

УДК 57.085.23

**УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ КОРРЕЛЯТЫ РАЗВИТИЯ НЕЙРОСЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ ДИССОЦИИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА**© 2014 г. **О.М. Широкова<sup>1</sup>, Л.Е. Фрумкина<sup>2</sup>, Е.А. Азрба<sup>1,3</sup>,  
М.В. Ведунова<sup>1,3</sup>, Л.Г. Хаспеков<sup>2</sup>, И.В. Мухина<sup>1,3</sup>**<sup>1</sup> Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского<sup>2</sup> Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, Москва<sup>3</sup> Нижегородская государственная медицинская академия

shirokovaom@gmail.com

Поступила в редакцию 26.09.2013

Исследованы ультраструктурные особенности синаптогенеза и функционального развития нейронной сети диссоциированной культуры эмбрионального гиппокампа (E18) при высокой плотности клеток (3000 кл/мм<sup>2</sup>) с использованием мультиэлектродной регистрации внеклеточных потенциалов и конфокальной флуоресцентной микроскопии внутриклеточного кальция. Определены стадии развития межклеточных контактов на ультраструктурном уровне в сравнении с биоэлектрической активностью и с динамикой функциональной активности нейронов по параметрам функционального Ca<sup>2+</sup>-имиджинга. Проведенные исследования продемонстрировали, что в процессе развития диссоциированной культуры гиппокампа наблюдались несколько критических периодов в синаптогенезе, связанных с формированием зрелой функциональной нейронной сети.

**Ключевые слова:** нейронная сеть, синаптогенез, первичные диссоциированные культуры гиппокампа, электронная микроскопия, Ca<sup>2+</sup>-имиджинг, сетевая пачечная активность, мультиэлектродная матрица.

Нарушение межклеточных контактов в онтогенезе часто приводит к формированию патологических нейронных сетей, лежащих в основе изменения психических функций мозга, и развитию заболеваний центральной нервной системы взрослого организма. Исследования клеточных взаимодействий в процессе развития гиппокампа *in vivo* затруднены из-за сложности визуализации структуры в составе целостного мозга, включающей огромное число межклеточных связей. Для применения различных методов структурно-функциональной визуализации нейронных сетей в хроническом эксперименте идеально подходит одна из распространенных биологических моделей – первичные диссоциированные культуры нервных клеток. Кроме того, использование этой модели позволяет исследовать клеточные и сетевые механизмы, лежащие в основе процессов обучения [1–4], запоминания [5] и адаптивного управления [6–8].

В настоящее время довольно хорошо изучены особенности развития клеточных культур гиппокампа: морфология клеточных элементов [9–12], синаптогенез [13, 14], динамика экспрессии различных типов рецепторов [15], характер электрической активности [16]. Однако, в результате отсутствия комплексных исследований морфофункционального состояния кле-

ток в данной биологической модели в процессе их длительного культивирования, характер корреляции ультраструктурных изменений формирующихся межнейронных связей с динамикой их функциональной активности остается неясным.

Цель настоящей работы – изучение ультраструктурных особенностей синаптогенеза и функционального развития нейронной сети диссоциированной культуры эмбрионального гиппокампа (E18) при длительном культивировании *in vitro*.

**Материалы и методы исследования**

В качестве объектов исследования использовались развивающиеся диссоциированные культуры гиппокампа мышинных эмбрионов (E18), культивируемые в течение 30 дней *in vitro* (DIV) при средней плотности клеток 3000–3500 кл/мм<sup>2</sup>. Методы функционального исследования включали многоканальную регистрацию внеклеточных потенциалов с помощью мультиэлектродной матрицы системы MED64 (*Alfa Med Science*, Япония), содержащей 64 микроэлектрода [17], с последующим анализом биоэлектрической активности нейронных сетей первичной культуры гиппокампа, а также регистрацию спонтанного из-

Таблица

**Результаты  $\text{Ca}^{2+}$ -имиджинга нейронов в составе нейронной сети первичной культуры гиппокампа в зависимости от дня развития *in vitro***

День развития <i>in vitro</i>	Частота одиночных $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций, Гц			Длительность одиночных $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций, с		Процент осциллирующих клеток
5	0.012±0.003			12.7±1.64		1.2
7	0.03±0.002			7.8±0.55		12.4
10	0.03±0.004			7.4±2.0		22.7
14	0.14±0.03			3.9±0.2		57.9
21	0.17±0.02	0.1±0.003*	0.2±0.02**	3.20±0.17	42.10±5.36*	55.4
30	0.090±0.006*		0.32±0.04**	7.20±0.65*		92.0

\* Для  $\text{Ca}^{2+}$ -суперосцилляций; \*\* для  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций внутри  $\text{Ca}^{2+}$ -суперосцилляций.

менения внутриклеточного кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ -имиджинга) [12]. В качестве маркера свободного кальция использовался чувствительный к кальцию краситель *Oregon Green* ВАРТА-1 АМ, флуоресценцию которого фиксировали с помощью лазерного конфокального микроскопа LCM 510 [18]. Морфологические методы включали изучение ультраструктуры межклеточных контактов в нейронной сети первичной культуры гиппокампа с помощью электронного микроскопа.

### Результаты и их обсуждение

Формирование структуры межклеточных контактов нейронной сети происходило в несколько этапов. В первые 3–5 дней культивирования в нейропиле обнаруживались вакантные постсинаптические уплотнения и незрелые (щелевидные, десмосомовидные и симметричные) (рис. 1а,б,г) авезикулярные соединения, необходимые в этот период синаптогенеза для проведения электрических сигналов в формирующейся сети нейронов. Стоит отметить, что были обнаружены нетипичные для зрелого мозга соматосоматические (рис. 1а), дендродендритные и соматодендритные контакты. Первые  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляции были выявлены на 5-й DIV в 1% нейронов, которые характеризовались большой длительностью (12.0±1.64 с) и низкой частотой (0.012±0.003 Гц) осцилляций (таблица). Биоэлектрическая активность на 5-й день развития культуры гиппокампа представляла собой единичные спонтанные события в виде спайков амплитудой 25.1±2.4 мкВ и длительностью 1–1.5 мс на всех электродах. Иногда одиночные спайки объединялись в малые сетевые пачки, регистрируемые менее чем на 5-ти электродах [19]. Появление редких спонтанных спайков вызвано шумовыми возмущениями, связанными с развитием клеток (ростом аксона и дендритов). Ранее проведенные иммуноцитохимические исследования выявили, что основную

популяцию клеток культуры в этот период развития составляли нейроны, в то время как дифференцированные глиальные клетки с простой формой отростков были немногочисленны [12]. Такое избыточное количество нейронов, часть из которых (50%) в последующем погибнет в процессе развития культуры, является характерной чертой развития центральной нервной системы всех позвоночных [20]. При сканировании культуры гиппокампа на 5 DIV в вертикальном направлении было выявлено, что нижний слой культуры образовывали нейроны, а редкие глиальные элементы находились выше монослоя нейронов.

С 5 по 7 DIV происходило формирование первых зрелых химических синапсов, появление которых отмечалось и другими авторами [11]. Стоит отметить, что иммуноцитохимически с 4-го по 10-й день развития *in vitro* в культуре была обнаружена интересная закономерность: образование кластеров клеток, в которых развивающаяся глиальная сеть, вероятно, создавала необходимые для работы нейронов условия [12]. В наших исследованиях контакты смешанного типа (рис. 1в) составляли основную популяцию синапсов на 7-й день развития культуры гиппокампа. Контакты смешанного типа представляли собой промежуточную стадию развития химического синапса. Необходимо отметить, что именно в этот период регистрировалась первая сетевая пачечная активность, представляющая собой синхронизованные малые сетевые пачки импульсов, записанные с многих электродов с коротким интервалом следования (1–50 мс) [19, 21].

С 14-го дня и до конца второй недели происходило формирование пачечной активности с варьирующейся частотой следования пачек (рис. 2).

Начиная с 21-го дня культивирования *in vitro* длительность сетевых пачек стабилизировалась и устанавливалась на уровне 0.4 с. Усложнение

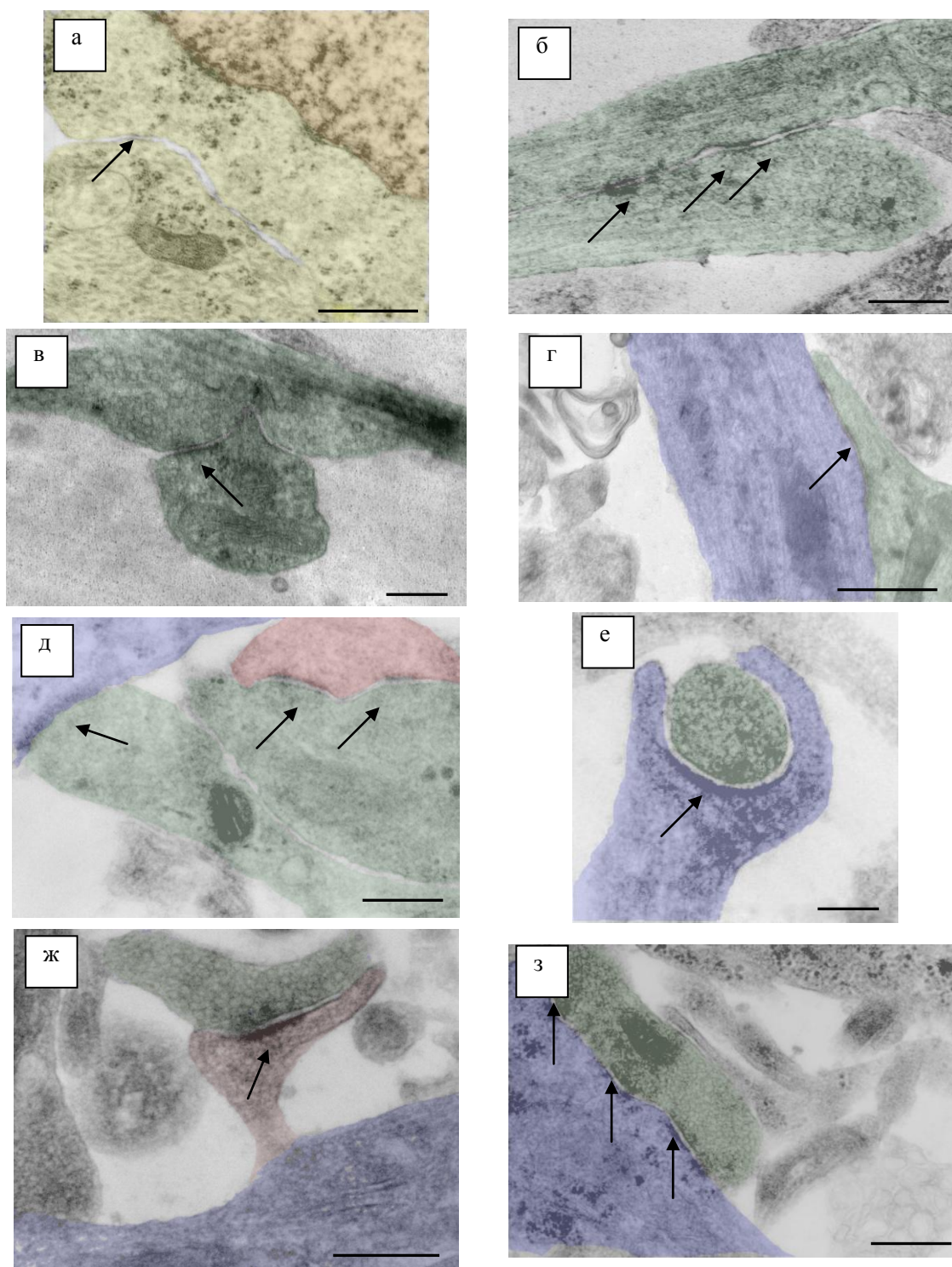


Рис. 1. Электронно-микроскопические изображения диссоциированных культур гиппокампа на 5 (а, б), 7 (в, г), 14 (д), 21 (е) и 30 (ж, з) день развития культуры *in vitro*. а – сома-соматический симметричный контакт, б – аксо-аксональный симметричный контакт, в – смешанный аксо-аксональный контакт, сочетающий в себе десмосому и асимметричный контакт, г – аксо-дендритный десмосовидный контакт, синаптические везикулы не подходят к пресинаптическому уплотнению синапса, д – аксо-шиповый перфорированный и аксо-дендритный синапсы, е – аксо-дендритный асимметричный конвергентный контакт, ж – аксо-шиповый асимметричный контакт, з – перфорированный аксо-дендритный асимметричный синапс. Обозначения: стрелка – контакт; псевдоцвета: зеленый – аксон, синий – дендрит, розовый – дендритный шипик, желтый – сома, оранжевый – ядро. Масштаб: 0.5 мкм

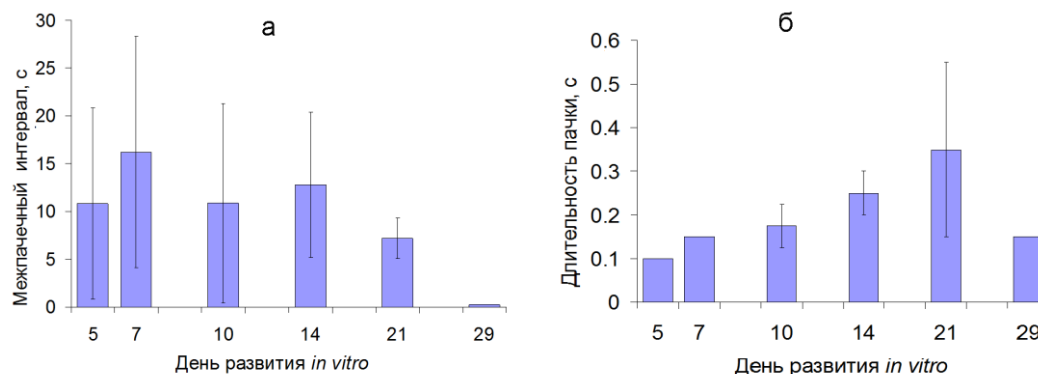


Рис. 2. Динамика параметров сетевой пачечной активности: межпачечного интервала (а) и длительности сетевой пачки (б) в процессе развития нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа *in vitro*

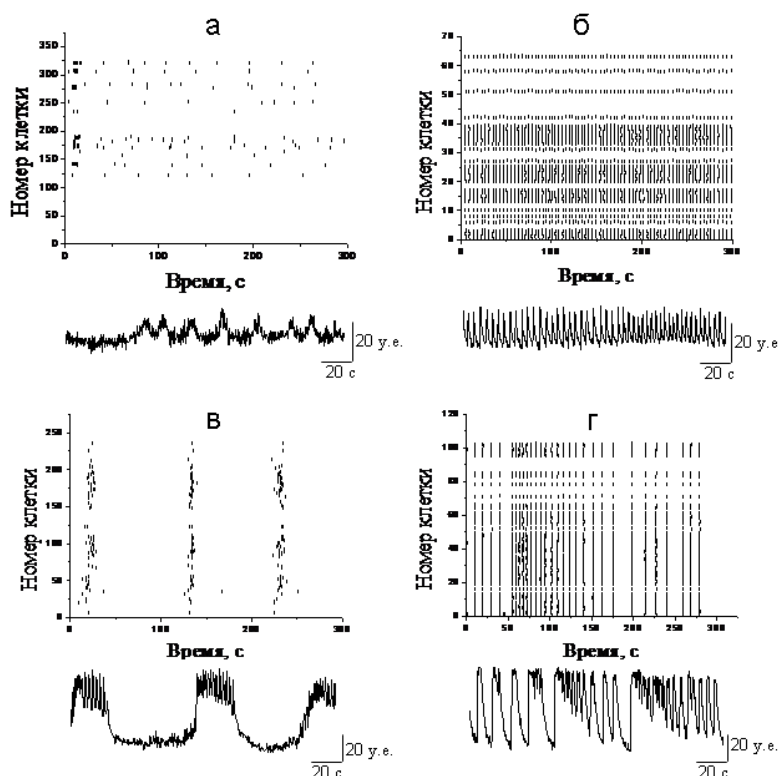


Рис. 3. Растровые диаграммы распределения клеточной активности и нативные записи  $Ca^{2+}$ -осцилляций одиночных клеток на 5 (а), 14 (б), 21 (в) и 30 (г) день развития культуры *in vitro*. Отмечается появление  $Ca^{2+}$ -суперосцилляций на 21 и 30 день развития культуры *in vitro*

динамики биоэлектрической активности нейронной сети в виде формирования «суперпачек спайков» сопровождалось появлением «суперосцилляций» внутриклеточного  $Ca^{2+}$  (рис. 3а). На 21 день часть клеток продолжала работать в среднем с частотой и длительностью изменения внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , близкими к 14-му дню развития (таблица), однако часть высокочастотных одиночных осцилляций этих же клеток объединялась в условиях записи 4 кадров/с в так называемые  $Ca^{2+}$ -суперосцилляции. На 21 день длитель-

ность таких суперосцилляций составляла, в среднем,  $42.1 \pm 5.36$  с, а частота их следования  $0.1 \pm 0.003$  Гц, частота же  $Ca^{2+}$ -событий внутри суперосцилляций составила  $0.2 \pm 0.02$  Гц. Наряду с этим, происходило практически полное исчезновение незрелых в функциональном отношении межклеточных контактов в нейронной сети. Полученные результаты *in vitro* согласуются по времени с исследованиями по синаптогенезу *in vivo* [10, 22, 23]. Биоэлектрические свойства культуры до этого этапа развития характеризовались вре-

менным распределением малых пачек в виде неинвертированных суперпачек. С 21-го дня развития *in vitro* сетевая активность характеризовалась наличием инвертированных суперпачек.

Таким образом, появление сложной сетевой пачечной активности было обусловлено развитием зрелых синаптических контактов и являлось индикатором формирования зрелой нейронной сети. По данным ранее проведенных иммуноцитохимических исследований, нейроны в составе культуры к 21 дню располагались в виде монослоя равномерно среди дифференцированных глиальных клеток сложной формы. При этом количество нейронов существенно уменьшалось [12].

Необходимо также отметить, что ультроструктура межнейронных связей стабилизировалась на уровне 21-го дня развития *in vitro*. С 21-го по 30-й DIV обнаруживались сложно организованные перфорированные, конвергентные и дивергентные синапсы (рис. 1д,е,з), а в шипиках – элементы шипикового аппарата.

### Заключение

Продемонстрировано, что в процессе развития первичных гиппокампальных культур, полученных из мозга эмбрионов мышей (E18), в течение месяца происходило изменение регистрируемой сетевой биоэлектрической активности, обусловленное формированием функциональной нейронной сети. Появление сложной сетевой пачечной активности нейронной сети и  $\text{Ca}^{2+}$ -суперосцилляций в нейронах было обусловлено развитием химических синаптических контактов и являлось индикатором формирования зрелой нейронной сети. В развитии ультроструктурных изменений в синапсах и проявлении функциональной активности сети в культуре гиппокампа при высокой плотности клеток ( $3000\text{--}3500$  кл/мм<sup>2</sup>) выделялись следующие критические периоды: 1) 3–5 дней, характеризующийся незрелыми (щелевидные, десмосомовидные и симметричные) авезикулярными соединениями, наличием единичных несинхронных спайков и длительных единичных  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций; 2) 5–7 дней, характеризующийся появлением первых переходных синапсов смешанного типа и первых малых сетевых пачек, представляющих собой синхронную активность нескольких нейронов в составе сформированной, но еще функционально незрелой сети, а также наличием коротких единичных  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций; 3) 14–16 дней, характеризующийся появлением аксошипиковых зрелых контактов,

в том числе перфорированных синапсов, усложнением рисунка пачечной активности сети в виде неинвертированных суперпачек и повышением частоты единичных  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций; 4) 21–23 день, характеризующийся доминированием зрелых синаптических контактов, наличием сложных инвертированных суперпачек и  $\text{Ca}^{2+}$ -суперосцилляций, что свидетельствует о формировании морфофункционально зрелой нейронной сети. Последующее развитие культуры гиппокампа характеризуется стабильностью функциональной активности, появлением более сложных форм синапсов (перфорированные, конвергентные и дивергентные).

### Список литературы

1. Shahaf G., Marom S. Learning in networks of cortical neurons // J. Neuroscience. 2001. V. 21. № 22. P. 8782–8788.
2. Marom S., Shahaf G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy // Q. Rev. Biophys. 2002. V. 35. № 1. P. 63–87.
3. Li Y. et al. Characterization of synchronized bursts in cultured hippocampal neuronal networks with learning training on microelectrode arrays // J. Biosens. Bioelectron. 2007. V. 22. № 12. P. 2976–2982.
4. Le Feber J., Stegenga J., Rutten W.L.C. The effect of slow electrical stimuli to achieve learning in cultured networks of rat cortical neurons // PLoS ONE. 2010. V. 5. № 1. P. e8871.
5. Wagenaar D.A., Pine J., Potter S.M. Searching for plasticity in dissociated cortical cultures on multi-electrode arrays // J. Negat. Results Biomed. 2006. V. 5. P. 16.
6. Demarse T.B., Wagenaar D.A., Blau A.W. et al. The Neurally Controlled Animat: Biological Brains Acting with Simulated Bodies // Auton. robot. 2001. V. 11. № 3. P. 305–310.
7. Shahaf G., Eytan D., Gal A., Kermany E. et al. Order-based representation in random networks of cortical neurons // PLoS Comput. Biol. 2008. V. 4. № 11. P. e1000228.
8. Bakkum D.J., Gamblen P.M., Ben-Ary G. et al. MEART: The Semi-Living Artist // Front. Neurobot. 2007. V. 1. № 5. P. 1–10.
9. Gasser U.E., Hatten M.E. Neuron-glia interactions of rat hippocampal cells in vitro: glial-guided neuronal migration and neuronal regulation of glial differentiation // J. Neuroscience. 1990. V. 10. № 4. P. 1276–1285.
10. Bartlett W.P., Banker G.A. An electron microscopic study of the development of axon and dendrites by hippocampal neurons of culture // J. Neuroscience. 1984. V. 4. № 8. P. 1954–1965.
11. Grabrucker A., Vaida B., Bockmann J. et al. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture // Cell Tissue Res. 2009. V. 338. P. 333–341.
12. Широкова О.М., Фрумкина Л.Е., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Захаров Ю.Н., Хаспеков Л.Г.,

Мухина И.В. Морфофункциональные закономерности развития нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа *in vitro* // *Соврем. технол. мед.* 2013. Т. 5. № 2. С. 6–13.

13. Matteoli M., Verderio C., Krawzeskic K. et al. Mechanisms of synaptogenesis in hippocampal neurons in primary culture // *J. Physiol.* 1995. V. 89. P. 51–55.

14. Rao A., Kim E., Sheng M., Craig A. Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture // *J. Neuroscience.* 1998. V. 18. № 4. P. 1217–1229.

15. Wagenaar D.A., Pine J., Potter S.M. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures // *BMC Neuroscience.* 2006. V. 7. P. 11.

16. Basarsky T.A., Parpura V., Haydon P.G. Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution // *J. Neuroscience.* 1994. V. 14. № 11. P. 6402–6411.

17. Мухина И.В., Хаспеков Л.Г. Новая технология в экспериментальной нейробиологии: нейронные сети на мультиэлектродной матрице // *Анн. клин. экперим. неврологии.* 2010. Т. 4. № 2. С. 44–51.

18. Zakharov Y., Ershova A., Golubkin N., Mukhina I. Ion concentration quantification with the help of single-wavelength dye fluorescence // *Applied Optics.* 2012. V. 51. № 10. P. 95–99.

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

20. Николлс Д.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. М.: Изд-во ЛКИ, 2008. 672 с.

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

22. Боголепов Н.Н., Фрумкина Л.Е., Яковлева Н.И., Королева С.К. Возможные механизмы формирования синапсов в онтогенезе // *Арх. анат.* № 5. С. 20–27.

23. Papa M., Bundman C.M., Greenberger V., Segal M. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons // *J. Neuroscience.* 1995. V. 15. № 1. P. 1–11.

#### ULTRASTRUCTURAL CORRELATES OF NEURONAL NETWORK ACTIVITY DEVELOPMENT IN DISSOCIATED HIPPOCAMPAL CULTURE

*O.M. Shirokova, L.E. Frumkina, E.A. Agrba, M.V. Vedunova, L.G. Khaspekov, I.V. Mukhina*

The article studies ultrastructural characteristics of synaptogenesis and functional development of the neuronal network of embryonic hippocampal (E18) dissociated culture with high cell density (3000 cell/mm<sup>2</sup>) using multi-electrode registration of extracellular potentials and confocal fluorescence microscopy of intracellular Ca<sup>2+</sup>. The stages of the intercellular contact development at the ultrastructural level as compared with bioelectrical activity and the dynamics of functional neuronal activity are determined by the parameters of functional Ca<sup>2+</sup> imaging. The studies have demonstrated that during the development of the dissociated hippocampal culture there have been several critical periods in synaptogenesis associated with the formation of a mature functional neuronal network.

*Keywords:* neuronal network, synaptogenesis, primary dissociated hippocampal culture, electron microscopy, Ca<sup>2+</sup> imaging, network burst, multielectrode array.

#### References

1. Shahaf G., Marom S. Learning in networks of cortical neurons // *J. Neuroscience.* 2001. V. 21. № 22. P. 8782–8788.

2. Marom S., Shahaf G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy // *Q. Rev. Biophys.* 2002. V. 35. № 1. P. 63–87.

3. Li Y. et al. Characterization of synchronized bursts in cultured hippocampal neuronal networks with learning training on microelectrode arrays // *J. Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. № 12. P. 2976–2982.

4. Le Feber J., Stegenga J., Rutten W.L.C. The effect of slow electrical stimuli to achieve learning in cultured networks of rat cortical neurons // *PLoS ONE.* 2010. V. 5. № 1. P. e8871.

5. Wagenaar D.A., Pine J., Potter S.M. Searching for plasticity in dissociated cortical cultures on multi-

electrode arrays // *J. Negat. Results Biomed.* 2006. V. 5. P. 16.

6. Demarse T.B., Wagenaar D.A., Blau A.W. et al. The Neurally Controlled Animat: Biological Brains Acting with Simulated Bodies // *Auton. robot.* 2001. V. 11. № 3. P. 305–310.

7. Shahaf G., Eytan D., Gal A., Kermany E. et al. Order-based representation in random networks of cortical neurons // *PLoS Comput. Biol.* 2008. V. 4. № 11. P. e1000228.

8. Bakkum D.J., Gamblen P.M., Ben-Ary G. et al. MEART: The Semi-Living Artist // *Front. Neurobot.* 2007. V. 1. № 5. P. 1–10.

9. Gasser U.E., Hatten M.E. Neuron-glia interactions of rat hippocampal cells *in vitro*: glial-guided neuronal migration and neuronal regulation of glial differentiation // *J. Neuroscience.* 1990. V. 10. № 4. P. 1276–1285.

10. Bartlett W.P., Banker G.A. An electron microscopic study of the development of axon and dendrites

by hippocampal neurons of culture // *J. Neuroscience*. 1984. V. 4. № 8. P. 1954–1965.

11. Grabrucker A., Vaida B., Bockmann J. et al. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture // *Cell Tissue Res*. 2009. V. 338. P. 333–341.

12. Shirokova O.M., Frumkina L.E., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Zakharov Iu.N., Khaspekov L.G., Mukhina I.V. Morfofunktsional'nye zakonomernosti razvitiia neironnykh setei dissotsirovannykh kul'tur gippokampa in vitro // *Sovrem. tekhnol. med*. 2013. T. 5. № 2. S. 6–13.

13. Matteoli M., Verderio C., Krawzeskic K. et al. Mechanisms of synaptogenesis in hippocampal neurons in primary culture // *J. Physiol*. 1995. V. 89. P. 51–55.

14. Rao A., Kim E., Sheng M., Craig A. Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture // *J. Neuroscience*. 1998. V. 18. № 4. P. 1217–1229.

15. Wagenaar D.A., Pine J., Potter S.M. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures // *BMC Neuroscience*. 2006. V. 7. P. 11.

16. Basarsky T.A., Parpura V., Haydon P.G. Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution // *J. Neuroscience*. 1994. V. 14. № 11. P. 6402–6411.

17. Mukhina I.V., Khaspekov L.G. Novaia tekhnologiia v eksperimental'noi neirobiologii: neironnye seti na mul'tielektrudnoi matritse // *Ann. klin. eksperim. nevrologii*. 2010. T. 4. № 2. S. 44–51.

18. Zakharov Y., Ershova A., Golubkin N., Mukhina I. Ion concentration quantification with the help of single-wavelength dye fluorescence // *Applied Optics*. 2012. V. 51. № 10. P. 95–99.

19. Agrba E.A., Mukhina I.V. Prostranstvenno-vremennaia kharakteristika neurosetevoi aktivnosti pervichnykh kul'tur gippokampa // *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2013. Vyp. 4. № 1. S. 139–144.

20. Nikolls D.G., Martin A.R., Vallas B.Dzh., Fuks P.A. Ot neirona k mozgu. M.: Izd-vo LKI, 2008. 672 s.

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

22. Bogolepov N.N., Frumkina L.E., Iakovleva N.I., Koroleva S.K. Vozmozhnye mekhanizmy formirovaniia sinapsov v ontogeneze // *Arkh. anat.* № 5. S. 20–27.

23. Papa M., Bundman C.M., Greenberger V., Segal M. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons // *J. Neuroscience*. 1995. V. 15. № 1. P. 1–11.