

УДК 576.535.5

## ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОСЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГИППОКАМПА

© 2013 г.

Е.А. Азрба,<sup>1,2</sup> И.В. Мухина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия

katerina\_neuron@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.2013

Приведены результаты исследования развития спонтанных пространственно-временных паттернов биоэлектрической активности нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа мышей *in vitro*. С использованием многоэлектродной системы MED64 (*Alpha MED Sciences*, Япония) показана динамика изменения функциональной активности нейронных сетей в виде сетевой пачечной активности на разных этапах развития первичных культур гиппокампа. Выявлено изменение таких параметров сетевой пачечной активности, как длительность пачек, межпачечный интервал, количество и частота спайков в пачке в зависимости от дня развития *in vitro*.

**Ключевые слова:** сетевая электрофизиология, сетевая пачечная активность, нейронная сеть, первичная культура гиппокампа, мультиэлектродная матрица.

### Введение

Одной из активно изучаемых в настоящее время биологических моделей сетевой динамики являются диссоциированные нейронные культуры. Широко распространенным методом изучения сетевой активности в настоящее время является использование многоэлектродных матриц. В мировой практике планарные многоэлектродные системы применяются, в основном, при разработке биосенсоров – систем тестирования действия фармакологических препаратов на процессы передачи сигналов в мозге. В последние годы нейроны, культивируемые на многоэлектродной матрице, привлекают все больший интерес в качестве биологической модели пластичности и обработки информации на сетевом уровне, в частности, обучения [1–4], памяти [5], адаптивного управления [6–8]. Использование культур диссоциированных клеток мозга для искусственного формирования нейронных сетей позволяет изучить клеточные и сетевые механизмы, лежащие в основе процессов обучения и обработки информации нейронными системами. Результаты исследований потенциально могут быть использованы в области создания неклассических вычислительных систем.

Биоэлектрическая активность диссоциированных культур динамична вследствие перемещений тел клеток в пространстве, а также вследствие процессов формирования и разрыва связей между клетками, что необходимо учитывать в исследованиях с биологическими нейронными сетями. Цель настоящего исследова-

ния – изучение динамики биоэлектрической активности в искусственно выращиваемых нейронных сетях гиппокампа в зависимости от времени развития культуры.

### Материалы и методы исследования

Методы исследования включали получение первичной культуры гиппокампа непосредственно на мультиэлектродном зонде, многоканальную регистрацию и последующий анализ активности сетей. В исследовании использовались 11 первичных культур клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных (E18) эмбрионов мышей линии *СВА*. Диссоциирование клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0.25% трипсином (*Invitrogen 25200–056*) в течение 20 минут. Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде *Neurobasal*<sup>TM</sup> (*Invitrogen 21103–049*) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (*Invitrogen 17504–044*), глутамином (*Invitrogen 25030–024*), эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко K055) и культивировали на многоэлектродном зонде системы MED64 (*Alpha Med Sciences*, Япония) в течение 28 дней *in vitro*. Предварительно матрицу стерилизовали УФ-облучением и обрабатывали полиэтиленмином (*Sigma P 3143*), служившим опорным субстратом для клеток. Исходная плотность клеточной культуры на матрице составила 9000 кл./мм<sup>2</sup>. Поддержание жизнеспособности культуры и регистрация активности осуществлялись в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при температуре 35.5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

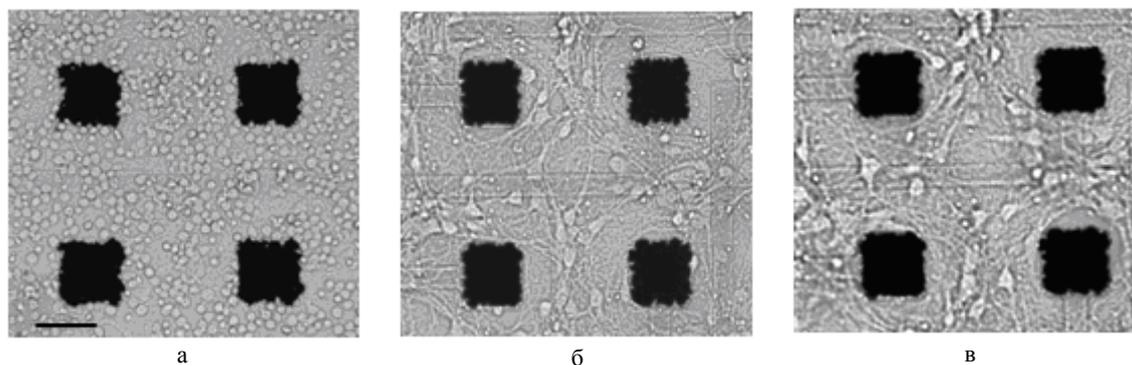


Рис. 1. Клетки гиппокампа в культуре на многоэлектродной матрице системы MED64 (*Alpha MED Sciences*, Япония) через 2 часа (а), 4 дня (б) и 10 дней (в) *in vitro*. Черные квадраты – электроды. Масштаб 50 мкм

### Результаты и их обсуждение

Формирование нейрональной сети происходило в несколько этапов. В результате ферментной и механической обработки гиппокампа большинство клеток утрачивало отростки, округлялось, и в клеточной суспензии, помещенной на многоэлектродную матрицу, можно было видеть лишь тела диссоциированных клеток с крупным круглым ядром и узким ободком цитоплазмы (рис. 1а). Только у отдельных клеток могли сохраняться начальные сегменты отростков. В конце первых суток культивирования большая часть жизнеспособных клеток прикреплялась к субстрату изолированно или небольшими группами (агрегатами).

На третьи–четвертые сутки культивирования у клеток наблюдалось начальное формирование отростков с колбами роста с тонкими подвижными пальцевидными выростами (рис. 1б). В течение первой недели культивирования растущие отростки нервных и глиальных клеток образовывали на поверхности субстрата сложные сплетения. Через 2 недели культивирования в монослойных клеточных культурах практически завершались процессы формирования дифференцированных нервных клеток (рис. 1в).

В начале развития культуры биоэлектрическая активность сети отсутствует. На 3–5 день развития *in vitro* регистрируемая активность представляет собой последовательности спонтанных некоррелированных событий в виде спайков (внеклеточно регистрируемых потенциалов действия) длительностью 1–1.5 мс и амплитудой  $25 \pm 2.4$  мкВ на всех электродах. Также наблюдается появление пачечной активности на одном, двух или трех электродах. Эта пачечная активность характеризуется более короткой длительностью и меньшим количеством импульсов, чем сетевая пачечная активность. Данная активность сети рассматривается как отдельный класс, называемый крошечной пачеч-

ной активностью. Крошечные пачки регистрируются менее чем на 5-ти электродах. Такие пачки не учитываются в последующем анализе.

Появление сравнительно редких некоррелированных между собой спонтанных спайков вызвано различными шумовыми возмущениями. Несмотря на случайность возникновения спайков, их генерация носит пороговый характер и возникает только на определенном этапе развития культуры. Сетевой механизм возникновения спонтанной активности связан с развитием клеток (в частности, рост дендритов и аксона). Несмотря на отсутствие на данном этапе синапсов, это приводит к увеличению эффективной площади, с которой клетка может получать сигналы, в частности, внеклеточные шумовые возмущения. Интеграция таких возмущений на определенном этапе приводит к возможности генерации спонтанных потенциалов действия и, как следствие, регистрации спайков.

Дальнейшее развитие культуры гиппокампа характеризуется формированием устойчивых (стабильных во времени) межнейронных связей и появлением сетевой пачечной активности. Пачки состоят из последовательностей спайков, возникающих на различных электродах и состоящих из нескольких спайков со сравнительно коротким интервалом следования (1–50 мс). Характерный интервал следования сетевых пачек составляет 5–20 секунд (рис. 2).

Появление сетевой пачечной активности обусловлено развитием синаптических контактов (установлением локальных синаптических связей с ближайшими соседними нейронами) и является индикатором формирования сети. Высокая плотность клеток способствует развитию более тесной структуры связей на каждую клетку и, как следствие, ведет к возможности ранней генерации спонтанной сетевой пачечной активности.

Последовательности спайков внутри сетевой пачки можно объяснить передачей возбуждения

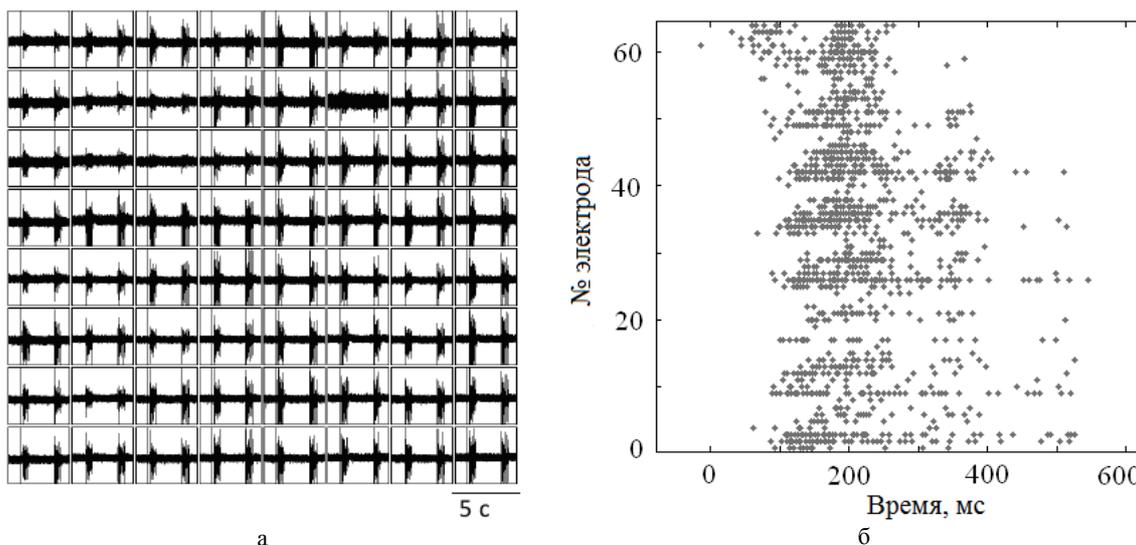


Рис. 2. Активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа мышинных эмбрионов, 9-й день *in vitro*: а – спонтанная сетевая пачечная активность нейронов, регистрируемая одновременно со всех 64-х микроэлектродов в культуре клеток гиппокампа на зонде системы MED64 (*Alpha MED Sciences*, Япония), б – растровая диаграмма сетевой пачечной активности. Моменты возникновения потенциалов действия отмечены точками

между элементами сформированной в культуре нейронной сети, что приводит к возникновению коррелированных спайков в различных ее участках. Следует отметить, что спайковые паттерны в пределах отдельной пачки разрядов являются в некотором смысле «самоподдерживающимися». Возбуждение может циркулировать по нейронным цепям сети без специфического воздействия извне, что приводит к периодическому повторению паттернов. Этот факт свидетельствует о наличии в сети активных межнейронных взаимодействий.

Функциональной важностью такой активности является то, что пачечные активности увеличивают надежность коммуникации между нейронами. Считается, что если спайки вызывают синаптическую передачу, то суммарный постсинаптический потенциал больше, когда межспайковый интервал в пачечной активности меньше. Пачечная активность может быть вызвана большим синаптическим входом медиатора, который вызывает у нейрона повторный запуск потенциала действия.

Пачечная активность диссоциированных культур гиппокампа сохраняется на протяжении всего времени жизни культуры, но пространственно-временная структура в процессе развития изменяется. С возрастом культуры отмечается усложнение паттерна активности и появление устойчивости «рисунка» пачки, что характеризует этапы становления зрелой нейронной сети с максимально возможным числом синапсов в отсутствие афферентации от внешних сигналов. Различные примеры структуры сетевой пачечной активности в культуре приведены на рис. 3.

К началу второй недели происходит формирование пачечной активности с варьирующей частотой следования пачек (рис. 3в). Такая активность сохраняется до конца второй недели развития (рис. 3г, 3д). Дальнейшее развитие характеризуется временным распределением пачек (межкластерный интервал в 10 раз больше, чем интервал между последовательностями внутри кластера), которые называются суперпачками. Длительные регулярные суперпачки сохраняются до 17 дня *in vitro* (рис. 3е). Следующий этап развития – появление активности в виде регулярных пачек с переменным (рис. 3ж), а в дальнейшем фиксированным количеством импульсов (рис. 3з, 3и), что является заключительной стадией формирования активности сети.

По результатам экспериментов был проведен статистический анализ данных, полученных с 11 культур. В ходе анализа было выявлено изменение таких параметров сетевой пачечной активности, как длительность пачек, межпачечный интервал, количество и частота спайков в пачке. На рис. 4 приведены зависимости медиан данных параметров от дня развития *in vitro*.

Межпачечный интервал начинает расти от начала формирования пачечной активности и к 7 дню развития *in vitro* достигает максимума, в дальнейшем наблюдается снижение до 12 дня, после чего происходит повторный рост данного показателя к 18 дню с выходом на стационарный уровень к концу четвертой недели развития *in vitro*. Количество импульсов в сетевой пачке возрастает к 14 дню развития *in vitro* и в дальнейшем не снижается. На 14 день наблюдается

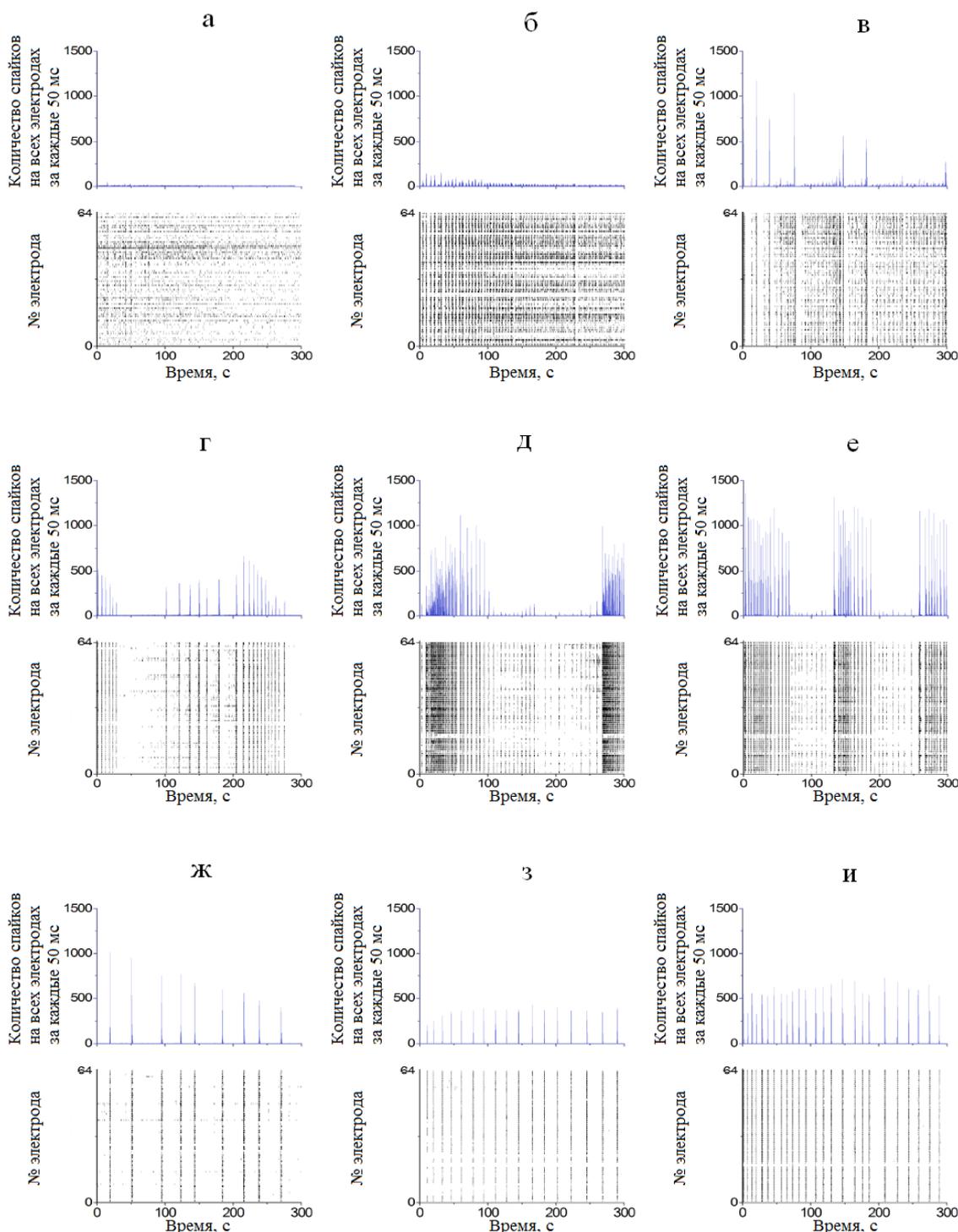


Рис. 3. Типичные растровые диаграммы спонтанной сетевой пачечной активности первичной культуры гиппокампа в процессе развития на 5 DIV (а), 7 DIV (б), 9 DIV (в), 11 DIV (г), 14 DIV (д), 17 DIV (е), 21 DIV (ж), 25 DIV (з) и 28 DIV (и). DIV – день развития *in vitro*

пик синаптогенеза по числу постсинаптических утолщений [9].

Длительность сетевых пачек в процессе развития культур оставалась постоянной до конца третьей недели развития и была около 0.15 с, а после возросла до 0.4 с. Вероятно это обусловлено резким увеличением числа шипиков в течение третьей недели развития [10].

Во временной динамике изменения частоты следования спаек в сетевой пачке можно выделить участок увеличения частоты импульсов до 18 дня *in vitro* ( $2406.67 \pm 433.33$  Гц). В дальнейшем наблюдается снижение частоты импульсов в сетевой пачке до  $491.43 \pm 47.43$  Гц (27 день *in vitro*), что связано с гибелью клеток. Это также согласуется с результатами работы [11],

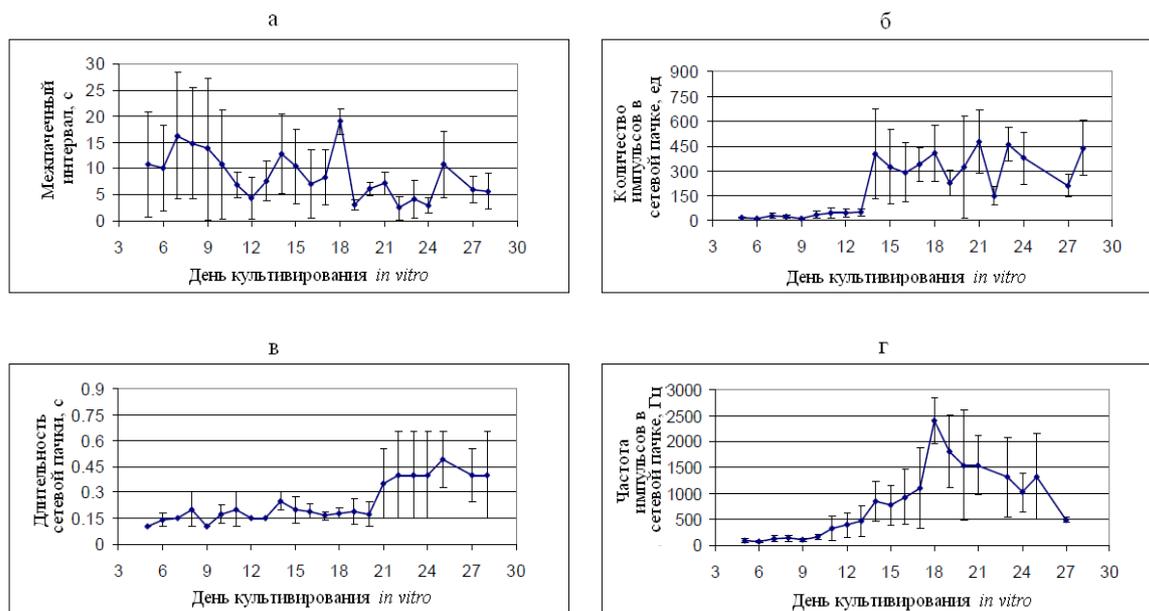


Рис. 4. Динамика изменения межпачечного интервала (а), количества импульсов в пачке (б), длительности пачки (в) и частоты импульсов в пачке (г) в процессе развития диссоциированных культур гиппокампа. Данные представлены в формате  $M_e \pm m_e$ , где  $M_e$  – медиана,  $m_e$  – отклонение медианы

где показано, что среднее количество синапсов увеличивается в течение 2 недели развития и достигает максимума к 3 неделе развития *in vitro*, после чего оно стабилизируется в условиях отсутствия дополнительной афферентации на более низком значении.

Изменяющийся рисунок сетевой пачечной активности связан с ростом числа и сложности синаптических контактов, увеличением шипиковых и перфорированных синапсов [12]. Вариабельное изменение показателей биоэлектрической активности (длительности пачек, межпачечного интервала, количества и частоты спайков в пачке) соответствует критическим временам, связанным с изменением экспрессии рецепторов, ростом структурных образований, формированием и накоплением внеклеточного матрикса [13, 14] и другими факторами, обуславливающими морфофункциональную зрелость сети. К четвертой неделе развития *in vitro* формируется зрелая сеть со сформированными связями, адаптированными к условиям среды.

### Заключение

Показано, что в процессе развития диссоциированных культур гиппокампа происходит изменение регистрируемой биоэлектрической активности, связанное с формированием единой функциональной системы. Биоэлектрическая активность характеризовалась следующими параметрами: межпачечный интервал, длительность сетевой пачки, количество импульсов в сетевой пачке и частота. Установлено, что меж-

пачечный интервал спадает от 15 с на 7 день регистрации активности до 5–7 с к 19 дню развития *in vitro*. Длительность регистрируемых сетевых пачек сохранялась постоянной в течение первых трех недель развития и составляла 0.15 с. Начиная с 21 дня развития *in vitro* длительность сетевых пачек устанавливалась на уровне 0.4 с. Количество импульсов в пачке возрастает на 14 день наблюдений от 10–50 импульсов в пачке до уровня 300–450 импульсов в пачке и сохраняет значение до конца наблюдений. Частота следования импульсов в сетевой пачке нарастает от начала эксперимента и к 18 дню достигает максимального значения в 2406.67 Гц, после чего наблюдается ее снижение. Полученные в ходе экспериментов данные важны для исследования возможности управления нейросетевой активностью с целью создания гибких (настраиваемых) функциональных систем, а также могут быть использованы для разработки новых моделей и алгоритмов искусственных нейронных сетей. Разработанные методы и технологии мониторинга активности в культурах нейронов являются первым и необходимым шагом для создания технологий сопряжения клеточной активности с электронными системами в адаптивных системах управления.

*Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и федеральными целевыми программами Министерства образования и науки Российской Федерации (госконтракты № 8055, № 14.В37.21.1073, № 14.В37.21.1203).*

## 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 // *Quarterly reviews of biophysics*. 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 // *Biosensors & bioelectronics*. 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. negative results in biomedicine*. 2006. V. 5. P. 16.
6. Demarse T.B. et al. The neurally controlled animat: biological brains acting with simulated bodies // *Autonomous robots*. 2001. V. 11. № 3. P. 305–310.
7. Shahaf G. et al. Order-based representation in random networks of cortical neurons // *PLoS computational biology*. 2008. V. 4. № 11. P. e1000228.
8. Bakkum D.J. et al. MEART: The semi-living artist // *Frontiers in neurorobotics*. 2007. V. 1. P. 5.
9. Papa M. et al. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. // *J. Neuroscience*. 1995. V. 15. № 1. P. 1–11.
10. Crain B. et al. A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat // *Brain research*. 1973. V. 63. P. 195–204.
11. Van Huizen F., Romijn H.J., Habets A.M. Synaptogenesis in rat cerebral cortex cultures is affected during chronic blockade of spontaneous bioelectric activity by tetrodotoxin // *Brain research*. 1985. V. 19. № 1. P. 67–80.
12. Bartlett W.P., Banker G.A. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships // *J. Neuroscience*. 1984. V. 4. № 8. P. 1954–1965.
13. Wang H. et al. Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth // *J. cell science*. 2008. V. 121. № 18. P. 3083–3091.
14. Gu W.-L. et al. Chondroitin sulfate proteoglycans regulate the growth, differentiation and migration of multipotent neural precursor cells through the integrin signaling pathway // *BMC neuroscience*. 2009. V. 10. P. 128.

**SPATIO-TEMPORAL CHARACTERISTICS OF NEURONAL NETWORK ACTIVITY  
OF PRIMARY HIPPOCAMPAL CULTURES**

*E.A. Agrba, I.V. Mukhina*

The article presents the research results on spatio-temporal patterns of spontaneous bioelectrical activity in neural networks of dissociated mouse hippocampal cultures *in vitro*. The neural network functional activity dynamics in the form of the network bursting activity at different developmental stages of primary hippocampal cultures is shown using the multi-electrode array system MED64 (Alpha MED Sciences, Japan). The changes of such network bursting activity parameters as burst duration, interburst interval, number and frequency of spikes in a burst during network development *in vitro* were observed.

*Keywords:* network electrophysiology, network bursting activity, neural network, primary hippocampal culture, multielectrode array.