микроканалы обеспечивают попадание в смежную камеру только аксонов, изолируя их также и от дендритов.

Подобные системы, оперирующие нано/микролитровыми объемами жидкости и использующие каналы с размерами десятки микрон, называются микрофлюидными.

В нейробиологии микрофлюидные технологии используются для решения задач анализа структуры и функций нервной системы, механизмов обучения и памяти на разных уровнях, действия лекарственных препаратов на нервную систему. Таким образом, методы микрофлюидики дают возможность для культивирования нейросетей в камерах чипа, связанных посредством нейритов, растущих в микроканалах. Зачастую культивирование нейронных сетей *in vitro* производится на микроэлектродных матрицах, которые используются как для стимуляции, так и для регистрации пространственно-временной активности нейрональных культур.

С использованием микрофлюидных чипов группа Г. Бревера изучала кодирование и декодирование информации о стимулах в двух связанных нейросетях содержащих нейроны зубчатой извилины и нейроны региона СА3 гиппокампа. Клетки двух отделов гиппокампа культивировались в разных камерах чипа, совмещенного с МЭА системой (Poli et al., 2017).

Широкое применение микрофлюидные чипы получили в исследованиях направленных на понимание механизмов способствующих росту аксонов, в том числе изучение ориентации и роста аксонов относительно микронаправляющих структур (Jeong, Lee, 2014), концентраций биохимических веществ (Dravid et al., 2019; Dadras-Toussi et al., 2021), внешних гидростатических сил (Takayama et al., 2012). Другими исследователями были созданы модели нейродегенеративных заболеваний на чипах (Holloway et al., 2021; Bang et al., 2021 B; Miny et al., 2022) и модели для исследования аксонального транспорта (Vitet et al., 2020; Emily et al., 2022).

### **1.2.3 Трехмерные конструкции**

Следующий способ формирования нейронных сетей *in vitro* состоит в применении трехмерных гидрогелей (Aregueta-Robles et al., 2019; Seidlits et al., 2019; Kajtez et al., 2021). Контроль роста нейритов может осуществляться за счет совмещения конструкций с коллагеновыми волокнами (Lam et al.,

2020; Rebelo et al., 2020). Была показана возможность нанесения отпечатков и фотолинкирования деформируемых подложек молекулами, направляющими рост нейронов (Kjar et al., 2019; Primo et al., 2021). Развитие данной технологии позволит создать трехмерные субстраты, в которых будет обеспечен рост нейронов в заданных геометрических структурах.

Уже продемонстрировано, что нейрональные культуры в трехмерных гидрогелях сохраняют жизнеспособность на протяжении нескольких недель, обладают коррелированной спонтанной активностью. Однако регистрация активности клеток в трехмерных нейронных сетях является сложной задачей, методы для которой активно разрабатываются в настоящее время. Например, для этого используют MEA на основе комплементарных металл-оксид-полупроводников (CMOSMEA), которые могут регистрировать активность на глубине до 100 мкм (Obien et al., 2019). Оптические методы позволяют регистрировать поверхностную активность, но с меньшей чувствительностью и разрешением по времени (Kirihara et al., 2019). Другой метод регистрации активности трехмерных нейронных сетей предполагает выращивание органоидов на искусственных структурах (Park et al., 2021) и использование имплантируемой сетчатой электроники клеточного или субклеточного масштаба (Yang et al., 2019).

### **1.3 Модуляция направленного роста аксона в нейронных сетях**

#### **1.3.1 Конус роста и принципы навигации аксона**

Нейронные сети формируются во время развития мозга, когда нейриты созревающих нейронов разрастаются для достижения синаптических мишеней. На конце аксона находится конус роста, который взаимодействует с внутриклеточными и внеклеточными сигналами и прокладывает путь через окружающую ткань к цели. Конус роста удлиняется и сокращается за счет широких пластинок, называемых ламеллиподиями, и тонких, остроконечных

выпячиваний, называемых филоподиями. Филоподии формируются за счет цитоскелетных актиновых нитей, которые активно перестраиваются во время роста аксонов в ответ на направляющие сигналы посредством взаимодействия между мембраносвязанными рецепторами, экспрессируемыми на филоподиях, и внешними направляющими молекулами. Ключевой особенностью конусов роста является изменчивость их морфологии, выражающаяся в постоянном удлинении и ретракции филоподий при исследовании окружающей среды. Такой уровень подвижности достигается за счет непрерывной реструктуризации первичных компонентов цитоскелета конуса роста: актина и тубулина. Актиновые микрофиламенты в основном обнаруживаются в периферической области конуса роста, где они существуют в виде параллельных пучков внутри филоподий или в виде сшитых сетей в периферических областях в ламеллоподиях. Эти актиновые структуры динамически регулируются несколькими процессами: полимеризацией нитевидных актиновых (F-актиновых) микрофиламентов на дистальном конце филоподий, деполимеризацией ламеллоподиальной актиновой сети и ретроградным транспортом F-актина от переднего края к более центральной области конуса роста. Разборка актина в центре позволяет субъединицам F-актина возвращаться в дистальный конец филоподиальных микрофиламентов, тогда как механизм ретроградного транспорта, управляемый моторными белками на основе миозина, уравнивает прямой поток актина (Franze, 2020).

Если происходят изменения в одном из транспортных процессов, может измениться баланс потока актина, что приведет к растяжению или ретракции филоподий. Это наблюдается, например, при контакте конуса роста с пермиссивным субстратом, что обычно вызывает расширение филоподий. Контакт с субстратом способствует связыванию белков адгезии с актиновым цитоскелетом и последующему ингибированию ретроградного потока актина, что вместе с продолжающейся полимеризацией актина на переднем крае приводит к удлинению микрофиламентов. Одновременно

актиновые сети, дистальные от места контакта с субстратом, подвергаются продолжающейся деполимеризации, что приводит к ретракции дистальных филоподий и удлинению конуса роста вдоль субстрата (McCormick et al., 2020).

Тубулин в виде длинных пучков образует другой компонент цитоскелета конуса роста - микротрубочки. Микротрубочки располагаются вдоль аксона и обеспечивают поддержку его структуры, транспорт везикул и органелл к конусу роста. Они также играют важную роль в росте аксонов. Это происходит посредством транспорта тубулина к дистальным кончикам микротрубочек в периферических частях конуса роста и последующей стабилизации этих рыхлых и динамичных концов микротрубочек в плотные пучки в их центральном домене. Микротрубочки участвуют в повороте конуса роста в ответ на направляющие сигналы, которые вызывают локальные изменения в полимеризации микротрубочек за конусом роста.

### **1.3.2 Сигналы, направляющие рост аксона *in vivo***

В развивающейся ЦНС присутствует большой набор молекул, управляющих построением нейронных сетей, включая диффузионные и мембраносвязанные сигнальные молекулы, такие как семафорины, нетрины и нейротрофины. Кроме того, тела клеток и клеточные отростки образуют гребни и поры нано- и микрометрового размера — физические сигналы, которые направляют рост развивающихся нейритов.

Во время раннего развития нейронов большинство аксонов растут не индивидуально, а вместе вдоль нескольких пионерских аксонов (Bentley & Caudé 1983), образуя пучки. Пионерские аксоны первыми перемещаются к ткани-мишени, ориентируясь на направляющие сигналы в виде диффундирующих молекул, и устанавливают опорную траекторию для последующих аксонов.

Для достижения целевых мишеней расположенных на больших расстояниях аксоны следуют по промежуточным мишеням. Ими могут быть глиальные клетки или так называемые коридорные нейроны. Известным примером промежуточной направляющей структуры является пластинка дна спинного мозга, заднего и среднего мозга позвоночных, состоящая из радиальных клеток глии на вентральной срединной линии и направляющая комиссуральные аксоны к средней линии. Другой пример - клетки латерального обонятельного тракта (ЛОБ), лежащие вдоль паллиально-субпаллиальной границы. Они являются промежуточной мишенью для аксонов ЛОБ, растущих каудально от обонятельной луковицы к переднему обонятельному ядру, обонятельному бугорку, грушевидной и энторинальной коре и миндалевидному телу (Скуарзони и др., 2015).

### **1.3.3 Модуляция навигации аксона *in vitro***

При культивировании нейрональных клеток *in vitro* невозможно воспроизвести тонкую настройку сигнальных молекул, характерную для развивающихся нейронных сетей мозга. Тем не менее, в последние годы вполне успешно развиваются методы управления навигацией аксонов с целью изучения реакции нейронов на молекулярные и физические сигналы в контролируемой среде и построения экспериментальных моделей сложных нейронных сетей, состоящих из связанных локальных сетей.

Основные методы модуляции роста аксонов включают технологию нанесения микропаттернов, создание микроканалов для аксонов методами микрофлюидики, создание постоянного потока культуральной среды, приложение высокочастотного электрического поля к аксонам в микроканалах или коллагеновом скаффолде, создание градиентов трофических факторов и факторов роста или градиента внеклеточного матрикса, модификация микроструктуры подложки с помощью микро- и нано-канавок или столбцов.

### 1.3.3.1 Физико-химические методы модуляции навигации аксонов

На рост аксонов влияют градиенты связанных с субстратом и растворенных во внеклеточной среде химических сигналов с помощью контакт-опосредованных и хемотропных механизмов, соответственно (Dravid, et al., 2019; Franze, 2020; McCormick et al., 2020; SeoJ et al., 2020). Использование методов, создающих градиенты растворимых веществ, требует сложных технологических решений и ограничивает репертуар возможных топологий сети, поэтому чаще всего применяют градиенты связанных с субстратом веществ (Hua et al., 2021). Во время роста и миграции нейронов эти вещества инициируют перестройку клеточного актинового цитоскелета, которая способствует продвижению клеточной структуры посредством механотрансдуктивных сил, действующих на новые появившиеся точки адгезии (McCormick et al., 2020; Schneider et al., 2023). Рост нейрита по направлению градиента или против него зависит от функции специфического взаимодействия между клеточными рецепторами, присутствующими в конусе роста аксона и связанной с субстратом молекулой.

Метод создания направленных связей с помощью микропаттернов (Ming et al., 2021; Truong et al., 2021) основан на использовании влияния границ адгезивных геометрических структур на рост нейритов. Адгезивное покрытие, чаще всего в виде сетки, наносят на подложку для культивирования клеток. Узлы сетки предназначены для культивирования небольших кластеров нейронов, ребра же используются для роста нейритов. К примеру, был представлен дизайн треугольных паттернов (Albers et al., 2015; Scott et al., 2012) узкое место которых обеспечивало направленный рост аксонов и направленное распространение импульсов. Изменение формы сторон треугольников на вогнутые привело к увеличению эффективности направленного роста аксонов (Tihaa et al., 2016). Также было показано, что

число треугольных микропаттернов в последовательности коррелирует с эффективностью однонаправленного распространения импульсов кальциевой активности между связанными нейросетями (Feinerman et al., 2008).

Для усиления контроля направленности роста аксонов используют химические градиенты, принцип действия которых основан на инициации клеточный ответа на изменения концентраций (Dravid et al., 2019).

Для нанесения непрерывного градиента белков на подложку в том числе используют методы микрофлюидики (Liu et al., 2019; Lee et al., 2020). Так, было представлена микрофлюидная система, состоящая из трех камер связанных прямыми микроканалами, которая позволяет создавать наложение субстратов за счет ламинарного потока жидкости в камерах, диффузии и физической адсорбции. Градиент веществ в средней камере создавался за счет микроканалов связывающих ее с боковыми камерами, в которые помещали растворы веществ: ламинина и сопряженного с изотиоцианатомфлуоресцеина поли-л-лизина (Ф-ПЛЛ). В первом представленном случае градиент ламинина, опосредованный диффузией, формировался на стеклянной подложке, и в результате был продемонстрирован направленный рост аксонов в сторону к увеличению концентрации ламинина. Во втором случае комбинированный в средней камере был сформирован градиент ламинина и Ф-ПЛЛ с помощью аспирационного ламинарного потока, в результате рост аксонов был ограничен зоной шириной 15 мкм в центре двух наложенных градиентов. В третьем случае были скомбинированы линии Ф-ПЛЛ с градиентами поверхности ламинина и бычьего сывороточного альбумина (BSA). На такой поверхности аксоны росли вдоль линий Ф-ПЛЛ в сторону градиента ламинина (Millet et al., 2010). Так же был предложен метод ступенчатого нанесения поли-л-лизина на подложку так, что образовывался локальный градиент ПЛЛ. Направление роста нейритов коррелировало с направлением отпечатков ПЛЛ, нанесенных вторым слоем (Joo et al., 2015).

Подобная методика, но с двухкамерным микрофлюидным устройством, была использована для создания градиента концентраций химических веществ для исследования влияния Netrin-1 и Slit1 на навигацию аксонов (Dupin et al., 2015).

Описанные методы являются статичными и создают неизменные условия, при которых в дальнейшем культивируются клетки. В настоящее время развиваются технологии модификации нанесенных на подложки веществ *in situ*, когда клетки уже растут на субстрате.

Например, последовательное экспонирование фотореактивной поверхности лазерным лучом позволяет направлять рост нейритов (Fendler et al., 2019). Локальное изменение покрытия PLL-g-PEG на адгезивный поли-л-лизин с помощью нанопипетки также направляло рост аксонов (Dermutz, 2016; Guillaume-Gentil et al., 2018). Применение покрытий из терморезистивных полимеров, также позволяет ограничивать рост нейронов и формировать пути для роста аксонов *in situ*, делая покрытие адгезивным повышением температуры (Behm et al., 2015; Flechner et al., 2022).

### **1.3.3.2 Электрические и оптические методы модуляции навигации аксонов**

Была продемонстрирована возможность управления ростом аксонов с помощью приложения переменного напряжения к электродам, расположенным в подложке камеры культивирования нейрональных клеток. Напряжение с частотой 105 Гц приводило к остановке роста аксонов, располагающихся рядом со стимулирующими электродами, при этом динамика роста остальных аксонов не изменялась. На основе этого эффекта были созданы нейронные сети из 2 и 3 подсетей, соединенных направленным образом (Honegger et al., 2016).

В другом исследовании была продемонстрирована возможность электрически удалять PLL-g-PEG с поверхности с целью изменения

адгезивности определенных областей сети, которая разработать чип с возможностью тонкой настройки адгезии нейронов и контроля роста нейритов на поверхности электродов (Gabi et al., 2010; Shinde et al., 2021).

Другим способ управления конусом роста является направление их световым пятном на ближней инфракрасной длине волны (Black et al., 2014; Farrukh et al., 2018).

### **1.3.3.3 Микроструктурные методы модуляции навигации аксонов**

Управление навигацией аксонов может контролироваться разной структурой поверхности подложки (Fan et al., 2021; Van et al., 2023). Однако, более простым способом является использование микроструктур с каналами в качестве физических барьеров, соединяющих камеры с клетками. В этом случае возможны два подхода к направлению аксонов для формирования направленных связей между нейронными сетями.

Первый подход заключается в двухэтапной посадке клеток в камеры для культивирования: сначала нейроны высаживают в одну из камер, где в дальнейшем образуется нейросеть-Источник, далее на протяжении недели аксоны прорастают через микроканалы во вторую камеру и только затем туда высаживают клетки и образуется нейросеть-Приемник. Таким образом, обеспечивается локализация синапсов во второй камере и направленность связей между нейросетями (Poli et al., 2017).

Второй подход опирается на направление аксонов с помощью опорных структур – микроканалов. В этом случае нейрональные клетки высаживают в обе камеры одновременно. Например, микроканалы содержащие зазубрины, направленные в сторону камеры нейросети-Приемника, позволяли задержать рост аксонов в направлении камеры с нейросетью-Источником (le Feber et al., 2015). Аксоны нейросети-Источника прорастали к нейросети-Приемнику на 20 день развития (длина канала составляла 800 мкм), за это время аксоны нейросети-Приемника прорастали в

обратном направлении на 100 мкм. Однако в данной модели связанных нейросетей аксоны нейросети-Приемника могут расти вдоль аксонов нейросети-Источника после 20 дня развития, нарушая направленность связи. Кроме того, активное формирование синапсов в культурах первичных нейронов происходит с 5 по 25 день развития и функциональная связь между локальными сетями после 20 дня развития может не возникнуть.

Воронкообразная форма микроканалов также обеспечивала преимущественно направленный рост аксонов между камерами (Peugin et al., 2011). Направленность связи в таком канале обеспечивалась благодаря асимметрии каналов: расширение канала со стороны нейросети-Источника было больше (15 мкм против 3 мкм со стороны нейросети-Приемника) и вероятность попадания аксонов в канал была выше. Кроме того, аксоны нейросети-Приемника, растущие вдоль стенок камеры, имели тенденцию сохранять направление роста и не поворачивать в микроканал. Долговременное сохранение направленности связи осуществлялось благодаря заполнению аксонами нейросети-Источника узкой части каналов. Эффективность направленности связи в таком канале зависит от ширины канала со стороны нейросети-Приемника, которая ограничивает число аксонов нейросети-Источника, достигающих нейросети-Приемника. В представленной работе исследована функциональная связность нейросетей двух типов нейронов: коры и стриатума головного мозга мышей (E14) и продемонстрировано возникновение кальциевой активности нейросети-Приемника, состоящей из клеток стриатума, на 12-16 дни развития.

Также была предложена форма каналов, учитывающая тенденцию аксонов расти вдоль опорных структур и поворачивать в случае резкого изменения направления границы. В таких каналах аксоны, растущие в сторону нейросети-Источника, перенаправлялись в нейросеть-Приемник посредством U-образных соединений между каналами (Renault et al., 2016; Winter-Hjelm et al., 2023). При этом число аксонов, растущих в сторону нейросети-Источника, уменьшалось к каждому дополнительным соединением

канала. По тому же принципу другой группой были разработаны каналы с 2 и 3 перенаправляющими соединениями (Na et al., 2016).

Сформированная связь должна обеспечивать не только распространение импульсов в одном направлении: от нейросети Источника к Приемнику, но и функциональную связность локальных сетей. Было показано, что высокий уровень направленности распространения импульсов между нейросетями может быть достигнут за счет использования компарментов для клеток малых размеров в сочетании с отводящими каналами для обеспечения направленности роста аксонов (Forró et al., 2018; Duru et al., 2022). Форма каналов не содержала острых углов, учитывая склонностью аксонов избегать резких поворотов. До 95% аксонов прорастали в заданном структурой каналов направлении. В данной модели связанных сетей была подтверждена функциональная связность локальных сетей методом кросскорреляционного анализа и оценкой энтропии переноса в прямом и обратном направлениях. Хотя данный подход позволяет формировать направленные межсетевые связи с высокой эффективностью, область его применения ограничена исследованиями динамики небольших сетей, так как высокая точность передачи активности между нейросетями в этих экспериментах обеспечивалась не только структурой соединений и компарментов, но также низкой активностью внутри нейросетей за счет их малого размера. Предполагается, что в полининаптических нейротах большего размера активность внутри подсетей будет более коррелирована, чем между ними, что уменьшает вероятность вызова пачки в нейросети-Приемнике в ответ на активность нейросети-Источника.

Контроль роста нейритов *in situ* возможен с использованием методов микрообработки. Микрокамеры, изготовленные из агарозы, систематически соединяют путем поэтапного плавления слоев агарозы лазерным пучком, тем самым контролируя пространственно-временный рост (Tanaka et al., 2021). С другой стороны фотохимически активируемое сшивание белков может

динамически создавать барьеры и компартменты вокруг нейритов (Kaehr et al., 2004).

## **1.4 Функциональные свойства сложных нейронных сетей *in vitro***

### **1.4.1 Интеграция и дифференциация активности**

Сложные нейронные сети, состоящие из нескольких подсетей, сочетают свойства функциональной дифференцировки и интеграции. Разделение нейрональных культур на несколько связанных подсетей (модулей) позволяет получить динамику спонтанной активности, отвечающей свойствам таких систем. В такой сложной сети каждая из подсетей обладает собственной спонтанной пачечной динамикой, и в тоже время, некоторые из пачек распространяются от одной подсети к другой с последующей инициацией в ней ответной пачки.

Данное свойство было продемонстрировано разными группами при исследовании как сетей, состоящих из двух подсетей, так и содержащих более четырех подсетей (от 4 до 60). Методами кросс-корреляции было подтверждено, что электроды, расположенные в одной подсети более коррелированы, чем электроды из разных подсетей. То есть, каждая подсеть, демонстрировала более высокие уровни внутренней связи по сравнению с уровнем связи между двумя подсетями.

В нейронной сети, состоящей из четырех подсетей, соединенных одним, двумя, или тремя тяжами аксонов, было показано, что динамическая сложность активности всей сети определяется количеством связей между подсетями (Yamamoto et al., 2018). В случае связи между подсетями, образованной тремя тяжами, сетевая активность становилась синхронной, то есть возникающая в одной из подсетей пачка вызывала пачку в остальных подсетях. В сети, связи в которой были сформированы посредством единичных тяжей между подсетями, полностью синхронизированный режим

существовал с фракционными режимами. Авторы предположили, что нейронная сеть такой конфигурации может работать около критической точки – в состоянии, которое оптимизирует информационный поток, максимизирует коммуникацию и способствует быстрой реакции на возмущения (Gutjahr et al., 2023; Okujeni et al., 2023). Гибкость описанной сложной сети с одинарной связью позволяет системе перейти в более сегрегированный или более интегрированный режим обработки информации в зависимости от состояний нейронов и связей, что может быть признаком способности сети выдерживать повреждения.

Различия во внутри и межсетевых взаимодействиях выражается также через задержки распространения импульсов или пачек импульсов спонтанной активности, оценка которых показала синхронность активации нейронов, принадлежащих к одной подсети, и задержку в десятки мс между активацией нейронов соседних подсетей.

В эксперименте с исследованием сети из двух подсетей, межсетевые связи в которой формировались за счет разного числа прямых каналов, было показано, что задержка распространения пачек, в том числе зависит от силы межсетевой связи, определяемой числом каналов между подсетями. Подобный результат был продемонстрирован для сети из четырех подсетей. В сети из 60 подсетей задержки накапливались при распространении активности от иницилирующей подсети последовательно к другим подсетями (Shein-Idelson et al., 2011). При этом задержка распространения активности в сетях, состоящих из большого числа подсетей, сильно вариабельна вследствие разной силы связей между парами подсетей.

С точки зрения обработки информации в мозге, длительные задержки позволяют разделить активность нейскольких подсетей, поступающих к одной подсети, по временной шкале, и являются средством отделения внутрисетевой и межсетевой обработки. В первые недели развития сетей они изменяются вследствие созревания синаптических связей между подсетями, а

в зрелых сетях изменения могут быть связаны с краткосрочной или долговременной пластичностью (Panand, 2009).

Интеграция в сложных сетях продемонстрирована в связанных подкультурах, состоящих из клеток разного типа. Так, группа К. Паркера показала, что общая частота импульсов, частота импульсов в пачке и интервал между импульсами в сложной сети, включающей взаимосвязанные нейросети нейронов коры, амигдалы и гиппокампа, изменяется по сравнению с нейросетями, культивируемыми по отдельности (Dauth et al., 2017).

В другом исследовании сокультивировали популяцию клеток коры с популяцией гиппокампальных клеток или клеток таламуса. Было показано, что функциональная связность внутри кортикальной подсети изменяется при взаимодействии с подсетью из гиппокампальных клеток, приводя к увеличению частоты пачек в общей сети. В свою очередь, в подсети из клеток таламуса появлялась тоническая активность в случае сокультивирования с клетками коры.

Таким образом, *in vitro* нейронные сети со сложной архитектурой демонстрируют базовые свойства модульных сетей, присущие сетям мозга, и могут использоваться в качестве репрезентативных моделей для изучения функциональных свойств таких сетей.

#### **1.4.2 Направленность связей между нейронными сетями**

Иерархия является центральным элементом в организации сложных биологических систем и, в частности, в структуре и функциях нейронных сетей. Само по себе, понятие иерархии может иметь разные интерпретации и применяться к топологическим, пространственным, временным, а также функциональным свойствам нейронных сетей. Одна из интерпретаций состоит в определении последовательности обработки поступающей в нейронную сеть информации. Например, схема зрительной системы приматов (Fellemanand van Essen, 1991) включает последовательно связанные

области зрительной коры, сигнал в которых распространяется от областей зрительной сенсорной периферии к областям более высокого уровня, участвующих в абстрактных аспектах зрения.

Уже в нейронных сетях *in vitro*, состоящих из двух подсетей с ненаправленными связями, выявляется последовательность обработки информации, выраженная в асимметрии генерации и распространении спонтанной пачечной активности, что, возможно, указывает на врожденность этого свойства у живых нейронных сетей (Bisio et al., 2014; DeMarse et al., 2016).

В этом случае одна из нейросетей (Источник) инициирует больше взаимных пачек, чем другая (Приемник). В исследовании сетей, состоящих из двух подсетей, с симметричными каналами группа M. Chiappalone показала, что направленность распространения пачек может определяться большей частотой импульсов одной из связанных нейрональных сетей, которая в результате становится нейросетью-Источником. Однако, такая тенденция наблюдалась только в 48% экспериментах. В остальных экспериментах частота импульсов в подсетях не отличалась, тем не менее направленность распространения возникала спонтанно в 85% случаях.

В сети, состоящей из 60 небольших подсетей, некоторые из них объединялись в функциональные подсети и это влияло на направление распространения активности (Shein-Idelson et al., 2016). Интересно, что блокирование ингибирования в такой сети привело к уменьшению направленности распространения активности.

### **1.4.3 Эффективность связности подсетей и общая динамика сети**

В предыдущих разделах обсуждалось влияние количества связей между нейронными сетями на динамику активности всей сети. Число связей влияет на вероятность распространения активности нейросети-Источника и вызова пачки в нейросети-Приемнике и таким образом определяет

соотношение интегрированной и дифференцированной обработки информации.

Кроме того, для многомодульной сети было показано, что вероятность распространения пачки импульсов зависит от интенсивности пачки, определяемой через амплитуду импульсов (Shein-Idelsonetal, 2016).

Таким образом, многие исследования подтвердили, что взаимодействие подсетей определяется числом и силой межсетевых связей, но также есть данные о влиянии активности отдельных подсетей на уровень интеграции сети. Известно, что вероятность активации нейронов увеличивается или уменьшается при низком или высоком уровне сетевой активности соответственно (Turrigiano et al., 1998; Wilson et al., 2007). Также и нейросеть-Приемник обладает некоторым порогом активации, преодоление которого может произойти при распространении пачки, достаточной интенсивности из нейросети-Источника. При этом, порог активации межсетевой всегда выше, чем в пределах одной подсети, вследствие более слабых связей между подсетями.

Таким образом, информация об интенсивности возбуждения может использоваться сложными нейронными сетями для управления распространением активности между связанными подсетями.

#### **1.4.4 Роль пачечной активности в эффективности передачи информации в нейронных сетях**

Исследования по распространению активности между направленно связанными нейронными сетями широко представлены в литературе по моделированию (Renart and van Rossum, 2012; Rezaei et al., 2020; Lobov et al., 2021; Sun et al., 2022). Также проведены экспериментальные исследования на кортикальных срезах *in vitro* (Reyes, 2003) и диссоциированных нейрональных культурах (Renault et al., 2016; Yamamoto et al., 2018; Winter-Hjelm et al., 2023). Ранее предполагалось, что синхронизированная

коррелированная активность (пачка импульсов) ухудшает передачу посредством частотного кода (Mehring et al., 2003; Kumar et al., 2008). С другой стороны, существуют гипотезы, предполагающие необходимость синхронной активности для обеспечения кодирования и повышения надежности передачи в системах с прямой связью (Park et al. , 2019; Guo et al., 2021; Williams et al., 2021). Данный вопрос исследовался в работе по изучению влияния числа микроканалов на передачу информации между двумя нейронными сетями. В частности, было показано, что достоверность передачи информации за счет импульсов, находящихся вне пачек, значительно хуже, чем в пачках. Увеличение числа каналов приводило к значимому увеличению передачи информации, как в частотном, так и во временном коде, именно во время пачек импульсов. Таким образом, пачечная активность важна для успешной передачи информации между нейронными сетями.

В исследовании влияния количества тормозных нейронов в нейрональной сети *in vitro* на характеристики пространственно-временных паттернов было показано, что увеличение их числа приводит к уменьшению длительности пачек, число импульсов в пачках при этом уменьшалось (Chen, Dzakrasu et al., 2010). Авторы предположили, что по мере увеличения числа ингибирующих нейронов импульсы в пачке используются все более точно для передачи информации.

Процесс культивирования нейронных сетей приводит к случайному образованию возбуждающих и тормозных связей. Увеличение числа ингибирующих нейронов приводит к большему количеству способов самоорганизации сети (Chen, Dzakrasu et al., 2010).

Таким образом, известные методы разделения нейрональных клеток на матрице и управления ростом нейритов позволяют создавать модульные сети с заданным числом подсетей и связей. При этом задача формирования строго направленных функциональных связей между подсетями остается актуальной и требует новых подходов к ее решению.

Кроме того, на сегодняшний момент развития представлений о механизме передачи и обработки сигналов в модульных нейронных сетях показано, что взаимодействие подсетей определяется числом и силой межмодульных связей. Встречаются отдельные данные о влиянии активности подсетей на уровень интеграции всей сети. Остается открытым вопрос определения характеристик собственной активности локальных сетей, влияющих на межсетевое взаимодействие и их изменение в процессе развития сложных нейронных сетей.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Объект исследования**

В исследовании использовались культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученных от 18-дневных (E18) эмбрионов мышей C56BL/6. Беременные мыши умерщвлялись путем дислокации шейных позвонков, эмбрионы были немедленно удалены кесаревым сечением. Все экспериментальные процедуры, основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Guide for care and use of laboratory animals. ILAR publication, National Academy Press. (1996) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» и были согласованы с Этическим комитетом ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

### **2.2 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 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.

## **2.3 Культивирование диссоциированных нейрональных культур с направленной архитектурой связей**

### **2.3.1 Разработка конфигураций микрофлюидных чипов**

Конфигурация микрофлюидных чипов включала две камеры для культивирования нейрональных клеток и соединяющие их микроканалы, структура которых обеспечивала направленный рост аксонов. В соответствии с направлением роста аксонов подсетей определяли, как «нейросеть-Источник» и «нейросеть-Приемник». Было разработано 10 типов симметричных микроканалов, каждый из которых состоял из

последовательности одинаковых сегментов. Стенки сегментов сужались в сторону нейросети-Приемника, что облегчало направленный рост аксонов в его сторону. Вероятность обратного роста аксонов уменьшалась благодаря наличию узких мест и специальных ловушек. Были исследованы микроканалы с тремя типами сегментов: «Зигзаг», «Зазубрины» и «Треугольник». Сегменты «Зигзаг» и «Зазубрины» были трех видов: длиной 70 мкм и шириной 60 мкм, длиной 100 мкм и шириной 80 мкм, длиной 200 мкм и шириной 160 мкм. Сегменты «Треугольник» были четырех видов: длиной 66 мкм и шириной 60 мкм, длиной 100 мкм и шириной 80 мкм, длиной 200 мкм и шириной 160 мкм, длиной 200 мкм и шириной 40 мкм (тип «Узкий треугольник»). У всех микроканалов, кроме состоящего из узких треугольных сегментов, ширина «узкого места» между сегментами составляла 5 мкм, а стенки сегментов сходились под углом 45°. Дополнительные ловушки для растущих к нейросети-Источнику аксонов располагались в микроканалах с сегментами типов «Зигзаг» и «Зазубрины» (рисунок 1, А). У микроканалов из узких треугольных сегментов ширина узкого места составляла 7 мкм, а стенки сегментов сходились под углом 10° (рисунок 1, Б).

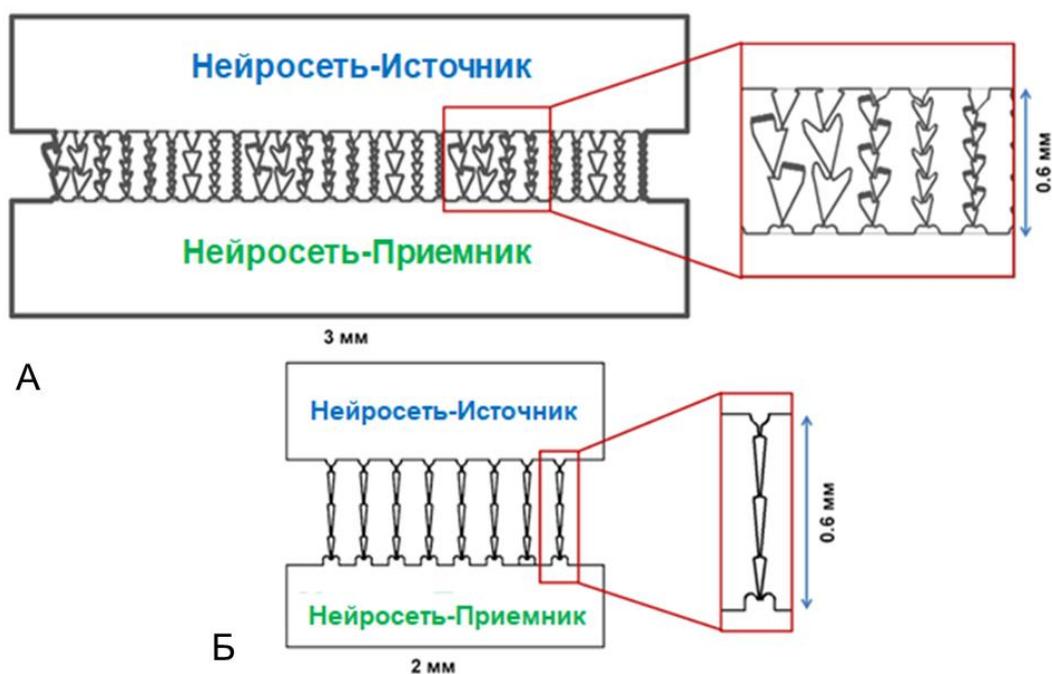


Рисунок 1 - Схема строения микрофлюидных чипов с симметричными микроканалами. А - микрофлюидный чип с 9 типами каналов: Б - микрофлюидный чип с микроканалами, состоящими из длинных узких сегментов

Также на основе исследования описанных 10 типов микроканалов был разработан асимметричный вариант микроканала. Он состоял из трех сегментов, два из которых имели узкую треугольную форму длиной 200 мкм и шириной 40 мкм. За основу формы третьего сегмента был взят треугольник с высотой 200 мкм и шириной 150 мкм, углы которого оканчивались ловушками для нейритов. Ширина узких мест данного канала составляла 7 мкм. Число каналов было увеличено с 8 до 16 (рисунок 2).

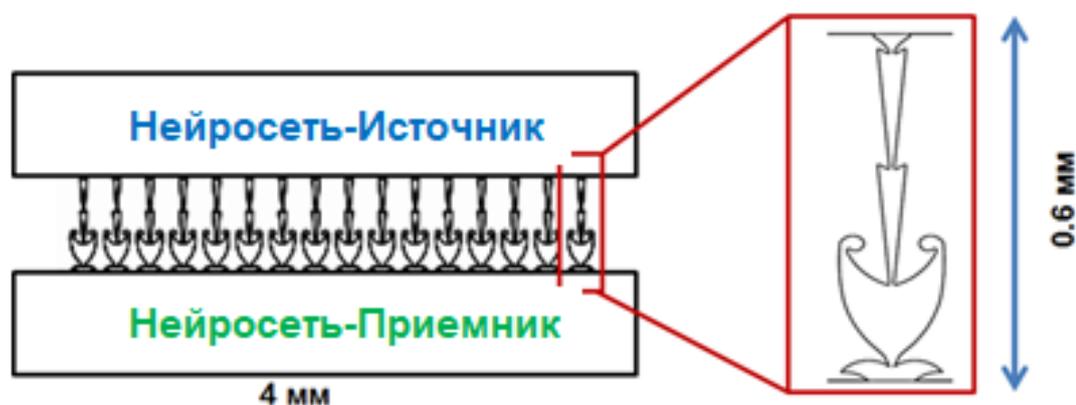


Рисунок 2 - Схема микрофлюидного чипа с асимметричными микроканалами

### 2.3.2 Изготовление микрофлюидных чипов

Микрофлюидные чипы изготавливали методом «мягкой литографии» из полидиметилсилоксана (ПДМС) с использованием кремниевой мастер-формы. Рельеф мастер-формы формировался методом фотолитографии в фоторезисте SU-8, нанесенном на кремниевую подложку.

Компоненты «Sylgard 184 silicone elastomer curing agent» и «Sylgard 184 silicone elastomer base» (DowCorning, США) смешивали в соотношении 1 к

10. Для удаления пузырьков воздуха раствор выдерживали в течение 10 минут в эксикаторе с разреженным воздухом ( $0,5 \text{ кгс/см}^2$ ). ПДМС тонким слоем (400-700 мкм) заливали на мастер-форму с использованием воздушного компрессора и равномерно распределяли по поверхности потоком воздуха. ПДМС затвердевал на мастер-форме в течение 3 ч в сушильном шкафу при температуре  $100^\circ\text{C}$ . После остывания до комнатной температуры слой ПДМС отделяли от мастер-формы. Далее слой ПДМС выдерживали при температуре  $100^\circ\text{C}$  в сушильном шкафу на протяжении 12 часов. Данный этап был необходим, так как непрореагировавшие компоненты ПДМС токсичны для клеток, а также оставляют трудноудаляемые следы на поверхности микроэлектродных матриц после открепления чипа.

В каждой камере чипа круглым пробойником делали отверстия биопсийным перфоратором (Kaimedical, Germany) диаметром 0,5 мм для заправки суспензии клеток. Два отверстия делали в противоположных углах каждой камеры. Чипы очищали от остатков ПДМС, образовавшихся при пробивании отверстий, и пыли с помощью скотча (3М 810). Каждый чип закрепляли на поверхности покровных стекол с помощью плазменной системы (FEMTO, Diener, Германия) при мощности 100 Вт и расходе кислорода  $5 \text{ см}^3/\text{мин}$  в течение одной минуты, затем кислород заменяли азотом. Далее чипы устанавливали на стекла или микроэлектродные матрицы и выдерживали в сушильном шкафу при температуре  $100^\circ\text{C}$  в течение 30 минут.

Далее внутренние структуры чипа заполняли деионизованной водой. Для удаления воздуха из микроканалов погружённые в воду чипы выдерживали в эксикаторе с разреженным воздухом ( $0,5 \text{ кг с/см}^2$ ) в течение 5 минут. Образующиеся на поверхности чипа пузырьки воздуха удаляли напором воды из кончика пипетки. Стерилизация чипов включала автоклавирование при температуре  $120^\circ\text{C}$  в течение 30 мин или облучение под УФ лампой в течение 2 часов. Затем поверхность стекла или

микроэлектродной матрицы (МЕА, MultichannelSystems, Германия) покрывали 0,1% водным раствором полиэтиленimina (Sigma P3143, США) в течение 90 мин. После трёхкратной промывки водой чипы заливали фосфатным буферным физиологическим раствором (PBS). Микрофотография микрофлюидного ПДМС чипа с закрытыми камерами, совмещенного с МЕА приведена на рисунке 3.

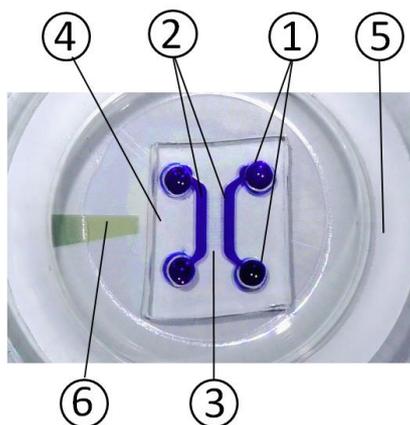


Рисунок 3 – Микрофотография микрофлюидного чипа с закрытыми камерами, совмещенного с МЕА: 1 – Отверстия для загрузки клеток; 2 – Закрытые камеры для культивирования нейрональных клеток; 3 – Соединяющие камеры микроканалы для невритов; 4 – Микрофлюидный чип из полидиметилсилоксана (ПДМС); 5 – Чашка МЕА; 6 – Электрод сравнения МЕА

### **2.3.3 Изготовление двухслойных ПДМС чипов, разделяющих питательную среду в нейросетях**

В экспериментах с изучением влияния одной сети на другую с применением фармакологической блокады активности нейросети-Источника были разработаны специальные чипы с изоляцией питательной среды в камерах для культивирования клеток. Такие чипы состояли из двух слоев. Нижний формировал структуру нейронной сети и был изготовлен методом мягкой литографии, аналогично тому, как описано в пункте 2.3.2. Слой

включал две камеры для культивирования нейрональных клеток (высота камеры 220 мкм) и 8 асимметричных микроканалов (высота микроканала 5,5 мкм), направляющих рост нейритов, связывающих нейросети в камерах. Изготовление нижнего слоя аналогично описанному в пункте 2.3.2. Верхний слой разделял объемы питательной среды в камерах для обеспечения возможности локального внесения химических веществ в одну камеру чипа (рисунок 4А). 3D-модель верхнего слоя была создана в программе Blender. Мастер-форма для слоя была напечатана на 3D-принтере из ABS-пластика и подвергнута воздействию паров ацетона в течение 20 минут для сглаживания поверхности. Раствор ПДМС заливали в мастер-форму и отверждали в сушильном шкафу в течение 6 часов при 45 °С. После отверждения ПДМС структуру удаляли из пластиковой формы и соединяли с нижним слоем путем склеивания жидким ПДМС так, чтобы полость верхнего слоя и целевая камера нижнего слоя образовали единый объем (1,1 мл) (рисунок 4). MEA с двухслойным ПДМС чипом фиксировали в перевернутом вверх дном положении, чтобы предотвратить проливание жидкого ПДМС на MEA, и помещали в сушильный шкаф на 6 часов при температуре 60 °С. Дальнейшая подготовка чипа была аналогична описанной в пункте 2.3.2.

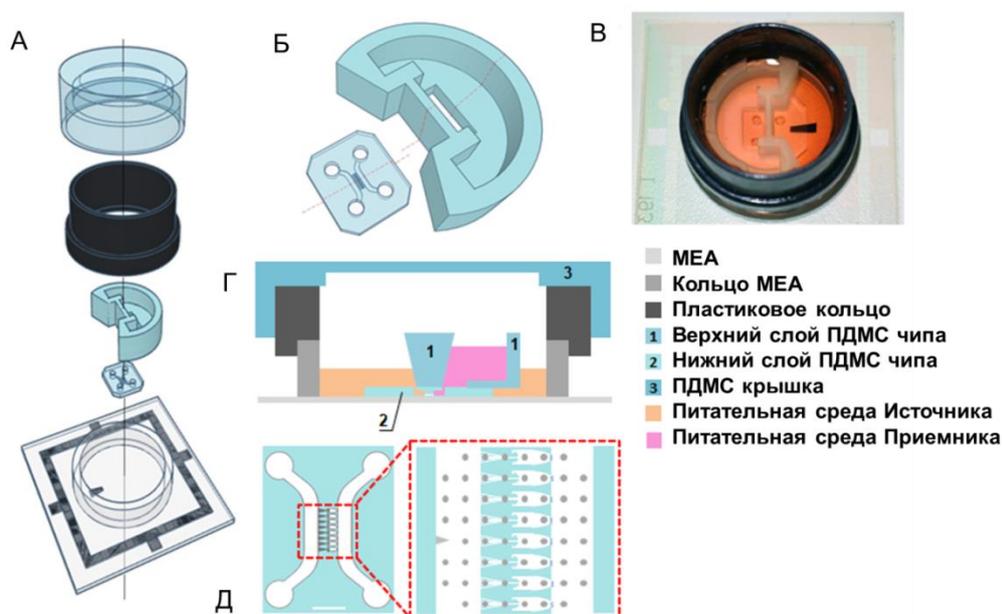


Рисунок 4 – ПДМС чип для изоляции питательной среды для двух нейросетей: А – Компоненты и структура чипа. Снизу вверх: МЕА, нижний и верхний слои чипа, пластиковое кольцо, крышка из ПДМС; Б – 3D-модель нижнего и верхнего слоев чипа PDMS; В – Фотография МЕА с чипом; Г – Схематический вид МЕА с чипом (вид сбоку); Д – Схематический вид микрофлюидного чипа (масштаб 1 мм)

#### **2.3.4 Культивирование диссоциированных клеток гиппокампа эмбрионов мышей**

Ткань гиппокампа эмбрионов мышей (E18) иссекалась из головного мозга в забуференном физиологическом растворе (PBS, phosphate buffered saline), затем измельчалась скальпелем и обрабатывалась 0,25% трипсином (Invitrogen 25200-056) в течение 20 минут при 35,5°C. Трипсин отмывали раствором PBS, ткань гиппокампа помещали в нейробазальную среду Neurobasal Medium (Invitrogen 21103-049) с добавленной в нее эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко K055) 5%, биоактивной добавкой B-27 (Invitrogen 17504-044) 2%, L-glytamine (Invitrogen 25030-024) 1 % и механически суспензировали с помощью узкого кончика стеклянной пипетки Пастера. Суспензию клеток полученную описанным образом высевали в камеры микрофлюидных чипов, совмещенных с микроэлектродными матрицами (МЕА) и покровные стёкла.

Каплю суспензии клеток добавляли в одно из отверстий камеры для загрузки суспензии, используя кончик дозатора на 100-200 мкл. При этом в момент загрузки суспензии наконечник дозатора направлялся в сторону камеры. Кроме того, в момент загрузки суспензии чип наклоняли приблизительно на 45 градусов вдоль заполняемой камеры, загрузка клеток производилась в верхнее отверстие. Такое расположение чипа позволяло обеспечить равномерное распределение клеток по площади камеры, а также препятствовало попаданию клеток в начальные сегменты микроканалов.

Микрофлюидные чипы с нейрональными клетками в камерах оставляли 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> на 90 мин, за которые клетки оседали и прикреплялись к адгезивной поверхности подложки. Плотность нейрональных клеток в камерах при посадке составляла около 9000 клеток/мм<sup>2</sup>. На рисунке 5 приведен пример микрофотографии клеток гиппокампа мыши, формирующих равномерный монослой в закрытой камере чипа в первый час после загрузки суспензии.

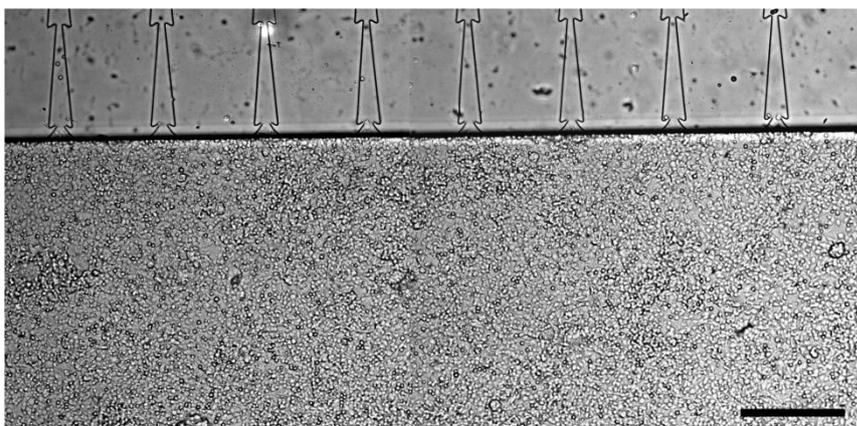


Рисунок 5 – Микрофотография монослоя клеток гиппокампа мыши в закрытой камере микрофлюидного чипа. Масштаб 200 мкм

Поддержание жизнеспособности клеточных культур осуществлялось в инкубаторе при температуре 35,5 °C, 100% влажности и содержании 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. В первые сутки культуры инкубировались в питательной среде Neurobasal Medium (92%) с добавлением B-27 (2%), L-glytamine (1%) и эмбриональной телячьей сыворотки (5%). Спустя сутки половина питательной среды менялась на среду с меньшим содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (0,5 %). В дальнейшем 200 мкл питательной среды заменялось на 400 мкл свежеприготовленной питательной среды раз в двое суток.

## **2.4 Протоколы экспериментов с фармакологической блокадой активности нейросети-Источника**

**Протокол с ТТХ.** Эксперименты проводили на 75–105 дни развития (n=5) культуры диссоциированных нейронов. После установки МЕА в коннектор системы регистрации активности первые 20 минут записи спонтанной активности были исключены из анализа данных для устранения эффекта механического воздействия на нейрональную сеть.

Протокол состоял из следующих этапов:

- запись спонтанной активности в течение одного часа (Спонт 1);
- повторная запись спонтанной активности в течение одного часа (Спонт2);

- аппликация тетродотоксина (ТТХ) в нейросеть-Источник. Аппликацию осуществляли в ламинаре при комнатной температуре. МЕА переносили из коннектора регистрирующей активность системы. Культуральную среду удаляли почти полностью, оставляя внутри камер чипов 3–5 мкл. Далее в камеру нейросети-Приемника возвращали питательную среду объемом 500 мкл. ТТХ добавляли к 1 мл культуральной среды (1 мкМ) и возвращали в камеру нейросети-Источника. В контрольных экспериментах данную процедуру проводили без нанесения ТТХ, но с аналогичным пипетированием среды.

- стабилизация спонтанной активности после замены питательной среды и переноса МЕА (20 мин);
- запись спонтанной активности в течение одного часа (Спонт 3);
- запись спонтанной активности в течение одного часа (Спонт 4);

**Протокол с блокаторами возбуждающих синапсов.** Эксперименты проводили на 21–50 дни развития (n = 6 экспериментов, 5 культур). Первые 20 минут записи спонтанной активности были исключены из анализа для

устранения эффекта механического воздействия на нейрональную сеть после установки МЕА в коннектор системы регистрации активности.

Протокол состоял из следующих этапов:

- запись спонтанной активности в течении 10 минут (Контроль);
- аппликация CPP и CNQX в нейросеть-Источник. Раствор CPP и CNQX в конечной концентрации 50 мкМ добавляли в камеру нейросети-Источника. Процедура аппликации была аналогична описанной для ТТХ;
- стабилизация спонтанной активности после замены питательной среды и переноса МЕА (20 мин);
- запись спонтанной активности в течение 10 минут (CPP + CNQX).

## **2.5 Регистрация и анализ внеклеточных потенциалов нейронов в первичной культуре гиппокампа**

Для изучения электрической активности первичных культур использовали четыре типа чипов: с симметричными микроканалами, содержащими зигзагообразные сегменты (длина 100 мкм) и узкие треугольные сегменты и с асимметричными каналами в однослойном и двухслойном чипе. Чипы совмещали под бинокулярным микроскопом с микроэлектродной матрицей (МЕА), на поверхности которой располагалось 60 электродов (включая 1 референс-электрод). В результате в камерах с нейросетями располагалось 14-22 электрода, в микроканалах - 24 электрода (по 3 электрода в каждом из 8 микроканалов). ПДМС чипы к МЕА прикрепляли обратимым способом, для этого их отверждали в сухожаровом шкафу при температуре 80°C в течение 30 минут.

Биоэлектрическая активность нейрональных культур записывалась с помощью электродов МЕА (электроды TiN, диаметр 30 мкм, расстояние между электродами 200 мкм, MultichannelSystems, Германия) и системы регистрации USB-MEA120-Inv-2-BC-System (Multichannelsystem, Германия) с частотой дискретизации 20 кГц.

МЕА включала в себя резервуар для культивирования клеток, подложку с плоскими микроэлектродами, с помощью которых регистрируется внеклеточная биоэлектрическая активность нейрональной культуры и производится ее стимуляция. Проводящие дорожки электродов были покрыты изолирующим непроводящим слоем. Внеклеточные потенциалы регистрировались электродами МЕА с клеток, расположенных рядом с электродом или непосредственно на нем, относительно потенциала среды вдали от клеток, регистрируемого электродом сравнения, который также называют референс-электродом.

### 2.5.1 Детектирование импульсов

Спонтанная активность нейрональных культур в микрофлюидных чипах регистрировалась каждые 5 дней с 10 до 25 дня развития.

Детектирование зарегистрированных импульсов активности нейрональных культур проводилось пороговым методом, порог вычислялся на основе значений медианы сигнала по формуле (1):

$$T = N_s \sigma, \sigma = \text{median} \left( \frac{|x|}{0.6745} \right) \quad (1)$$

где  $x$  - сигнал, пропущенный через полосовой фильтр (0,3–8 кГц),

$\sigma$  - оценка медиана, нормализованная к оценке среднеквадратичного отклонения белого Гауссова шума (Quiroga et al., 2004),

$NS$  - коэффициент детектирования импульсов, определяющий порог детектирования (Pimashkin et al., 2011).

Амплитуда импульсов, зарегистрированных электродами в камерах, находилась в диапазоне 20-100 мВ, тогда как в микроканалах диапазон составлял 30-300 мВ. Разница в амплитуде сигнала связана с разным сопротивлением среды. Малый объем среды в микроканале по сравнению с объемом в камере приводит к увеличению сопротивления среды, и как следствие, к увеличению амплитуды сигнала.

### 2.5.2 Детектирование пачек импульсов

Детектирование пачек проводилось для каждой нейросети по алгоритму, разработанному Пимашкиным А.С. (Pimashkin et al., 2011). Сначала вычислялась частота импульсов [TSR (t)], детектированных на всех электродах камеры во временном интервале 1 мс. Критерием появления пачки являлось быстрое появление большого количества импульсов на всех электродах в коротком (50–100 мс) интервале времени.

На основе TSR (t) определялись начало и конец сетевой пачки пороговым методом. Порог вычислялся по формуле (2):

$$T_{\text{Burst}} = 0,1 \times \sigma\text{TSR}, \quad (2)$$

где  $\sigma\text{TSR}$  - среднеквадратичное отклонение TSR (t).

Время начала пачки  $T_r$  определялось временем первого импульса в интервале, в котором TSR (t) превышала пороговое значение. Время окончания пачки определялось как время последнего спайка в интервале, после которого значение TSR (t) становилось ниже порога.

### 2.5.3 Кластеризация пачек импульсов

Начиная с 10 дня развития биоэлектрическая активность модульной нейронной сети представляла собой набор отдельных импульсов и спонтанных пачек импульсов. В каждой записи спонтанной активности культур были определены типы пачек с помощью алгоритма кластеризации К-средних. Кластеризация проводилась по числу импульсов в пачках в нейросети. Разделение кластеров проводилось путем расчета индекса Дэвиса-Боулдина (DB).

Индекс DB оценивал соотношение между внутренним расстоянием в кластерах и расстоянием между кластерами. Превышение индексом значения 0,5 определяло наличие одного кластера в спонтанной активности. В случае,

если индекс находился в пределах от 0 до 0,5 и процент пачек в каждом из кластеров составлял не менее 10% от общего числа, считалось, что активность включала два кластера.

#### 2.5.4 Функциональный показатель однонаправленности межмодульных связей

При наличии однонаправленной связи «Источник→Приемник» некоторые пачки, возникающие в нейросети-Источнике, могли распространяться по аксонам в нейросеть-Приемник и инициировать там вызванную пачку импульсов (вызванная сетевая активность) (рисунок 6), а при наличии связи «Приемник↔Источник» некоторые пачки нейросети-Приемника могли инициировать вызванную пачку в нейросети-Источнике.

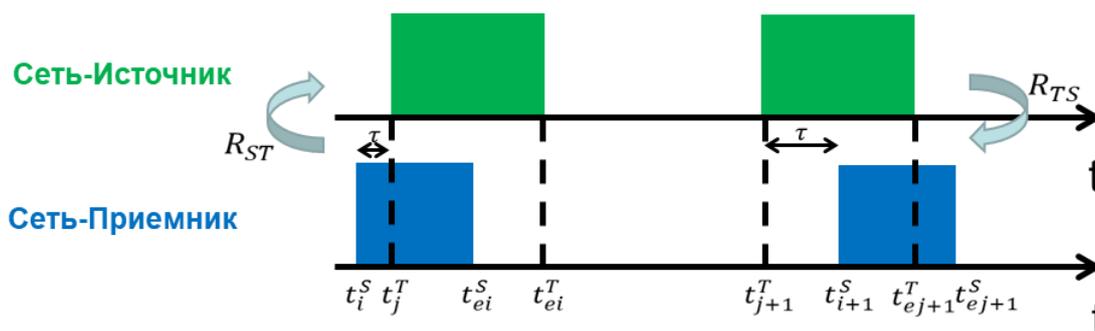


Рисунок 6 – Схематическое изображение временной последовательности пачек в нейросетях Источник и Приемник

С целью исследования однонаправленного функционального взаимодействия между модулями сложной сети определяли *коэффициент направленности связи  $R(\tau)$* , который выражался в проценте коррелированных пачек относительно исходного числа пачек в одной из нейросети.

Коэффициент направленности связи  $R(\tau)$  определяли по следующему алгоритму:

1. Определение коэффициента направленной связи Источник-Приемник. Сетевые пакеты в первой подсети представляли в виде  $X$  дискретного набора событий со временами начала  $(t_1^X, t_2^X, \dots, t_n^X)$  и временами окончания  $(t_{e1}^X, t_{e2}^X, \dots, t_{en}^X)$ . Аналогично, пакеты во второй подсети представляли в виде  $Y$  набора событий со временами начала  $(t_1^Y, t_2^Y, \dots, t_m^Y)$  и временами окончания  $(t_{e1}^Y, t_{e2}^Y, \dots, t_{em}^Y)$ , где  $N_T$  – число всех пакетов (рисунок 5). В случае пересечения событий в двух подсетях вводилась временная задержка  $\tau = t_i^X - t_j^Y$ . Тогда, коэффициент кросс-корреляции между сериями пакетов двух подсетях вычисляли по формуле (3):

$$R(X, Y, \tau) = \sum_{t_i^X} \sum_{t_j^Y} X(t_i^X) * Y(t_j^Y) \delta(t_i^X - t_j^Y - \tau), \quad (3)$$

где дельта-функция принимала следующие значения

$$\delta(t_i^X - t_j^Y - \tau) = \begin{cases} 1, & t_i^X - t_j^Y = \tau; \\ 0 & \end{cases}$$

$$X(t_i^X) * Y(t_j^Y) = \begin{cases} 1, & t_i^X < t_j^Y < t_{ei}^X; \\ 0 & \end{cases}$$

а  $0 < \tau < 500$  мс.

Коэффициент направленности связи для пакетов управляющей нейросети, инициирующих пакету в нейросети-Приемнике, вычисляли по формуле (4):

$$R_{ST}(\tau) = 100 * \frac{1}{N_S} R(X, Y, \tau), \quad (4)$$

где  $N_S$  – число всех пакетов в нейросети-Источнике,

$X$  – набор событий в нейросети-Источнике,

$Y$  – набор событий в нейросети-Приемнике.

Таким образом, коэффициент  $R_{ST}(\tau)$  определял направленность межсетевых связей в направлении от нейросети Источник к Приемнику на задержках  $\tau$ .

2. Определение коэффициента направленности связи от нейросети Приемника к Источнику. В свою очередь, коэффициент направленности

связи для пачек нейросети-Приемника, инициирующих пачку в нейросети-Источнике, вычисляли по формуле (5):

$$R_{TS}(\tau) = 100 * \frac{1}{N_T} R(X, Y, \tau), \quad (5)$$

где  $N_T$  – число всех пачек в нейросети-Приемнике,

$X$  – набор событий в нейросети-Приемнике,

$Y$  – набор событий в нейросети-Источнике.

Таким образом, коэффициент  $R_{TS}(\tau)$  определял направленность межсетевых связей в направлении от нейросети Приемник к Источнику на задержках  $\tau$ .

### 2.5.5 Сравнение временных задержек с набором суррогатных данных методом Монте-Карло

Для подтверждения того, что наблюдаемые временные задержки отражали взаимодействие подсетей, а не случайное временное наложение двух пачек импульсов, был проведен анализ суррогатных данных.

Для этого времена возникновения пачек из исходной последовательности переставляли 1000 раз для получения равномерного распределения задержек. На каждой итерации вычислялись задержки между пачками нейросетей Источник и Приемник, как и для исходных данных.

Далее оценивалась вероятность случайности задержек: если вероятность инициации пачки с задержкой из исходных данных была в 5 раз больше стандартного отклонения суррогатных данных, то задержка определялась как значимая и использовалась в дальнейшем анализе.  $R_{ST}(\tau)$  и  $R_{TS}(\tau)$  оценивались для каждого эксперимента, а затем усреднялись по всем культурам на 10, 15, 20 или 25 день развития.

## 2.5.6 Характеристики кросс-корреляции последовательностей импульсов

Исследование функциональных связей между нейронами в пределах одной нейронной подсети, так и между нейронами двух подсетей проводилось с помощью кросскорреляционного анализа. Известно, что в нейронной сети амплитуда кросскорреляционной функции зависит от свойств синапсов, опосредующих межнейронные взаимодействия, и также модулируется активностью окружающей сети.

Кросскорреляционный анализ последовательностей импульсов проводился для каждой пары электродов мультиэлектродной матрицы. Кросскорреляционная функция ( $C_{i,j}[\tau]$ ) рассчитывалась как отношение количества импульсов, переданных от первого электрода и полученных вторым электродом  $j$  к количеству импульсов на электроде  $i$  (%) с временными задержками от 1 до 300 мс ( $t = [\tau, \tau + 0,5]$ ) по формуле (6):

$$C_{i,j}[\tau] = (N_{i,j}/N_i) \times 100\% = (\sum_t X_i[t] \cdot X_j[t + \tau] / \sum_t X_i[t]), \quad (6)$$

$$1 < \tau < 300 \text{ мс},$$

где  $N_i$  – число импульсов на электроде  $i$ ;

$N_{i,j}$  – число импульсов, переданных от первого электрода  $i$  и найденных на втором электроде  $j$ ;

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

Считается, что между последовательностью импульсов, зарегистрированных на двух участках сети есть связь, если кросскорреляционная функция имеет максимум (le Feber et al., 2007; le Feber, Stegenga, Rutten, 2010).

Таким образом, для оценки взаимодействия нейронов локальных нейронных подсетей в составе модульной сети были использованы следующие характеристики:

1. **Сила связи** - значение максимума кросскорреляционной функции, выраженное в количестве переданных импульсов ( $M_{ij}$ , у.е.);

2. **Задержка связи** - временная задержка между последовательностью импульсов, зарегистрированных на двух электродах, которая соответствует максимуму кросскорреляционной функции ( $T_{ij}$ , мс) (Feberle et al., 2007) и отражает количество синапсов, вовлеченных в передачу сетевой активности.

Значения  $M_{ij}$  и  $T_{ij}$  определяли для каждой пары электродов отдельно в каждой подсети и отдельно между электродами двух подсетей.

### **2.5.7 Анализ активности модульной нейронной сети с однонаправленными межмодульными связями после блокады потенциал-зависимых натриевых каналов в нейросети-Источнике**

Частоту импульсов (ЧИ) вычисляли как количество импульсов в секунду отдельно в каждой из подсетей, нормированных на число электродов в подсети. ЧИ вычисляли и сравнивали для активности в первые 10 минут записи Спонт1 (Исходная1), последние 10 минут Спонт2 (Исходная2), а так же в 10 минутных интервалах в 1-й, 2-й и 3-й часы после добавления ТТХ в нейросеть-Источник.

### **2.5.8 Анализ активности модульной нейронной сети с однонаправленными межмодульными связями после блокады глутаматных рецепторов в нейросети-Источнике**

Число импульсов в пачке (ЧИ в пачке), продолжительность спонтанных пачек и интервалы между пачками оценивали в нейросети-Приемнике и нормировали на среднее значение соответствующих характеристик в контрольной записи.

Деление пачек на крупные и мелкие проводилось с помощью метода К-средних, как описано в пункте 2.6.3. Крупные пачки нейросети-Приемника, инициированные активностью нейросетью-Источником, были определены как Инициированные пачки. Остальные крупные пачки нейросети-Приемника были определены как Собственные пачки.

С целью выявления функциональных изменений в нейросети-Приемнике после подавления входной активности из нейросети-Источника были проанализированы характеристики распространения импульсов во время генерации пачек. Для определения функциональной связности вычисляли кросскорреляционную функцию ( $C_{i,j}[\tau]$ ) для всех возможных пар электродов в нейросети-Приемнике, как описано в пункте 2.6.6. Функциональные связи между электродами  $i$  и  $j$  характеризовались силой  $M_{ij}$  (в пределах от 0 до 1) и задержками  $T_{ij}$  (мс). Чтобы измерить разницу между связностью двух записей спонтанной активности, мы оценили евклидово расстояние двух матриц связности по формулам (7) и (8):

$$E_{\text{сила}}(R_1, R_2) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n [M_{ij}(R_2) - M_{ij}(R_1)]^2}, \quad (7)$$

$$E_{\text{задержка}}(R_1, R_2) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n [T_{ij}(R_2) - T_{ij}(R_1)]^2}, \quad (8)$$

где  $R_1$  и  $R_2$  – спонтанная активность 1 и 2;  $n$  – количество электродов в нейросети-Приемнике.

$C_{i,j}[\tau]$  вычисляли в нейросети-Приемнике в контрольных условиях и после аппликации CPP + CNQX к нейросети-Источнику. Анализ связности в контрольных условиях проводился по Собственным пачкам, без учета Инициированных пачек. Запись спонтанной активности нейросети-Приемника после добавления CPP + CNQX к нейросети-Источнику была разделена на две 5-минутные записи (CPP + CNQX 1 и CPP + CNQX 2), в которых вычисляли ( $C_{i,j}[\tau]$ ). Связность в Собственных пачках в контрольных условиях сравнивали со связностью в пачках в условиях блокировки возбуждающей синаптической активности в нейросети-Источнику CPP +

CNQX 1 ( $EP_{\text{сила}}$ (Собственные, CPP + CNQX 1) и  $EP_{\text{задержка}}$ (Собственные, CPP + CNQX 1)), а затем сравнивали с изменениями связности в пачках в записях CPP + CNQX 1 и CPP + CNQX 2 ( $EP_{\text{сила}}$ (CPP + CNQX 1, CPP + CNQX 2) и  $EP_{\text{задержка}}$ (CPP + CNQX 1, CPP + CNQX 2)).

## 2.6 Методы исследования навигации аксонов в каналах

Для изучения роста нейритов в микроканалах были разработаны многолуночные планшеты (рисунок 7, А). Планшет изготавливали из полилактидного (PLA) пластика ((Ultimaker, Нидерланды) диаметром 2,85 мм, UM-9015-A) с помощью 3D-принтера, в лунки приклеивали покровные стекла размером 24 мм с помощью жидкого ПДМС (10: 1), отверждение происходило в сухожаровом шкафу при температуре 70°C в течение четырех часов. Анализ динамики роста нейритов проводили с помощью системы непрерывного прижизненного мониторинга клеточных культур и анализа изображений (Cell IQ, ChipManTechnologies, Финляндия) (рисунок 7, Б).

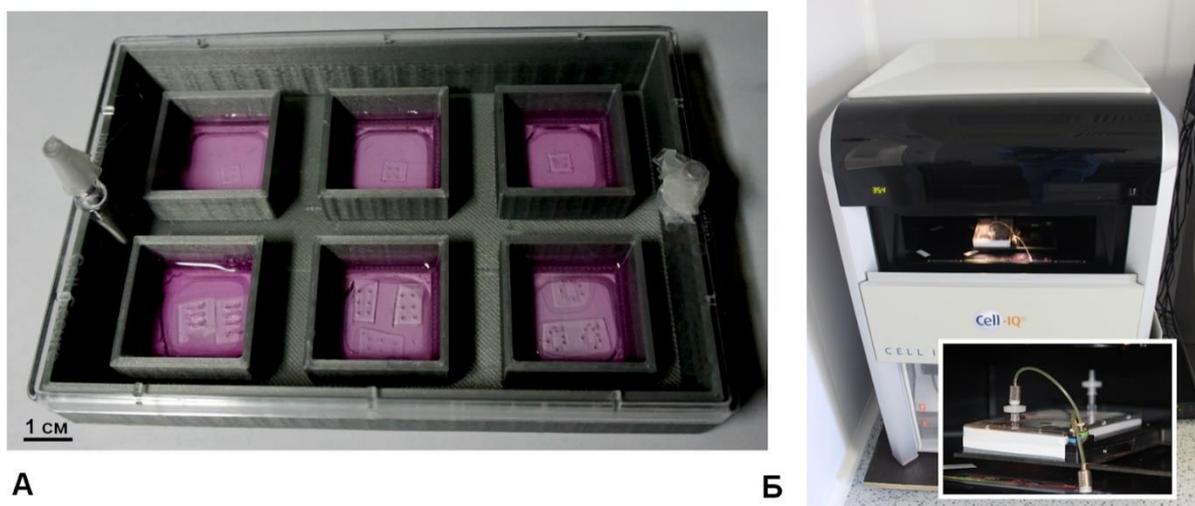


Рисунок 7 – Исследование навигации аксонов в микроканалах: А – Шести-луночный планшет; Б – Расположение планшета в системе непрерывного прижизненного мониторинга клеточных культур и анализа изображений (Cell IQ, ChipManTechnologies, Финляндия)

Мониторинг роста нейритов начинался через 24 часа после посадки клеток и проводился одновременно на нескольких культурах до 10 дня развития, к которому все микроканалы заполнялись нейритами. Фазово-контрастные изображения регистрировали в течение 10 дней через каждые 20 минут для выбранного региона с помощью объектива  $\times 20$  (Nikon CFI PlanFluorescence ELWD ADL, Япония). Данные обрабатывали и анализировали с помощью программ Cell IQ Analyzer и ImageJ.

Количественная оценка эффективности микроканалов для направленного роста нейритов от нейросети Источника к Приемнику заключалась в определении:

1. *Локализация в канале места встречи нейритов, растущих в прямом и обратном направлении. Расстояние оценивали относительно длины канала и представляли в процентах. В случае если нейрит из нейросети-Источника достигал нейросети-Приемника, в то время как нейриты не вырастали из нейросети-Приемника, расстояние до места встречи приравнивали к 0%;*
2. *максимальный рост аксона в обратном направлении;*
3. *скоростей роста аксона через сегмент канала в прямом и обратном направлении, рассчитываемого через скорость одного аксона, прорастающего через один сегмент микроканала (отношение длины сегмента микроканала ко времени прорастания через сегмент).*

## **2.7 Иммуоцитохимические методы исследования**

Для оценки морфологических особенностей нейритов в микроканалах, оценки количества возбуждающих и тормозных нейронов, глии и синапсов проводили иммуоцитологическое исследование.

Для исследования морфологических особенностей нейритов в качестве объекта использовали культуры 6-го дня развития.

Для оценки количества возбуждающих и тормозных нейронов и синапсов использовали культуры 20-го дня развития.

Нейрональные культуры 3 раза подряд промывали теплым (37°C) натрий-фосфатным буфером (Phosphatebufferedsaline, PBS) от питательной среды NeurobasalMedium (NBM-3). Для фиксации клеток применяли 4% параформальдегид (Sigma-Aldrich, США) нагретый до 37°C в течение 15 минут при комнатной температуре и затем трижды отмывали раствором PBS. Чтобы получить доступ к нейритам в микроканалах микрофлюидные чипы удаляли со стекол. Демаскирование клеток проводили с помощью неионного поверхностно активного вещества 0,1% Triton X-100 в PBS с 2% BSA (бычий сывороточный альбумин) в течение 20 минут при комнатной температуре, затем нейрональную культуру трижды промывали раствором PBS.

Маркирование нейронов и аксонов проводили с помощью следующих антител: антитела морской свинки для  $\beta$ 3-тубулина (SYSY, 302 304, Германия) и тау мыши (SYSY, 314 011, Германия); маркирование дендритов проводили с помощью антител для MAP2 курицы (Abcam, ab92434, Великобритания). Клетки инкубировали с первичными антителами при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем трижды промывали раствором PBS. В качестве вторичных антител использовали антитела козы к антигенам морской свинки, меченные флуоресцентным красителем, AlexaFluor 488 (ThermoFisherScientific, США) и антитела козы к антигенам мыши AlexaFluor 647 (ThermoFisherScientific, США) либо антитела козы к антигенам курицы AlexaFluor 546 (ThermoFisherScientific, США) для визуализации  $\beta$ 3-тубулина и белка микротрубочек тау/MAP2 соответственно.

Для оценки количества возбуждающих и тормозных нейронов использовали антитела кролика для CaMKII (Abcam, ab134041, Великобритания), антитела мыши для NeuN (Abcam, ab279297, Великобритания).

Для оценки количества синапсов, маркировали везикулярный глутаматный и ГАМК-транспортер и дендриты антителами кролика для

VGluT1 (Abcam, ab180188, Великобритания), антителами мыши для SLC32A1/VGAT (Abcam, ab211534, Великобритания), антителами курицы для MAP2 (Abcam, ab5392, Великобритания). Клетки инкубировали с первичными антителами при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем трижды промывали буфером PBS в течение 5 мин. В качестве вторичных антител использовали антитела козы к антигенам кролика AlexaFluor 647 (Abcam, ab150083, Великобритания), антитела козы к антигенам мыши AlexaFluor 555 (Abcam, ab150166, UK), антитела козы к антигенам кролика AlexaFluor 488 (Abcam, ab150077, UK), антитела козы к антигенам мыши AlexaFluor 647 (Abcam, ab150115, Великобритания), антитела козы к антигенам курицы AlexaFluor 555 (Abcam, ab150170, Великобритания) для CaMKII, NeuN, VGluT1, SLC32A1/VGAT и MAP2 соответственно.

Клетки инкубировали в темноте с вторичными антителами при комнатной температуре в течение 30 минут и затем промывали PBS и деионизированной водой для удаления солей. После этого клетки помещали в среду для заключения (Sigma-Aldrich, США) на 24 часа при 4°C. Визуализацию проводили с помощью конфокального микроскопа (Zeiss LSM 710, Германия). В результате получали 4-20 z-стеков толщиной 2-5 мкм. Затем изображения стека сглаживали Гауссовым фильтром в программе ZenBlue.

Возбуждающие и тормозные синапсы определяли как VGluT1 либо SLC32A1/VGAT положительные области, наложенные на дендриты, меченные MAP2.

## **2.8 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 (место встречи нейритов, максимальное расстояние прорастания в обратном направлении, скорости роста нейритов в прямом и обратном направлениях) использовался односторонний анализ ANOVA с поправкой Данна (пункт 3.1.1).

Для оценки влияния размера и формы сегментов на максимальную длину прорастания аксонов в обратном направлении был проведен двусторонний ANOVA (пункт 3.1.1).

Для сравнения двух независимых выборок, а именно, коэффициентов направленности связи (пункты 3.2.1, 3.2.2), процентов импульсов, распространяющихся по аксонам (пункт 3.2.3), характеристик пачек импульсов (пункты 3.3.1, 3.3.2, 3.4.2), характеристик связей между ансамблями нейронов (пункт 3.3.2), плотностей VGluT1- (возбуждающих) и VGAT- (тормозных) иммуноположительных терминалей на дендритах (пункт 3.4.3), использовался критерий Манна-Уитни. Для сравнения коэффициентов направленности связи в разные дни развития использовался критерий суммы рангов Уилкоксона (пункты 3.2.1, 3.2.2).

Для сравнения характеристик спонтанной активности модульной нейрональной сети после аппликации ТТХ к нейросети-Источнику использовался односторонний анализ ANOVA с поправкой Бонферрони (пункт 3.4.1).

Для сравнения характеристик связности модульной нейрональной сети после аппликации ТТХ к нейросети-Источнику использовался критерий суммы рангов Уилкоксона (пункт 3.4.2).

Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . На рисунках данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  среднеквадратическое отклонение, либо медианного значения  $\pm$  медианное отклонение.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Конструирование однонаправленной связи между двумя нейронными сетями *in vitro*

Модульные нейронные сети - сети, структура которых включает связанные между собой подмножества нейронов одной локальной сети, которые также связаны с нейронами других подмножеств локальных сетей. В головном мозге высокая кластеризация связей между нейронами в подсетях способствует локальной обработке специализированных функций, в то время как межсетевые связи поддерживают глобально интегрированную обработку более общих функций (Sporns et al., 2004).

В процессе нейрогенеза связи в нейронных сетях мозга *in vivo* 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 данной работе с помощью методов микрофлюидики мы разработали *in vitro* модель модульной нейронной сети, состоящей из двух направленно связанных нейронных сетей. В нашей экспериментальной модели роль направляющего структурного фактора для навигации нейритов, соединяющих две нейронные сети, выполняли микроканалы. Сконструированная с помощью микрофлюидных каналов связь между подсетями должна была иметь направленный характер, то есть активность одной нейросети (Источник) должна распространяться по аксонам в каналах в другую нейросеть (Приемник) и вызывать в ней сетевой ответ. Распространение активности в направлении от сети Приемник в Источник должно было быть минимизировано. Создание такой направленной связи требует формирования синаптических соединений между аксонами

нейросети-Источника и дендритами нейросети-Приемника, в тоже время, исключает наличие обратных соединений.

В нашем исследовании размеры микроканалов выбирались таким образом, чтобы предотвратить попадание в них тел клеток (рисунок 8). В результате, в каналы проникали только аксоны и дендриты, рост и навигацию которых можно контролировать с помощью структуры микроканалов. 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). Длину каналов выбирали с учетом максимальной длины дендритов, делая их как минимум вдвое больше с целью уменьшения вероятности пересечения дендритов нейросети-Источника и аксонов нейросети-Приемника.

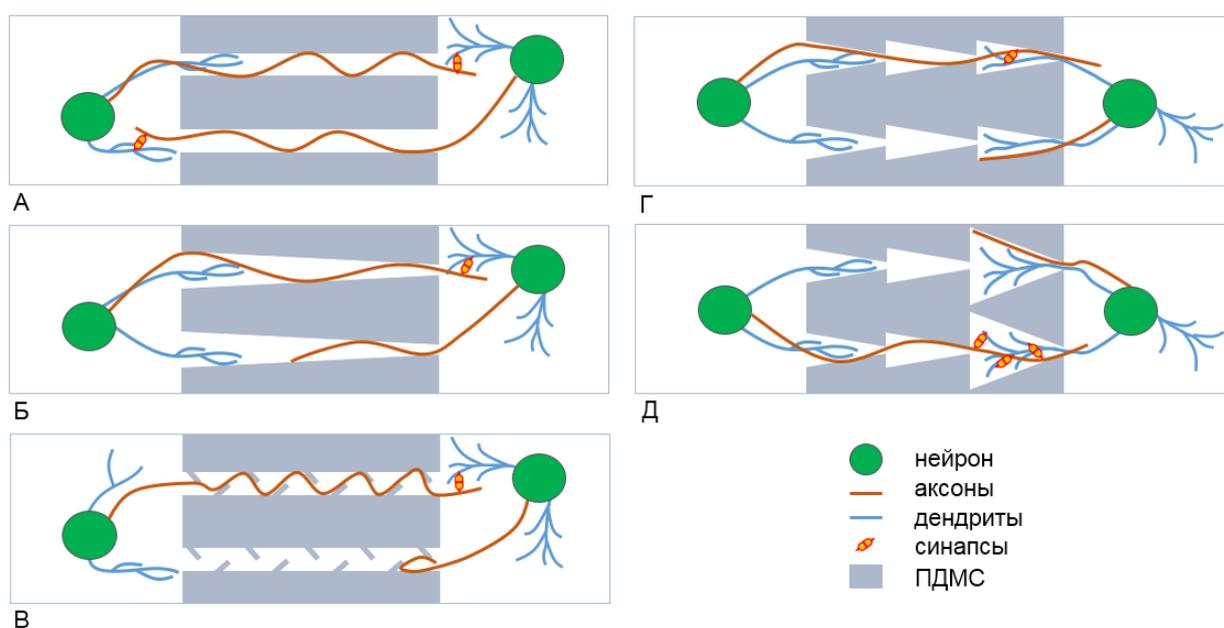


Рисунок 8 – Схема конфигурации разных типов микроканалов, соединяющих две нейронные сети: А – прямой микроканал; Б – воронкообразный микроканал; В – микроканал с перегородками; Г – микроканал, состоящий из нескольких сегментов; Д – «асимметричный» микроканал

Наиболее простой формой микроканалов являются прямые микроканалы, соединяющие две камеры микрофлюидного чипа. Прямые

каналы широко используются для изучения изолированных аксонов, при этом клетки высаживаются только в одну камеру, а микроканалы выполняют функцию отделения аксонов. При культивировании двух нейронных сетей в обеих камерах чипа с прямыми каналами, аксоны беспрепятственно прорастают через каналы с обеих сторон и вместе с дендритами формируют двунаправленную связь между нейросетями (рисунок 8, А).

Выделить направление связи при использовании чипов с прямыми каналами возможно только за счет посадки нейрональных клеток с задержкой в несколько дней в разные камеры чипа. В этом случае, аксоны нейросети-Источника полностью заполнят каналы и не позволят механически аксонам нейросети-Приемника прорасти в соседнюю камеру.

При одновременном культивировании клеток в обеих камерах микрофлюидного чипа должны использоваться микроканалы с особой структурой. При выборе формы канала учитываются такие свойства аксонов, как «жесткость», которая не позволяет растущим аксонам делать резкие повороты, и склонность конусов роста аксонов следовать вдоль стенок (Mahoney et al., 2005). Простейшим примером канала, облегчающего рост аксонов в направлении от нейросети Источника к Приемнику, является воронкообразный канал (рисунок 8, Б). Для того чтобы уменьшить вероятность роста аксонов в обратном направлении от нейросети приемника к Источнику, добавляют дополнительные приспособления, такие как перегородки и возвратные каналы (рисунок 8, В) (Renault et al., 2016; Forró. et al., 2018; Winter-Hjelm et al., 2023). Однако необходимо учитывать, что такие дополнительные структуры могут уменьшить общее число аксонов нейросети-Источника, достигающих до нейросети-Приемника.

В нашем исследовании мы разработали микроканалы, состоящие из нескольких сегментов, стенки которых сужались в сторону нейросети-Приемника, что облегчало направленный рост аксонов в его сторону (рисунок 8, Г, Д). Вероятность роста аксонов в обратном направлении уменьшалась благодаря наличию узких мест между сегментами, которые

заполнялись быстро растущими аксонами нейросети-Источника. Кроме того, в углах сегментов нескольких типов микроканалов находились так называемые «ловушки», куда попадали аксоны нейросети-Приемника, растущие вдоль стенок сегментов.

Сначала мы изучили рост нейритов в микроканалах, состоящих из нескольких одинаковых сегментов, и определили структурные факторы, регулирующие функцию направленного роста аксонов. Каналы с идентичной формой сегментов мы условно назвали «симметричными», а каналы с сегментами разной формы - «асимметричными». Между симметричными и асимметричными каналами было проведено сравнение морфологических и функциональных характеристик связи.

### **3.1.1 Влияние структуры направляющих путей на функцию направленного роста аксонов**

Были исследовано десять типов симметричных микроканалов с тремя типами сегментов: «Зигзаг», «Зазубрины» и «Треугольник» (см. Методы). У всех микроканалов, кроме состоящего из узких треугольных сегментов, ширина «узкого места» между сегментами составляла 5 мкм, а стенки сегментов сходились под углом 45°. У микроканалов из узких треугольных сегментов ширина узкого места составляла 7 мкм, а стенки сегментов сходились под углом 10°.

Первичные нейроны гиппокампа (E18) высаживали в микрофлюидные чипы, прикрепленные к 6-луночному планшету (рисунок 9, А). Через 48 часов после посадки нейриты начинали прорастать в микроканалы одновременно из нейросетей Источника и Приемника. Для мониторинга роста аксонов в микроканалах проводили съемку нейрональных культур в микрофлюидных чипах с помощью системы прижизненного мониторинга CellIQ (Финляндия) на протяжении 10 дней. В общей сложности было проанализировано 138 микроканалов (6 культур). Аксоны нейросети-

Источника прорастали вдоль всей длины микроканалов, аксоны нейросети-Приемника прорастали как минимум через одно узкое место, затем росли вдоль стенок и попадали в ловушки. Большая часть аксонов, растущих из нейросети-Источника, прорастали до последнего сегмента микроканалов в прямом направлении в течение 5 дней (рисунок 9, Б, В, Г, Д, Е).

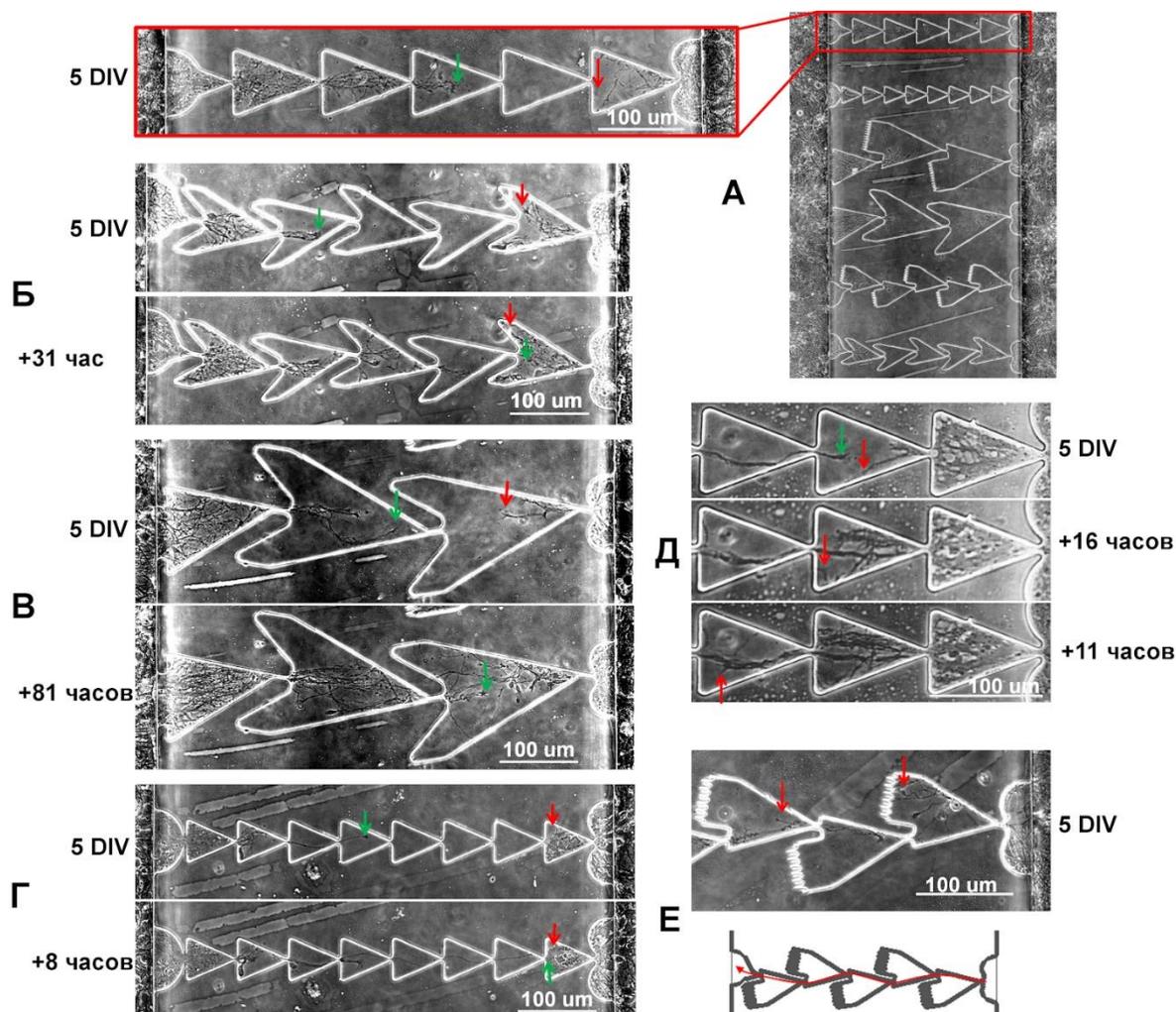


Рисунок 9 – Направленный рост аксонов в микроканалах с сегментами разной формы. Зеленые стрелки указывают на терминаль роста аксонов нейрона нейросети-Источника, красные стрелки указывают на терминаль аксонов нейрона нейросети-Приемника: А – Две нейросети в микрофлюидном чипе с симметричными микроканалами, направляющими рост аксонов от нейросети-Источника (слева) к нейросети-Приемнику (справа); Б – Рост нейритов в микроканале с сегментами типа «Зигзаг» (длина сегмента 100 мкм). Аксоны нейросети-Источника растут вдоль стенок микроканала и на 7 день достигают последнего сегмента (зеленые стрелки).

Аксоны нейросети-Приемника зарастают в ловушки и не прорастают к нейросети-Источника (красные стрелки); В – Рост нейритов в микроканале с большими сегментами типа «Зигзаг». Аксоны нейросети-Приемника за 81 час проходят два узких места (зеленые стрелки) и встречаются с нейритами нейросети-Источника (красные стрелки); Г – Рост нейритов в микроканале с маленькими треугольными сегментами. За 5 дней аксоны нейросети-Приемника прорастают через весь микроканал (зеленые стрелки), в то время как аксоны нейросети-Источника остаются в последнем сегменте микроканала (красные стрелки); Д – Нейриты нейросети-Источника прорастают в обратном направлении по аксонам нейросети-Приемника; Е – Нейриты нейросети-Приемника, растущие в микроканале с сегментами типа «Зазубрины», могут расти как в ловушки, так и вдоль стенок в направлении нейросети-Приемника

На основании наблюдения за ростом нейритов были выявлены критерии для оценки эффективности направленного роста аксонов для всех типов микроканалов.

Первым критерием являлась *локализация в канале места встречи аксонов, растущих в прямом и в обратном направлении*. Для каждого типа канала оценивали среднее значение и стандартное отклонение места встречи как расстояние, измеренное от конца микроканала (рисунок 10). Односторонний ANOVA (F-тест) не выявил статистически значимой разницы ( $p > 0,05$ ) между разными типами микроканалов. Относительное расстояние до места встречи для всех типов каналов находилось в пределах  $33 \pm 5\%$  ( $n = 6$  культур).

Далее была проведена оценка *максимального роста аксона в обратном направлении* в микроканалах (рисунок 10). В среднем, аксоны достигли  $46 \pm 9\%$  длины микроканала от конца микроканала ( $n = 6$  культур) ( $282 \pm 54$  мкм). Только нейриты в микроканалах с большими сегментами проросли

почти до начала микроканала. Дальнейший рост был предотвращен высокой плотностью аксонов из нейросети-Источника в микроканале.

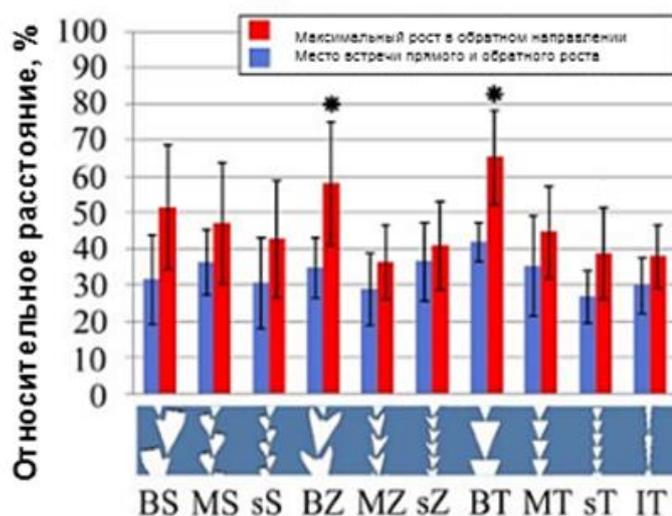


Рисунок 10 – Характеристики роста аксонов для различных типов микроканалов: максимальный рост в обратном направлении - максимальное расстояние, на которое прорастает аксон в направлении от нейросети-Приемника к нейросети-Источника (красные столбцы). Расстояние представлено относительно длины микроканала, которая составляла 600 мкм (n = 6 культур, 138 микроканалов);

место встречи прямого и обратного роста - точка, где аксон, растущий в прямом направлении, встретился с аксонами, растущими в обратном направлении; точка отсчета – конец микроканала (синие столбцы);

\* - наличие статистически значимых различий, выявленные односторонним анализом ANOVA ( $p < 0,05$ )

Односторонний анализ ANOVA (F-тест) выявил статистически значимое различие ( $p < 0,05$ ) между формой микроканалов и *максимальным ростом аксона в обратном направлении*. Наибольшее значимое различие наблюдалось для сегментов BT («Большой треугольник»), который отличался от других шести типов (sS, MS, sZ, MZ, sT, MT).

Микроканалы с сегментами типа «Большой Зигзаг» (BZ) также показали статистически значимое различие с двумя типами микроканалов

(MZ, sT). Наиболее эффективным типом сегмента в соответствии с этим критерием был канал типа MZ («Средний Зигзаг»). Максимальный рост аксона в обратном направлении составлял для этого типа сегментов  $36 \pm 10\%$  ( $n = 6$  культур). Эффективность сегментов такой формы связана с наличием ловушек в форме «рога» и балансом между количеством узких мест и длиной сегмента. Для оценки влияния размера и формы сегментов на максимальную длину прорастания аксонов в обратном направлении был проведен двусторонний ANOVA (F-тест). Показано, что значимую роль для обратного роста имеет длина сегмента ( $n = 6$  культур, 138 каналов,  $p < 0,05$ ). Важно отметить, что длина сегмента также определяет число узких мест между сегментами, которые влияют на пропускную способность микроканала для роста аксонов в обоих направлениях. Так, в канале типа sT на 100 мкм приходится три узких места, тогда как в канале типа BT – два.

Далее была измерена скорость роста аксона через сегмент микроканала в прямом и обратном направлении (рисунок 11).

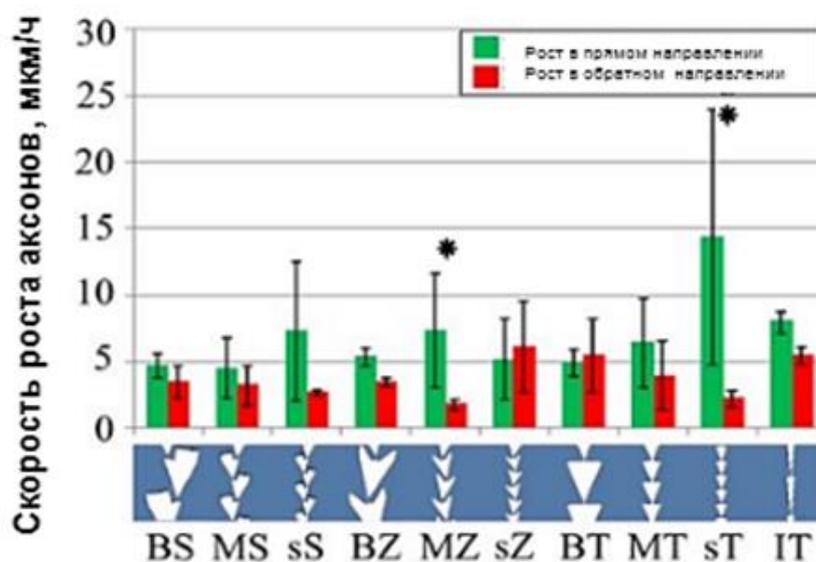


Рисунок 11 – Характеристики роста аксонов для различных типов микроканалов: скорости роста в прямом и обратном направлении, измеренные при прорастании аксона через один сегмент ( $n = 6$  культур, 121 сегмент); \* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0.05$  (Среднее  $\pm$  Среднеквадратическое отклонение)

Максимальная скорость прямого роста наблюдалась в сегментах треугольной формы с наименьшим размером (sT). Этот результат можно объяснить небольшой областью внутри сегмента, которая ограничивает изменчивость траектории роста аксона во время прорастания. Кроме того, узкие места вдоль канала располагались вдоль прямой, что также обеспечило более быструю динамику роста. Максимальная скорость обратного роста наблюдалась в сегментах типа «Зигзаг» (sZ). Скорость прямого роста была значимо больше, чем скорость обратного роста в микроканалах типов sT и MZ (тест Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ). Средняя скорость роста существенно не различалась для различных типов микроканалов (односторонний тест ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Далее была проведена оценка *углового направления* роста нейритов при прохождении узкого места между сегментами. Мы проанализировали два типа узких мест: микроканалов с сегментами типа «Зигзаг» и «Треугольник» (рисунок 12). Большинство нейритов продолжали расти вперед с небольшой изменчивостью в диапазоне 0–30 градусов, и наиболее вероятным было прямое направление.

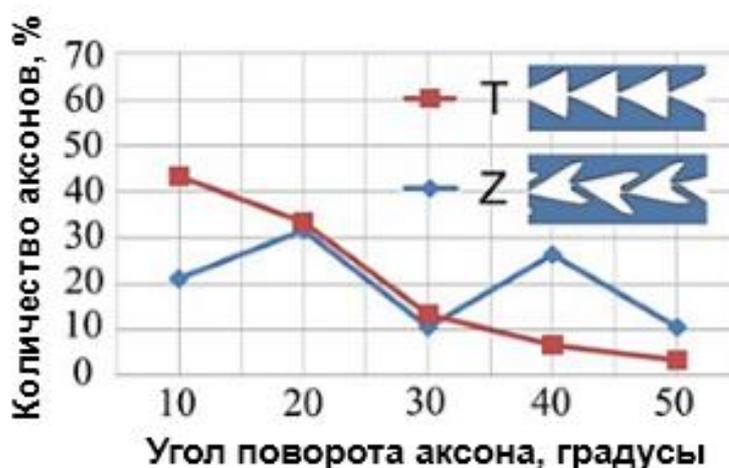


Рисунок 12 – Распределение углов отклонения аксонов относительно типа узкого места в сегментах «Треугольник» и «Зигзаг»

В дальнейшем для разработки наиболее эффективного типа микроканала для направленного роста аксонов были использованы следующие выявленные **особенности навигации аксонов** в микроканалах:

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.

В результате был разработан «асимметричный» микроканал, состоящий из двух типов сегментов. Первый тип имел размеры аналогичные узким треугольным сегментам с длиной 200 мкм и шириной 40 мкм. Два сегмента такого типа располагались в начале микроканала и предназначались для быстрого роста аксонов нейросети-Источника до третьего сегмента. Форма третьего сегмента представляла собой треугольник со сглаженными углами с основанием 150 мкм и высотой 200 мкм. Углы оканчивались ловушками для нейритов, а стенки сегмента отклонялись от оси канала на 45 градусов. Данный сегмент был предназначен для предотвращения прорастания аксонов нейросети-Приемника в остальные сегменты микроканала. Аксоны нейронов нейросети-Приемника либо росли вдоль поверхности широкого сегмента и попадали в ловушки, либо медленно росли без опоры внутри широкого сегмента. В то же время, дендриты нейронов нейросети-Приемника могли образовывать синапсы с аксонами нейросети-Источника в широком сегменте.

Таким образом, асимметричная форма микроканала позволяла быстро растущим аксонам нейросети-Источника образовывать связи с дендритами нейросети-Приемника и уменьшала вероятность прорастания аксонов в обратном направлении, тем самым между нейросетями формировалась однонаправленная синаптическая связь.

Критической областью взаимодействия нейритов нейросетей Источник и Приемник в асимметричных микроканалах является широкий третий сегмент, предназначенный для образования синаптических контактов между аксонами нейросети-Источника и дендритами нейросети-Приемника. Для формирования направленных связей данной цели было необходимо, чтобы аксоны нейросети-Источника прорастали до третьего сегмента быстрее, чем аксоны нейросети-Приемника дорастали до узкого места между вторым и третьим сегментом. Мы оценили число каналов, в которых было выполнено это условие. Наблюдения проводились до 4 дня развития, после которых чаще всего количество нейритов в третьем сегменте не позволяло точно различить аксоны из двух подсетей. В 13 каналах из 20 исследуемых нейриты нейросети-Приемника либо росли вдоль стенок микроканала и оставались в ловушке, либо сталкивались со стенками микроканала и отклонялись от роста в направлении нейросети-Источника (рисунок 13). Таким образом, в 65% случаях аксоны нейросети-Приемника не дорастали до узкого места между вторым и третьим сегментами.

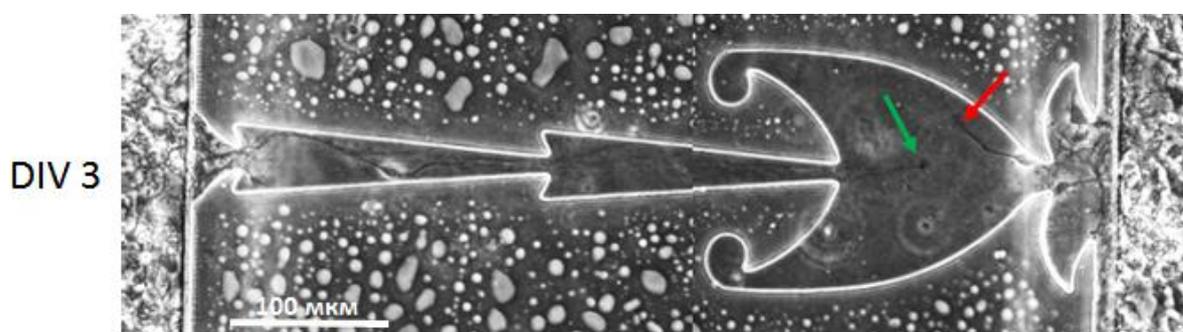


Рисунок 13 – Фотография асимметричного микроканала. Зеленой стрелкой обозначен аксон из нейросети-Источника, красной - аксон из нейросети-Приемника

Для оставшихся 35% медианное значение разницы во времени роста до критической области между вторым и третьим с сегментами составило 28,5 часов. Мы полагаем, что такая разница во времени позволяет аксонам нейросети-Источника плотно прорасти через первые два сегмента канала,

снижая вероятность прорастания аксонов нейросети-Приемника в направлении к управляющей нейросети.

Таким образом, изучение особенностей навигации и роста аксонов в каналах различной формы позволило сделать заключение, что быстрый и направленный рост аксонов обеспечивается каналом, состоящим из сегментов треугольного типа, расположенных вдоль одной оси с основанием треугольника 40-60 мкм и высотой 66 мкм; количество узких мест в канале определяет задержку роста аксонов в обратном направлении. Кроме того, было показано, что аксон при прохождении узкого места (5-7 мкм) способен поворачивать в пределах угла 45 градусов (вероятность поворота в этих пределах составила 90%).

В связи с чем была разработана ассиметричная форма каналов, максимально снижающая вероятность роста аксонов нейросети-Приемника в направлении нейросети-Источника.

### **3.1.2 Анализ особенностей морфологии аксонов и дендритов, растущих в микрофлюидных каналах**

Для определения типов нейритов в микроканалах нейроны первичных культур гиппокампа маркировали на 6 DIV специфическим антителами для визуализации белка микротрубочек Тау в аксонах и белка микротрубочек  $\beta$ 3-tubulin во всем нейроне. В результате было показано, что аксоны находятся во всех сегментах симметричных микроканалов (рисунок 14, желтый)

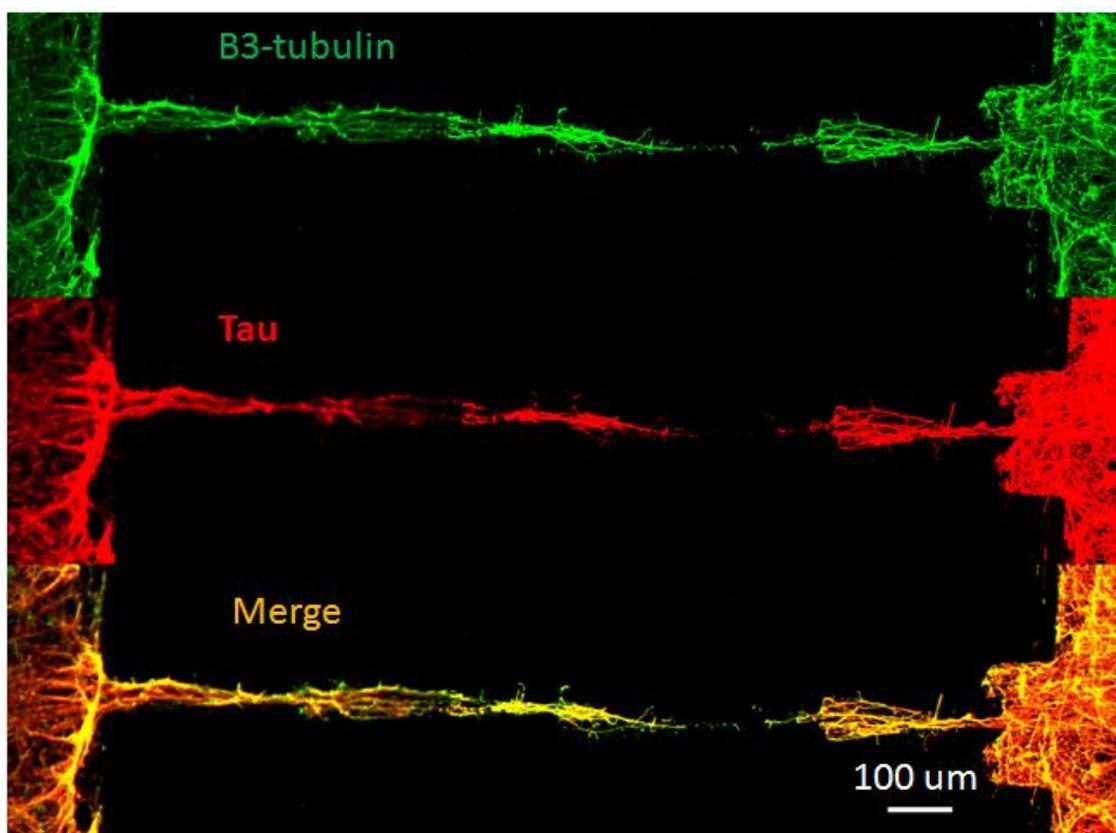


Рисунок 14 – Флуоресцентные изображения двух нейросетей, связанных посредством нейритов в микроканалах симметричного канала. Нейроны и их аксоны в микроканалах визуализированы маркированием  $\beta 3$ -tubulin (зеленый) и тау (красный) специфическими антителами, соответственно.

Масштаб 100 мкм

Определение максимальной длины дендритов в асимметричных микроканалах производилось путем посадки клеток только в камеру для нейросети-Источника и визуализации белка микротрубочек Mar2 в дендритах (рисунок 15, красный) и  $\beta 3$ -tubulin в нейронах в целом (рисунок 15, зеленый). Ядра клеток были визуализированы с помощью ДНК-связывающего красителя DAPI. Дендриты нейронов нейросети-Источника (рисунок 15, желтый) проросли в первый и второй сегмент микроканалов ( $231 \pm 76$  мкм,  $n = 14$  канала), в то время как аксоны проросли через весь микроканал (рисунок 14, зеленый).

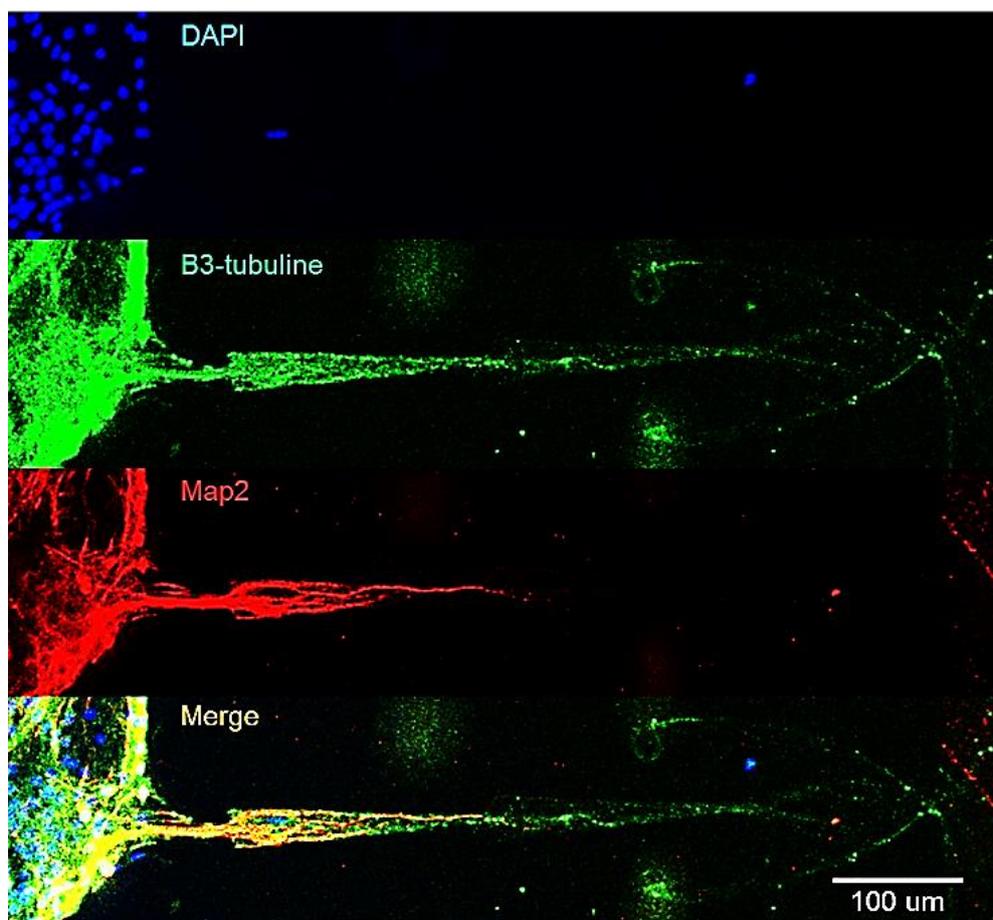


Рисунок 15 – Флуоресцентные изображения нейросети-Источника и нейритов в асимметричных микроканалах. Нейроны и их аксоны в микроканалах визуализированы маркированием  $\beta 3$ -tubulin (зеленый), дендриты Map2 (красный) специфическими антителами, соответственно. Сомы клеток визуализированы ДНК-связывающим красителем DAPI. Масштаб 100 мкм

При маркировании пресинаптических окончаний (рисунок 16) было показано, что синапсы присутствовали только в третьем широком сегменте микроканала. Плотность VGluT1-иммуноположительных терминалей на дендритах (глутаматных синапсов) была в 7,5 больше, чем VGAT-иммуноположительных терминалей (ГАМК-эргических синапсов) ( $1,17 \pm 0,24$  терминалей/мкм и  $0,15 \pm 0,07$  терминалей/мкм соответственно) (Среднее  $\pm$  Среднеквадратическое отклонение,  $n=20$  дендритов, 5 каналов, 5 чипов; критерий Манна-Уитни,  $p < 0,001$ ).

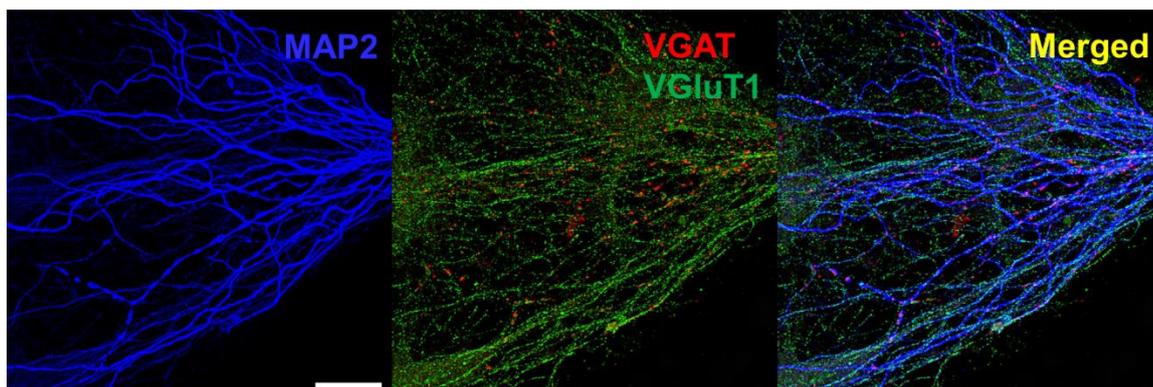


Рисунок 16 – Флуоресцентные изображения дендритов и пресинаптических терминалей в широком сегменте асимметричного микроканала чипа. Дендриты визуализированы маркированием Map2 (синий), тормозные пресинаптические терминали – VGAT (красный), возбуждающие пресинаптические терминали– VGlut1 (зеленый) специфическими антителами, соответственно. Масштаб 20 мкм

Таким образом, с помощью методов иммуноцитохимии было доказано, что в каналах как симметричной, так и асимметричной формы аксоны нейросети-Источника прорастают через всю длину канала до нейросети-Приемника, в то время как дендриты нейронов нейросети-Источника не дорастают до нейросети-Приемника. В третьем сегменте асимметричного микроканала дендриты нейросети-Приемника образуют синаптические связи с аксонами нейросети-Источника с соотношением возбуждающих и тормозных синапсов 7,5:1.

### 3.1.3 Обсуждение полученных результатов

Проведенные исследования навигации и роста аксонов в микроканалах позволили разработать нейрофизиологическую модель однонаправленно связанных нейронных сетей *in vitro*. Модель состояла из двух нейронных сетей, культивируемых в камерах микрофлюидного чипа, связанных посредством нейритов, растущих в соединяющих камеры микроканалах.

Разработка модели включала две концепции построения однонаправленной связи: с использованием симметричных микроканалов и асимметричных микроканалов. Было исследовано десять типов симметричных микроканалов с разной формой сегментов и проведена оценка таких критериев роста аксонов в каналах как: (1) локализация в канале места встречи аксонов, растущих в прямом и в обратном направлении, (2) максимальный рост аксона в обратном направлении, (3) скорость роста аксона через сегмент микроканала в прямом и обратном направлении.

Было продемонстрировано, что при формировании модульных нейронных сетей функция направленного роста аксонов могла 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 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.

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.

Свойство аксонов расти вдоль ограничивающих стенок использовалось в других моделях модульных сетей для перенаправления аксонов нейросети-Приемника обратно в камеру с нейросетью-Приемник (Renault et al., 2016; Forró. et al., 2018; Winter-Hjelm et al., 2023). В разработанной нами модели данное свойство применялось для ускорения роста аксонов нейросети-Источника в первых двух узких сегментах треугольной формы. Третий сегмент служил местом образования синаптических контактов с дендритами нейронов нейросети-Приемника. Угол, под которым расходились стенки

третьего сегмента (90 градусов), был выбран в соответствии с тенденцией аксонов при прохождении узкого места поворачивать в пределах 45 градусов относительно оси канала.

Морфологическая связность локальных сетей в составе модульной сети была подтверждена иммуоцитохимическими исследованиями отростков нейронов в каналах, которые показали наличие аксонов в канале на протяжении всей его длины, а дендритов преимущественно в первых сегментах микроканала (средняя длина дендритов  $231 \pm 76$  мкм). Синапсы формировались в местах соединения дендритов нейронов нейросети-Приемника и аксонов нейронов нейросети-Источника в сегментах микроканалов, примыкающих к камере нейросети-Приемника.

## **3.2 Оценка направленности функциональных связей между локальными сетями в модульных нейронных сетях**

### **3.2.1 Эффективность однонаправленной функциональной связи между нейросетями Источник и Приемник в симметричных каналах**

Кроме морфологических характеристик однонаправленности связи между нейронными сетями были изучены функциональные характеристики эффективности межсетевой связи. Показателем эффективности функциональной межсетевой связи были *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 модульные сети с эффективной направленной межмодульной связью. Для этого исследования использовали чипы с симметричными микроканалами, состоящими из узких треугольных сегментов и сегментов типа «Зигзаг» длиной 100 мкм (рисунок 17, А). Расстояние, на которое прорастали аксоны в

обратном направлении, в таких микроканалах было минимальным по сравнению с остальными типами каналов, поэтому они выбраны в качестве основных кандидатов симметричных микроканалов для формирования однонаправленных синаптических связей между культурами клеток. На 6–8 дни развития аксоны и дендриты полностью заполняли микроканалы и обеспечивали связность культур (рисунок 17, Б).

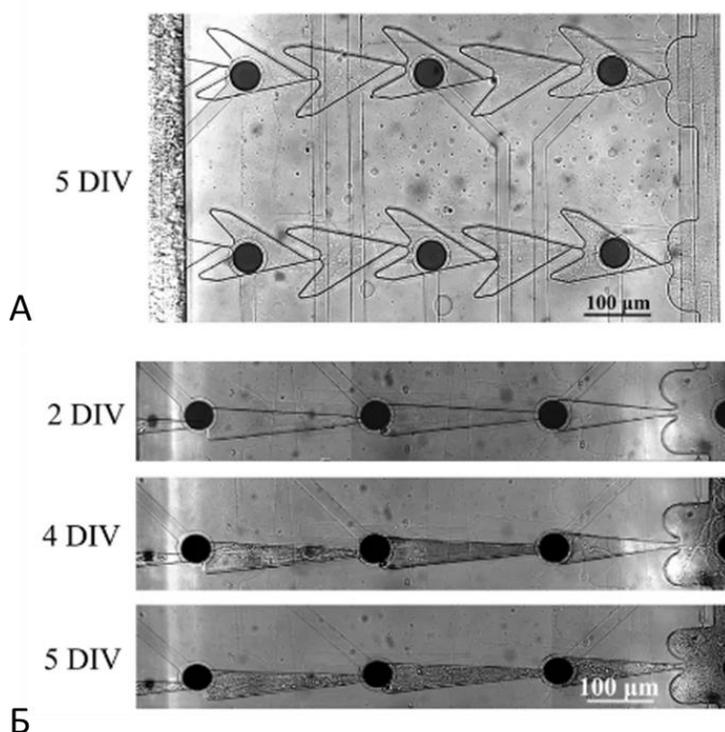


Рисунок 17 – Рост аксонов через симметричные микроканалы на 5-й день развития *in vitro*: А – симметричный микроканал с сегментами типа «Зигзаг»; Б – симметричный микроканал с узкими треугольными сегментами

Регистрация биоэлектрической активности культур с помощью МЭА проводилась с 10 по 25 день развития каждые 5 дней. Пачечная активность наблюдалась в каждой культуре в камерах микрофлюидного чипа (рисунок 18).

Спонтанная пачечная активность наблюдалась в локальных сетях начиная с 10 дня развития. Корреляция пачек между локальными сетями не наблюдалась в культурах в чипах с симметричными каналами с сегментами

типа «Зигзаг» ( $n=5$ ), но была зафиксирована в 9 культурах из 14 в чипах с симметричными каналами с узкими треугольными сегментами.

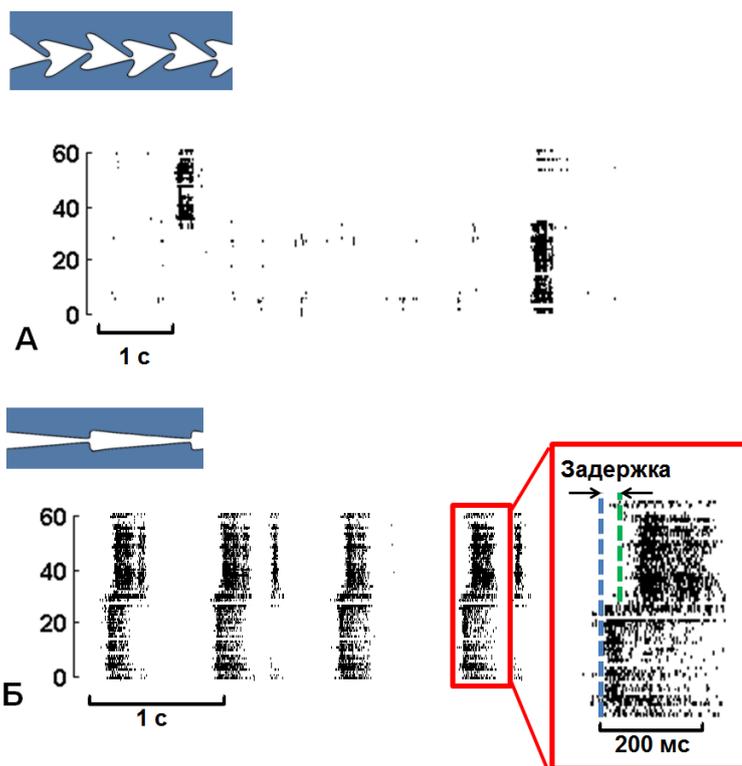


Рисунок 18 – Растровая диаграмма импульсной активности нейронных сетей  
 Источник и Приемник: А – чип с симметричными микроканалами с сегментами типа «Зигзаг», корреляция пачек между подсетями не наблюдается; Б – чип с симметричными каналами с узкими треугольными сегментами. Пачки, возникающие в нейросети-Источнике, распространяются через аксоны в микроканалах и вызывают пачку в нейросети-Приемнике

Причина отсутствия корреляции пачек, т.е. функциональной связности между нейронными сетями в чипах с зигзагообразными каналами, вероятно, заключается в малой ширине узких мест между сегментами (5 мкм). Аксоны, растущие из нейронов нейросети-Источника, прорастали в микроканал в недостаточном количестве для того, чтобы обеспечить синаптическую передачу активности нейронам нейросети-Приемника.

В 5 культурах из 14 в чипах с симметричными каналами с треугольными сегментами пачки в подсетях не коррелировали, хотя импульсная активность обнаруживалась в микроканалах. Для остальных

культур (n=9) был определен коэффициент направленности связи между нейросетями Источник и Приемник.

На рисунке 19 представлен пример усредненного профиля спонтанной пачки, возникающей в нейросети-Источнике (выделено синим), распространяющейся по аксонам в каналах (выделено красным) и вызванная пачка в нейросети-Приемнике (выделено зеленым), построенного по активности одной нейронной сети в чипе с симметричными каналами на 20-й день развития *in vitro*.

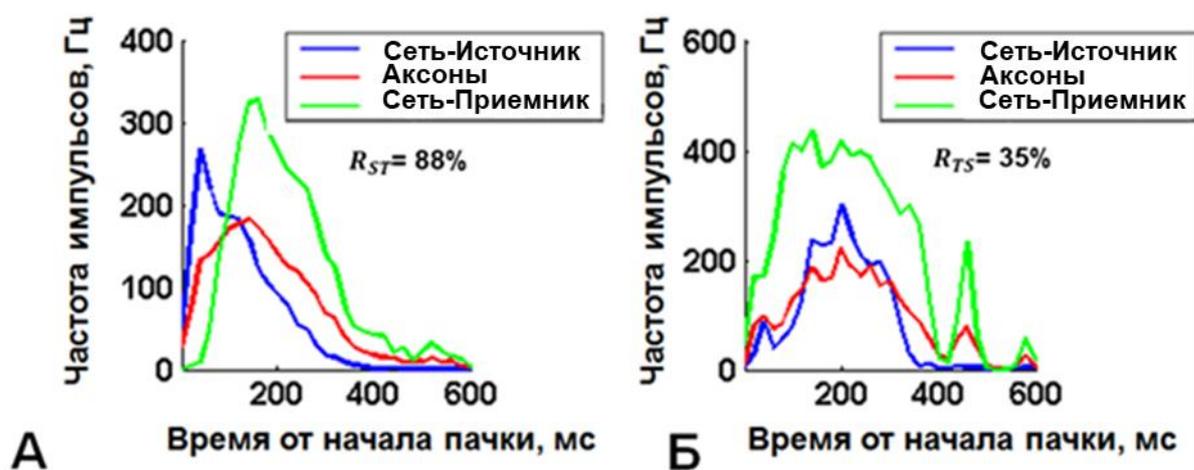


Рисунок 19 – Усредненный профиль частоты импульсов: А – в пачках нейросети-Источника, коррелированных с пачками нейросети-Приемника; Б – в пачках нейросети-Приемника, коррелированных с пачками нейросети-Источника. Цветом отмечена усредненная частота импульсов в пачке, зарегистрированная на всех электродах нейросети-Источника (синий), микроканалов (красный) и нейросети-Приемника (зеленый). Данные представлены для одной нейронной сети на 20-й день развития *in vitro*

Коэффициент направленности связи в направлении от нейросети Источник к Приемнику  $R_{ST}$  был равен 88% (170 из 193), коэффициент направленности связи в направлении от нейросети Приемник к Источнику  $R_{TS}$  составлял 35% (143 из 409) (рисунок 19, Б). Изменения коэффициентов направленности связи во время развития нейронных сетей с 10 до 25 дня представлены на рисунке 20. В среднем  $R_{ST}$  увеличивался до 20 дня ( $47 \pm 20\%$ )

и затем стабилизировался на 25 день ( $40 \pm 20\%$ ), при этом был достоверно больше, чем  $R_{TS}$  на все дни развития (критерий Уилкоксона,  $p < 0,05$ ). Значительные отличия в коэффициентах направленности связи были выявлены между 10 и 15 днями, что может быть связано с возрастанием собственной активности подсетей.

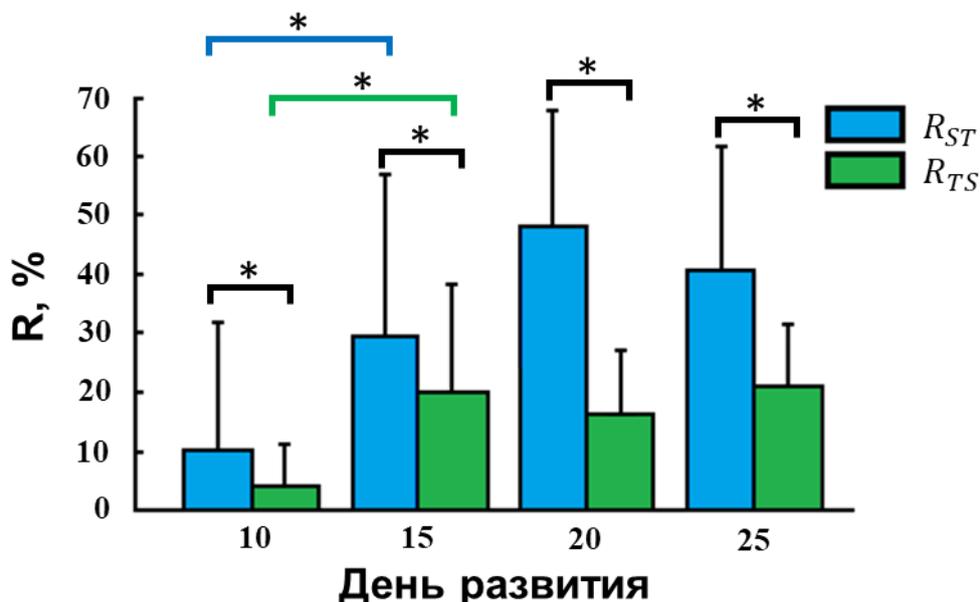


Рисунок 20 – Коэффициент направленности связи от нейросети Источник к Приемнику (синий)  $R_{ST}$  и от нейросети Приемник к Источнику (зеленый)  $R_{TS}$  во время развития нейрональной культуры в микрофлюидном чипе с симметричными микроканалами. \* - наличие статистически значимых различий по критерию Уилкоксона,  $p < 0,05$  (среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение)

Таким образом, в чипах с симметричными каналами с сегментами в виде треугольников коэффициент направленности связей из нейросети Источника в Приемник составил в среднем к 25-му дню развития *in vitro* 40%, а коэффициент направленности связей от нейросети Приемника к Источнику – 20%. Следовательно, межсетевые связи в чипах с каналами с узкими треугольными сегментами носили не направленный характер.

### 3.2.2 Эффективность однонаправленной функциональной связи между нейросетями Источник и Приемник в асимметричных каналах

Для исследования активности нейрональных культур в чипах с асимметричными каналами чипы совмещали с микроэлектродными матрицами таким образом, что микроэлектроды попадали в 8 микроканалов из 16, расположенных по центру чипа, по 3 электрода на микроканал. В камерах было расположено по 14 или 22 электрода. Так же, как и в чипах с симметричными каналами, аксоны заполняли каналы на 6–8 дни развития (рисунок 21).

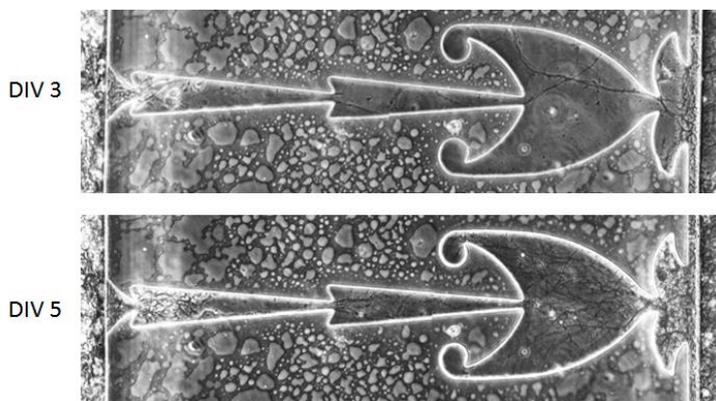


Рисунок 21 – Рост аксонов в асимметричном микроканале на 3 и 5 дни развития

Регистрация биоэлектрической активности культур с помощью МЭА проводилась с 10 по 25 день развития каждые 5 дней. Спонтанная пачечная активность наблюдалась в каждой подсети начиная с 10 дня развития (рисунок 22). Корреляция пачек между нейросетями была зафиксирована в 5 культурах из 8, для них была проведена оценка процента пачек, генерируемых в нейросети-Источник, которые распространялись по аксонам в микроканалах и вызывали пачку в нейросети-Приемнике.

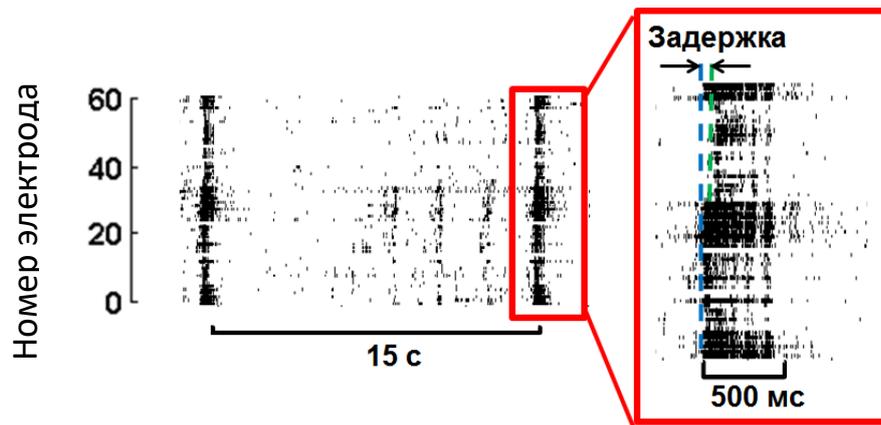


Рисунок 22 – Растровая диаграмма импульсной активности нейросетей Источник и Приемник в чипе с асимметричными каналами. Пачки, возникающие в нейросети-Источнике, распространяются через аксоны в микроканалах и вызывают пачку в нейросети-Приемнике

На рисунке 23 приведен пример усредненного профиля спонтанной пачки для нейронной сети в чипе с асимметричными микроканалами. Коэффициент направленности связей от нейросети Источник к Приемнику  $R_{ST}$  составил 75% (60 коррелированных пачек из 79 пачек нейросети-Источника). Важно, что в отличие от чипов с симметричными каналами в чипах с асимметричными каналами пачки нейросети-Приемника не вызвали пачку в нейросети-Источнике.

В среднем коэффициент направленности связей от нейросети Источника к Приемнику  $R_{ST}$  увеличивался до 20 дня и составил  $43 \pm 26\%$  (рисунок 24).

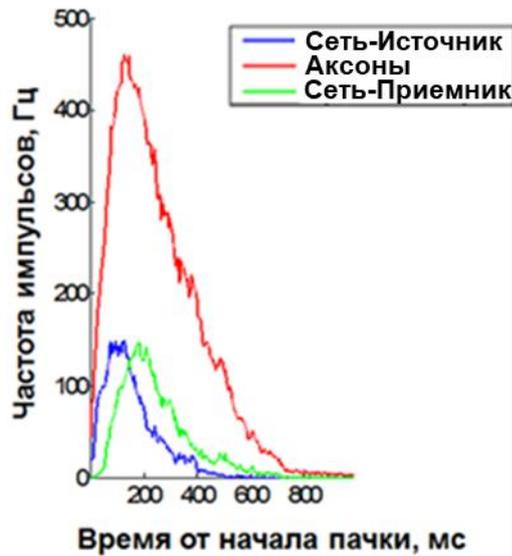


Рисунок 23 – Растровая диаграмма импульсной активности нейросетей Источник и Приемник в чипе с асимметричными каналами

Значимое изменение эффективности связей в направлении от нейросети Источник к Приемнику, наблюдаемое между 15 и 20 днями развития нейросетей *in vitro*, может быть связано с созреванием синаптических контактов между подсетями.

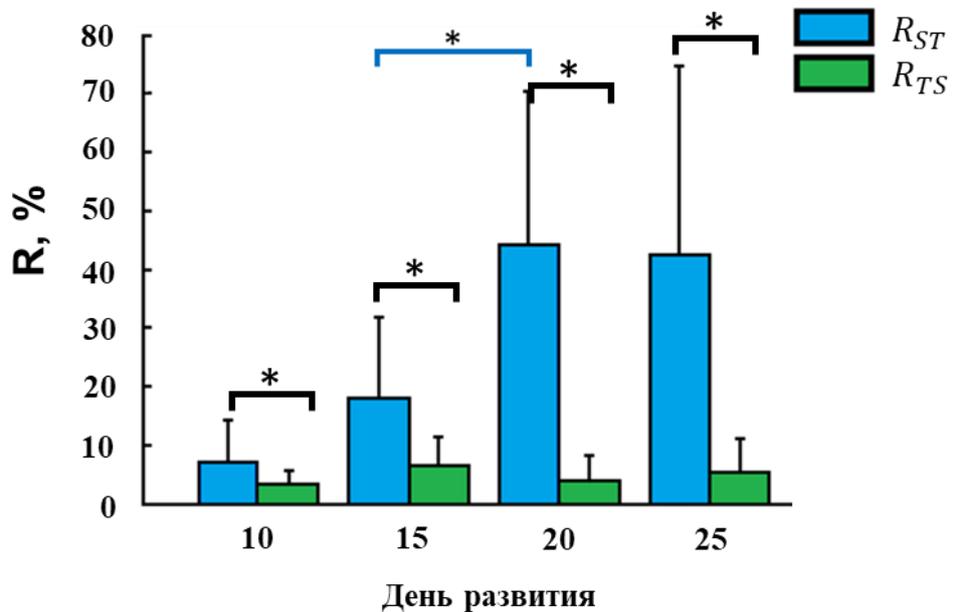


Рисунок 24 – Коэффициент направленности связи от нейросети Источник к Приемнику ( $R_{ST}$ ) (синие столбцы) и от нейросети Приемник к Источнику ( $R_{TS}$ ) (зеленые столбцы) во время развития нейрональной

культуры в микрофлюидном чипе с асимметричными микроканалами. \* - наличие статистически значимых различий по критерию Уилкоксона,  $p < 0,05$   
(Среднее  $\pm$  Среднеквадратическое отклонение)

Коэффициент направленности связи от нейросети Приемник к Источнику  $R_{TS}$  достигал максимального значения на 15-й день развития *in vitro* и составлял  $6 \pm 5\%$ .

Таким образом, в чипах с асимметричными каналами коэффициент направленности связи  $R_{ST}$  составил в среднем к 25-му дню развития *in vitro*  $42 \pm 32\%$ , а  $R_{TS}$  –  $4 \pm 8\%$ . В этом случае однонаправленность передачи сигнала от нейросети Источник к Приемнику была высокая, что позволяло сформировать экспериментальную модель однонаправленно связанных нейронных сетей *in vitro*.

### **3.2.3 Особенности распространения импульсов по аксонам в микрофлюидных микроканалах**

ПДМС чипы совмещались с микроэлектродными матрицами таким образом, что в каждом микроканале длиной 600 мкм располагалось по 3 электрода. Исследование распространения импульсов по аксонам в каналах проводилось на следующих участках: между электродами, расположенными в конце 1 сегмента и конце 2 сегмента; между электродами, расположенными в начале 2 сегмента и начале 3 сегмента.

Известно, что амплитуда внеклеточно регистрируемого сигнала зависит не только от величины нейрональных токов, но и от удельного сопротивления окружающей среды. Модель внеклеточного потенциала представляет собой участок нервной мембраны, действующий как источник тока с удаленным стоком, создающим потенциальное поле.

Для электродов в камере импеданс включает в себя комплексный импеданс, возникающий на границе электрод-электролит, и небольшое по

величине сопротивление среды, и составляет примерно 0,21 МОм (Pan et al., 2013). В канале основной вклад дает сопротивление среды, которое можно рассчитать по формуле (9):

$$R = \sigma L / (W \times H), \quad (9)$$

где  $\sigma$  — сопротивление нейробазальной среды (90 Ом·см) (Yu Z. et al., 2004);

$H$  – высота, 5 мкм;

$W$  – ширина, 7-20 мкм;

$L$  - расстояние от электрода к концам туннеля, 100 - 300 мкм.

Таким образом, сопротивление среды в первых двух сегментах может принимать значения от 0,9 МОм до 7,7 МОм в зависимости от расположения электрода. Зарегистрированные в камерах внеклеточные потенциалы действия иногда превышают 50 мкВ, но потенциал быстро падает по мере удаления от клетки. Внутри канала импеданс может быть в 500 раз больше, и зарегистрированный потенциал падает линейно пропорционально расстоянию до конца канала.

Кроме увеличения амплитуды импульса (рисунок 25) в микроканалах наблюдается изменение его формы, а именно усиление отрицательного пика, связанное с распространением потенциала действия, и появление положительных фаз по обе стороны от отрицательного пика из-за временного смещения заряда в канал. То есть в канале существует не распространяющаяся положительная фаза, продолжительность которой совпадает с входом и выходом точки доступа в канал и из него.

Мы оценили скорость распространения спонтанно возникающих импульсов в микроканалах с помощью оценки времени регистрации импульсов одинаковой формы на соседних электродах в канале.

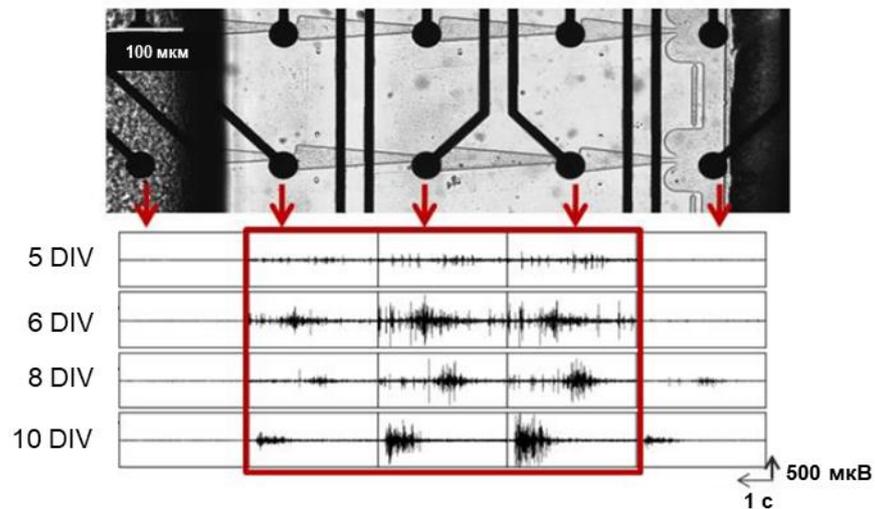


Рисунок 25 – Усиление регистрируемого внеклеточного сигнала в микроканалах: Г – Микроскопическая фотография микроканала с аксонами и камер с нейронами; Д – Регистрируемая микроэлектродами активность в камерах и микроканалах (красная рамка) на разные дни развития *in vitro*

В среднем скорость распространения составила  $0,4 \pm 0,9$  м/с ( $n=13$  каналов) (рисунок 26). Средняя скорость немиелинизированных аксонов в срезах гиппокампа составляет 0,38 м/с (Meeks, Mennerick et al., 2007). В исследовании гиппокампальных культур *in vitro*, полученных из эмбрионов крыс E18, скорость распространения импульсов по аксонам, растущим в прямых микроканалах, находилась в пределах 0.2–0.5 м/с (Hong, Joo, Nam, 2016). Скорости, измеренные на аксонах гиппокампальных культур *in vitro*, полученных из неонатальных крыс P3, изменялись в более широких пределах: от 0.2 м/с до 0.83 м/с (Narula et al., 2017). Полученные нами значения скорости распространения импульсов соответствует данным, полученными другими исследователями в культурах и в срезах. Таким образом, свойства проводимости исследуемой нейронной сети, по-видимому, схожи с таковыми в срезах, в которых сохраняется структура связей, сформированных *in vivo*.

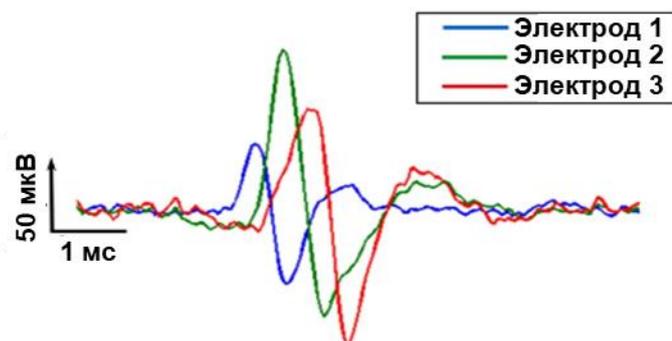


Рисунок 26 – Распространение одного спайка, зарегистрированного на трех электродах в микроканале. Цвета соотносятся с порядком электрода в микроканале

Далее был определен процент импульсов, переданных в каналах в прямом и обратном направлениях на разные дни развития культур. Каждая культура характеризовалась собственным профилем изменения числа распространяющихся импульсов, что связано с индивидуальными особенностями роста аксонов в микроканалах. Так, в исследовании распространения импульсов вдоль аксонов, растущих в прямых микроканалах разной ширины, было показано, что наиболее точно импульсы воспроизводятся в узких каналах шириной 2,5 мкм, число аксонов в которых невелико (Narula et al., 2017). Также было подтверждено, что аксоны имеют тенденцию сначала расти вдоль краев каналов, а затем заполнять центральную область канала. При этом траектория роста отдельных аксонов получается извилистой, в связи, с чем аксон может контактировать с одним электродом в канале и не контактировать с другим. В результате, формы и число зарегистрированных на соседних электродах импульсов могут отличаться (Pan et al., 2011).

Для исследования направленности связи, образованной между двумя подсетями, мы определили процент импульсов, распространяющихся в прямом и обратном направлениях по аксонам в микроканалах с помощью оценки задержек между импульсами, обнаруженными на соседних электродах в канале (см. Методы). Мы исследовали распространение

импульсов на участке микроканала между 1 и 2 сегментами ( $n = 4$  культуры) и между 2 и 3 сегментами ( $n = 5$  культур) (рисунок 27). Было показано, что распространение импульса между первыми двумя сегментами микроканала преимущественно происходит в прямом направлении на протяжении всего развития культуры. Медианное значение процента импульсов, распространяющихся в прямом направлении, изменялось не более, чем на 3,6% во время развития. В прямом направлении импульсов распространялось значимо больше, чем в обратном (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ). На 25 день развития оно составило  $35,7 \pm 13\%$ , в то время как в обратном направлении процент распространяющихся импульсов был равен  $4,8 \pm 8\%$ .

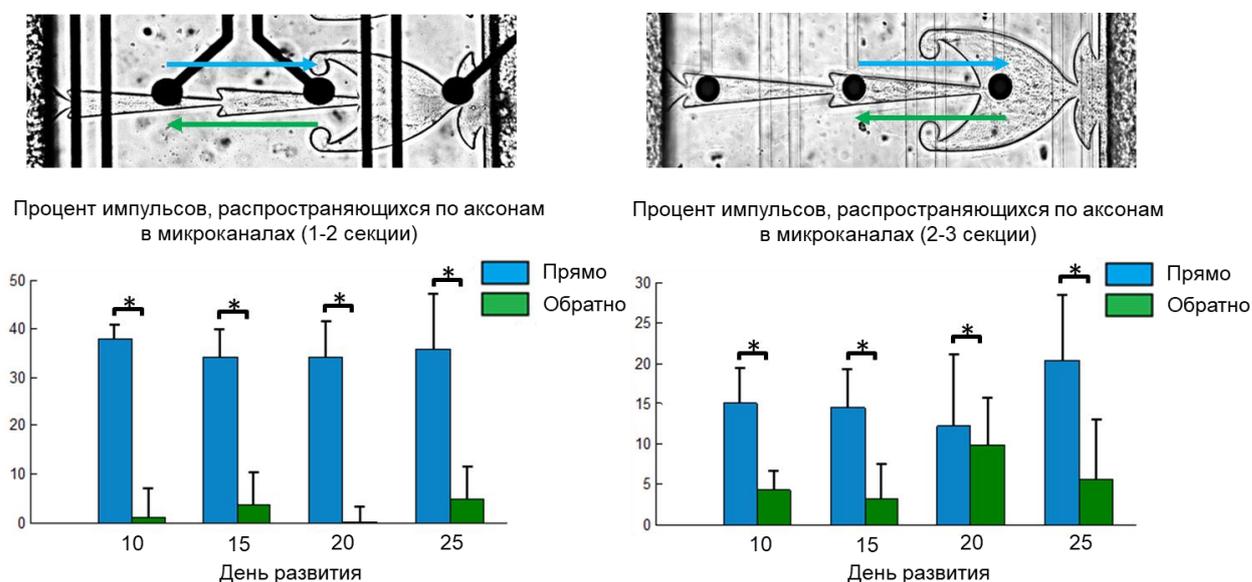


Рисунок 27 – Распространение импульсов по аксонам в микроканалах:  
 А – Процент импульсов, распространяющихся в направлении от нейросети  
 Источник к Приемнику и обратном направлении между первой и второй  
 сегментами микроканалов; Б – Процент импульсов, распространяющихся в  
 направлении от нейросети Источник к Приемнику и обратном направлении  
 между второй и третьей сегментами микроканалов; \* - наличие  
 статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0.05$   
 (Медиана  $\pm$  Медианное абсолютное отклонение)

Распространение импульсов между 2 и 3 сегментами канала было более вариабельным. Процент числа импульсов, распространяющихся в прямом направлении, был значимо больше, чем в обратном на 10 и 15 дни развития. На 25 день медианное значение процента распространяющихся в прямом направлении импульсов составило  $20,4 \pm 11\%$ , в обратном направлении -  $5,5 \pm 8\%$ . Процент импульсов, распространяющихся в обратном направлении, был максимальным на 20 день развития и составлял  $9,7 \pm 7\%$ .

В целом, для 2-3 сегментов процент импульсов, распространяющихся в прямом направлении, уменьшился, по сравнению с 1-2 сегментами, и увеличился для импульсов, распространяющихся в обратном направлении. Первое может быть объяснено большей возможностью отклонения траектории роста аксонов при выходе в третий широкий сегмент микроканала. Меньший процент аксонов будет располагаться одновременно на 2 и на 3 электроде в канале. Увеличение процента распространения в обратном направлении может отражать случаи прорастания аксонов из нейросети-Приемника во 2 сегмент канала. Дальнейшее уменьшение этого показателя свидетельствует о замедлении обратного роста в первого сегмента благодаря заполненности каналов аксонами нейросети-Источника.

Несмотря на то, что высокий процент импульсов, распространяющихся в прямом направлении между 1 и 2 сегментами в микроканале, обнаруживался в четырех исследуемых культурах, только в одной из них наблюдалась межсетевая корреляция пачечной активности. По-видимому, распространение сигнала по аксонам в прямом направлении в первых двух сегментах канала не обеспечивает формирование межсетевой связи, достаточной для возбуждения пачки в нейросети-Приемнике. Тем не менее, небольшой процент импульсов, распространяющихся от нейросети Приемник в Источник на данном участке связи, указывает на преобладание роста аксонов в прямом направлении.

Процент импульсов, распространяющихся в прямом направлении между 2 и 3 сегментами, был меньше, чем между сегментами 1 и 2, но для

всех исследуемых культур коэффициент эффективности межсетевой связи от нейросети Источник к Приемнику была выше, чем в обратном направлении.

Таким образом, благодаря асимметричным микроканалам между подсетями формируется направленная функциональная связь от нейросети-Источника к нейросети-Приемнику.

### 3.2.3 Обсуждение полученных результатов

Функциональная эффективность микроканалов была подтверждена исследованием электрофизиологической активности, зарегистрированной с помощью МЭА. Мы исследовали эффективность направленности межсетевых связей от нейросети Источника к Приемнику и в обратном направлении на 10, 15, 20 и 25 дня развития нейрональных культур *in vitro*. Для исследования были выбраны чипы с асимметричными микроканалами и чипы с симметричными микроканалами, состоящими из узких треугольных сегментов и сегментов типа «Зигзаг» длиной 100 мкм.

Мы не наблюдали коррелированной пачечной активности между подсетями в чипах с микроканалами типа «Зигзаг», что может быть связано с малой шириной узкого места между сегментами (5 мкм) и недостаточным количеством аксонов для передачи сигналов. Действительно, в проведенных ранее исследованиях (Pan et al., 2015) распространения пачечной активности между подсетями, связанными прямыми каналами, было показано, что существует минимальное необходимое количество аксонов, связывающих нейросети, для возможности появления интегрированной активности.

В двух других типах чипов наблюдались коррелированные между подсетями пачки. В чипах с микроканалами симметричного типа, состоящих из узких треугольных сегментов, наибольший коэффициент направленности связи  $R_{ST}$  в направлении от нейросети Источника к Приемнику наблюдался на 20 день развития и составлял  $47 \pm 20\%$ . Коэффициент  $R_{TS}$  в обратном направлении составлял  $15 \pm 11\%$  на 20 день развития. Как показано в наших

исследованиях морфологии связей, микроканалы такого типа не имеют эффективного механизма для предотвращения роста аксонов в направлении к нейросети-Источнику. Вследствие чего аксоны могут прорасти в обратном направлении и образовывать синаптические контакты с дендритами нейросети-Источника, что в случае достаточного числа аксонов в каналах может привести к появлению функциональных связей в направлении от нейросети Приемника к Источнику.

Для нейросетей в чипах с асимметричными каналами, коэффициент направленности связи от нейросети Источника к Приемнику также был максимальным на 20-й день развития и составлял  $43 \pm 26\%$ , что сопоставимо со значениями в чипах с симметричными каналами.

На рисунке 28 представлено сравнение коэффициента направленности связи от нейросети Источника к Приемнику для нейронных сетей связанных посредством симметричных и асимметричных микроканалов. Значимых различий для двух видов соединений не наблюдалось.

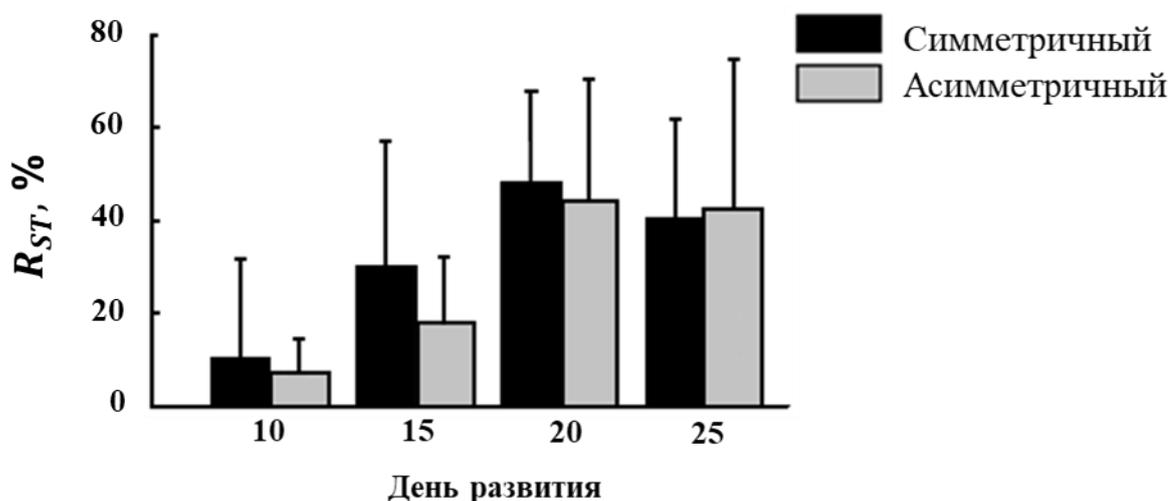


Рисунок 28 – Коэффициент направленности связи от нейросети Источника к Приемнику, связанных посредством симметричных (черные столбцы) и асимметричных (серые столбцы) микроканалов (Среднее  $\pm$  Среднеквадратическое отклонение)

Коэффициент направленности связей от нейросети Приемника к Источнику  $R_{TS}$  на 20 и 25 дни развития был достоверно меньше для подсетей, связанных посредством асимметричных микроканалов (тест Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

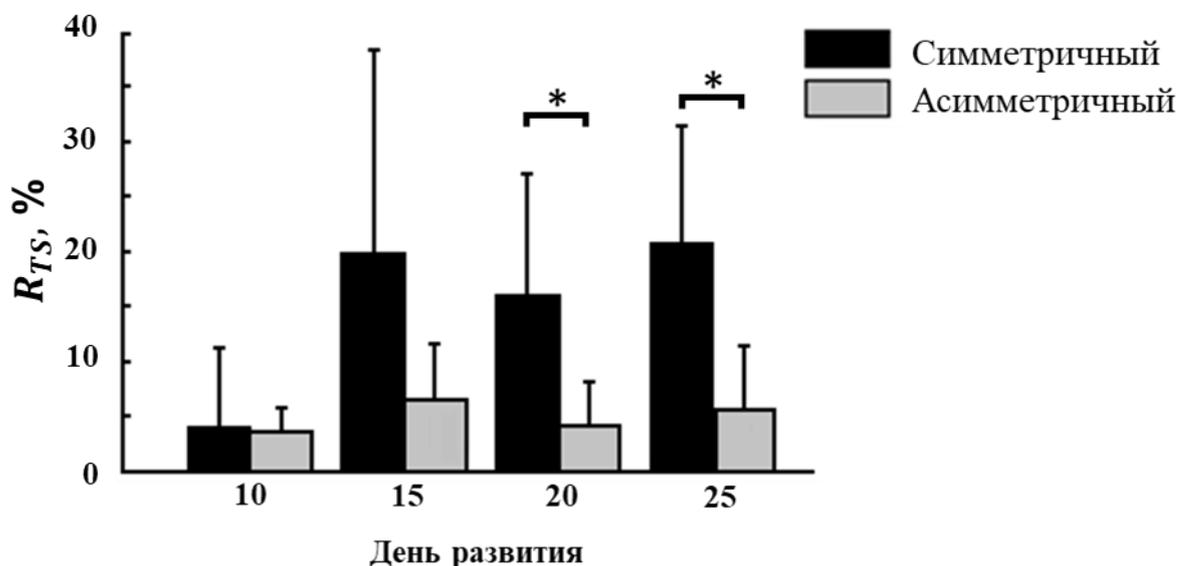


Рисунок 29 – Коэффициент направленности связей  $R_{TS}$  в направлении от нейросети Приемника к Источнику, связанных посредством симметричных (черные столбцы) и асимметричных (серые столбцы) микроканалов. \* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0,05$  (Среднее  $\pm$  Среднеквадратическое отклонение)

Таким образом, асимметричная форма микроканала в сочетании с увеличением числа микроканалов не приводит к увеличению коэффициента направленности связи от нейросети Источника к Приемнику.

Тем не менее, асимметричные микроканалы показали большую эффективность для предотвращения прорастания аксонов от нейросети Приемника к Источнику и распространения пачечной активности в этом направлении. В целом, чипы с асимметричными микроканалами обеспечивают более надежную однонаправленную связь, чем чипы с симметричными каналами. Таким образом, с использованием метода кросс корреляции был разработан коэффициент направленности связи  $R(\tau)$ , с

помощью которого было определено, что для создания однонаправленной морфофункциональной связи между нейронными сетями наиболее эффективной является асимметричная форма каналов с наличием «сегментов-ловушек».

В предыдущих работах по исследованию модульных сетей *in vitro* функциональная связность также определялась наличием коррелированной межсетевой активности (Peyrin et al., 2011; Poli et al., 2017; Renault et al., 2016; Na et al., 2016), однако эффективность направленной связности подсетей не исследовалась. Высокая степень корреляции межсетевой активности с преобладающим направлением распространения была продемонстрирована только для малых сетей, включающих десятки нейронов (Forró et al., 2018; Duru et al., 2022). В нашей работе впервые было приведено доказательство наличия функциональной связности и надежности однонаправленной связи между большими нейронными сетями.

### **3.3 Влияние спонтанной активности в направленно связанных подсетях на их взаимодействие**

Проведенные исследования показали, что направленность функциональных межсетевых связей может быть обеспечена за счет направления роста аксонов нейронов нейросети-Источника и торможения роста аксонов нейронов нейросети-Приемника с помощью микроканалов асимметричной формы.

Для выявления условий эффективного функционального взаимодействия двух локальных сетей *in vitro* мы исследовали собственную спонтанную активность нейронных сетей, их связность и влияние данных параметров на силу межсетевых связей в сложной сети.

### 3.3.1 Типы спонтанной активности в модели однонаправленно связанных нейронных сетей *in vitro*

Для выявления типов спонтанной активности мы исследовали изменение временно-частотных характеристик спонтанной активности 7 модульных нейронных сетей с направленными межмодульными связями на 20 и 25 дни развития.

Для описания динамики спонтанной активности нейронных сетей были построены гистограммы для следующих параметров сетевой пачки:

- число импульсов в сетевой пачке, нормированное на число электродов;
- длительность сетевой пачки.

Распределения строились отдельно для нейросетей Источника и Приемника в составе модульной нейронной сети на 20, 25 дни развития *in vitro*, когда наблюдалась корреляция пачечной активности между подсетями.

#### *Число импульсов в пачке*

Используя метод кластеризации К-средних, мы определили, что активность нейронных сетей по числу импульсов в пачках распределялась на один или два кластера. На рисунке 30,А представлен пример бимодального распределения числа импульсов в пачке для нейросетей Источник и Приемник. В данном примере на рисунке 30, А для нейросети-Источник медианное значение числа импульсов в пачке составило 2,7 импульсов для кластера малых пачек и 28 импульсов для кластера крупных пачек. Аналогично, для нейросети-Приемника значения составили 2,7 импульсов и 33 импульса. Спадающее однокластерное распределение числа импульсов в пачке соответствовало большому числу малых пачек с редкими крупными пачками. В примере на рисунке 30, Б медианное значение числа импульсов в пачках составило 3 импульса для нейросети-Источник и 1,7 импульса для нейросети-Приемника.

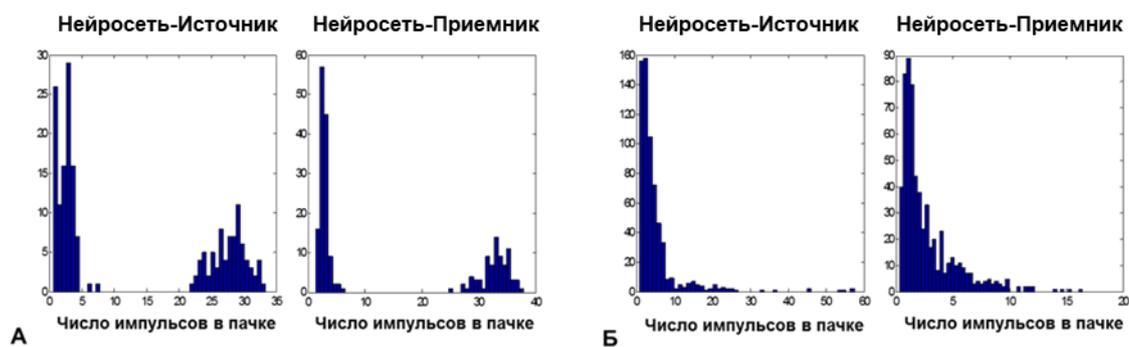


Рисунок 30 – Пример распределений числа импульсов в пачках, нормированное на число электродов, в нейросетях Источник и Приемник: А – «Бимодальное» распределение (культура А1, 20-й день развития *in vitro*); Б – «Спадающее» распределение (культура Б2, 20-й день развития *in vitro*)

В случае бимодального распределения в активности нейронной сети выделяли кластер крупных и кластер мелких пачек. При этом медиана распределения числа импульсов в крупных пачках превышала 20 импульсов на электрод. В случае присутствия в активности нейронной сети только одного кластера, распределение по числу импульсов в мелких пачках имело либо спадающий вид, с максимумом около нуля, либо нормальный вид (в двух случаях).

На основании данных кластерного анализа пачек по числу импульсов мы выделили **два типа активности модульной нейронной сети**:

- к первому типу отнесли спонтанную активность, содержащую 2 кластера пачек: мелкие и крупные пачки с бимодальным распределением по числу импульсов в пачках и один случай с нормальным распределением, медиана которого составляла 60 импульсов на электрод;

- ко второму типу отнесли активность, содержащую один кластер мелких пачек со спадающим распределением и случай нормального распределения, медиана которого составляла 5 импульсов на электрод.

Стоит отметить, что одна и та же нейронная сеть могла проявлять активность и 1 и 2 типа в разные дни развития *in vitro*. Так, в трех случаях распределение числа импульсов в пачке на 20-й день имело спадающий вид

(тип 2), а на 25-й день становилось бимодальным (1 тип активности). В другом случае, напротив, бимодальное распределение числа импульсов в пачке наблюдалось на 20-й день (1 тип) и изменялось на 2 тип активности на 25-й день.

Наличие двух кластеров пачек в распределении числа импульсов в пачках в активности 1 типа отвечает теории о наличии суперпачечной активности в нейронных сетях (Wagenaar et al., 2006). В стандартных прямых суперпачках первая пачка содержит наибольшее число импульсов и является самой длительной (рисунок 31, А). В инвертированных суперпачках сначала следует последовательность малых пачек, а затем крупная, после которой идет период молчания (рисунок 31, Б).

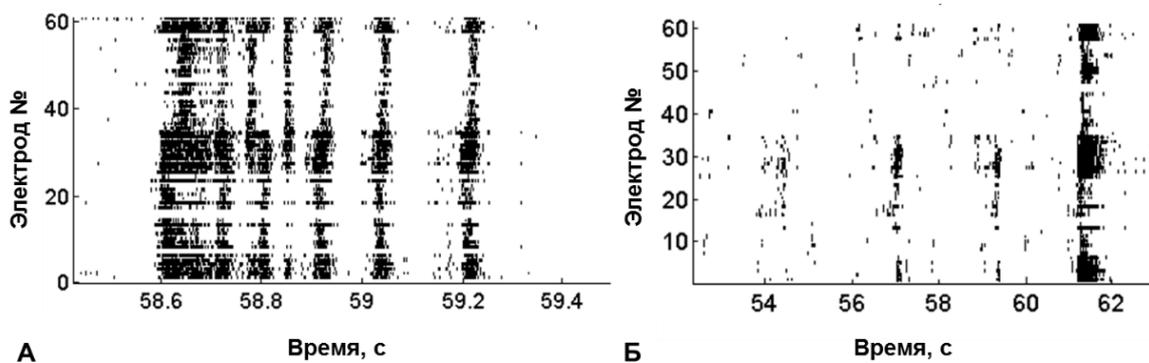


Рисунок 31 – Пример растров биоэлектрической активности 1 типа: А – растр, содержащий стандартные (прямые) суперпачки импульсов; Б – растр, содержащий инвертированные суперпачки импульсов

### *Длительность пачек*

Распределения длительностей пачек включали один или два кластера и имели ту же форму, что и для распределения числа импульсов пачек (рисунок 32).

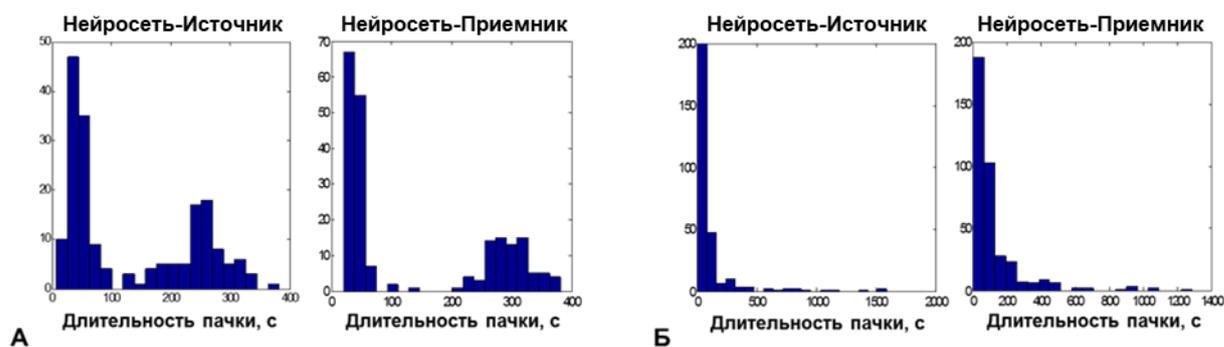


Рисунок 32 – Пример распределений длительностей пачек в нейросетях Источник и Приемник: А – Бимодальное распределение (культура А1, 20 день развития); Б – Спадающее распределение (культура Б2, 25 день развития)

Соответственно, тип активности нейросети мог быть определен как по распределению импульсов в пачках, так и по длительности пачек.

Важно отметить, что активности локальных сетей в нейросетях Источник и Приемник в составе модульной сети принадлежали к одним и тем же типам.

Сравнение числа импульсов в пачке и длительности пачки в нейросетях Источник и Приемник для нейронных сетей различных типов не показало значимой разницы (рисунок 33). Медианное значение числа импульсов в пачке в нейросетях Источник и Приемник активности типа 1 составляло 35 импульсов и 32 импульса соответственно и было выше, чем в случае активности 2-го типа (1,9 импульсов и 3,4 импульсов;  $n=8$  для 1-го типа активности;  $n=6$  для 2-го типа активности, критерий Манна-Уитни,  $p<0,01$ ). Медианное значение длительности пачек также было больше для активности 1-го типа в обоих подсетях и составляло 292 мс для нейросети-Источник и 280 мс для нейросети-Приемника. Соответственно число импульсов на электрод составило для активности 2-го типа 43 мс и 82 мс в нейросетях Источник и Приемник.

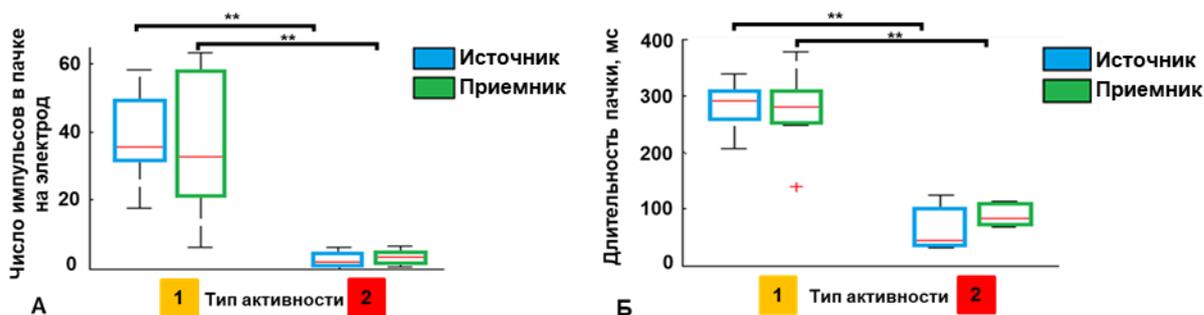


Рисунок 33 – Характеристики пачек нейросети Источника и Приемника для сетей 1-го и 2-го типов: А – число импульсов в пачках; Б – длительность пачек; значения на графике представлены боксплотами («гвоздики» - размах вариации, границы боксплота - межквартильный размах, разделенный медианой); \* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ;

\*\* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0,01$

#### Число пачек в минуту

На рисунке 34 представлены результаты оценки числа пачек в минуту в нейросетях Источник и Приемник.

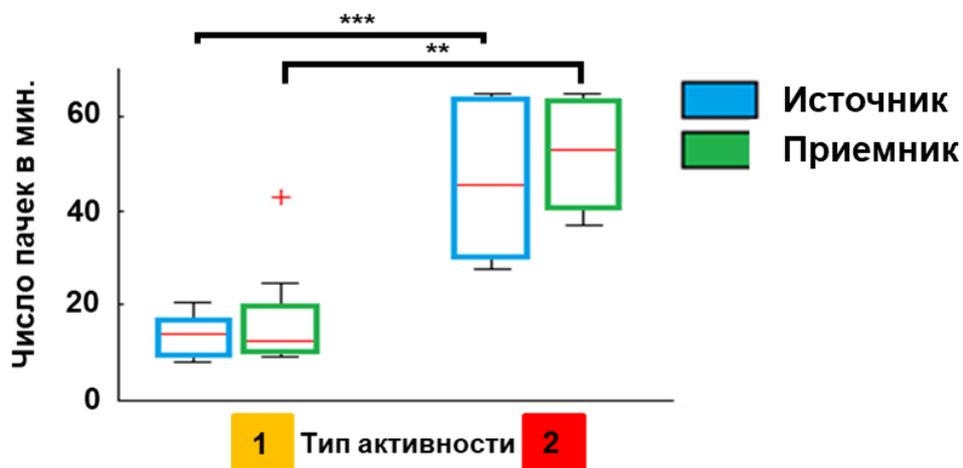


Рисунок 34 – Число пачек в минуту в нейросетях Источник и Приемник с 1 и 2 типом активности; значения на графике представлены боксплотами («гвоздики» - размах вариации, границы боксплота - межквартильный размах, разделенный медианой); \*\* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0,01$ ;

\*\*\* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0,001$

Число пачек импульсов в минуту было выше в нейронных сетях с активностью 2 типа: в 4,3 раза для нейросети-Источник (14 пачек/мин для нейросетей с активностью 1 типа и 45 пачек/мин для нейросетей с активностью 2 типа) и в 3 раза для нейросети-Приемника (12 пачек/мин для нейросетей с активностью 1 типа и 52 пачек/мин для нейросетей с активностью 2 типа).

### **3.3.2 Коэффициент эффективности межсетевой связи в зависимости от типа спонтанной активности нейронных сетей**

Следует отметить, что в процессе развития *in vitro* нейросеть-Приемник всегда находится под постоянным влиянием нейросети-Источника, в связи с чем, его активность включает как собственную активность, так и инициированную нейросетью-Источником.

Мы предположили, что коэффициент направленности связи  $R_{ST}$  может зависеть не только от морфологии каналов в чипе, обеспечивающей направленность связи, но и от типа спонтанной активности, присутствующей в нейросети-Источнике.

На рисунке 35, А представлен коэффициент направленности связей  $R_{ST}$  для каждой из исследуемых нейросетей на 20 и 25 дни развития. Для нейросетей с активностью 1-го типа  $R_{ST}$  превышал 15 % в 7 случаях из 8. Для сетей 2-го типа был характерен малый  $R_{ST}$ , несмотря на одинаковую структуру каналов чипа ( $R_{ST}$  менее 15%; 6 случаев). Медианное значение  $R_{ST}$  составило 27 ( $n = 8$ ) для 1 типа активности и 7 ( $n = 6$ ) для 2 типа активности (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ) (рисунок 35, Б).

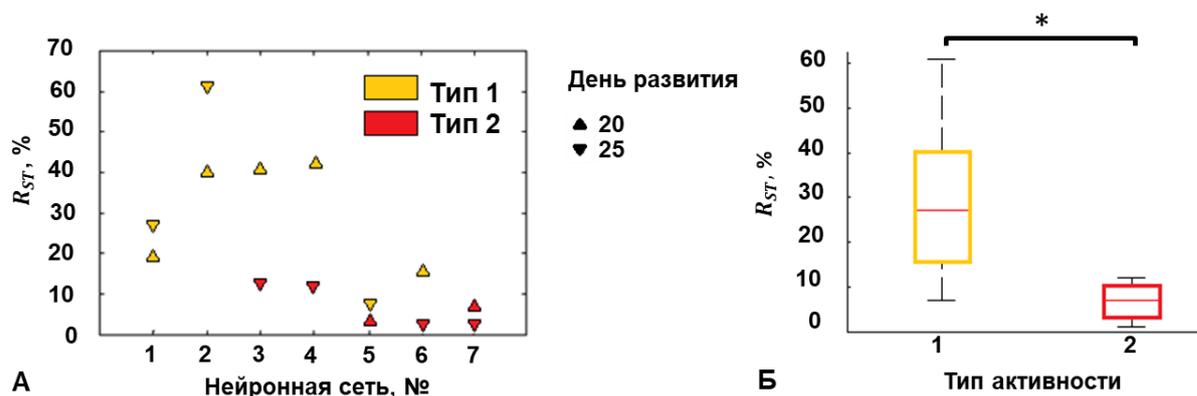


Рисунок 35 – Коэффициент направленности связи ( $R_{ST}$ ) для модульных сетей 1-го и 2-го типов активности: А – на 20 и 25 разные дни развития; Б – суммарно за все дни развития нейронных сетей; значения на графике представлены боксплотами («гвоздики» - размах вариации, границы боксплота - межквартильный размах, разделенный медианой); \*- наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0,05$

Таким образом, коэффициент направленности связи зависел не только от обеспечения морфологической направленности связи, но и типа спонтанной активности модульной нейронной сети.

С целью определения параметров спонтанных пачек нейросети-Источника, вызывающих пачки в нейросети-Приемнике, были построены двумерные диаграммы характеристик переданных пачек, по осям которых были отложены значения длительностей пачек в мс и значения числа импульсов в пачке (рисунок 36). Переданные пачки нейросети-Источника обозначены цветом: желтым для нейросетей с активностью 1-го типа, красным – для нейросетей с активностью 2-го типа.

Для нейросетей с активностью обоих типов вероятность передачи увеличивалась для пачек с большим числом импульсов и большей длиной (рисунок 36 Б, В).

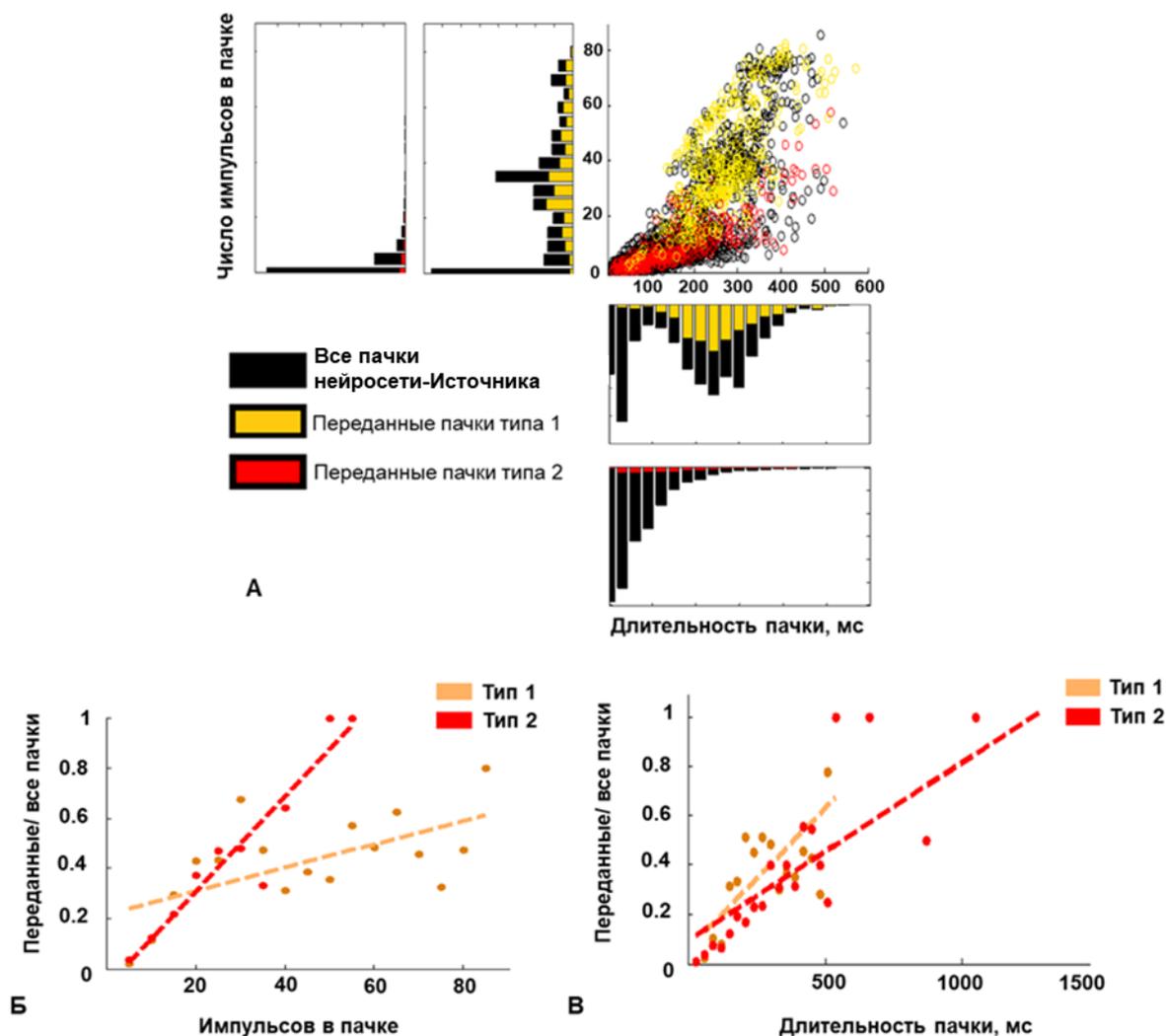


Рисунок 36 – Пачки нейросети-Источника, вызывающие пачку в нейросети-Приемнике: А – Распределение длительности и частоты импульсов в пачках; Б – Отношение числа импульсов в переданных пачках к числу импульсов во всех пачках нейросети-Источника, и линейная аппроксимация; В – Отношение длительности переданных пачек к длительности всех пачек нейросети-Источника, и линейная аппроксимация. Пачки, вызывающие ответную пачку в нейросети-Приемнике, обозначены желтым цветом для нейросетей с активностью типа 1 (n=8), красным цветом – для нейросетей с активностью типа 2(n=6)

Медианное значение числа импульсов в переданных пачках нейросети-Источника для активности модульной сети 1-го типа *in vitro* было выше, чем

для активности 2-го типа ( $p < 0,001$ , критерий Манна-Уитни) и составило 35 импульсов и 4,6 импульсов соответственно (рисунок 37).

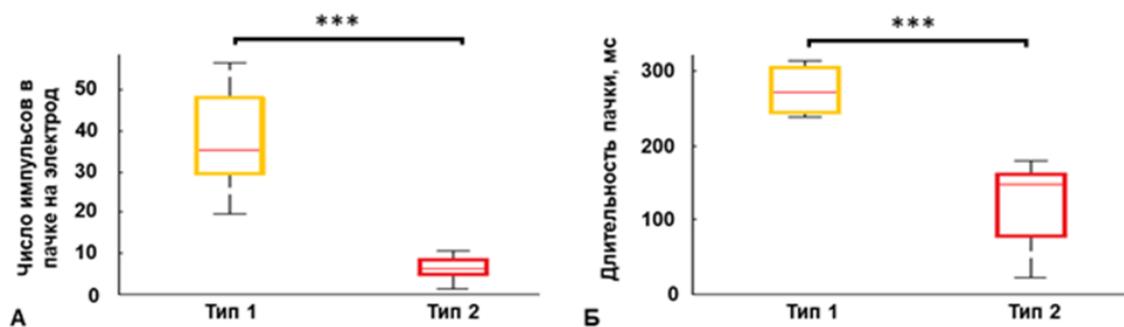


Рисунок 37 – Характеристики пачек нейросети-Источника, вызывающих пачки в нейросети-Приемнике, для модульных сетей типа 1-го и 2-го типов: А – Число импульсов в пачках, нормированное на число электродов; Б – Длительность пачек; значения на графике представлены боксплотами («гвоздики» - размах вариации, границы боксплота - межквартильный размах, разделенный медианой); \*\*\* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни,  $p < 0,001$

Та же тенденция наблюдалась для длительности переданных пачек, величина которых составила 271 мс и 147 мс для 1-го и 2-го типа активности соответственно ( $p < 0,01$ , критерий Манна-Уитни)

Таким образом, наиболее эффективной для формирования сильных межсетевых связей является 1-й тип нейронной сети, в которой присутствуют крупные сетевые пачки с числом импульсов более 20 мс на электрод и длительностью пачки более 200 мс. Переданные пачки нейросети 1-го типа активности содержали большее число импульсов и были продолжительнее, чем переданные пачки нейросети 2-го типа активности. Нейросети с активностью 2-го типа практически не содержали крупных пачек, поэтому передача наблюдалась, в основном, для пачек с небольшим числом импульсов и меньшей длительностью.

### 3.3.3 Сила связей между нейронами внутри подсетей и между подсетями модульной сети в зависимости от типа активности

Известно, что собственная спонтанная активность локальных нейронных сетей характеризуется связями между элементами этой сети. Мы исследовали связи между участками нейронной сети внутри подсетей и между подсетями, используя метод кросс-корреляции для каждой пары электродов в камерах. На рисунке 38 представлен пример матрицы связей между электродами, где цвет кодирует *силу связи* (рисунок 38, А) или *задержку связи (распространение импульсов)* (рисунок 38, Б) на связанных электродах.

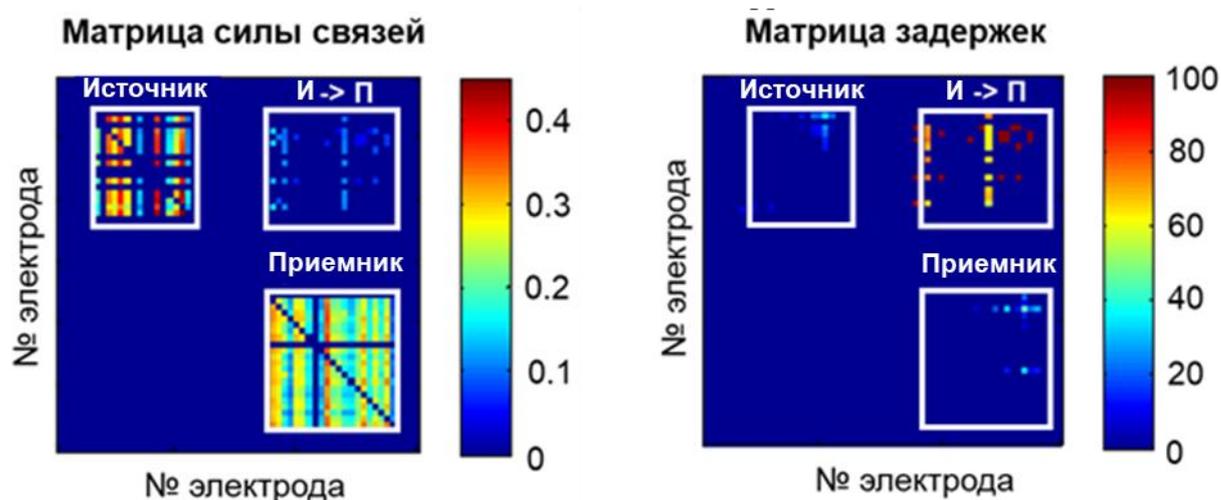


Рисунок 38 – Пример кросскорреляционного анализа связей внутри и между подсетями: А – Матрица силы связей; Б – Матрица задержек распространения импульсов. Нейросеть-Источник обозначена как «И», нейросеть-Приемник – «П», связи между нейросетями Источник и Приемник – «ИП»

Сравнение внутрисетевых связей между участками нейронной сети показало, что сила связей и длительность задержек распространения импульсов внутри нейросетей с активностью 1-го типа были значимо выше, чем у 2-го типа (0,15 и 0,05 для силы связей; 6,1 мс и 4,4 мс для задержки, соответственно) (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ) (рисунок 39 А, Б).

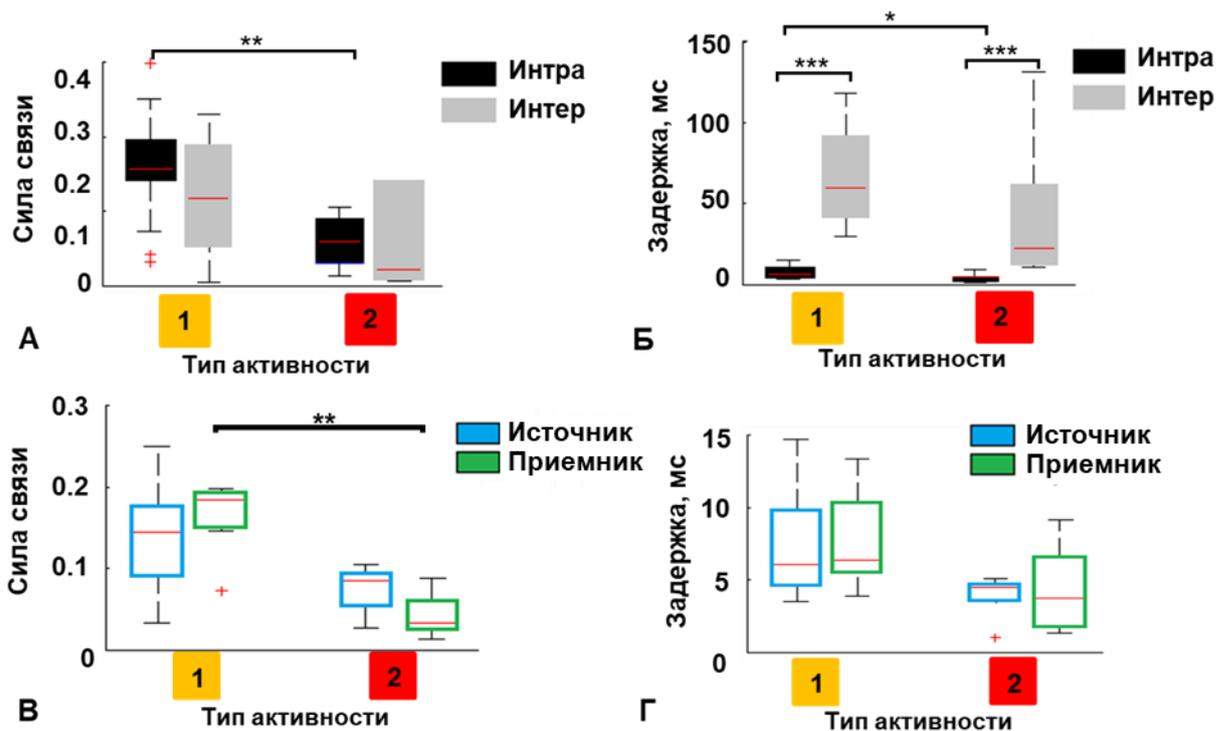


Рисунок 39 – Характеристика связей между участками нейронной сети *in vitro* для 1 и 2 типа активности: А – Сила связей внутри подсетей и между подсетями; Б – Задержка распространения импульсов внутри подсетей и между подсетями; В – Сила связей в нейросетях Источник и Приемник; Г – Задержка распространения импульсов в нейросетях Источник и Приемник; значения на графике представлены боксплотами («гвоздики» - размах вариации, границы боксплота - межквартильный размах, разделенный медианой); \* - 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,  $p < 0,001$

Задержка распространения импульсов внутри подсетей была меньше, чем между подсетями для обоих видов активности (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,001$ ) (рисунок 39, Б). Сила связи была выше в сетях с активностью типа 1 в нейросети-Приемнике (0,17 для типа 1 и 0,05 для типа 2; критерий Манна-Уитни,  $p < 0,01$ ) (рисунок 39, В). Однако разницы в задержке распространения

импульсов в подсетях для двух типов активности обнаружено не было (рисунок 39, Г).

Таким образом, сила связей и длительность задержек распространения импульсов в локальных нейросетях с активностью типа 1 были значимо выше, чем у сетей типа 2, что свидетельствовало о более сложной топологии нейронных сетей с активностью 1-го типа, включающей, вероятно, больше синаптических путей внутри подсетей. Подобные результаты были показаны и у авторов, которые выявили, что длительность пачек увеличивается в зависимости от сложности нейронной сети (Shein-Idelson et al., 2016).

Значимо большая задержка распространения импульсов между подсетями, чем внутри подсетей, свидетельствовала о вовлечении большего числа синапсов при переносе информации из одной сети в другую в общей модульной сети. При этом следует отметить, что для обоих типов активности задержка распространения импульсов между подсетями была одинакова, т.е. отсутствовало различие в путях передачи импульсов двумя типами активности сетей.

### 3.3.4 Обсуждение полученных результатов

В исследуемой модели однонаправленно связанных нейронных сетей *in vitro* структура чипов обеспечивала только направленность межсетевых связей, при этом архитектура локальных сетей формировалась самостоятельно.

Исследования *in vitro* показали, что степень взаимодействия подсетей возрастает с увеличением количества межсетевых связей, регулируемых количеством и геометрией каналов, соединяющих камеры микрофлюидных чипов (Forró et al., 2018; Peyrin et al., 2011; Na et al., 2016; Maisonneuve et al., 2021), однако исследования влияния спонтанной активности подсетей на межсетевые взаимодействия практически отсутствуют.

В разработанных модульных сетях идентичность культур обеспечивалась одинаковым размером камер, количеством микроканалов и плотностью клеток при посадке. Ранее С. Поттер показал, что в нейронных культурах при одних и тех же начальных условиях наблюдались разные типы спонтанных пачек импульсов (Wagenaar et al., 2006). Действительно, мы выделили два типа характерной спонтанной пачечной активности локальных сетей, основываясь на распределении таких характеристик пачек, как число импульсов в пачке и длительность пачки. К 1-му типу мы отнесли активность, содержащую кластер «крупных» пачек, ко 2-му типу - активность, не содержащую такого кластера.

В случае активности 1-типа пачки в нейросети-Источнике принадлежали к кластеру «крупных» пачек, а коэффициент направленности связи составлял более 15% в 87% случаях. Напротив, в нейросетях с активностью 2-го типа, коэффициент направленности связи всегда был менее 15%.

Таким образом, присутствие в спонтанной активности нейросети-Источника кластера «крупных» пачек увеличивало эффективность межсетевого взаимодействия. Сравнение характеристик пачек двух типов активности показало, что медианные значения числа импульсов в пачках были выше в 9-18 раз в нейросетях с активностью 1-го типа; медианные значения длительностей пачек культур с активностью 1-го типа превышали длительность пачек культур с активностью 2 типа в 3-6 раз. Таким образом, наличие в спонтанной активности нейросети-Источника кластера крупных сетевых пачек является важным фактором, повышающим межсетевую связность, и, наоборот, отсутствие крупных сетевых пачек снижает межмодульную связность в модульной сети, что может привести к нарушению передачи информации между локальными сетями. Похожие результаты были получены в нейронной сети из 60 подсетей, где пачки, активирующие соседнюю подсеть, имели более высокую интенсивность, выраженную через амплитуду импульсов в пачке (Shein-Idelson et al., 2016).

Важно отметить, что тип активности одной нейросети мог изменяться с развитием. Так, в трех из семи исследуемых нейросетей 2-й тип активности изменялся на 1-й тип активности к 25 дню развития, в одной нейросети наблюдалось изменение со 2-го типа активности на 1-й тип. Таким образом, в процессе развития нейросетей может происходить качественная перестройка архитектуры локальных сетей, приводящая к изменениям межсетевых взаимодействий. Изменение типа активности может происходить вследствие созревания синаптических связей, реконфигурации синаптических весов, уровня возбудимости нейронов.

Для каждого типа активности наблюдались различия во временных задержках внутри и между подсетями, присущие модульным сетям, обеспечивающие разделение внутри- и межмодульной обработки информации (Wang et al., 2021).

Исследование связей между участками нейрональной сети в подсетях показало, что нейронные сети с активностью 1-го типа, содержащей крупные пачки, характеризуются более сильными связями и взаимодействиями на больших задержках, чем нейронные сети с активностью без крупных пачек. Известно, что величина задержки может отражать количество синаптических связей в сети: чем больше задержка, тем больше синаптических связей. Т.е., модульные нейронные сети 1-го типа, вероятно, характеризуются полисинаптическими связями, а 2 типа - связями с меньшим числом переключений.

Таким образом, эффективность межсетевых взаимодействий в однонаправленно связанных нейронных сетях определяется не только наличием морфологической связи, но и типом спонтанной сетевой биоэлектрической активности в виде крупных сетевых пачек в локальной сети-источнике, обусловленных наличием сильных полисинаптических связей.

### 3.4 Функциональные изменения в нейросети-Приемнике, развивающейся под влиянием активности нейросети-Источника

#### 3.4.1 Оценка изолированности культуральной среды в двухслойном биочипе

Для подтверждения изолированности питательной среды в разделенных структурой из ПДМС камерах для культивирования клеток, мы добавили блокатор потенциал-зависимых натриевых каналов (ТТХ) к нейросети-Источнику и проанализировали спонтанную активность модульной нейросети. Предварительно стабильность экспериментальных условий была подтверждена сохранением частоты импульсов (ЧИ) нейронной сети в течение двух часов без внешнего воздействия. После добавления ТТХ ЧИ нейросети-Источника уменьшилась до нуля в течение 20 минут, в нейросети-Приемнике ЧИ не изменялась в течение 3 часов (рисунок 40).

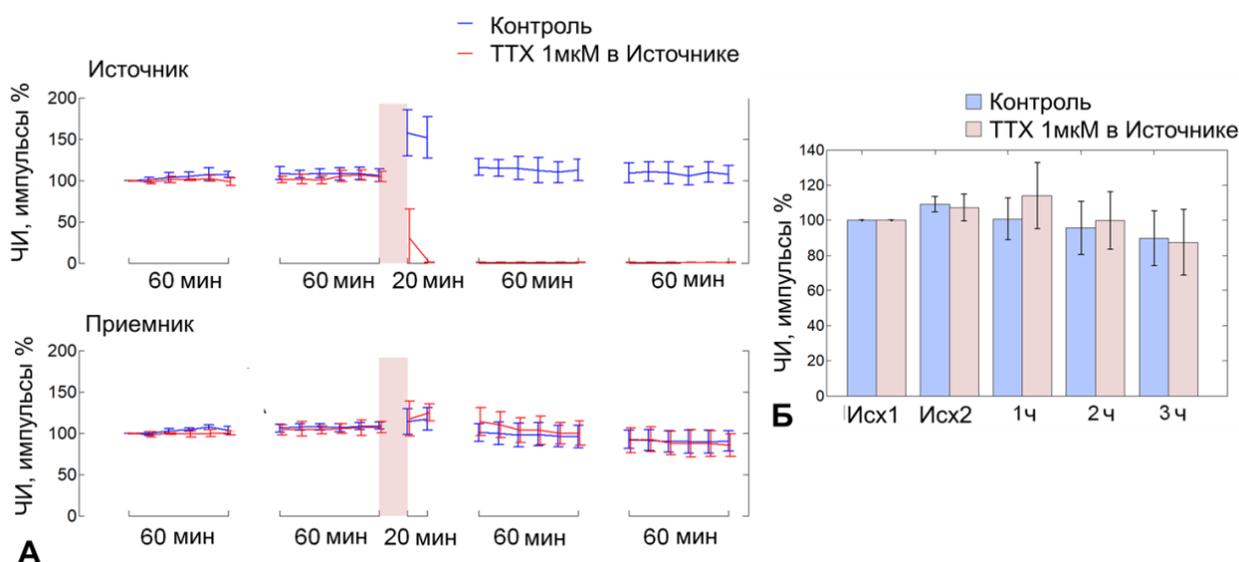


Рисунок 40. Сетевая активность модульной нейрональной сети при аппликации ТТХ к нейросети-Источнику. А – Частота импульсов (ЧИ) спонтанной сетевой активности, нормализованная к ЧИ в первые 10 минут записи. Каждая точка представляет собой ЧИ (среднее  $\pm$  стандартное

отклонение) в течение 10 минут в нейросети Источник и Приемник. Красная линия соответствует активности нейрональных сетей при добавлении 1 мкМ ТТХ к нейросети-Источнику, синяя линия соответствует активности в контрольных условиях. Выделенная серым область соответствует остановке регистрации активности на 15–20 минут во время и после манипуляций с культуральной средой и аппликации ТТХ. Б – ЧИ в первый (Исх 1) и последний (Исх 2) 10-минутный интервал регистрации исходной спонтанной активности, а также через 1, 2 и 3 ч после манипуляций с культуральной средой или аппликации ТТХ

Таким образом, было показано, что в двухслойном чипе имеет место изоляция двух сред, питающих культуры двух подсетей, что необходимо для проведения экспериментов по доказательству гипотезы о влиянии постоянно действующей спонтанной активности одной нейросети на спонтанную функциональную активность другой нейросети.

### **3.4.2 Сетевая активность в нейросети-Приемнике при подавлении возбуждающей синаптической передачи в нейросети-Источнике**

Коэффициент направленности связи от нейросети Источника к Приемнику составлял  $25 \pm 14\%$  в контрольных условиях ( $n = 6$  экспериментов, 5 нейросетей, среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение).

Для изучения функциональных межсетевых взаимодействий возбуждающая синаптическая передача в нейросети-Источнике блокировалась аппликацией блокаторов NMDA и AMPA рецепторов (CPP+CNQX) и проводился анализ изменения спонтанной сетевой активности в нейросети-Приемнике. Мы сравнили такие характеристики спонтанной сетевой активности в нейросети-Приемнике, как продолжительность пачек импульсов, частота импульсов в пачках и

межпачечные интервалы, нормированные на медианное значение в контрольной записи.

Спонтанная активность сети относилась к типу 1. Изменения после блокировки возбуждающей синаптической передачи в нейросети-Источнике обнаруживались только в кластере больших пачек. Их длительность уменьшилась на 6 %, частота импульсов в пачке снизилась на 12 %, а интервал между всплесками уменьшился на 30% (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,001$ ) (рисунок 41, А-В).

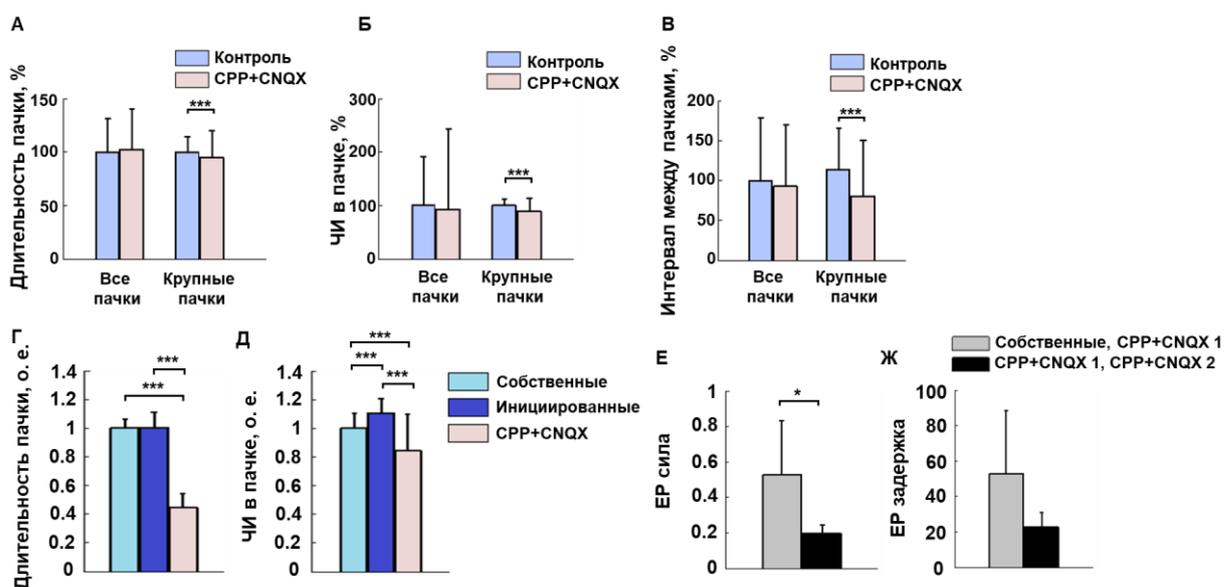


Рисунок 41. Спонтанная активность в нейросети-Приемнике до и после подавления возбуждающей синаптической активности в нейросети-Источнике. А-В – Длительность пачек импульсов, число импульсов в пачке и интервал между пачками для всех спонтанных пачек и для пачек из кластера крупных в нейросети-Приемнике (медиана  $\pm$  медианное отклонение,  $n = 6$  экспериментов, критерий Манна – Уитни, \*\*\*  $p < 0,001$ ). Г-Д – Длительность пачек и частота импульсов в собственных крупных пачках, инициированных крупных пачках в контрольных условиях и крупных пачках при добавлении CPP + CNQX в нейросеть-Источник (медиана  $\pm$  медианное отклонение,  $n = 6$  экспериментов, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, \* \*\*  $p < 0,001$ ). Е, Ж – 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, \*  $p < 0,05$ )

Таким образом, отсутствие влияния спонтанной активности нейросети-Источника привело к уменьшению продолжительности спонтанных пачек в нейросети-Приемнике, увеличению их частоты и уменьшению числа импульсов в них.

Поскольку активность нейросети-Приемника состояла из собственных пачек нейросети-Приемника и пачек, инициированных входящей активностью из нейросети-Источника, мы исследовали, связаны ли изменения в характеристиках активности нейросети-Приемника с отсутствием инициированных пачек или изменения произошли в собственных пачках сетевой активности нейросети-Приемника. Собственные и инициированные пачки в контрольных условиях не отличались по длительности, однако число импульсов было выше в инициированных пачках (рисунок 41, Г, Д). После аппликации CPP + CNQX к нейросети-Источнику длительность пачек и число импульсов в пачке нейросети-Приемника уменьшились (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

Далее мы оценили функциональные характеристики внутренней связи между участками нейросети-Приемника. Было проведено сравнение матрицы связности собственных пачек в контрольных условиях с пачками в двух последовательных записях активности при аппликации CPP + CNQX (CPP + CNQX 1, CPP + CNQX 2) с помощью меры евклидова расстояния. Было обнаружено, что сила связи значительно изменилась после подавления активности нейросети-Источника, что достоверно указывает на функциональную реорганизацию нейросети-Приемника под действием импульсов нейросети-Источника (рисунок 41, Е,  $n = 6$  экспериментов, 5 культур; критерий суммы рангов Уилкоксона,  $p < 0,05$ ).

Интересно отметить, что количество активных синапсов, вероятно, не изменилось, так как задержки связей внутри локальной сети существенно не изменились (рисунок 41, Ж,  $n = 6$  экспериментов, 5 культур; критерий суммы рангов Уилкоксона,  $p = 0,063$ ).

Таким образом, применение фармакологического подхода с помощью блокаторов возбуждающих синапсов для изучения механизмов влияния импульсов одной сети на активность другой сети в общей модульной сети выявило, что постоянное воздействие спонтанных импульсов нейросети-Источника на нейросети-Приемник вызывает не только появление вызванных пачек в нейросети-Приемнике, но и обратимое изменение спонтанных функциональных характеристик нейросети-Приемника.

### **3.4.3 Соотношение возбуждающих/тормозных нейронов и синапсов в модульной нейронной сети с однонаправленными межмодульными связями**

На основании полученных данных о функциональных перестройках в нейросети-Приемнике под действием стимулов из нейросети-Источника было сделано предположение, что изменение спонтанных функциональных характеристик нейросети-Приемника может быть обусловлено изменением соотношения нейронов/глии, соотношения возбуждающих/тормозных нейронов или, наконец, соотношения возбуждающих/тормозных синапсов.

Для исследования данной гипотезы были иммуноцитохимически промаркированы возбуждающие (рисунок 42, Merged – жёлтый) и тормозные нейроны (рисунок 42, Merged – зеленый). Было показано, что в нейросети-Источнике соотношение возбуждающие/тормозные нейроны составляет 8,6:1, а в нейросети-Приемнике – 9,6:1.

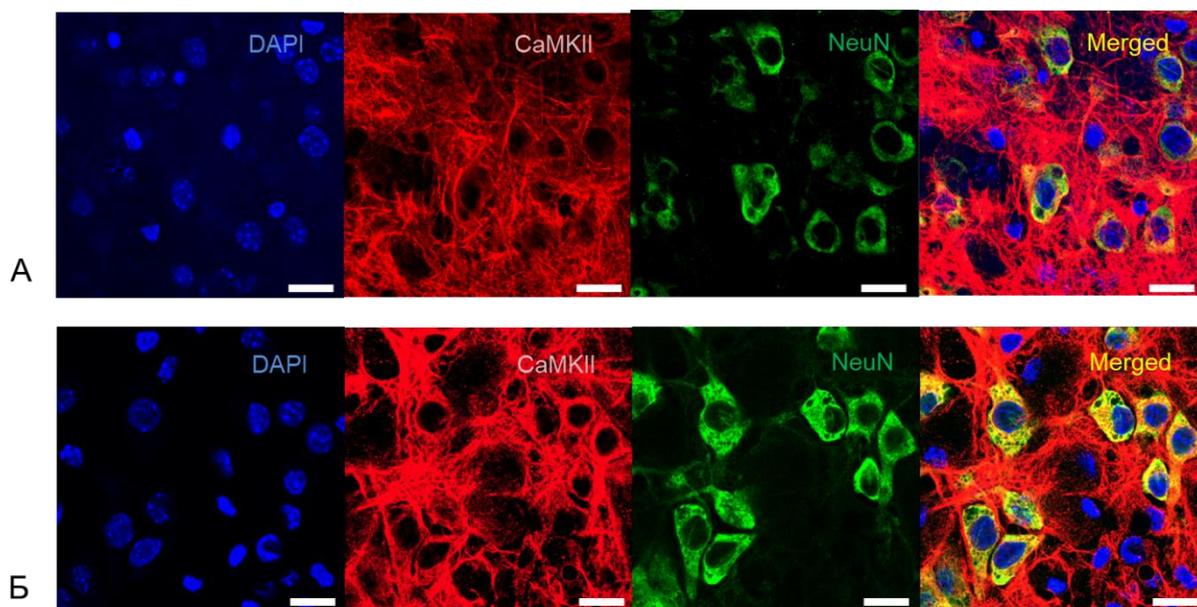


Рисунок 42 – Флуоресцентные изображения клеток в камере чипа. Нейроны визуализированы маркированием NeuN (зеленый), возбуждающие нейроны визуализированы маркированием ядра клеток NeuN (зеленый) и CaMKII (красный) специфическими антителами. Ядра всех клеток визуализированы ДНК-связывающим красителем DAPI. А – культура клеток в нейросети-Источнике; Б - культура клеток в нейросети-Приемнике. Масштаб 20 мкм

При этом соотношение нейронов к глиальным клеткам в нейросетях Источник и Приемник составило 1,3:1 и 1,6:1, соответственно (рисунок 43).

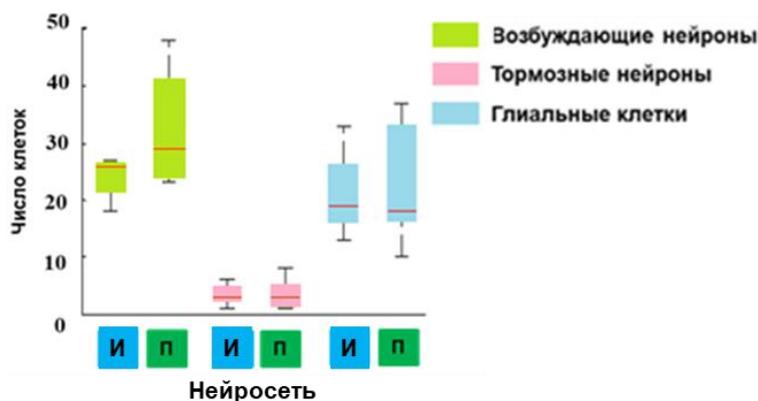


Рисунок 43 – Количество возбуждающих нейронов, тормозных нейронов и NeuN- клеток в нейросети-Источнике (синий) и Приемник (зеленый) в области интереса площадью 0,01 мм<sup>2</sup> на 21 день развития

Статистической разницы в числе нейронов разных типов и глиальных клеток выявлено не было

Далее были определены плотности VGluT1- (возбуждающих) и VGAT- (тормозных) иммуноположительных терминалей на дендритах на 21 DIV. Пример флуоресцентного изображения дендритов (синий) и пресинаптических терминалей (VGluT1- зеленый, VGAT- красный) в камере чипа приведен на рисунке 44.

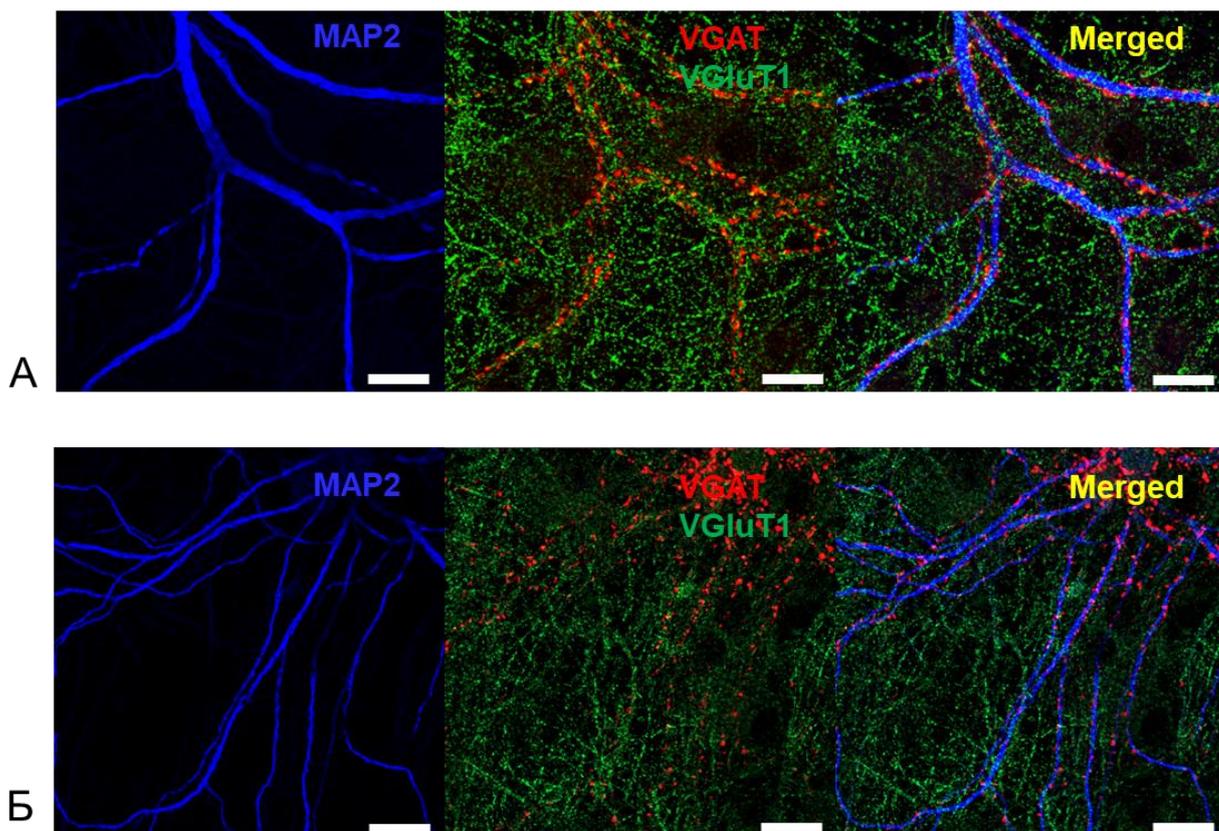


Рисунок 44 – Флуоресцентные изображения дендритов и пресинаптических терминалей в камере чипа. Дендриты визуализированы маркированием Map2 (синий), тормозные пресинаптические терминали– VGAT (красный), возбуждающие синаптические терминали– VgluT1 (зеленый) специфическими антителами, соответственно. А – культура клеток в нейросети-Источнике; Б - культура клеток в нейросети-Приемнике.

Масштаб 20 мкм

Мы обнаружили большую плотность VGAT пресинаптических терминалей на дендритах в нейросети-Источнике, чем в нейросети-Приемнике (n=7 культур, 82 дендрита; VGAT: медианные значения 0,3 синапс/мкм<sup>2</sup> и 0,23 синапс/мкм<sup>2</sup> соответственно; критерий Манна-Уитни, p<0,01) (рисунок 45).

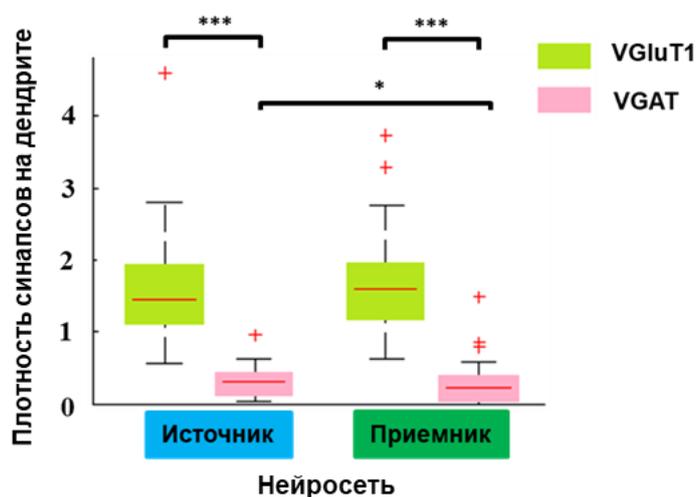


Рисунок 45 – Число VGluT1 и VGAT терминалей на дендритах на мкм<sup>2</sup> в нейросетях Источник и Приемник на 21 DIV (n = 7 сетей, 82 дендрита); \* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, p<0,05; \*\*\* - наличие статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни, p<0,001

Таким образом, постоянная стимуляция нейросети-Приемника паттернами активности нейросети-Источника вызывает изменение в количестве тормозных синапсов в нейросети-Приемнике – их количество уменьшается относительно количества тормозных синапсов в нейросети-Источнике. Однако количество возбуждающих и тормозных нейронов, глиальных клеток не меняется и сравнимо в нейросетях Источник и Приемник.

### 3.4.4 Обсуждение полученных результатов

С целью обеспечения локального химического воздействия на подсети модульной нейронной сети была разработана двухслойная структура из ПДМС, адаптированная для использования с микроэлектродными матрицами. Работоспособность платформы была доказана с помощью добавления ТТХ к нейросети-Источнику, что подавило спонтанную активность нейросети-Источника, в то время как активность в нейросети-Приемнике существенно не изменялась на протяжении 3 часов.

В исследованиях, где нарушение взаимодействия нейрональных подсетей вызывалось лазерным поражением аксонов, наблюдалось значительное снижение средней частоты импульсов сети, восстановление которой происходило в течение 2 часов (Buccelli et al., 2019; Averna et al., 2019). Разработанная платформа позволяет обратимо блокировать сетевую активность одной из подсетей химическими методами, без повреждения клеток и изменения спонтанной активности из-за травмирующего воздействия.

Локальная аппликация антагонистов возбуждающих рецепторов  $\text{SRP}+\text{CNQX}$  к нейросети-Источнику приводила к подавлению спонтанной пачечной активности в данной подсети. В нейросети-Приемнике продолжала работать локальная сеть, что согласуется с исследованиями, в которых изоляция нейрональных подсетей достигалась разрезанием аксонов УФ-лазером (Maeda et al., 1995; Averna et al., 2019).

Однако исследование спонтанных крупных пачек в нейросети-Приемнике, представляющих собой активность, вовлекающую большинство нейронов подсети, показало уменьшение продолжительности пачек и числа импульсов в пачках, а также уменьшение интервалов между пачками после блокировки возбуждающей синаптической передачи в нейросети-Источнике.

Устранение входящей пачечной активности нарушило баланс активности и связности в нейросети-Приемнике, обусловленный постоянным влиянием импульсов из нейросети-Источника, что привело к реорганизации синаптических связей и возникновению нового функционального состояния

нейросети-Приемника, что согласуется с результатами, полученными в других лабораториях (Le Feber et al., 2015; Dias et al., 2021).

Иммуноцитохимическое исследование выявило меньшее количество тормозных синапсов в нейросети-Приемнике по сравнению с нейросетью-Источником. Известно, что формирование синапсов и синаптическая передача нарушаются, если внешняя стимуляция блокируется во время развития нейронной сети *in vivo* (Turrigiano, Nelson, 2004). Наоборот, оптогенетическая стимуляция, применяемая к мотонейронам, полученным из эмбриональных стволовых клеток *in vitro*, во время нейрогенеза и синаптогенеза приводила к удлинению нейритов, кластеризации синаптофизина, усилению синхронизации сети и улучшению вызванных ответов на стимуляцию (Pagan-Diaz et al., 2020). Предыдущие исследования показали, что спонтанная активность и вызванные ответы увеличиваются в нейрональных сетях *in vitro* при воздействии внешней стимуляции (Brewer et al., 2009; Ide et al., 2010). Было высказано предположение, что синаптическое масштабирование возбуждающих и тормозных рецепторов может различаться в нейрональных сетях *in vitro* в зависимости от наличия или отсутствия внешних стимулов во время развития (Brewer et al., 2009). Наши данные о количестве тормозных синапсов подтверждают это предположение. Также, наши результаты согласуются с экспериментами *in vivo*, в которых зрительная депривация у крыс не изменяла возбуждающие связи в коре, но усиливала тормозную обратную связь (Maffei et al., 2006). В отличие от хронической электростимуляции (Brewer et al., 2009; Ide et al., 2010) входы из другой подсети не приводили к изменению уровня спонтанной активности в наших экспериментах. Отсутствие различий в уровнях активности между нейросетями Источник и Приемник можно объяснить механизмами гомеостатической регуляции (Turrigiano, Nelson, 2004; Turrigiano et al., 2010). Кроме того, наши результаты согласуются с предыдущими результатами, показывающими уменьшение числа тормозных синапсов на дендритах в локальных нейронных сетях, развивающихся в условиях химически

индуцированной гиперактивности (Prestigio et al., 2021). Предположительно, механизм этого явления может быть связан со специфическим расположением синапсов, например, с уменьшением количества тормозных синапсов на дендритах и одновременным увеличением на сомах за счет включения REST-зависимых транскрипционных каскадов (Prestigio et al., 2021).

Таким образом, подчиненная нейросеть-Приемник независимо от типа биоэлектрической активности в составе модульной сети демонстрировала изменение своей функциональной активности при постоянном действии импульсов из нейросети-Источника за счет снижения количества тормозных синапсов. Вероятно, что подобные функциональные перестройки в подчиненной нейронной сети под влиянием внешней активности, способствовали оптимальному режиму взаимодействия между направленно связанными локальными сетями в модульной нейронной сети при обработке и передаче информации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе с использованием методов микрофлюидики и мультieleктродной регистрации внеклеточных потенциалов был разработан экспериментальный метод изучения на клеточном уровне физиологических механизмов работы направленно связанных нейронных сетей мозга *in vitro*, исследованы морфологическая и функциональная связность между локальными сетями и влияние собственной биоэлектрической активности нейросети на силу межсетевого взаимодействия.

Было продемонстрировано, что при формировании направленных связей между нейронными сетями 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 подсетей была подтверждена иммуноцитологическим окрашиванием отростков нейронов в каналах, которое показало наличие аксонов на протяжении длины всего микроканала и дендритов преимущественно в первых сегментах микроканала. Синапсы формировались в местах соединения дендритов нейронов нейросети-Приемника и аксонов нейронов нейросети-Источника только в последнем сегменте микроканалов, примыкающих к камере нейросети-Приемника.

Функциональная связность локальных нейросетей была подтверждена путем оценки коэффициента направленности связей *в направлении от нейросети Источника к Приемнику и в направлении от нейросети Приемника к Источнику* для нейрональных культур, растущих в микрофлюидных чипах с симметричными микроканалами и с асимметричными микроканалами. Был сделан вывод о том, что для создания однонаправленной морфофункциональной связи между нейронными сетями наиболее эффективной является асимметричная форма каналов с наличием «сегментов-ловушек».

Исследование вероятности распространения импульсов по аксонам в микроканалах показало, что направленный рост аксонов необходим, но не достаточен для формирования надежных функциональных межсетевых связей.

В культурах, в которых функциональные межсетевые связи успешно сформировались, наблюдалось характерное для модульных сетей соотношение задержек межмодульных и внутримодульных связей: задержки распространения импульсов между подсетями были больше, чем внутри подсетей.

Электрофизиологическими исследованиями было показано, что наличие в спонтанной биоэлектрической активности нейросети-Источника кластера крупных сетевых пачек в первый месяц развития первичной культуры клеток мозга 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 связей между участками нейрональной сети в подсетях показало, что нейронные сети с активностью 1-го типа, содержащей крупные пачки, характеризуются взаимодействиями большей силы и на больших задержках, чем нейронные сети с активностью без крупных пачек. Известно,

что величина задержки может отражать количество синаптических связей в сети: чем больше задержка, тем больше синаптических связей. Т.е., модульные нейронные сети 1-го типа, вероятно, характеризуются полисинаптическими связями, а 2 типа – связями с меньшим числом переключений.

Таким образом, эффективность межсетевых взаимодействий в однонаправленно связанных нейронных сетях определяется не только наличием морфологической связи, но и типом спонтанной сетевой биоэлектрической активности в виде крупных сетевых пачек в локальной сети-источнике, обусловленных наличием сильных полисинаптических связей.

Применение фармакологического подхода с помощью блокаторов возбуждающих синапсов для изучения механизмов влияния импульсов одной сети на активность другой сети в общей модульной сети выявило, что постоянное воздействие спонтанных импульсов нейросети-Источника на нейросеть-Приемник вызывает не только появление вызванных пачек в нейросети-Приемнике, но и обратимое изменение спонтанных функциональных характеристик нейросети-Приемника.

Поддержание функциональных характеристик нейросети-Приемника под постоянной стимуляцией паттернами активности нейросети-Источника обусловлено изменением количества тормозных синапсов в нейросети-Приемнике – на 24% меньше относительно тормозных синапсов в нейросети-Источнике при отсутствии изменений в количестве возбуждающих и тормозных нейронов, глиальных клеток в нейросетях Источник и Приемник.

Таким образом, проведенные исследования выявили, что управление навигацией аксона в отсутствие клеток глии в экспериментах *in vitro* возможно в пределах угла 45 градусов относительно оси роста, что может быть обеспечено особой треугольной формой канала в составе микрочипа. Было показано, что 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. Иммуноцитологическим исследованием доказано, что 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.

## 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 ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aversa, A. Hybrid Systems Biology, 1st ed. / A. Aversa, M. Carè, S. Buccelli, M. Semprini, F. Difato, M. Chiappalone // Springer Cham: Prague, Czech Republic. – 2019. – P. 3–15.
2. Badcock, P. B. The hierarchically mechanistic mind: an evolutionary systems theory of the human brain, cognition, and behavior / P. B. Badcock, K. J. Friston, M. J. Ramstead, A. Ploeger, J. Hohwy // Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience. – 2019. – Vol. 19. – P. 1319-1351.
3. Ban, M., Chen, J. Fabrication of plane-type axon guidance substrates by applying diamond-like carbon thin film deposition / M. Ban, J. Chen // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 8489.
4. Batista-García-Ramó, K., Fernández-Verdecia, C. I. What we know about the brain structure–function relationship / K. Batista-García-Ramó, C. I. Fernández-Verdecia // Behavioral Sciences. – 2018. – Vol. 8, № 4. – P. 39.
5. Bisio, M. Emergence of bursting activity in connected neuronal subpopulations / M. Bisio, A. Bosca, V. Pasquale, L. Berdondini, M. Chiappalone // PloS one. – 2014. – Vol. 9, № 9. – P. e107400.
6. Black, B. J. Highly effective photonic cue for repulsive axonal guidance / B. J. Black, L. Gu, S. K. Mohanty // PloS one. – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. e86292.
7. 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, № 1. – P. 104-109.
8. Brofiga, M. On the road to the brain-on-a-chip: a review on strategies, methods, and applications / M. Brofiga, M. Pisano, R. Raiteri, P. Massobrio // Journal of Neural Engineering. – 2021. – Vol. 18, № 4. – P. 041005.
9. Bruno, G. Microfluidic multielectrode arrays for spatially localized drug delivery and electrical recordings of primary neuronal cultures / G. Bruno,

- N. Colistra, G. Melle, A. Cerea, A. Hubarevich, L. Deleye, M. Dipalo // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 626.
10. Buccelli, S. A neuromorphic prosthesis to restore communication in neuronal networks / S. Buccelli, Y. Bornat, I. Colombi, M. Ambroise, L. Martines, V. Pasquale, M. Bisio, J. Tessadori, P. Nowak, F. Grassia // *IScience*. – 2019. – Vol. 19. – P. 402-414.
11. Buentello, D. C. Neuron (s)-on-a-chip: A review of the design and use of microfluidic systems for neural tissue culture / D. C. Buentello, M. García-Corral, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez // *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*. – 2022.
12. Cabrera-Garcia, D. Early prediction of developing spontaneous activity in cultured neuronal networks / D. Cabrera-Garcia, D. Warm, P. de la Fuente, M. T. Fernández-Sánchez, A. Novelli, J. M. Villanueva-Balsera // *Scientific reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 20407.
13. Cecen, B. Biosensor integrated brain-on-a-chip platforms: Progress and prospects in clinical translation / B. Cecen, E. Saygili, I. Zare, O. Nejati, D. Khorsandi, A. Zarepour, E. Alarcin, A. Zarrabi, S.N. Topkaya, O. Yesil-Celiktas, E. Mostafavi, A. Bal-Öztürk // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2023. – Vol. 225. – P. 115100.
14. Chang, Z. Segregation, integration and balance in resting-state brain functional networks associated with bipolar disorder symptoms / Z. Chang, X. Wang, Y. Wu, P. Lin, R. Wang // *Human Brain Mapping*. – 2023. – Vol. 44, № 2. – P. 599-611.
15. Chen, X. Observed network dynamics from altering the balance between excitatory and inhibitory neurons in cultured networks / X. Chen, R. Dzakpasu // *Physical Review E*. – 2010. – Vol. 82, № 3. – P. 031907.
16. Chiaradia, I., Lancaster, M. A. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo / I. Chiaradia, M. A. Lancaster // *Nature Neuroscience* 2312. – P. 1496-1508.

17. Chouzouris, T. Chimera states in brain networks: Empirical neural vs. modular fractal connectivity / T. Chouzouris, I. Omelchenko, A. Zakharova, J. Hlinka, P. Jiruska, E. Schöll // *Chaos: an interdisciplinary journal of nonlinear science*. – 2018. – Vol. 28, № 4. – P. 045112.
18. Dadras-Toussi, O. Gradients of Surface-Bound Laminin on Conducting Polymer Films for Potential Nerve Regeneration / O. Dadras-Toussi, M. Khorrami, S. Majd, M. R. Abidian // *2021 10th International IEEE / EMBS Conference on Neural Engineering (NER)*. – IEEE, 2021. – P. 395-398.
19. D'Arcangelo, E. Micropatterning strategies to engineer controlled cell and tissue architecture in vitro / E. D'Arcangelo, A. P. McGuigan // *Biotechniques*. – 2015. – Vol. 58, № 1. – P. 13-23.
20. Dauth, S. Neurons derived from different brain regions are inherently different in vitro: a novel multiregional brain-on-a-chip / S. Dauth, B. M. Maoz, S. P. Sheehy, M. A. Hemphill, T. Murty, M. K. Macedonia, K. K. Parker // *Journal of neurophysiology*. – 2017. – Vol. 117, № 3. – P. 1320-1341.
21. 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. – P. 32.
22. Dermutz, H. *Patterned Neurons in a Dish: In the Seek of Order* : дис. – ETH Zurich, 2016.
23. Dias, I. Consolidation of memory traces in cultured cortical networks requires low cholinergic tone, synchronized activity and high network excitability / I. Dias, M. R. Levers, M. Lamberti, G. C. Hassink, R. Van Wezel, J. Le Feber // *Journal of neural engineering*. – 2021. – Vol. 18, № 4. – P. 046051.

24. Dravid, A. Determining neurotrophin gradients in vitro to direct axonal outgrowth following spinal cord injury / A. Dravid, S. Parittotokkaporn, Z. Agrawe, S. J. O'Carroll, D. Svirskis // ACS Chemical Neuroscience. – 2019. – Vol. 11, № 2. – P. 121-132.
25. Dumoulin, A., Stoeckli, E. T. Looking for guidance–models and methods to study axonal navigation / A. Dumoulin, E. T. Stoeckli // Neuroscience. – 2023. – Vol. 508. – P. 30-39.
26. Dupin, I. Subrepellent doses of Slit1 promote Netrin-1 chemotactic responses in subsets of axons / I. Dupin, L. Lokmane, M. Dahan, S. Garel, V. Studer. // Neural development. – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. 1-10.
27. Duru, J. Engineered biological neural networks on high density CMOS microelectrode arrays / J. Duru, J. Kuechler, S. J. Ihle, C. Forró, A. Bernardi, S. Girardin, J. Hengsteler, S. Wheeler, J. Vörös, T. Ruff // Frontiers in neuroscience. – 2022. – Vol. 16. – P. 829884.
28. Eaton, M. Multi-electrode array of sensory neurons as an in vitro platform to identify the nociceptive response to pharmaceutical buffer systems of injectable biologics / M. Eaton, Z. Que, J. Zhang, K. Beck, R. Shi, J. McDermott, Y. Yang // Pharmaceutical Research. – 2021. – Vol. 38, № 7. – P. 1179-1186.
29. Edde, M. Functional brain connectivity changes across the human life span: From fetal development to old age / M. Edde, G. Leroux, E. Altena, S. Chanraud // Journal of neuroscience research. – 2021. – Vol. 99, № 1. – P. 236-262.
30. Emily, M. F. Use of microfluidics chambers to image axonal transport in adult sensory neurons / M. F. Emily, L. Agrawal, P. Barzaghi, M. Otsuki, M. Terenzio // Axonal Transport. – Humana, New York, NY, 2022. – P. 271-288.
31. Fan, S. Guiding the patterned growth of neuronal axons and dendrites using anisotropic micropillar scaffolds / S. Fan, L. Qi, J. Li, D. Pan, Y.

- Zhang, R.Li, C. Zhang, D. Wu, P. Lau, Y. Hu, G. Bi, Weiping Ding J. Chu // *Advanced Healthcare Materials*. – 2021. – Vol. 10, № 12. – P. 2100094.
32. Fan, Y. Hierarchical overlapping modular structure in the human cerebral cortex improves individual identification / Y. Fan, R. Wang, C. Yi, L. Zhou, Y. Wu // *Iscience*. – 2023. – Vol. 26, № 5.
33. Farahani, F. V. Application of graph theory for identifying connectivity patterns in human brain networks: a systematic review / F. V. Farahani, W. Karwowski, N. R. Lighthall // *frontiers in Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 585.
34. Farrukh, A. In situ, light-guided axon growth on biomaterials via photoactivatable laminin peptidomimetic IK (HANBP) VAV / A. Farrukh, S. Zhao, J. I. Paez, A. Kavyanifar, M. Salierno, A. Cavalié, A. Del Campo // *ACS applied materials & interfaces*. – 2018. – Vol. 10, № 48. – P. 41129-41137.
35. Feinerman, O. Reliable neuronal logic devices from patterned hippocampal cultures / O. Feinerman, A. Rotem, E. Moses // *Nature physics*. – 2008. – Vol. 4, № 12. – P. 967.
36. Fendler, C. Microscaffolds by Direct Laser Writing for Neurite Guidance Leading to Tailor-Made Neuronal Networks / C. Fendler, C. Denker, J. Harberts, P. Bayat, R. Zierold, G. Loers, M. Münzenberg, R. H. Blick // *Advanced Biosystems*. – 2019. – Vol. 3, № 5. – P. 1800329.
37. Flechner, M. Adhesion, proliferation, and detachment of various cell types on thermoresponsive microgel coatings / M. Flechner, J. Schaller, M. Stahl, K. Achberger, S. Gerike, Y. Hannappel, K. Uhlig // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2022.
38. Fong, A. H. C. Dynamic functional connectivity during task performance and rest predicts individual differences in attention across studies / A.H.C. Fong, K. Yoo, M.D. Rosenberg, S. Zhang, C.S.R. Li, D. Scheinost, R.T. Constable, M.M. Chun // *NeuroImage*. – 2019. – Vol. 188. – P. 14-25.

39. Fornaro M. Role of neurotrophic factors in enhancing linear axonal growth of ganglionic sensory neurons *in vitro* / M. Fornaro, A. Giovannelli, A. Foggetti, L. Muratori, S. Geuna, G. Novajra, I. Perroteau // Neural regeneration research. – 2020. – Vol. 15, №. 9. – P. 1732-1739.
40. Forró, C. Modular microstructure design to build neuronal networks of defined functional connectivity / C. Forró, G. Thompson-Steckel, S. Weaver, S. Weydert, S. Ihle, H. Dermutz, J. Vörös // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Vol. 122. – P. 75-87.
41. Franze, K. Integrating chemistry and mechanics: the forces driving axon growth / K. Franze // Annual review of cell and developmental biology. – 2020. – Vol. 36. – P. 61-83.
42. Gabi M. Electrically controlling cell adhesion, growth and migration / M. Gabi, A. Larmagnac, P. Schulte, J. Vörös // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – Vol. 79, № 2. – P. 365-371.
43. Ginestra, P. S. Production of carbonized micro-patterns by photolithography and pyrolysis / P. S. Ginestra, M. Madou, E. Ceretti // Precision Engineering. – 2019. – Vol. 55. – P. 137-143.
44. Ghose, A., Pullarkat, P. The role of mechanics in axonal stability and development / A. Ghose, P. Pullarkat // Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press. – 2023. – Vol. 140. – P. 22-34.
45. Guillaume-Gentil, O. FluidFM applications in single-cell biology / O. Guillaume-Gentil, M. Mittelviehhaus, L. Dorwling-Carter, T. Zambelli, J. A. Vorholt // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2018. – P. 325-354.
46. Guillaume-Gentil, O. Force-controlled manipulation of single cells: from AFM to FluidFM / O. Guillaume-Gentil, E. Potthoff, D. Ossola, C. M. Franz, T. Zambelli, J. A. Vorholt // Trends in biotechnology. – 2014. – Vol. 32, № 7. – P. 381-388.
47. Guo, W. Neural coding in spiking neural networks: A comparative study for robust neuromorphic systems / W. Guo, M. E. Fouda, A. M.

- Eltawil, K. N. Salama // *Frontiers in Neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – P. 638474.
48. Gutjahr, N., Hövel, P., Viol, A. Controlling extended criticality via modular connectivity / N. Gutjahr, P. Hövel, A. Viol // *Journal of Physics: Complexity*. – 2021. – Vol. 2, № 3. – P. 035023.
49. Habibey, R. Microfluidics for Neuronal cell and circuit engineering / R. Habibey, J. E. Rojo Arias, J. Striebel, V. Busskamp // *Chemical Reviews*. – 2022. – Vol. 122, № 18. – P. 14842-14880.
50. Harry, B. B. Brain networks for temporal adaptation, anticipation, and sensory-motor integration in rhythmic human behavior / B. B. Harry, D. S. Margulies, M. Falkiewicz, P. E. Keller // *Neuropsychologia*. – 2023. – Vol. 183. – P. 108524.
51. Hasan, M. Neural circuits on a chip / M. Hasan, Y. Berdichevsky // *Micromachines*. – 2016. – Vol. 7, № 9. – P. 157.
52. Hilger K. Temporal stability of functional brain modules associated with human intelligence / K. Hilger, M. Fukushima, O. Sporns, C. J. Fiebach // *Hum. Brain Mapp.* – 2020. – Vol. 41. – P. 362–372.
53. Holloway, P. M. Advances in microfluidic in vitro systems for neurological disease modeling / P. M. Holloway, S. Willaime-Morawek, R. Siow, M. Barber, R. M. Owens, A. D. Sharma, M. Zagnoni // *Journal of Neuroscience Research*. – 2021. – Vol. 99, № 5. – P. 1276-1307.
54. Hondrich, T. J. J. Improvements of microcontact printing for micropatterned cell growth by contrast enhancement / T. J. Hondrich, O. Deußen, C. Grannemann, D. Brinkmann, A. Offenhäusser // *Micromachines*. – 2019. – Vol. 10, № 10. – P. 659.
55. 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. 28384.

56. Hong, N. Neurons-on-a-chip: in vitro neurotools / N. Hong, Y. Nam // *Molecules and Cells*. - 2020. – Vol. 45, № 2. – P. 76.
57. Hong, N., Joo, S., Nam, Y. 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. 64, № 2. – P. 492-498.
58. Hramov, A. E. Physical principles of brain–computer interfaces and their applications for rehabilitation, robotics and control of human brain states / A. E. Hramov, V. A. Maksimenko, A. N. Pisarchik // *Physics Reports*. – 2021. – Vol. 918. – P. 1-133.
59. Hua, D. Concentration gradients in material sciences: methods to design and biomedical applications / D. Hua, R. Xiong, K. Braeckmans, B. Scheid, C. Huang, F. Sauvage, S. C. De Smedt // *Advanced Functional Materials*. – 2021. – Vol. 31, № 15. – P. 2009005.
60. Hur, J., Chung, A. J. Microfluidic and nanofluidic intracellular delivery / J. Hur, A. J. Chung // *Advanced Science*. – 2021. – Vol. 8, № 15. – P. 2004595.
61. Ide, A. N. Chronic network stimulation enhances evoked action potentials / A. N. Ide, A. Andruska, M. Boehler, B. C. Wheeler, G. J. Brewer // *Journal of neural engineering*. – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 016008.
62. Ito, T. Discovering the computational relevance of brain network organization / T. Ito, L. Hearne, R. Mill, C. Cocuzza, M. W. Cole // *Trends in cognitive sciences*. – 2020. – Vol. 24, № 1. – P. 25-38.
63. Jalink, P., Caiazzo, M. Brain organoids: Filling the need for a human model of neurological disorder / P. Jalink, M. Caiazzo // *Biology*. – 2021. – Vol. 10, № 8. – P. 740.
64. Jenks, K. R. Heterosynaptic plasticity and the experience-dependent refinement of developing neuronal circuits / K. R. Jenks, K. Tsimring, J. P. K. Ip, J. C. Zepeda, M. Sur // *Frontiers in neural circuits*. – 2021. – Vol. 15. – P. 803401.

65. Jeong, G. S. Microfluidic spinning of grooved microfiber for guided neuronal cell culture using surface tension mediated grooved round channel / G. S. Jeong, S. H. Lee // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2014. – Vol. 11, № 4. – P. 291-296.
66. Joo, S. In vitro neurite guidance effects induced by polylysine pinstripe micropatterns with polylysine background / S. Joo, K. Kang, Y. Nam // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2015. – Vol. 103, № 8. – P. 2731-2739.
67. Kaehr, B. Guiding neuronal development with in situ microfabrication / B. Kaehr, R. Allen, D. J. Javier, J. Currie, J. B. Shear // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101, № 46. – P. 16104-16108.
68. Kajtez, J. 3D biomaterial models of human brain disease / J. Kajtez, F. Nilsson, A. Fiorenzano, M. Parmar, J. Emnéus // *Neurochemistry International*. – 2021. – Vol. 147. – P. 105043.
69. Kamudzandu, M. A micro-fabricated in vitro complex neuronal circuit platform / M. Kamudzandu, M. Köse-Dunn, M. G. Evans, R. A. Fricker, P. Roach // *Biomedical Physics & Engineering Express*. – 2019. – Vol. 5, № 4. – P. 045016.
70. Kirihara, T. A human induced pluripotent stem cell-derived tissue model of a cerebral tract connecting two cortical regions / T. Kirihara, Z. Luo, S. Y. A. Chow, R. Misawa, J. Kawada, S. Shibata, Y. Ikeuchi // *IScience*. – 2019. – Vol. 14. – P. 301-311.
71. Kirst, C. Shifting attention to dynamics: Self-reconfiguration of neural networks / C. Kirst, C. D. Modes, M. O. Magnasco // *Current Opinion in Systems Biology*. – 2017. – Vol. 3. – P. 132-140.
72. Kjar, A., Huang, Y. Application of micro-scale 3D printing in pharmaceuticals / A. Kjar, Y. Huang // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11, № 8. – P. 390.

73. Kronberg, G. Direct current stimulation boosts hebbian plasticity in vitro / G. Kronberg, A. Rahman, M. Sharma, M. Bikson, L. C. Parra // *Brain Stimulation*. – 2020. – Vol. 13, №. 2. – P. 287-301.
74. Kumar, A., Rotter, S., Aertsen, A. Conditions for propagating synchronous spiking and asynchronous firing rates in a cortical network model / A. Kumar, S. Rotter, A. Aertsen // *Journal of neuroscience*. – 2008. – Vol. 28, № 20. – P. 5268-5280.
75. Lam, D. Optimizing cell encapsulation condition in ECM-Collagen I hydrogels to support 3D neuronal cultures / D. Lam, H. A. Enright, S. K. Peters, M. L. Moya, D. A. Soscia, J. Cadena, N. O. Fischer // *Journal of neuroscience methods*. – 2020. – Vol. 329. – P. 108460.
76. le Feber J. 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. Rutten // *Frontiers in neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 412.
77. le Feber, J. 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, № 2. – P. 54.
78. Lee, U. N. Layer-by-layer fabrication of 3D hydrogel structures using open microfluidics / U. N. Lee, J. H. Day, A. J. Haack, R. C. Bretherton, W. Lu, C. A. DeForest, E. Berthier // *Lab on a Chip*. – 2020. – Vol. 20, № 3. – P. 525-536.
79. Li, W. Large-scale topographical screen for investigation of physical neural-guidance cues / W. Li, Q. Y. Tang, A. D. Jadhav, A. Narang, W. X. Qian, P. Shi, S. W. Pang // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 8644.
80. Li, W. NeuroArray: a universal interface for patterning and interrogating neural circuitry with single cell resolution / W. Li, Z. Xu, J.

- Huang, X. Lin, R. Luo, C. H. Chen, P. Shi // *Scientific reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 4784.
81. Liang, J. Less is more: wiring-economical modular networks support self-sustained firing-economical neural avalanches for efficient processing / J. Liang, S. J. Wang, C. Zhou // *National Science Review*. – 2022. – Vol. 9, № 3. – P. nwab102.
82. Liu, W. A Microfluidic Model with Hydrogel Barriers for the Construction of Shear-Free Attractive and Repulsive Cue Gradients / W. Liu, K. Han, M. Sun, Z. Huang, J. Wang // *Advanced Materials Technologies*. – 2019. – Vol. 4, № 2. – P. 1800434.
83. Liu, Z. L. Functional modular organization unfolded by chimera-like dynamics in a large-scale brain network model / Z. L. Liu, Y. Yu, Q. Y. Wang // *Science China Technological Sciences*. – 2022. – Vol. 65, № 7. – P. 1435-1444.
84. Lobov, S. A. Spatial memory in a spiking neural network with robot embodiment / S. A. Lobov, A. I. Zharinov, V. A. Makarov, V. B. Kazantsev // *Sensors*. – 2021. – Vol. 21, № 8. – P. 2678.
85. Luo, B. Development of an axon-guiding aligned nanofiber-integrated compartmentalized microfluidic neuron culture system / B. Luo, A. P. Tiwari, N. Chen, S. Ramakrishna, I. H. Yang // *ACS Applied Bio Materials*. – 2021. – Vol. 4, № 12. – P. 8424-8432.
86. Luttge, R. Nanofabricating neural networks: Strategies, advances, and challenges / R. Luttge // *Journal of Vacuum Science & Technology B, Nanotechnology and Microelectronics: Materials, Processing, Measurement, and Phenomena*. – 2022. – Vol. 40, № 2. – P. 020801.
87. Lynn, C. W. The physics of brain network structure, function and control / C. W. Lynn, D. S. Bassett // *Nature Reviews Physics*. – 2019. – Vol. 1, № 5. – P. 318-332.
88. Maeda, E. The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons / E.

- Maeda, H. Robinson, A. Kawana // *Journal of Neuroscience*. – 1995. – Vol. 15, № 10. – P. 6834-6845.
89. Maffei, A. Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation / A. Maffei, K. Nataraj, S. B. Nelson, G. G. Turrigiano // *Nature*. – 2006. – Vol. 443, № 7107. – P. 81-84.
90. Mahoney, M. J. The influence of microchannels on neurite growth and architecture / M. J. Mahoney, R. R. Chen, J. Tan, W. M. Saltzman // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26, № 7. – P. 771-778.
91. Maisonneuve, B. G. C. Microchannel patterning strategies for in vitro structural connectivity modulation of neural networks / B. G. C. Maisonneuve, J. Vieira, F. Larramendy, T. Honegger // *BioRxiv*. – 2021. – P. 2021.03.05.434080.
92. 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. – Vol. 2015.
93. Mateus, J. C. Nanoscale Patterning of In Vitro Neuronal Circuits / J. C. Mateus, S. Weaver, D. van Swaay, A. F. Renz, J. Hengsteler, P. Aguiar, J. Vörös // *ACS nano*. – 2022. – Vol. 16, № 4. – P. 5731-5742.
94. McCormick, L. E. Mechanistic advances in axon pathfinding / L. E. McCormick, S. L. Gupton // *Current opinion in cell biology*. – 2020. – Vol. 63. – P. 11-19.
95. Meeks, J. P., Mennerick, S. Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons / J. P. Meeks, S. Mennerick // *Journal of neurophysiology*. – 2007. – Vol. 97, № 5. – P. 3460-3472.
96. Mehring, C. Activity dynamics and propagation of synchronous spiking in locally connected random networks / C. Mehring, U. Hehl, M. Kubo, M. Diesmann, A. Aertsen // *Biological cybernetics*. – 2003. – Vol. 88, № 5. – P. 395-408.

97. Millet, L. J. Guiding neuron development with planar surface gradients of substrate cues deposited using microfluidic devices / L. J. Millet, M. E. Stewart, R. G. Nuzzo, M. U. Gillette // *Lab on a Chip*. – 2010. – Vol. 10, № 12. – P. 1525-1535.
98. Ming, Y. Microdevice for directional axodendritic connectivity between micro 3D neuronal cultures / Y. Ming, M. J. Abedin, S. Tatic-Lucic, Y. Berdichevsky // *Microsystems & Nanoengineering*. – 2021. – Vol. 7, № 1. – P. 67.
99. Miny, L. Modeling neurodegenerative diseases using in vitro compartmentalized microfluidic devices / L. Miny, B. G. Maisonneuve, I. Quadrio, T. Honegger // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 919646.
100. Na, S. Microfluidic neural axon diode / S. Na, M. Kang, S. Bang, D. Park, J. Kim, S. J. Sim, N. L. Jeon // *Technology*. – 2016. – Vol. 4, №. 04 – P. 240-248.
101. Narula, U. Narrow microtunnel technology for the isolation and precise identification of axonal communication among distinct hippocampal subregion networks / U. Narula, A. Ruiz, M. McQuaide, T. B. DeMarse, B. C. Wheeler, G. J. Brewer // *PloS one*. – 2017. – Vol. 12, № 5. – P. e0176868.
102. Obien, M. E. J. Accurate signal-source localization in brain slices by means of high-density microelectrode arrays / M. E. J. Obien, A. Hierlemann, U. Frey // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1-19.
103. Okujeni, S. Self-organization of modular network architecture by activity-dependent neuronal migration and outgrowth / S. Okujeni, U. Egert // *Elife*. – 2019. – Vol. 8. – P. e47996.
104. Okujeni, S., Egert, U. Structural modularity tunes mesoscale criticality in biological neuronal networks / S. Okujeni, U. Egert // *Journal of Neuroscience*. – 2023. – Vol. 43, № 14. – P. 2515-2526.
105. Pagan-Diaz, G.J. Modulating electrophysiology of motor neural networks via optogenetic stimulation during neurogenesis and

- synaptogenesis / G.J. Pagan-Diaz, J. Drnevich, K.P. Ramos-Cruz, R. Sam, P. Sengupta, R. Bashir // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 12460.
106. 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 // *Journal of neural engineering*. – 2011. – Vol. 8, № 4. – P. 046031.
107. 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. 32.
108. 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*. – 2013. – Vol. 22, № 3. – P. 453-459.
109. Pan, R. K. Modularity produces small-world networks with dynamical time-scale separation / R. K. Pan, S. Sinha // *EPL (Europhysics Letters)*, 2019. – Vol. 85, №6. – 68006.
110. Park M. U. Collective dynamics of neuronal activities in various modular networks / M. U. Park, Y. Bae, K. S. Lee, J. H. Song, S. M. Lee, K. H. Yoo // *Lab on a Chip*. – 2021. – Vol. 21, № 5. – P. 951-961.
111. Park, S. Fast and efficient information transmission with burst spikes in deep spiking neural networks / S. Park, S. Kim, H. Choe, S. Yoon // *Proceedings of the 56th Annual Design Automation Conference 2019*. – 2019. – P. 1-6.
112. Park, Y. Three-dimensional, multifunctional neural interfaces for cortical spheroids and engineered assembloids / Y. Park, C. K. Franz, H. Ryu, H. Luan, K. Y. Cotton, J. U. Kim, J. A. Rogers // *Science advances*. – 2021. – Vol. 7, №. 12. – P. eabf9153.

113. Pelkonen, A. A modular brain-on-a-chip for modelling epileptic seizures with functionally connected human neuronal networks / A. Pelkonen, R. Mzezewa, L. Sukki, T. Ryyänen, J. Kreutzer, T. Hyvärinen, A. Vinogradov, L. Aarnos, J. Leikkala, P. Kallio, S. Narkilahti // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2020. – Vol. 168. – P. 112553.
114. Petersen, S. E. Brain networks and cognitive architectures / S. E. Petersen, O. Sporns // *Neuron*. – 2015. – Vol. 88, № 1. – P. 207-219.
115. 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, B. Brugg // *Lab on a Chip*. – 2011. – Vol. 11, № 21. – P. 3663-3673.
116. Poli D. Sparse and specific coding during information transmission between co-cultured dentate gyrus and CA3 hippocampal networks / D. Poli, S. Thiagarajan, T. B. DeMarse, B. C. Wheeler, G. J. Brewer // *Frontiers in neural circuits*. – 2017. – Vol. 11. – P. 13.
117. Poli, D. Functional connectivity in in vitro neuronal assemblies / D. Poli, V. P. Pastore, P. Massobrio // *Frontiers in neural circuits*. – 2015. – Vol. 9. – P. 57.
118. Poli, D., Massobrio, P. High-frequency electrical stimulation promotes reshaping of the functional connections and synaptic plasticity in in vitro cortical networks / D. Poli, P. Massobrio // *Physical Biology*. – 2018. – Vol. 15, № 6. – P. 06LT01.
119. Prestigio, C. REST/NRSF drives homeostatic plasticity of inhibitory synapses in a target-dependent fashion / C. Prestigio, D. Ferrante, A. Marte, A. Romei, G. Lignani, F. Onofri, P. Valente, F. Benfenati, P. Baldelli // *Elife*. – 2021. – Vol. 10. – P. e69058.
120. Primo, G. A. 3D patterning within hydrogels for the recreation of functional biological environments / G. A. Primo, A. Mata // *Advanced Functional Materials*. – 2021. – Vol. 31, № 16. – P. 2009574.

121. Puxeddu, M. G. The modular organization of brain cortical connectivity across the human lifespan / M. G. Puxeddu, J. Faskowitz, R. F. Betzel, M. Petti, L. Astolfi, O. Sporns // *NeuroImage*. – 2020. – Vol. 218. – P. 116974.
122. Qiu, B. Bioprinting neural systems to model central nervous system diseases / B. Qiu, N. Bessler, K. Figler, M. B. Buchholz, A. C Rios, J. Malda, R. Levato, M. Caiazzo // *Advanced functional materials*. – 2020. – Vol. 30, №. 44. – P. 1910250.
123. 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.
124. Raut, R. V. Hierarchical dynamics as a macroscopic organizing principle of the human brain / R. V. Raut, A. Z. Snyder, M. E. Raichle // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117, № 34. – P. 20890-20897.
125. Rebelo, A. L. Glycan-functionalized collagen hydrogels modulate the glycoenvironment of a neuronal primary culture / A. L. Rebelo, J. Bizeau, L. Russo, A. Pandit // *Biomacromolecules*. – 2020. – Vol. 21, №. 7. – P. 2681-2694.
126. Reinartz, S. Long-Term Activity Dynamics of Single Neurons and Networks / S. Reinartz // *In Vitro Neuronal Networks*. – Springer, Cham, 2019. – P. 331-350.
127. Renart, A., van Rossum, M. C. W. Transmission of population-coded information / A. Renart, M. C. W. van Rossum // *Neural computation*. – 2012. – Vol. 24, № 2. – P. 391-407.
128. Renault, R. Asymmetric axonal edge guidance: a new paradigm for building oriented neuronal networks / R. Renault, J. B. Durand, J. L. Viovy, C. Villard // *Lab on a Chip*. – 2016. – Vol. 16, № 12. – P. 2188-2191.
129. Rezaei, H. Facilitating the propagation of spiking activity in feedforward networks by including feedback / H. Rezaei, A. Aertsen, A.

- Kumar, A. Valizadeh // PLoS computational biology. – 2020. – Vol. 16, № 8. – P. e1008033.
130. Richter, L. M. A. Understanding neural circuit development through theory and models / L. M. A. Richter, J. Gjorgjieva // Current opinion in neurobiology. – 2017. – Vol. 46. – P.39-47.
131. Schneider, F., Metz, I., Rust, M. B. Regulation of actin filament assembly and disassembly in growth cone motility and axon guidance/ F. Schneider, I. Metz, M. B. Rust //Brain Research Bulletin. – 2023. – Vol. 192. – P. 21-35.
132. 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.
133. Seidlits, S. K. Peptide-modified, hyaluronic acid-based hydrogels as a 3D culture platform for neural stem/progenitor cell engineering / S. K. Seidlits, J. Liang, R. D. Bierman, A. Sohrabi, J. Karam, S. M. Holley, C. Cepeda, C. M. Walthers // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2019. – Vol. 107, №. 4. – P. 704-718.
134. Seo, J. Neuro-taxis: Neuronal movement in gradients of chemical and physical environments / J. Seo, W. Youn, J. Y. Choi, H. Cho, H. Choi, C. Lanara, I. S. Choi // Developmental Neurobiology. – 2020. – Vol. 80, № 9-10. – P. 361-377.
135. Sharma, P. An overview of latest advances in exploring bioactive peptide hydrogels for neural tissue engineering / P. Sharma, V. K. Pal, S. Roy //Biomaterials Science. – 2021. – Vol. 9, № 11. – P. 3911-3938.
136. Shein-Idelson, M. Engineered neuronal circuits: a new platform for studying the role of modular topology / M. Shein-Idelson, E. Ben-Jacob, Y. Hanein // Frontiers in neuroengineering. – 2011. – Vol. 4. – P. 10.
137. Shein-Idelson, M. Modularity induced gating and delays in neuronal networks/ M.Shein-Idelson, G.Cohen, E.Ben-Jacob, Y. Hanein //PLoS Computational Biology, 2016. – Vol. 12, № 4. – e1004883.

138. Shinde, A. A review of single-cell adhesion force kinetics and applications / A. Shinde, K. Illath, P. Gupta, P. Shinde, K. T. Lim, M. Nagai, T. S. Santra // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 3. – P. 577.
139. Shirao, A. B. A versatile method of patterning proteins and cells / A. B. Shirao, F. H. Kung, D. Yip, B. L. Firestein, H. Cheul, E. Townes-Anderson // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. – 2017. – №. 120. – P. e55513.
140. Sitti, M. Biomedical Applications of Untethered Mobile Milli/Microrobots/ M. Sitti, H. Ceylan, W. Hu, J. Giltinan, M. Turan, S. Yim, E. Diller // *Proceedings of the IEEE*. – 2015. – Vol. 103, № 2. – P. 205-224.
141. Sporns, O., Zwi, J. D. The small world of the cerebral cortex / O. Sporns, J. D. Zwi // *Neuroinformatics*. – 2004. – Vol. 2. – P. 145-162.
142. Sporns, O. Contributions and challenges for network models in cognitive neuroscience / O. Sporns // *Nature neuroscience*. – 2014. – Vol. 17, № 5. – P. 652.
143. Suárez, L. Linking structure and function in macroscale brain networks / L. E. Suárez, R. D. Markello, R. F. Betzel, B. Misic // *Trends in cognitive sciences*. – 2020. – Vol. 24, № 4. – P. 302-315.
144. Sun C. et al. Revealing directed effective connectivity of cortical neuronal networks from measurements // *Physical Review E*. – 2022. – T. 105. – №. 4. – C. 044406.
145. 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.
146. Takemuro, T. Polydimethylsiloxane microfluidic films for in vitro engineering of small-scale neuronal networks / T. Takemuro, H. Yamamoto,

- S. Sato, A. Hirano-Iwata // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2020. – Vol. 59, № 11. – P. 117001.
147. Tanaka, Y. Stepwise neuronal network pattern formation in agarose gel during cultivation using non-destructive microneedle photothermal microfabrication / Y. Tanaka, H. Watanabe, K. Shimoda, K. Sakamoto, Y. Hondo, M. Sentoku, R. Sekine, T. Kikuchi, K. Yasuda // *Scientific reports*. – 2021. – Vol. 11. № 1. – P. 14656.
148. Tanwar, A. A review on microelectrode array fabrication techniques and their applications / A. Tanwar, H. A. Gandhi, D. Kushwaha, J. Bhattacharya // *Materials Today Chemistry*. – 2022. – Vol. 26. – P. 101153.
149. Tihaa, I. Neuronal guiding: Designing In Vitro Networks On MEA / I. Tihaa, J. Albers, A. Offenhausser // *Front. Neurosci. Conference Abstract: MEA Meeting*. – 2016.
150. Toh, A. G. G. Engineering microfluidic concentration gradient generators for biological applications / A. G. Toh, Z. P. Wang, C. Yang, N. T. Nguyen // *Microfluidics and nanofluidics*. – 2014. – Vol. 16, № 1-2. – P. 1-18.
151. Toker, D., Sommer, F. T. Information integration in large brain networks / D. Toker, F. T. Sommer // *PLoS computational biology*. – 2019. – Vol. 15, № 2. – P. e1006807.
152. Truong, K. Interaction of micropatterned topographical and biochemical cues to direct neurite growth from spiral ganglion neurons / K. Truong, B. Leigh, J. T. Vecchi, R. Bartholomew, L. Xu, C. A. Guymon, M. R. Hansen // *Hearing research*. – 2021. – Vol. 409. – P. 108315.
153. Turrigiano, G. G. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons / G. G. Turrigiano, K. R. Leslie, N. S. Desai, L. C. Rutherford, S. B. Nelson // *Nature*, 1998. – Vol. 391(6670). – P. 892-896.
154. Turrigiano, G. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function / G. Turrigiano // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. a005736.

155. Turrigiano, G.G., Nelson, S.B. Homeostatic plasticity in the developing nervous system / G.G. Turrigiano, S.B. Nelson // *Nature reviews neuroscience*. – 2004. – Vol. 5, № 2. – P. 97-107.
156. Vidaurre, D. Discovering dynamic brain networks from big data in rest and task / D. Vidaurre, R. Abeysuriya, R. Becker, A. J. Quinn, F. Alfaro-Almagro, S. M. Smith, M. W. Woolrich // *Neuroimage*. – 2018. – Vol. 180. – P. 646-656.
157. Vitet, H. Traffic signaling: new functions of huntingtin and axonal transport in neurological disease / H. Vitet, V. Brandt, F. Saudou // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2020. – Vol. 63. – P. 122-130.
158. Voytek, B. Dynamic network communication as a unifying neural basis for cognition, development, aging, and disease / B. Voytek, R. T. Knight // *Biological psychiatry*. – 2015. – Vol. 77, № 12. – P. 1089-1097.
159. 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*. – 2006. – Vol. 7, № 1. – P. 1-18.
160. Wang, R. Segregation, integration, and balance of large-scale resting brain networks configure different cognitive abilities / R. Wang, M. Liu, X. Cheng, Y. Wu, A. Hildebrandt, C. Zhou // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118, № 23. – P. e2022288118
161. Williams, E. Neural burst codes disguised as rate codes / E. Williams, A. Payeur, A. Gidon, R. Naud // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 15910.
162. Wilson, N. R. Synaptic reorganization in scaled networks of controlled size / N. R. Wilson, M. T. Ty, D. E. Ingber, M. Sur, G. Liu // *Journal of Neuroscience*, 2007. – Vol. 27(50). – P. 13581-13589.
163. Winter-Hjelm, N. Structure-function dynamics of engineered, modular neuronal networks with controllable afferent-efferent connectivity / N. Winter-Hjelm, Å. B. Tomren, P. Sikorski, A. Sandvig, I. Sandvig // *Journal of Neural Engineering*. – 2023. – T. 20. – №. 4. – C. 046024.

164. Xu, S. Recent Progress and Perspectives on Neural Chip Platforms Integrating PDMS-Based Microfluidic Devices and Microelectrode Arrays / S. Xu, Y. Liu, Y. Yang, K. Zhang, W. Liang, Z. Xu, X. Cai // *Micromachines*. – 2023. – Vol. 14, № 4. – P. 709.
165. Yamamoto, H. Impact of modular organization on dynamical richness in cortical networks / H. Yamamoto, S. Moriya, K. Ide, T. Hayakawa, H. Akima, S. Sato, A. Hirano-Iwata // *Science advances*, 2018. – Vol. 4, № 11. – eaau4914.
166. Yang, X. Bioinspired neuron-like electronics / X. Yang, T. Zhou, T. J. Zwan, G. Hong, Y. Zhao, R. D. Viveros, C. M. Lieber // *Nature materials*. – 2019. – Vol. 18, № 5. – P. 510-517.
167. Yu, S. Micropatterning of polymer substrates for cell culture / S. Yu, D. Liu, T. Wang, Y. Z. Lee, J. C. N. Wong, X. Song // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2021. – Vol. 109, № 10. – P. 1525-1533.
168. Yu, Z. Negative dielectrophoretic force assisted construction of ordered neuronal networks on cell positioning bioelectronic chips / Z. Yu, G. Xiang, L. Pan, L. Huang, Z. Yu, W. Xing, J. Cheng // *Biomedical microdevices*. – 2004. – Vol. 6. – P. 311-324.
169. Yurchenko, I. Neuronal growth and formation of neuron networks on directional surfaces / I. Yurchenko, M. Farwell, D. D. Brady, C. Staii // *Biomimetics*. – 2021. – Vol. 6, № 2. – P. 41.