

# МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ В ДИССОЦИИРОВАННЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ГИППОКАМПА

УДК 57.085.23

Поступила 20.03.2013 г.



**О.М. Широкова**, аспирант кафедры нейродинамики и нейробиологии<sup>1</sup>;

**Л.Е. Фрумкина**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктуры и цитохимии мозга  
Отдела исследований мозга<sup>2</sup>;

**М.В. Ведунова**, к.б.н., старший научный сотрудник проблемной научной группы клеточных технологий НИИ ПФМ<sup>3</sup>;

**Е.В. Митрошина**, младший научный сотрудник проблемной научной группы клеточных технологий НИИ ПФМ<sup>3</sup>;

**Ю.Н. Захаров**, к.ф.-м.н., доцент кафедры общей физики<sup>1</sup>;

**Л.Г. Хаспексов**, д.б.н., зав. лабораторией экспериментальной нейрцитологии Отдела исследований мозга<sup>2</sup>;

**И.В. Мухина**, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ НИИ ПФМ<sup>3</sup>; зав. кафедрой нормальной физиологии<sup>3</sup>;

профессор кафедры нейродинамики и нейробиологии<sup>1</sup>, сотрудник лаборатории по исследованию матрикса мозга<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

<sup>2</sup>Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, Москва, 125367, Волоколамское шоссе, д. 80;

<sup>3</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

**Цель исследования** — изучение закономерностей морфофункционального развития нейронных сетей, формируемых длительно культивируемыми клетками гиппокампа.

**Материалы и методы.** Методом электронной микроскопии исследованы ультраструктурные характеристики развивающихся межклеточных контактов в нейронной сети, формируемой культивируемыми клетками гиппокампа 18-дневных эмбрионов мыши, в сопоставлении с динамикой функциональной сетевой активности нейронов, оцениваемой по параметрам мультিকлеточного флюоресцентного  $Ca^{2+}$ -имиджинга. Параллельно иммуноцитохимическим методом определяли изменения количественного соотношения и взаиморасположения культивируемых нейронов и глиальных клеток.

**Результаты.** В первичной диссоциированной культуре клеток гиппокампа к 3–4-й неделе *in vitro* происходит постепенное формирование зрелых синаптических контактов, что коррелирует с усложнением  $Ca^{2+}$ -активности нейронов сети. К этому времени отдельные нейроны располагаются равномерным монослоем в окружении многочисленных глиальных клеток. Полученные данные отражают морфофункциональные закономерности различных этапов развития культуры как биологической модели онтогенеза нейронных сетей *in vitro*.

**Ключевые слова:** первичные диссоциированные культуры гиппокампа; нейронные сети; синаптогенез; электронная микроскопия;  $Ca^{2+}$ -имиджинг.

## English

### Morphofunctional Patterns of Neuronal Networks Developing in Dissociated Hippocampal Cell Cultures

**O.M. Shirokova**, Postgraduate, the Department of Neurodynamics and Neurobiology<sup>1</sup>;

**L.E. Frumkina**, PhD, Leading Research Worker, Laboratory of Brain Ultrastructure and Cytochemistry,  
Brain Research Department<sup>2</sup>;

Для контактов: Широкова Олеся Михайловна, тел. моб. +7 920-054-51-52; e-mail: shirokovaom@gmail.com

**M.V. Vedunova**, PhD, Senior Research Worker, the Scientific Problem Group of Cell Technologies, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>3</sup>;

**E.V. Mitroshina**, Junior Research Worker, the Scientific Problem Group of Cell Technologies, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>3</sup>;

**Y.N. Zakharov**, PhD, Associate Professor, the Department of General Physics<sup>1</sup>;

**L.G. Khaspekov**, D.Bio.Sc., Head of Laboratory of Experimental Neurocytology, Brain Research Department<sup>2</sup>;

**I.V. Mukhina**, D.Bio.Sc., Professor, Head of Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>3</sup>; Head of the Department of Normal Physiology<sup>3</sup>; Professor of the Department of Neurodynamics and Neurobiology<sup>1</sup>; Researcher of the Brain Matrix Research Laboratory<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

<sup>2</sup>Scientific Centre of Neurology of Russian Academy of Medical Sciences, Volokolamskoye Road, 80, Moscow, Russian Federation, 125367;

<sup>3</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005

**The aim of investigation** was to study the morphofunctional patterns of neuronal network developing in primary long-term hippocampal cell cultures.

**Materials and Methods.** The ultrastructural features of developing intercellular contacts in neuronal network formed by cultured hippocampal cells of 18 day-old mouse embryos were studied. The sequence of ultrastructural development of these contacts was compared with dynamics of functional network neuronal activity estimated by parameters of multicellular fluorescent Ca<sup>2+</sup>-imaging. At the same time the changes of quantitative interrelation and positional relationship of neurons and glial cells were immunocytochemically determined.

**Results.** In primary hippocampal cell culture at 3th–4st weeks *in vitro* the gradual formation of mature synaptic contacts correlates with appearance of complex Ca<sup>2+</sup> neuronal network activity. In this period individual neurons forms a uniform monolayer distributed among numerous glial cells. Thus the results obtained reflect morphofunctional patterns of different stages of cultural development as a biological model of neuronal network ontogenesis.

**Key words:** primary dissociated hippocampal cultures; neuronal networks; synaptogenesis; electron microscopy; Ca<sup>2+</sup>-imaging.

Формирование нейронных сетей — одно из проявлений пластичности развивающейся нервной системы в норме и патологии, поэтому вопрос морфофункционального развития головного мозга является центральным как в нейробиологии, так и в медицине. Нарушение межклеточных контактов в онтогенезе приводит впоследствии к развитию патологических нейронных сетей, лежащих в основе изменения психических функций мозга, формирования эпилепсии и многих других заболеваний центральной нервной системы.

Для исследования различных аспектов функционирования и строения головного мозга существует ряд биологических моделей: поведенческие модели *in vivo*, переживающие срезы мозга, культуры ткани и диссоциированных клеток различных структур ЦНС и т.д. Одной из наиболее адекватных моделей для исследования закономерностей межклеточных взаимодействий и формирования нормальных и/или патологических межнейронных и нейроглиальных связей в процессе их развития являются первичные диссоциированные культуры, в которых процессы жизнедеятельности нейронов и глиальных клеток становятся доступными для наблюдения и манипуляций. Кроме того, при низкой клеточной плотности культур исследование локализации и миграции различных клеток в процессе развития нейронных сетей упрощается. Наконец, данная модель позволяет проводить хронические эксперименты в течение длительного времени (до года и более) [1, 2].

В настоящее время хорошо изучены особенности развития культур клеток гиппокампа: морфологические изменения клеточных элементов [3–5], синаптогенез [6, 7], динамика экспрессии определенных типов

рецепторов [8], изменение характера электрической активности [9]. Однако, поскольку комплексные исследования морфофункционального состояния клеток эмбрионального гиппокампа в процессе их длительного культивирования не проводились, характер корреляции ультраструктурных изменений формирующихся межнейронных связей с динамикой их функциональной активности остается неясным.

**Цель исследования** — изучение закономерностей морфофункционального развития диссоциированных клеток эмбрионального гиппокампа при длительном культивировании.

**Материалы и методы.** Развитие нейронных сетей в процессе культивирования оценивалось по функциональным характеристикам Ca<sup>2+</sup>-имиджинга, клеточному составу формирующейся нейроглиальной сети и ультраструктуре межклеточных контактов.

**Диссоциированные культуры гиппокампа.**

Объектом исследования служили диссоциированные культуры клеток гиппокампа 18-дневных эмбрионов мышей линии СВА. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, указанным в приказе Минздрава России от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Гиппокамп механически измельчали, после чего обрабатывали 0,25% трипсином (Invitrogen, США). Для приготовления культур суспензию клеток, полученную путем ферментативной и механической диссоциации, наносили на покрытые опорным субстратом (полиэтиленимином, Sigma, США) покровные стекла (по 40 мкл суспензии на стекло), помещенные в чашки Петри диаметром

35 мм. В каждую чашку вносили по 1 мл нейробазальной среды Neurobasal™ (Invitrogen), содержащей 2% биоактивной добавки B27 (Invitrogen), 2 mM L-глутамин (Invitrogen) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия). Через сутки для дальнейшего культивирования использовали среду с меньшим содержанием сыворотки (0,5%). Смену среды проводили через день. Культуры содержали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 95% воздуха), при температуре 35,5°C. В экспериментах использовали культуры на 5, 7, 10, 14, 21 и 30-й день *in vitro* (DIV).

**Кальциевый имиджинг.** Мониторинг функциональной активности осуществляли путем измерения динамики концентрации внутриклеточного кальция ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) с использованием специфического флуоресцентного кальциевого красителя Oregon Green BAPTA-1 AM (Invitrogen) и конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 510 (Германия). Регистрацию изменения интенсивности флуоресценции красителя в ответ на повышение [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> осуществляли при частоте смены кадров 4 с<sup>-1</sup>. По полученным сериям изображений строили графики временной зависимости интенсивности флуоресценции для каждой клетки в поле зрения (рис. 1), определяли частоту и длительность Ca<sup>2+</sup>-осцилляций, а также число спонтанно осциллирующих клеток. По форме Ca<sup>2+</sup>-осцилляций с помощью программного обеспечения, реализованного на базе MATLAB, выявляли природу осциллирующих клеток, что позволяло в дальнейшем анализировать динамику [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> только в нейронах.

**Иммуноцитохимия.** Для цитологической характеристики и определения качественного и количественного клеточного состава культур их фиксировали в ледяном метиловом спирте и иммуноцитохимически маркировали глию глиальным фибриллярным кислым белком (GFAP), а нейроны — ядерным белком NeuN (Invitrogen). Первичные антитела (Abcam) с GFAP визуализировали с помощью вторичных антикуриновых антител, связанных с флуоресцентным маркером Cy5 (Millipor, США) (максимальное значение коэффици-

ента поглощения — на длине волны 650 нм, излучения — 670 нм). Для визуализации первичных антител к ядерному белку NeuN использовали вторичные антимышиные антитела с флуоресцентным маркером Alexa 430 (Invitrogen) (максимальное значение коэффициента поглощения — на длине волны 434 нм, излучения — 539 нм). Исследования проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510. Коэффициент соотношения нейронов и глии рассчитывали как отношение количества нейронов к проценту площади, занимаемой глиальными клетками. Значения представлены в усл. ед. в расчете на мм<sup>2</sup>.

**Электронная микроскопия.** Для ультраструктурных исследований культуры последовательно фиксировали в глutarовом альдегиде (2,5%) на фосфатном буфере (pH=7,4) и в четырехокиси осмия (1%), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, обрабатывали смесью 100% этилового спирта с ЭПОН-812 без катализатора (1:1) в течение 1 ч, заключали в ЭПОН-812 без катализатора на 10 ч и, наконец, в ЭПОН-812 с катализатором (42,7% ЭПОН-812, 43,2% DDSA, 14,2% MNA, 2% DMP). Ультратонкие срезы готовили на ультратоме ULTRACUT (Reichert-Jung, Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Morgagni 268D (FIE, Нидерланды).

**Методы статистики.** Полученные данные изменения флуоресценции красителя Oregon Green BAPTA-1 AM, отражающие динамику [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (частоту и длительность Ca<sup>2+</sup>-осцилляций), выражали в виде среднего (M) ± стандартная ошибка среднего (m). Достоверность статистических различий выборок определяли с помощью непараметрического теста Манна-Уитни, статистически значимыми считали различия выборок при p<0,05.

**Результаты.** Иммуноцитохимическое исследование выявило изменения во взаимном расположении и количественном соотношении нейронов и глиальных клеток в процессе развития культур. На 5-й день *in vitro* в толще монослоя нейронов идентифицировались немногочисленные дифференцированные глиальные клетки с

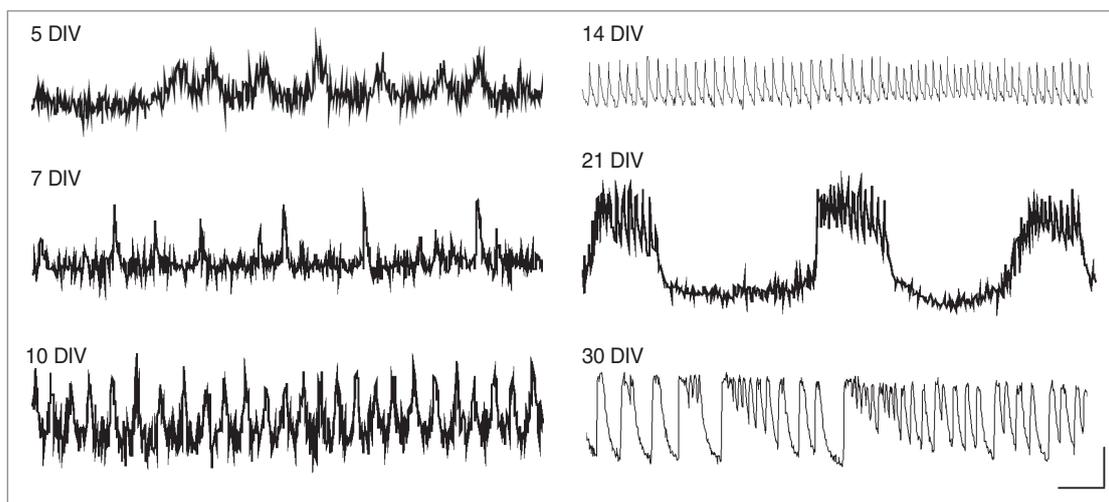


Рис. 1. Графики изменения абсолютной интенсивности флуоресценции Oregon Green BAPTA-1 AM во времени на разных стадиях развития; масштаб по горизонтали — 20 с, по вертикали — 20 усл. ед.

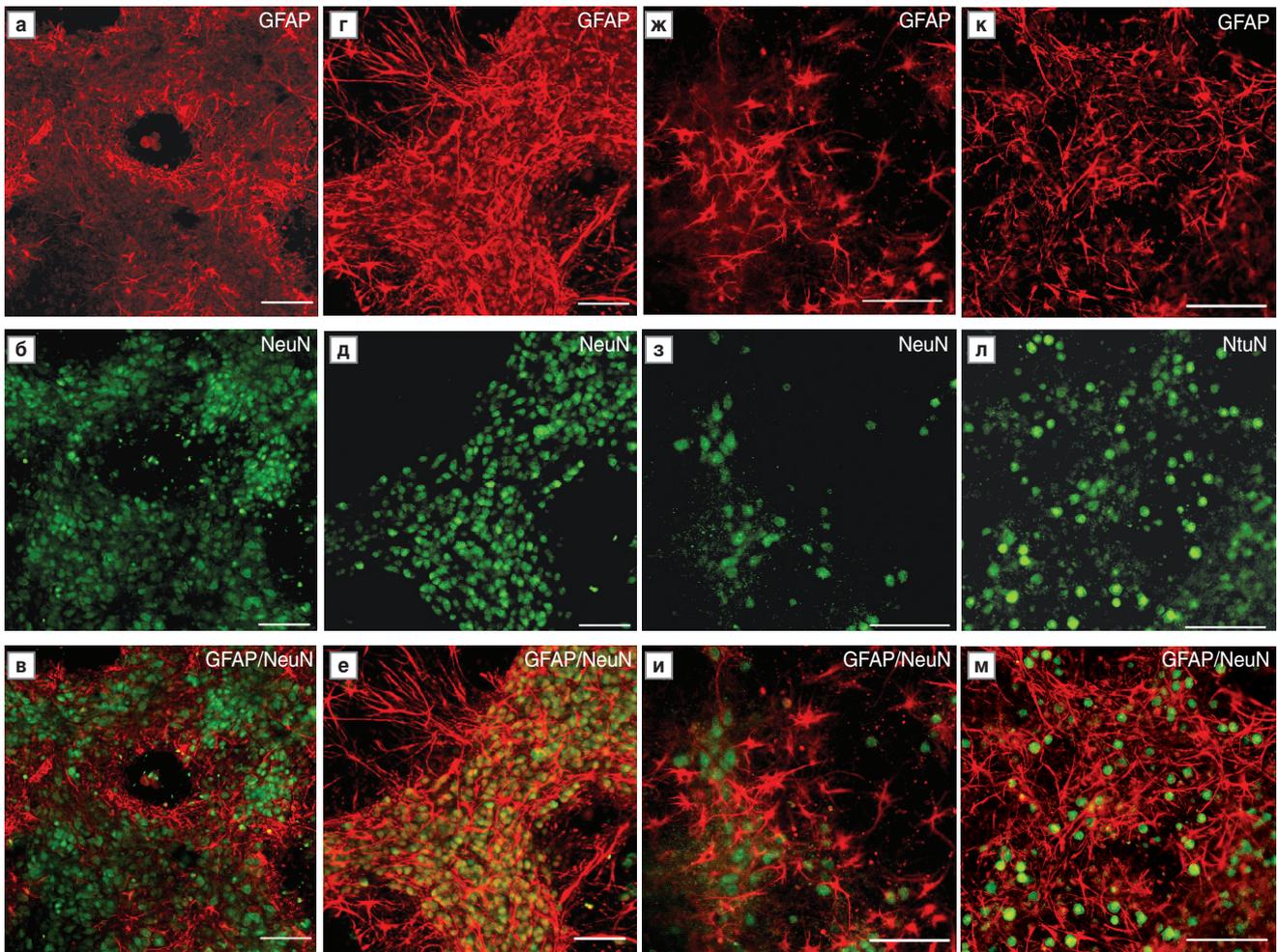
простой формой отростков (рис. 2, а–в). К 10-му дню нейроны уже не образовывали сплошной монослой, а распределялись среди множества глиальных элементов с более сложной формой отростков (рис. 2, г–е). На 14-й и 21-й день в культурах преобладали глиальные клетки, а отдельные нейроны располагались равномерно редким монослоем (рис. 2, ж–м).

Первые  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляции, отражающие изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , были зарегистрированы уже на 5-й DIV, но только в 1% нейронов (рис. 3, в), и характеризовались низкой частотой ( $0,012 \pm 0,003$  Гц) и большой длительностью ( $12,00 \pm 1,64$  с) (рис. 3, а, б). На 7–10-й день частота осцилляций незначительно возрастала (до  $0,030 \pm 0,007$  Гц), а их длительность снижалась (до  $8,00 \pm 0,55$  с). Для 14-го DIV было характерно резкое уменьшение длительности осцилляций (до  $3,7 \pm 0,2$  с) и увеличение их частоты (до  $0,14 \pm 0,03$  Гц), а число нейронов, в которых наблюдались спонтанные осцилляции, повышалось до 54% (рис. 3, а, б, в). На 21-й DIV  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляции по длительности и частоте статистически не отличались от 14-го DIV (рис. 3, а, б), однако их рисунок изменялся: среди возникающих спонтанно одиночных изменений  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  с частотой  $0,17 \pm 0,02$  Гц и дли-

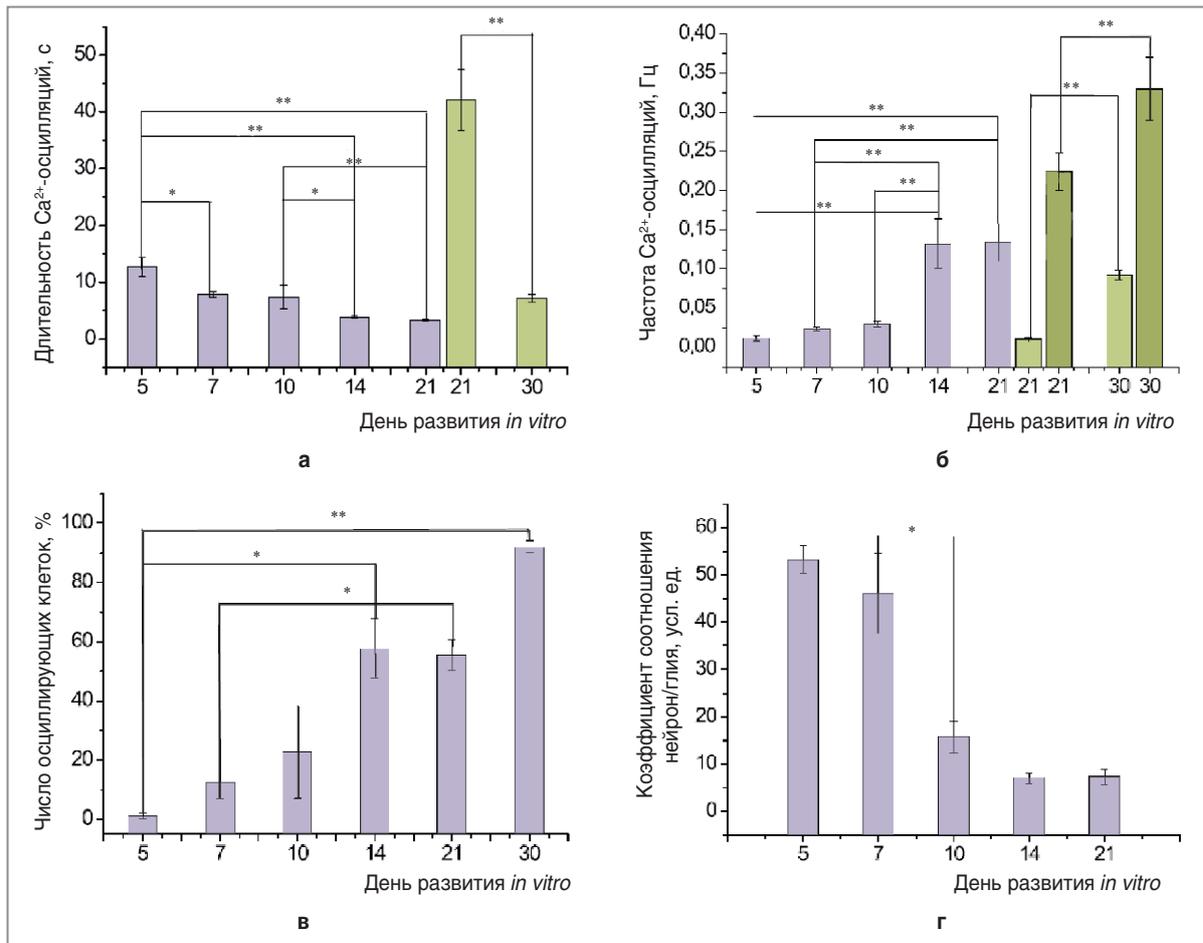
тельностью  $3,40 \pm 0,17$  с появлялись «суперосцилляции» длительностью  $42,00 \pm 5,36$  с и частотой  $0,010 \pm 0,003$  Гц, состоящие из большого числа одиночных осцилляций с частотой  $0,20 \pm 0,02$  Гц.

К 30-му дню обнаруживались только «суперосцилляции», отличавшиеся по своему паттерну от наблюдаемого на 21-й DIV: их длительность снижалась до  $7,00 \pm 0,65$  с, а частота повышалась до  $0,090 \pm 0,006$  Гц наряду с повышением частоты одиночных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов в составе «суперосцилляций» до  $0,32 \pm 0,04$  Гц. Кроме того, общее число активных нейронов на 30-й DIV возрастало до 92%.

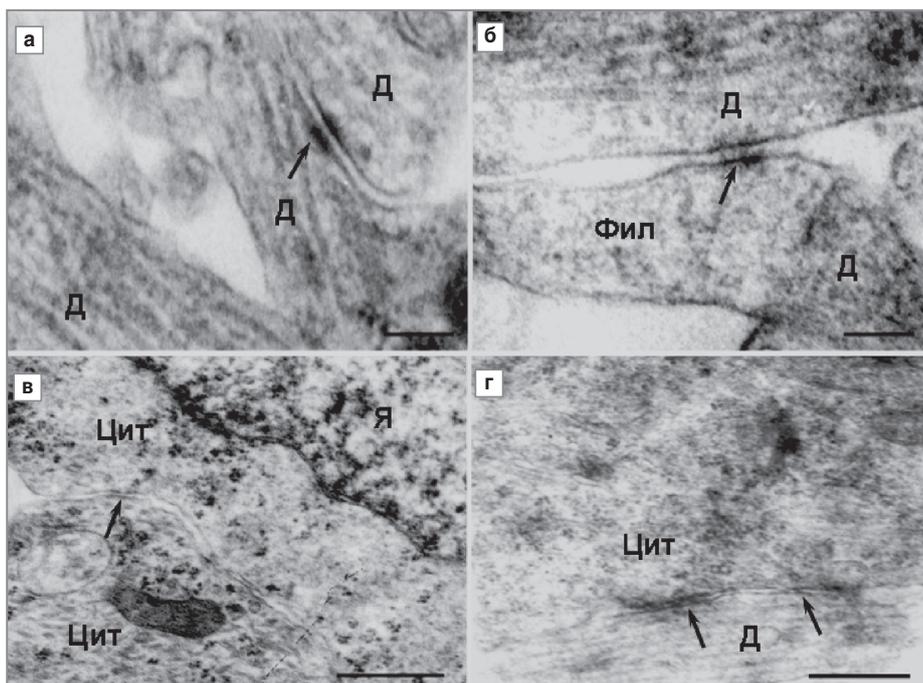
Ультраструктурный анализ культур на 5-й DIV выявил в нейропиле вакантные постсинаптические уплотнения и преобладание незрелых (десмосомовидных, щелевидных и симметричных) авезикулярных соединений, формирующих нетипичные для зрелого мозга денродендритные (рис. 4, а, б), соматосоматические (рис. 4, в) и соматодендритные (рис. 4, г) контакты, способные в этот период развития синапсов проводить электрические сигналы. На 7-й DIV десмосомы, локализованные на одном протяжении с симметричным или асимметричным соединением, формировали сме-



**Рис. 2.** Флюоресцентные изображения диссоциированных культур гиппокампа на 5-й (а, б, в), 10-й (г, д, е), 14-й (ж, з, и) и 21-й (к, л, м) день развития *in vitro*. Глиальные клетки маркируются первичными антителами к GFAP (а, г, ж, к), ядра нейронов — антителами к ядерному белку NeuN (б, д, з, л); масштаб — 50 мкм



**Рис. 3.** Графики зависимости длительности (а) и частоты (б) на разных временных этапах развития гиппокампальных культур *in vitro*: сиреневый цвет — среднее значение для осцилляций, светло-зеленый — для суперосцилляций, темно-зеленый — для осцилляций внутри «суперосцилляций»; в — число работающих клеток и г — коэффициент соотношения нейрон/глия на разных временных интервалах развития плотных гиппокампальных культур *in vitro*; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,001$

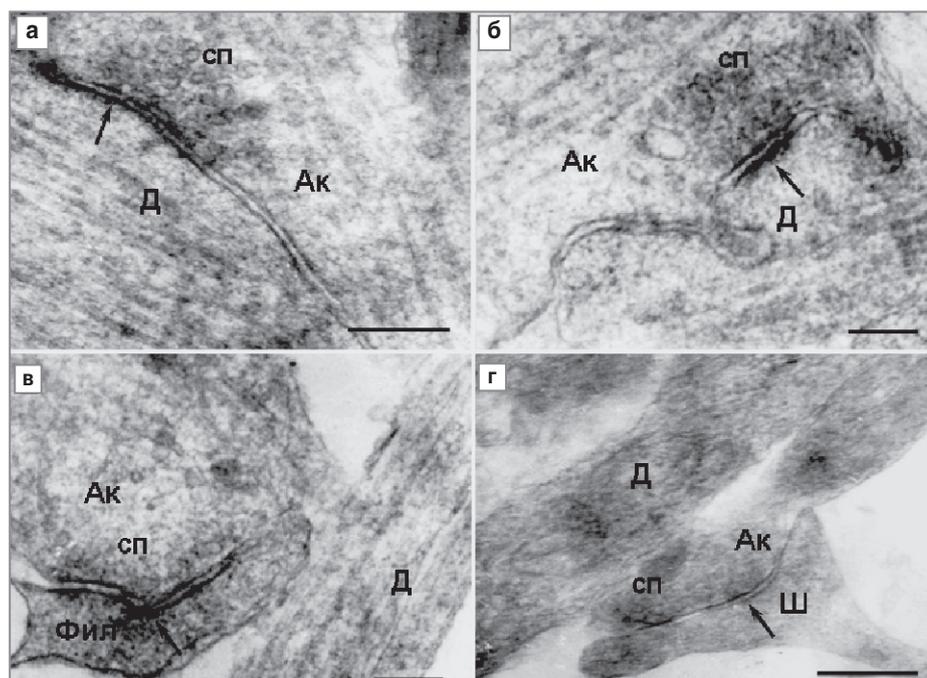


**Рис. 4.** Электронограммы десмосомовидных денродендритных (а, б), соматосоматических (в) и соматодендритных (г) авезикулярных контактов (показаны стрелками). 5 DIV. Масштаб — 1 мкм. Здесь и далее: Ак — аксон; Д — дендрит; Фил — филоподия; Цит — цитоплазма; Ш — шипик; ша — шипиковый аппарат; Я — ядро; сп — синаптические пузырьки

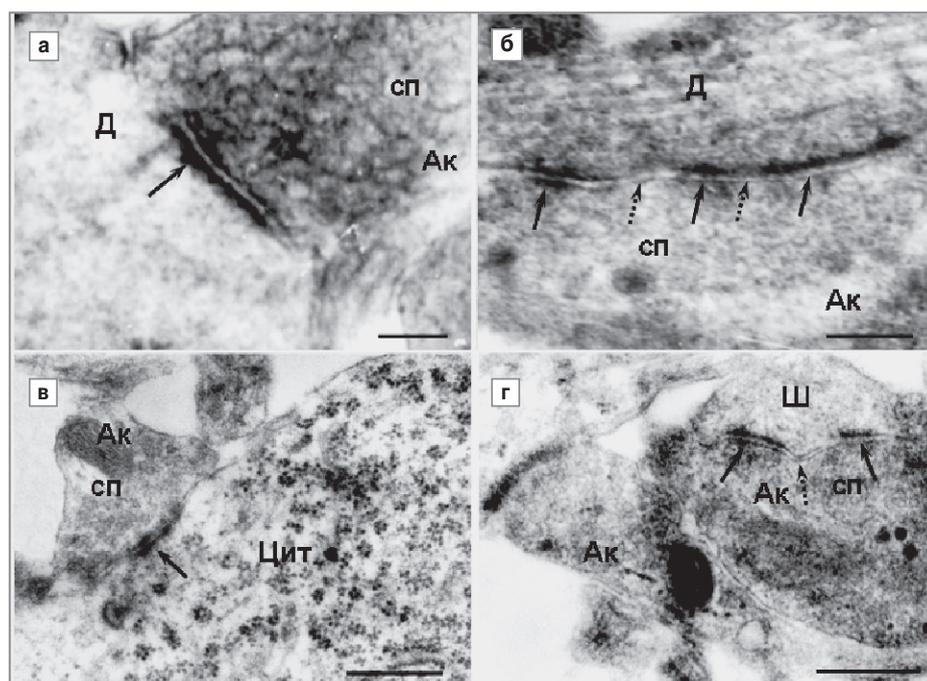
шанные контакты (рис. 5), представляющие собой промежуточную стадию развития химического синапса. Первые зрелые химические синапсы в этот период развития культур были как асимметричными аксодендритными (рис. 5, б), так и симметричными, в том числе аксошиповыми (рис. 5, г), в которых пресинаптические терминалы содержали многочисленные синаптические пузырьки. Через 2 нед культивирования в нейропиле еще присутствовали смешанные контакты (рис. 6, а), но появлялись типичные симметричные (тормозные) аксосоматические (рис. 6, в) и многочисленные асимметричные (возбуждающие) зрелые синапсы, основную

популяцию которых составляли аксошиповые контакты (рис. 6, г). Кроме того, начинали формироваться перфорированные синапсы (рис. 6, б, г), которые могут повышать эффективность нейротрансмиссии. С 21-го по 30-й DIV обнаруживались сложно организованные перфорированные, дивергентные и конвергентные контакты (рис. 7, в, г), а в шипиках — элементы шипикового аппарата (рис. 7, а, б, г).

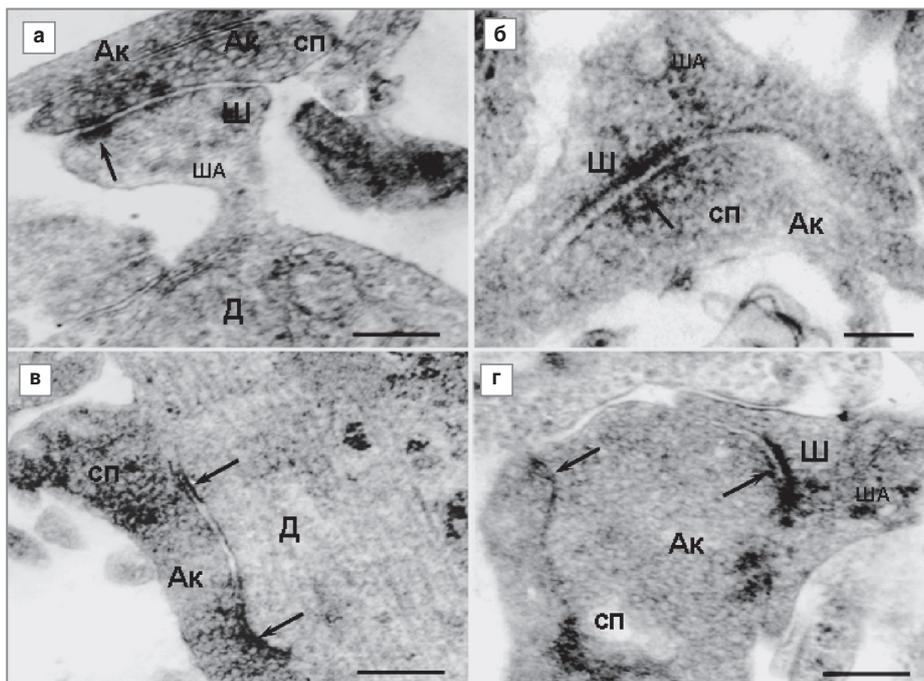
Необходимо подчеркнуть, что в течение первых трех недель культивирования количество межнейронных контактов в нейропиле, содержащих сформированные постсинаптические уплотнения, посте-



**Рис. 5.** Электронограммы смешанных аксодендритных (а, в), асимметричного аксодендритного (б) и симметричного аксошипового (г) везикулярных синаптических контактов (показаны стрелками). 7 DIV. Масштаб — 1 мкм



**Рис. 6.** Электронограммы смешанных аксодендритного (а) и аксосоматического (в), перфорированных аксодендритного (б) и аксошипового (г) синапсов (сплошные стрелки). Пунктирные стрелки — перфорации. 14 DIV. Масштаб — 1 мкм



**Рис. 7.** Электронограммы аксошиповых (а, б, г) и перфорированного аксодендритного (в) синапсов (показаны стрелками). На г показан сложноорганизованный дивергентный синапс. 21-й (а), 25-й (в, г), 30-й (б) день *in vitro*. Масштаб — 1 мкм

пенно нарастало, что свидетельствует об усилении процессов морфофункциональной дифференцировки синапсов.

**Обсуждение.** Характерной чертой развития центральной нервной системы позвоночных является первоначальное образование избыточного количества нейронов, часть из которых (больше 50%) погибает в процессе онтогенеза [10]. Такая же закономерность наблюдалась и в развитии клеток эмбрионального гиппокампа *in vitro* (см. рис. 2). В первые дни культивирования множество нейронов формировали несинаптические контакты, которые обеспечивали морфофункциональную стабилизацию нейрональной сети на ранних этапах ее развития. Наличие множества свободных постсинаптических уплотнений подтверждает мнение авторов [11] о готовности постсинаптического сайта мембраны нейронов к формированию зрелого контакта, однако на 5-й DIV сетевая активность практически отсутствовала, поскольку  $Ca^{2+}$ -осцилляции регистрировались всего у 1% нейронов. Повышение  $Ca^{2+}$ -активности на 7-й DIV может быть связано с формированием первых химических синапсов, появление которых отмечалось и другими авторами [5]. Именно в этот период регистрировалась первая пачечная активность в виде случайных спайков и синхронизованных пачек импульсов [12, 13]. На 10-й DIV иммуоцитохимический анализ обнаружил формирование морфологических кластеров, в которых глиальные клетки создавали необходимые условия для функционирования нейронов, что отражалось в повышении количества активных клеток до 20% (см. рис. 3, в). Со 2-й недели культивирования уменьшение длительности  $Ca^{2+}$ -осцилляций и увеличение их частоты совпадало по времени с дальнейшим усложнением ультраструктуры химических синапсов, среди которых преобладали зрелые аксошиповые контак-

ты, способствующие, как полагают, повышению эффективности синаптической передачи [14], о высокой активности которой свидетельствуют заполненные везикулами аксонные терминали. 21-й DIV характеризовался появлением кальциевых «суперосцилляций», сопровождавшимся усложнением биоэлектрической активности нейронной сети в виде формирования суперпачек спайков [8, 15, 16]. Наряду с этим на ультраструктурном уровне происходило практически полное исчезновение незрелых в функциональном отношении контактов, что согласуется во времени с данными по синаптогенезу *in vivo* [4, 17, 18].

Таким образом, полученные нами данные о динамике формирования нейронной сети *in vitro* на морфофункциональном уровне в целом соответствуют общим представлениям об основных стадиях нейрогенеза и свидетельствуют о том, что культура клеток гиппокампа может рассматриваться как адекватная биологическая модель нейронных сетей головного мозга. Со 2-й недели культивирования для нейронов характерна устойчивая синхронная активность, а основную популяцию синапсов составляют зрелые аксодендритные и аксошиповые контакты.

**Заключение.** Диссоциированная культура клеток гиппокампа может рассматриваться как адекватная биологическая модель нейронных сетей головного мозга. Начало исследований зрелых нейронных сетей, формируемых культивируемыми нейронами, следует проводить в срок с 14-го по 21-й день *in vitro*, когда основную популяцию синапсов составляют зрелые аксодендритные и аксошиповые асимметричные контакты. В функциональном отношении культуры на этом этапе развития также характеризуются устойчивой синхронной активностью. Численное соотношение нейронов и глии соответствует соотношению клеток в нативном мозге.

## Литература

1. Potter S.M., DeMarse T.B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods* 2001; 110: 17–24.

2. Kaech S., Banker G. Culturing hippocampal neuron. *Nat Protoc* 2006; 1: 2406–2415.

3. 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 Neurosci* 1990; 10(4): 1276–1285.

4. Bartlett W.P., Banker G.A. An electron microscopic study of the development of axon and dendrites by hippocampal neurons of culture. *J Neurosci* 1984; 4(8): 1954–1965.

5. Grabrucker A., Vaida B., Bockmann J., Boeckers T.M. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture. *Cell Tissue Res* 2009; 338: 333–341.

6. Matteoli M., Verderio C., Krawczeski K., Mundigl O., Coca S., Fumagalli G., De Camillio P. Mechanisms of synaptogenesis in hippocampal neurons in primary culture. *J Physiology* 1995; 89: 51–55.

7. 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 Neurosci* 1998; 18(4): 1217–1229.

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

9. 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 Neurosci* 1994; 14(11): 6402–6411.

10. Николс Д.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. М.; 2008; 672 с.

11. Fletcher T.L., Camilli P., Banker G.A. Synaptogenesis in hippocampal cultures evidence indicating that axons and dendrites become complemented to form synapses by different stages of neuronal development. *J Neurosci* 1994; 14(11): 6695–6706.

12. 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.

13. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., Корягина Е.А. Мультиэлектродные матрицы — новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети. *Соврем технол мед* 2009; 1: 8–15.

14. Carveley R.K.S., Jones D.G. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res Rev* 1990; 15: 215–249.

15. Gritsun T., Stegenga G., Feber J., Rutten W.L.C. Network bursts in cortical neuronal cultures. In: *Proceedings of the 4th International IEEE EMBS conference on neural engineering*. 2009.

16. Симонов А.Ю., Пимашкин А.С., Корягина Е.А., Прокин И.С., Миронов В.И., Кастальский И.А., Савихин С.А., Терентьев А.Б., Иудин Д.И., Мухина И.В., Казанцев В.Б. Эффекты сетевой сигнализации в моделях спонтанно развивающихся нейрональных сетей в диссоциированных культурах клеток мозга. В кн.: *Материалы XIII Всероссийской научно-технической конференции «Нейроинформатика-2011»*. М.: НИЯУ-МИФИ; 2010; 138–184.

17. Боголепов Н.Н., Фрумкина Л.Е., Яковлева Н.И., Королева С.К. Возможные механизмы формирования синапсов в онтогенезе. *Арх анатомии* 1987; 5: 20–27.

18. Pápa M., Bundman C.M., Greenberger V., Segal M. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci* 1995; 15(1): 1–11.

## References

1. Potter S.M., DeMarse T.B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods* 2001; 110: 17–24.

2. Kaech S., Banker G. Culturing hippocampal neuron. *Nat Protoc* 2006; 1: 2406–2415.

3. 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 Neurosci* 1990; 10(4): 1276–1285.

4. Bartlett W.P., Banker G.A. An electron microscopic study of the development of axon and dendrites by hippocampal neurons of culture. *J Neurosci* 1984; 4(8): 1954–1965.

5. Grabrucker A., Vaida B., Bockmann J., Boeckers T.M. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture. *Cell Tissue Res* 2009; 338: 333–341.

6. Matteoli M., Verderio C., Krawczeski K., Mundigl O., Coca S., Fumagalli G., De Camillio P. Mechanisms of synaptogenesis in hippocampal neurons in primary culture. *J Physiology* 1995; 89: 51–55.

7. 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 Neurosci* 1998; 18(4): 1217–1229.

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

9. 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 Neurosci* 1994; 14(11): 6402–6411.

10. Nikolls D.G., Martin A.R., Vallas B.Dzh., Fuks P.A. *Ot neyrona k mozgu* [From Neuron to Brain]. Moscow; 2008; 672 p.

11. Fletcher T.L., Camilli P., Banker G.A. Synaptogenesis in hippocampal cultures evidence indicating that axons and dendrites become complemented to form synapses by different stages of neuronal development. *J Neurosci* 1994; 14(11): 6695–6706.

12. 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.

13. Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Khaspekov L.G., Zakharov Yu.N., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Korotchenko S.A., Koryagina E.A. Mul'tielektroodnye matritsy — novye vozmozhnosti v issledovanii plastichnosti neyronal'noy seti [Multielectrode matrices — new possibilities in investigation of the neuronal network plasticity]. *Sovrem Tehnol Med — Modern Technologies in Medicine* 2009; 1: 8–15.

14. Carveley R.K.S., Jones D.G. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res Rev* 1990; 15: 215–249.

15. Gritsun T., Stegenga G., Feber J., Rutten W.L.C. Network bursts in cortical neuronal cultures. In: *Proceedings of the 4th International IEEE EMBS conference on neural engineering*. 2009.

16. Simonov A.Yu., Pimashkin A.S., Koryagina E.A., Prokin I.S., Mironov V.I., Kastal'skiy I.A., Savikhin S.A., Terent'ev A.B., Iudin D.I., Mukhina I.V., Kazantsev V.B. Effekty setevoy signalizatsii v modelyakh spontanno razvivayushchikhsya neyronal'nykh setey v dissotsirovannykh kul'turakh kletok mozga. V kn.: *Materialy XIII Vserossiyskoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii "Neuroinformatika — 2011"* [The effects of network signaling in the models of spontaneously developing neuronal networks in dissociated cultures of brain cells. In: *Proceedings of the XIII All-Russian Scientific and Technical Conference "Neuroinformatics-2011"*]. Moscow: NIYaU-MIFI; 2010; p. 138–184.

17. Bogolepov N.N., Frumkina L.E., Yakovleva N.I., Koroleva C.K. Vozmozhnye mekhanizmy formirovaniya sinapsov v ontogeneze [Possible mechanisms of synapses formation in ontogenesis]. *Arkhiv anatomii — Anatomy Archives* 1987; 5: 20–27.

18. Pápa M., Bundman C.M., Greenberger V., Segal M. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci* 1995; 15(1): 1–11.