

НЕЙРОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА BDNF НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ КУЛЬТУР ДИССОЦИИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГИППОКАМПА *in vitro*

УДК 612.8:576.3/4:57.085.23

Поступила 27.03.2015 г.

© **Т.А. Мищенко**, младший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ¹; младший научный сотрудник лаборатории по изучению фармакологических свойств нейротропных лекарственных средств Нижегородского нейронаучного центра Института биологии и биомедицины²;
М.В. Ведунова, к.б.н., руководитель лаборатории по разработке методов нейропротекции Нижегородского нейронаучного центра Института биологии и биомедицины²; старший научный сотрудник отдела биохимии ЦНИЛ¹;
Е.В. Митрошина, научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ¹; научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Нижегородского нейронаучного центра Института биологии и биомедицины²;
А.С. Пимашкин, к.ф.-м.н., ассистент кафедры нейродинамики и нейробиологии биологического факультета²;
И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ¹; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹; профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

Цель исследования — оценить нейротропное действие нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей гиппокампа в зависимости от стадии их развития *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученные от эмбрионов мыши линии C57BL/6 18-го дня гестации. Культивирование первичных культур выполняли на мультиэлектродных матрицах MED64 (Alpha Med Science, Япония). Аппликацию нейротрофического фактора в концентрации 0,1; 1; 10 нг/мл в среду культивирования осуществляли на 7, 14 и 21-й дни развития культур *in vitro*. Регистрацию базового уровня спонтанной биоэлектрической активности диссоциированных культур проводились в течение 10 мин до аппликации вещества. После добавления нейротрофина регистрация активности осуществлялась непрерывно в течение 35 мин. Повторная 10-минутная регистрация выполнялась через 2 и 24 ч после добавления нейротрофина.

Результаты. Показано, что нейротрофический фактор BDNF модулирует спонтанную биоэлектрическую активность культур диссоциированных клеток гиппокампа начиная с 14-го дня развития *in vitro*. Эффект проявляется в увеличении длительности сетевой пачки и реструктуризации паттерна спонтанной сетевой активности при отсутствии изменений в количестве спайков в пачке. Нейротропный эффект BDNF наблюдается через 10–15 мин после аппликации с продолжительностью действия не менее 2 ч.

Заключение. Применение нейротрофического фактора BDNF в концентрации 0,1; 1 и 10 нг/мл оказывает транзитный нейротропный эффект на спонтанную биоэлектрическую активность зрелых нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа начиная с 14-го дня развития *in vitro*. Изучение механизмов участия BDNF в синаптической передаче позволит прояснить роль нейротрофина в таких высших функциях ЦНС, как научение и память.

Ключевые слова: нейротрофический фактор головного мозга; BDNF; диссоциированная культура гиппокампа; мультиэлектродная матрица.

English

Neurotropic Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor at Different Stages of Dissociated Hippocampal Cultures Development *in vitro*

T.A. Mishchenko, Junior Researcher, Molecular and Cell Technologies Department, Central Research Laboratory¹; Junior Researcher, Laboratory for Pharmacological Properties of Neurotropic Drug Research, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Institute of Biology and Biomedicine²;
M.V. Vedunova, PhD, Head of the Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Institute of Biology and Biomedicine²; Senior Researcher, Biochemistry Department, Central Research Laboratory¹;

Для контактов: Мищенко Татьяна Александровна, e-mail: saHarnova87@mail.ru

E.V. Mitroshina, Researcher, Department of Molecular and Cell Technologies, Central Research Laboratory¹; Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Institute of Biology and Biomedicine²;

A.S. Pimashkin, PhD, Assistant, Neurodynamics and Neurobiology Department, Biological Faculty²;

I.V. Mukhina, DSc, Professor, Head of the Central Research Laboratory¹; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov¹; Professor, Neurodynamics and Neurobiology Department, Institute of Biology and Biomedicine²

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospect Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

The aim of the investigation was to evaluate the neurotropic effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the spontaneous bioelectrical activity of hippocampal neural networks according to the stage of their development *in vitro*.

Materials and Methods. The studies were performed using hippocampal cells dissociated from C57BL/6 mice embryos (E18) and cultured on multielectrode arrays consisting of 64 electrodes (MED64, Alpha Med Science, Japan). BDNF was applied to the culture medium in concentrations 0.1, 1.0, and 10 ng/ml on days 7, 14 and 21 of the culture development *in vitro*.

Spontaneous bioelectrical activity of dissociated hippocampal cultures was recorded within 10 min before the BDNF application. After the neurotrophin addition, the activity was recorded continuously for 35 min. The 10-minute recordings was repeated at 2 and 24 h after the BDNF application.

Results. The experiments revealed that BDNF modulates the spontaneous bioelectrical activity of dissociated hippocampal cultures, starting from day 14 of culture development *in vitro*. The effect is manifested as increased network burst duration and in the restructuring of the pattern of spontaneous network activity without any changes in the number of spikes in a burst. BDNF neurotropic action was observed between 10 and 15 min after application with a validity period not less than 2 h.

Conclusion. BDNF (0.1; 1.0; 10 ng/ml) application has a transient neurotropic effect on the spontaneous bioelectrical activity of mature neural networks starting from day 14 of dissociated hippocampal cultures development *in vitro*. Investigation the mechanisms of BDNF participation in synaptic transmission clarifies the role this neurotrophin in such functions of the central nervous system, as learning and memory processes.

Key words: brain-derived neurotrophic factor; BDNF; dissociated hippocampal cultures; multielectrode arrays.

Изучение механизмов регуляции биологических процессов, наблюдаемых в центральной нервной системе (ЦНС), является одной из значимых задач современной биологии и медицины. Нейротрофины — одни из важнейших регуляторных белков, обеспечивающих основные процессы жизнедеятельности человека и животных [1]. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) является ключевым представителем данного семейства белков, функции которого непосредственно связаны с работой ЦНС. Основную роль данной нейротрофин играет на стадии пренатального развития, принимая участие в процессах нейрогенеза, обеспечивая активную дифференцировку и пролиферацию нейронов различного фенотипа и локализации. Однако особый интерес представляет действие BDNF на функционирование ЦНС в постнатальный период [2]. Недавними исследованиями [3] показана возможность модулирования нейротрофическим фактором синаптической передачи в гиппокампе и некоторых отделах коры головного мозга. В результате взаимодействия BDNF с высокоаффинным тирозинкиназным рецептором B (TrkB) происходит запуск нескольких сигнальных механизмов, обеспечивающих действие нейротрофического фактора на пресинаптическую и постсинаптическую передачу сигнала в клетке. BDNF способен активировать потенциалзависимые натриевые, калиевые каналы, повышать уровень экспрессии GABA-рецепторов, а также фосфорилирования NR1- и NR2B-субъединиц NMDA-рецепторов, тем самым влияя на

эффективность синаптической передачи. Кроме того, BDNF принимает участие в формировании синаптической пластичности и в процессах обучения и памяти [4, 5]. Однако в связи с недостаточностью знаний о роли и механизмах действия BDNF на функционирование нейронов на сетевом уровне в процессе их развития, а также об участии нейротрофина в гомеостатической пластичности очевидна необходимость дальнейшего исследования.

Цель исследования — оценить нейротропное действие нейротрофического фактора головного мозга на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей гиппокампа в зависимости от стадии их развития *in vitro*.

Материалы и методы

Культивирование диссоциированных клеток гиппокампа. Материалом для исследований служили культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в приказе Минздрава России №267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

С целью регистрации основных электрофизиологических показателей активности нейронных сетей культивирование клеток проводилось на мультиэлектродных матрицах MED64 (Alfa Med Science, Япония).

Ферментативную диссоциацию клеток эмбриональ-

ного гиппокампа выполняли при помощи обработки гиппокампа 0,25% раствором трипсина (Gibco, США). Культивирование первичных культур осуществляли в нейробазальной среде Neurobasal™ (Invitrogen, США) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen, США), L-глутамином (Invitrogen, США), эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Россия) согласно ранее разработанному протоколу [6] в течение 30 дней *in vitro* на мультиэлектродной матрице. Перед посадкой клеток мультиэлектродные матрицы обрабатывали положительно заряженным гидрофильным веществом — полиэтиленимином (Sigma, Германия) для повышения адгезии клеток на их поверхность. Исходная плотность культуры на матрице составляла 9000 кл./мм². Жизнеспособность культур поддерживалась в условиях CO₂-инкубатора (MCO-18AIC, Sanyo, Япония) при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂ [7].

Схема эксперимента. BDNF апплицировали на 7-, 14- и 21-й день развития культур *in vitro*. В 1-й группе культур BDNF добавляли в культуральную среду в концентрации 0,1 нг/мл, во 2-й группе — 1 нг/мл, в 3-й группе — 10 нг/мл. В качестве контроля использовали соответствующие концентрации раствора альбумина в фосфатно-солевом буфере PBS (phosphate buffered saline).

Регистрация базового уровня спонтанной биоэлектрической активности диссоциированных культур проводилась в течение 10 мин до аппликации вещества. После добавления нейротрофина регистрация активности осуществлялась непрерывно в течение 35 мин. Повторная 10-минутная регистрация проводилась через 2 и 24 ч после добавления нейротрофина (рис. 1).

Для получения данных и их первичного анализа использовали набор программного обеспечения Conductor™ (Alpha Med Science, Япония). Анализ сетевой активности нейронов проводили с помощью разработанного в программной среде MATLAB оригинального пакета алгоритмов MEAMAN (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2012611190).

Детектирование спайков (внеклеточных потенциалов действия) осуществляли по следующему алгоритму: выбиралась граница, равная 8σ, где σ — среднеквадратичное число. При условии превышения амплитудой спонтанной активности данного порога событие считалось спайком, без превышения активности распознавалось как шум и не учитывалось при анализе данных. Исследовались основные характеристики спонтанной

биоэлектрической активности нейронной сети: количество малых сетевых пачек в записи; количество спайков в пачке; длительность малой пачки импульсов в секундах. Критерием малой сетевой пачки являлось наличие спайков минимум на четырех различных электродах матрицы с межспайковым интервалом не более 100 мс [8].

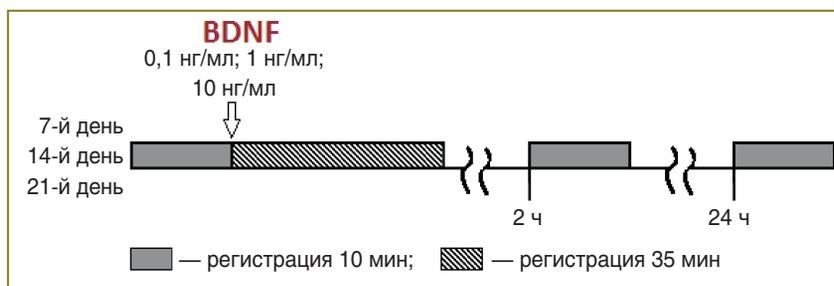
Анализ паттерна активации нейронной сети. Дополнительно для характеристики функциональной структуры сетевой активности был выполнен анализ последовательности спайков внутри вызванной пачки, обусловленных сложной сетевой динамикой, которая способна варьироваться в разных пачках. Для анализа функциональных характеристик всех регистрируемых клеток был проведен следующий анализ паттернов активации. Для каждой пачки был определен 64-мерный паттерн активации — времена первого спайка на каждом электроде после временной точки, равной времени начала пачки.

Статистический анализ данных. Полученные результаты подвергались статистической обработке с помощью пакета прикладных программ SigmaPlot 11.0 с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Данные представлены в форме «среднее значение ± стандартная ошибка среднего». Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Исследование влияния нейротрофического фактора BDNF на функциональную биоэлектрическую активность первичных клеток гиппокампа проведено на 7-, 14- и 21-й дни культивирования. Согласно ранее полученным данным [9–12], эти сроки развития являются ключевыми этапами формирования нейронных сетей диссоциированных культур *in vitro*. Добавление различных концентраций альбумина в PBS не вызвало статистически значимых изменений в спонтанной биоэлектрической активности на всех сроках развития культур диссоциированных клеток гиппокампа, что дало основание усреднить значения контрольных групп для каждого этапа проведения исследования.

Установлено, что в ответ на аппликацию BDNF (0,1 и 1 нг/мл) **на 7-й день развития культур *in vitro*** спонтанная биоэлектрическая активность статистически значимо не изменялась ни по одному из исследуемых параметров (количество малых сетевых пачек, количество спайков в пачке, длительность малой сетевой пачки). Однако следует отметить, что после добавления в среду культивирования BDNF отмечалось увеличение синхронизации работы нейронов, формирующих

Рис. 1. Схема регистрации спонтанной биоэлектрической активности культур диссоциированных клеток гиппокампа на разных стадиях развития *in vitro*



сетевую пачку импульсов (рис. 2, б, в). Данный эффект наблюдался в течение суток (рис. 2, г).

При исследовании влияния BDNF на 14-й день

развития культур *in vitro* обнаружены изменения спонтанной биоэлектрической активности диссоциированных культур. Наиболее значимые события были

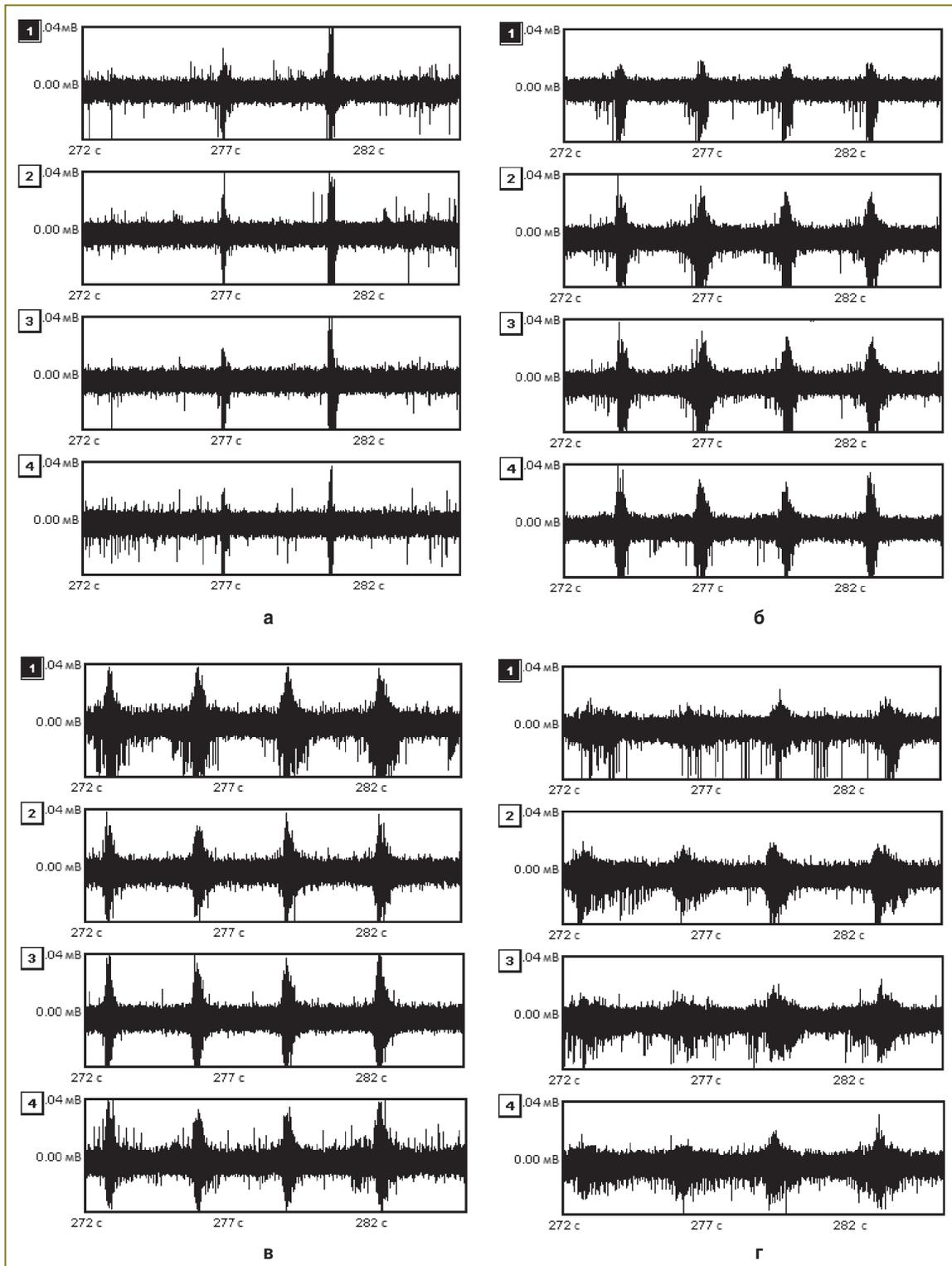


Рис. 2. Пример записи спонтанной биоэлектрической активности на 7-й день развития культуры *in vitro*, регистрируемой с 4 (1–4) электродов мультиэлектродной матрицы MED64 (Alfa MED Science, Япония): а — до добавления BDNF, 1 нг/мл; б — через 20 мин после добавления BDNF, 1 нг/мл; в — через 2 ч после добавления BDNF, 1 нг/мл; г — через 24 ч после добавления BDNF, 1 нг/мл

выявлены при анализе длительности малой сетевой пачки импульсов. Так, во временном промежутке 15–20 мин после добавления в среду культивирования BDNF в концентрации 0,1 нг/мл длительность малой сетевой пачки статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивалась по сравнению с исходным уровнем в среднем на 70% (от $0,65 \pm 0,16$ до $1,11 \pm 0,19$ с). Кроме того, также

($p < 0,05$) возрастала длительность малой сетевой пачки относительно активности контрольных культур. Однако нейротропный эффект носил транзиторный характер (не менее 20 мин), и через 2 ч после аппликации BDNF спонтанная биоэлектрическая активность возвращалась к исходным значениям и не отличалась от активности контрольных культур (рис. 3, а).

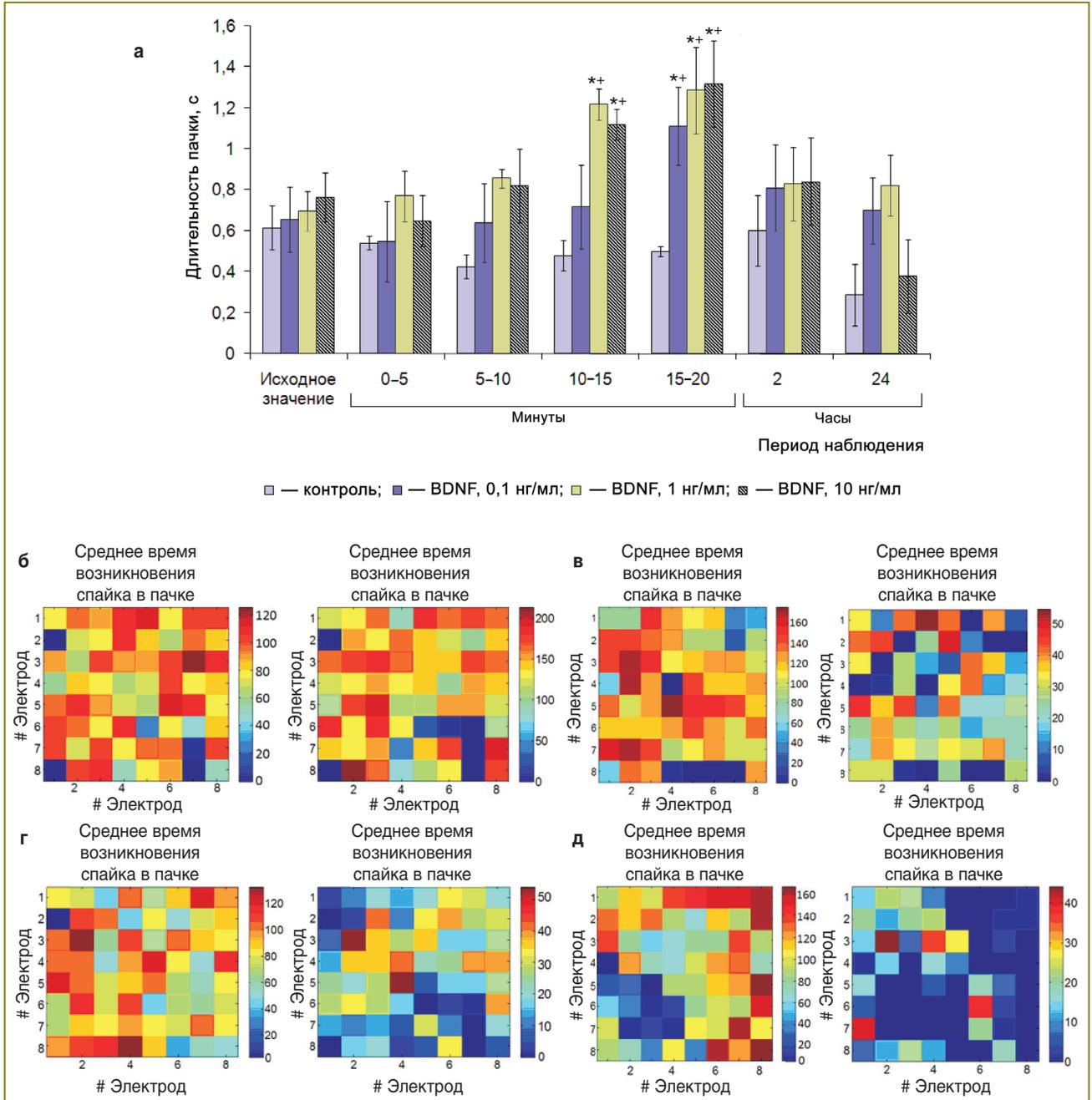


Рис. 3. Влияние нейротрофического фактора BDNF на длительность малой сетевой пачки импульсов на 14-й день развития *in vitro* (а); * — статистическая значимость различий значений с исходным уровнем; + — с контрольной группой, $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни); б–д — паттерны спонтанной биоэлектрической активности диссоциированных культур гиппокампа, слева — активность культур до аппликации, справа — через 24 ч после аппликации: б — контрольная культура; в — BDNF, 0,1 нг/мл; г — BDNF, 1 нг/мл; д — BDNF, 10 нг/мл. Цветовая диаграмма — время появления спайков в сетевой малой пачке, регистрируемых с электродов, мс

Схожая динамика изменений спонтанной биоэлектрической активности наблюдалась в группе культур с добавлением BDNF в концентрации 1 нг/мл. Однако эффект действия нейротрофина в этом случае был более выражен по сравнению с культурами, получавшими BDNF в концентрации 0,1 нг/мл. Через 10–15 мин длительность малой сетевой пачки была статистически значимо больше ($p < 0,05$) как относительно исходной активности, так и активности культур с аппликацией BDNF в концентрации 0,1 нг/мл. На 20-й минуте регистрации длительность пачки в среднем ($p < 0,05$) превысила исходные значения на 83% (с $0,698 \pm 0,09$ до $1,286 \pm 0,21$ с), но уже не отличалась от значений, полученных в группе с меньшей концентрацией BDNF. Через 2 и 24 ч после добавления нейротрофина спонтанная биоэлектрическая активность группы культур с BDNF в концентрации 1 нг/мл не отличалась от исходных значений.

При оценке длительности малой сетевой пачки в группе с добавлением в среду культивирования BDNF в концентрации 10 нг/мл (рис. 2, а) обнаружено, что к 10–15-й минуте наблюдения статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивается длительность малой сетевой пачки как относительно исходных значений, так и значений группы с BDNF в концентрации 0,1 нг/мл. Достоверных различий с группой BDNF в концентрации 1 нг/мл не зафиксировано.

Таким образом, нами обнаружен нейротропный эффект концентраций BDNF 1 и 10 нг/мл и не выявлен выраженный эффект BDNF в концентрации 0,1 нг/мл. Нейротропный эффект BDNF длился кратковременно, и через 2 ч после добавления нейротрофического фактора активность нейронных сетей возвращалась к

исходному уровню, статистически значимых различий относительно исходных значений не обнаружено.

Кроме того, аппликация различных концентраций нейротрофического фактора приводила к разным изменениям функциональных характеристик сетевой пачки импульсов, отражающих индивидуальную структуру нейронной сети диссоциированных культур клеток гиппокампа (рис. 3, б–д). Нейротропный эффект BDNF может быть связан с повышением эффективности синаптической передачи, что, в свою очередь, приводит к увеличению количества нейронов с временем активации не более 50 мс. Подобная синхронизация нейронов в сети наблюдалась через 24 ч после аппликации. Следует отметить, что степень синхронизации спайков зависела от концентрации добавляемого нейротрофического фактора. Наибольший эффект отмечен в случае применения BDNF с концентрацией 10 нг/мл, на большинстве электродов время появления спайков в сетевой пачке составляло не более 15 мс.

Исследования, проведенные на 21-й день развития культур *in vitro*, показали, что аппликация BDNF в концентрации 1 нг/мл приводит к активации спонтанной биоэлектрической активности культур диссоциированных клеток гиппокампа. Достоверные изменения длительности малой сетевой пачки регистрировались через 20 мин после добавления нейротрофина. Применение более низких концентраций BDNF (0,1 нг/мл) не вызывало статистически значимых изменений биоэлектрической активности (рис. 4).

Через 20 мин после аппликации BDNF в концентрации 1 нг/мл наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение длительности пачки импульсов

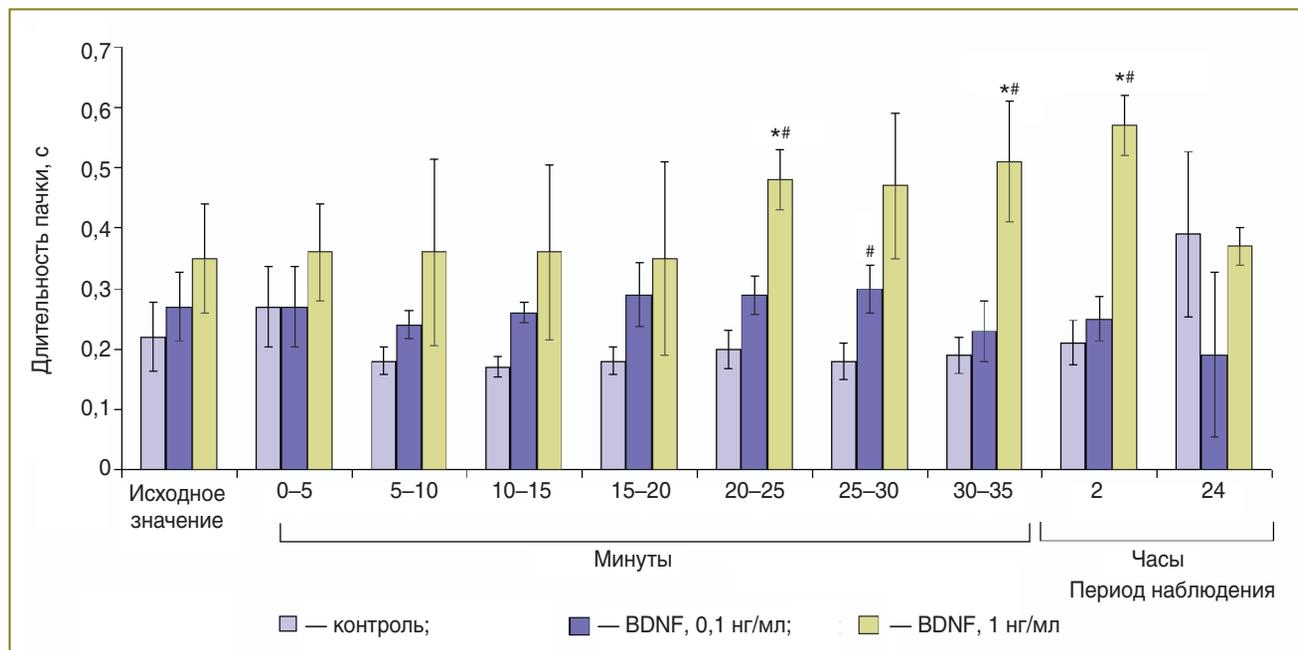


Рис. 4. Влияние нейротрофического фактора BDNF на длительность малой сетевой пачки импульсов на 21-й день развития *in vitro*; * — статистическая значимость различий значений с исходным уровнем; # — с контрольной группой, $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни)

относительно исходной активности и активности контрольных культур, длящееся в течение последующих 2 ч (контрольные значения были превышены в среднем на 62%). Однако эффект был транзиторный и через 24 ч после добавления нейротрофического фактора длительность пачки не отличалась от первоначальных и контрольных показателей.

Анализ функциональных характеристик сетевой пачки импульсов, отражающих индивидуальную структуру нейронной сети, показал, что добавление в среду культивирования контрольного раствора (альбумина в PBS) не повлияло на паттерн сетевой пачки диссоциированных культур. В отличие от контрольной группы добавление в культуральную среду BDNF в концентрации 0,1 и 1 нг/мл привело к сокращению времени появления первого спайка в сетевой пачке, что говорит о повышении синхронизации работы нейронов. Данный эффект сохранялся в течение 24 ч после аппликации нейротрофина, также как и на 14-й день развития нейронных сетей первичных культур гиппокампа.

Обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что нейротрофический фактор BDNF модулирует спонтанную биоэлектрическую активность культур диссоциированных клеток гиппокампа. Изменение спонтанной биоэлектрической активности нейронов на сетевом уровне выразилось в увеличении длительности малой сетевой пачки импульсов, сокращении времени появления первых спайков в пачке, что изменяло структуру как паттерна активации, так и всей пачки импульсов, являющейся функциональной характеристикой сети. Проявление наблюдаемых изменений зависело от концентрации добавляемого нейротрофина и от стадии развития диссоциированных культур *in vitro*.

Аппликация BDNF на 7-й день развития культур *in vitro* не влияла на спонтанную биоэлектрическую активность культур диссоциированных клеток гиппокампа, в то время как на 14-й и 21-й дни культивирования модулировала биоэлектрическую активность нейронных сетей. Эффект в ответ на добавление нейротрофина проявлялся в увеличении длительности малой сетевой пачки импульсов и развивался на временном промежутке 10–20 мин. Важно отметить, что характерным проявлением нейротропного действия BDNF служили также повышение эффективности синаптической передачи в нейронной сети гиппокампа и усиление синхронизации нейронов при их включении в сетевую активность.

Можно предположить, что полученный нейротропный эффект в ответ на добавление нейротрофического фактора связан с метаболическими процессами, опосредованными запуском сигнальных каскадов при взаимодействии BDNF с рецептором TrkB [3, 13–15]. Для реализации данных реакций необходимо наличие сформированных зрелых синаптических контактов в нейронной сети [4, 5, 16]. Этим объясняется отсутствие изменений в спонтанной активности диссоциированных культур при добавлении нейротрофина на 7-й день развития культур *in vitro*, поскольку в данный период развития нейронная сеть находится на стадии формирования с преобладанием электрических синапсов и отсутствием полноценных химических синаптических контактов

[9–12]. Более поздние сроки развития диссоциированных культур характеризуются наличием сформированных нейронных сетей, в структуре которых преобладают химические синапсы, обеспечивающие пластичность диссоциированных культур [9, 10] и необходимые для реализации нейротропного эффекта BDNF.

Таким образом, BDNF может выступать в роли нейромодулятора спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа. Раскрытие механизмов участия BDNF в синаптической передаче позволит прояснить роль нейротрофина в таких высших функциях ЦНС, как обучение и память.

Заключение. Нейротрофический фактор головного мозга BDNF в концентрациях 0,1; 1; и 10 нг/мл оказывает транзиторный нейротропный эффект на спонтанную биоэлектрическую активность только зрелых нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа начиная с 14-го дня развития *in vitro*.

Финансирование исследования. Работа поддержана грантами РФФИ №13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601, грантом (соглашение от 27 августа 2013 г. №02.В.49.21.0003 между Министерством образования и науки РФ и Нижегородским государственным университетом им. Н.И. Лобачевского). Публикация частично подготовлена в рамках выполнения государственной работы «Обеспечение проведения научных исследований».

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Гомазков О.А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга. М: Икар; 2006; 331 с.
2. Martin J.L., Finsterwald C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Commun Integr Biol* 2011; 4(1): 14–16, <http://dx.doi.org/10.4161/cib.13761>.
3. Rose C.R., Blum R., Kafitz K.W., Kovalchuk Y., Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *BioEssays* 2004; 26(11): 1185–1194, <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20118>.
4. Aptowicz C.O., Kunkler P.E., Kraig R.P. Homeostatic plasticity in hippocampal slice cultures involves changes in voltage-gated Na⁺ channel expression. *Brain Res* 2004; 998(2): 115–163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2003.11.035>.
5. Cunha C., Brambilla R., Tomas K.L. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 2010; 3: 1, <http://dx.doi.org/10.3389/fnmo.02.001.2010>.
6. 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. *Современные технологии в медицине* 2009; 1: 8–15.
7. Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E., Perminova M., Pimashkin A., Zakharov Y., Dityatev A., Mukhina I. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures. *Front Cell Neurosci* 2013; 7(149), <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2013.00149>.
8. Pimashkin A., Kastalskiy I., Simonov A., Koryagina E.,

Mukhina I., Kazantsev V. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures. *Front Comput Neurosci* 2011; 5(46), <http://dx.doi.org/10.3389/fncom.2011.00046>.

9. 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*. *Современные технологии в медицине* 2013; 2: 6–13.

10. Агрба Е.А., Мухина И.В. Пространственно-временная характеристика нейросетевой активности первичных культур гиппокампа. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского* 2013; 4(1): 139–144.

11. Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Широкова О.М., Захаров Ю.Н., Калинин Я.И., Мухина И.В. Оценка динамики функционального состояния диссоциированной культуры гиппокампа *in vitro*. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского* 2011; 2(2): 283–286.

12. Гладков А.А., Ведунова М.В., Коротченко С.А., Захаров Ю.Н., Балашова А.Н., Мухина И.В. Развитие пространственно-временной структуры нейрональной сети гиппокампа *in vitro*. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского* 2011; 2(2): 243–248.

13. Caldeira M.V., Melo C.V., Pereira D.B., Carvalho R.F., Carvalho A.L., Duarte C.B. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 2007; 35(2): 208–219, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2007.02.019>.

14. Porcher C., Hatchett C., Longbottom R.E., McAinch K., Sihra T.S., Moss S.J., Thomson A.M., Jovanovic J.N. Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J Biol Chem* 2011; 286(24): 21667–21677, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.201582>.

15. Patapoutian A., Reichardt L.F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(3): 272–280, [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00208-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00208-7).

16. Sakharnova T.A., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its role in the functioning of the central nervous system. *Neurochem J* 2012; 6(4): 251–259, <http://dx.doi.org/10.1134/s1819712412030129>.

References

1. Gomazkov O.A. *Neyrotroficheskaya regulyatsiya i stvolovyye kletki mozga* [Neurotrophic regulation and brain stem cells]. Moscow: Ikar; 2006; 331 p.

2. Martin J.L., Finsterwald C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Commun Integr Biol* 2011; 4(1): 14–16, <http://dx.doi.org/10.4161/cib.13761>.

3. Rose C.R., Blum R., Kafitz K.W., Kovalchuk Y., Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *BioEssays* 2004; 26(11): 1185–1194, <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20118>.

4. Aptowicz C.O., Kunkler P.E., Kraig R.P. Homeostatic plasticity in hippocampal slice cultures involves changes in

voltage-gated Na⁺ channel expression. *Brain Res* 2004; 998(2): 115–163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2003.11.035>.

5. Cunha C., Brambilla R., Tomas K.L. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 2010; 3: 1, <http://dx.doi.org/10.3389/fnmo.2010.001.2010>.

6. Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Khaspekov L.G., Zakharov Yu.N., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Korotchenko S.A., Koryagina E.A. Multielectrode matrices — new possibilities in investigation of the neuronal network plasticity. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2009; 1: 8–15.

7. Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E., Perminova M., Pimashkin A., Zakharov Y., Dityatev A., Mukhina I. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures. *Front Cell Neurosci* 2013; 7(149), <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2013.00149>.

8. Pimashkin A., Kastalskiy I., Simonov A., Koryagina E., Mukhina I., Kazantsev V. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures. *Front Comput Neurosci* 2011; 5(46), <http://dx.doi.org/10.3389/fncom.2011.00046>.

9. Shirokova O.M., Frumkina L.E., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Zakharov Y.N., Khaspekov L.G., Mukhina I.V. Morphofunctional patterns of neuronal network developing in dissociated hippocampal cell cultures. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2013; 2: 6–13.

10. Agrba E.A., Mukhina I.V. Spatio-temporal characteristics of neuronal network activity of primary hippocampal cultures. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* 2013; 4(1): 139–144.

11. Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Shirokova O.M., Zakharov Yu.N., Kalintseva Ya.I., Mukhina I.V. Assessment of functional state dynamics of dissociated hippocampal cell culture *in vitro*. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* 2011; 2(2): 283–286.

12. Gladkov A.A., Vedunova M.V., Korotchenko S.A., Zakharov Yu.N., Balashova A.N., Mukhina I.V. Development of spatiotemporal structure of hippocampal neural network *in vitro*. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* 2011; 2(2): 243–248.

13. Caldeira M.V., Melo C.V., Pereira D.B., Carvalho R.F., Carvalho A.L., Duarte C.B. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 2007; 35(2): 208–219, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2007.02.019>.

14. Porcher C., Hatchett C., Longbottom R.E., McAinch K., Sihra T.S., Moss S.J., Thomson A.M., Jovanovic J.N. Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J Biol Chem* 2011; 286(24): 21667–21677, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.201582>.

15. Patapoutian A., Reichardt L.F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(3): 272–280, [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00208-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00208-7).

16. Sakharnova T.A., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its role in the functioning of the central nervous system. *Neurochem J* 2012; 6(4): 251–259, <http://dx.doi.org/10.1134/s1819712412030129>.