

МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ВЫЗВАННОЙ СТИМУЛОМ ПЛАСТИЧНОСТИ В НЕЙРОННЫХ СЕТЯХ НА ОСНОВЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК МОЗГА В МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПАХ

DOI: 10.17691/stm2017.9.4.02

УДК 616.8:004.032.6:532.5

Поступила 22.03.2017 г.



А.А. Гладков, младший научный сотрудник лаборатории нейроинженерии Центра трансляционных технологий¹; младший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ²;

В.Н. Колпаков, лаборант лаборатории нейроинженерии Центра трансляционных технологий¹;

Я.И. Пигарева, младший научный сотрудник лаборатории нейроинженерии Центра трансляционных технологий¹;

А.С. Букатин, к.ф.-м.н., научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологий³;

В.Б. Казанцев, д.ф.-м.н., проректор по научной работе¹; зав. кафедрой нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹; зав. лабораторией разработки интеллектуальных биомехатронных технологий Центра трансляционных технологий¹;

И.В. Мухина, д.б.н., профессор, руководитель Центра трансляционных технологий¹; зав. ЦНИЛ²; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова²; профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹;

А.С. Пимашкин, к.ф.-м.н., зав. лабораторией нейроинженерии Центра трансляционных технологий¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

³Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194021, ул. Хлопина, 8/3, лит. А

Культуры диссоциированных клеток мозга на микроэлектродных матрицах (МЭМ) широко используются для изучения фундаментальных механизмов обработки информации и синаптической пластичности. Установлено, что высокочастотная электрическая стимуляция вызывает функциональные изменения в нейронной сети. Тем не менее сложная и однородная морфологическая структура сети культивируемых клеток мозга существенно ограничивает дальнейшее исследование синаптической пластичности на сетевом уровне. В данном исследовании предложен новый подход к проблеме изучения пластичности нейронных сетей с использованием микрофлюидных устройств со специально спроектированными каналами. Микрофлюидные чипы позволяют направлять аксоны и формировать нейронные цепи с двумя подсетями, соединенными синаптическими путями в заданном направлении. Для индукции синаптической пластичности применялась высокочастотная тетаническая стимуляция двух групп электродов, расположенных в области пре- и постсинаптических нейронов. Разработанный метод потенцирования и депрессии заданных функциональных связей в нейронной цепи может быть использован для дальнейшего изучения сетевых эффектов синаптической пластичности, индуцированной в локальной субпопуляции клеток.

Ключевые слова: нейронные сети *in vitro*; микрофлюидика; нейроинженерия; синаптическая пластичность; зависящая от времени импульса синаптическая пластичность; STDP; обработка информации мозгом.

Как цитировать: Gladkov A.A., Kolpakov V.N., Pigareva Y.I., Bukatin A.S., Kazantsev V.B., Mukhina I.V., Pimashkin A.S. Study of stimulus-induced plasticity in neural networks cultured in microfluidic chips. *Modern Tehnologies in Medicine* 2017; 9(4): 15–24, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.02>

English

Study of Stimulus-Induced Plasticity in Neural Networks Cultured in Microfluidic Chips

A.A. Gladkov, Junior Researcher, Laboratory of Neuroengineering, Center for Translational Technologies¹;

Junior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Central Research Laboratory²;

V.N. Kolpakov, Research Assistant, Laboratory of Neuroengineering, Center for Translational Technologies¹;

Для контактов: Гладков Арсений Андреевич, e-mail: gladkov@neuro.nnov.ru

Y.I. Pigareva, Junior Researcher, Laboratory of Neuroengineering, Center for Translational Technologies¹;
A.S. Bukatin, PhD, Researcher, Laboratory for Nanobiotechnologies³;
V.B. Kazantsev, DSc, Vice-Rector for Research¹; Head of the Department of Neurotechnologies,
 Institute of Biology and Biomedicine¹; Head of the Laboratory for the Development of Intellectual
 Biomechatronic Technologies, Center for Translational Technologies¹;
I.V. Mukhina, DSc, Professor, Head of the Center for Translational Technologies¹;
 Head of the Central Research Laboratory²; Head of the Department of Normal Physiology
 named after N.Y. Belenkov²; Professor, Neurotechnology Department, Institute of Biology and Biomedicine¹;
A.S. Pimashkin, PhD, Head of the Laboratory of Neuroengineering, Center for Translational Technologies¹

¹Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950,
 Russian Federation;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005,
 Russian Federation;

³Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, 8/3 Khlopina St.,
 Saint Petersburg, 194021, Russian Federation

Dissociated brain cell cultures on microelectrode arrays (MEA) are widely used to study fundamental mechanisms of information processing and synaptic plasticity. It has been established that high frequency electrical stimulation causes functional changes in neural networks. However, complex and homogeneous morphological structure of cultured brain cell networks presents a significant challenge for further evaluation of the synaptic plasticity at the network level. In this study, we propose a new approach to studying neural network plasticity using microfluidic devices with specially designed channels. Microfluidic chips can guide axons and form neural circuits with two subnetworks connected by synaptic paths in the required direction. To induce synaptic plasticity, high frequency tetanic stimulation by two groups of electrodes located in the area of pre- and postsynaptic neurons was applied. The developed method of potentiation and depression of the required functional connectivity in the neural circuit can be used to further study network effects of synaptic plasticity induced in the local subpopulation of cells.

Key words: neural networks *in vitro*; microfluidics; neuroengineering; synaptic plasticity; spike timing dependent plasticity; STDP; information processing by the brain.

Культуры диссоциированных нервных клеток широко используются в качестве экспериментальной модели для длительных исследований синаптической пластичности на сетевом уровне, возможностей обучения и памяти [1–10]. Эта модель позволяет производить долгосрочный мониторинг биоэлектрической функциональной активности и морфологических изменений нейронных сетей. Существует множество исследований нейронных сетей, зависящих от активности пластичности в сетях диссоциированных клеток мозга, длительно культивируемых на мультиэлектродных матрицах. Наиболее распространенными протоколами электрической стимуляции являются: стимуляция с обратной связью (когда стимуляция зависит от сетевых ответов) [1–4], стимуляция с низкой частотой (1–0,5 Гц) [5, 6] и высокочастотная тетаническая стимуляция [7–10], основанная на зависимой от времени импульса пластичности (STDP, spike time dependent plasticity).

В сетях диссоциированных клеток связи между нейронами формируются случайным образом. Для выявления функциональных взаимосвязей и их изменений после стимуляции в таких сетях необходимы различные методы математического анализа [11, 12]. В последнее время развитие микрофлюидных методов позволило направлять рост нейритов и конструировать культуры с заданными функциональными связями [13–20]. Связи, по которым сигналы распространяются в одном направлении, наиболее интересны, так как

участвующие в них пре- и постсинаптические клетки находятся в разных камерах. В связи с этим удобно использовать стимуляцию, основанную на STDP. Мы исследовали распространение сигнала по аксонам между двумя популяциями нервных клеток после высокочастотной стимуляции с задержкой в соответствии с STDP. Были обнаружены изменения распространения ответов на стимулы после стимуляции. Это свидетельствует о том, что разработанный подход эффективен для индукции пластичности электрическими стимулами в культурах диссоциированных нервных клеток.

Материалы и методы

Изготовление микрофлюидных чипов. Для создания направленных синаптических связей мы разработали микрофлюидный чип с определенной формой микроканалов, которые соединяют две камеры (рис. 1). Форма микроканалов (рис. 1, б) обеспечивает преимущественный рост аксонов из одной камеры — камеры-источника (или камеры А) — в камеру-приемник (или камеру Б). Микроканалы между камерами состоят из последовательности треугольных сегментов. Однонаправленная связь достигается за счет использования «направляющих» боковых стенок, ограничивающих возможные направления роста аксонов, и за счет узкого места для предотвращения роста аксонов в обратном направлении. Микрофлюидный чип изготовлен с использованием полидиметилсилоксана

(ПДМС) методом «мягкой» литографии (рис. 1, в). Для создания мастер-формы использовали стандартную двухслойную оптическую литографию: на кремниевую подложку наносили первый слой негативного фоторезиста SU-8 2025, разбавленного растворителем T thinner (MicroChem, США), толщиной 4,5 мкм, после экспонирования которого был нанесен второй слой SU-8 2075 толщиной ~200 мкм. Термообработка при температуре 95°C была выполнена в течение 4 и 7 мин для первого и второго слоя соответственно. Экспонирование проводили через хромовый фотосаблон на установке MJB4 (SUSS MicroTec, Германия) с УФ-фильтром PL-360-LP (Omega Optics, США). Затем экспозиционные кремниевые пластины отжигались при 95°C в течение 5 и 7 мин соответственно. Впоследствии мастер-формы подвергались термической обработке при температуре 200°C в течение 7 мин.

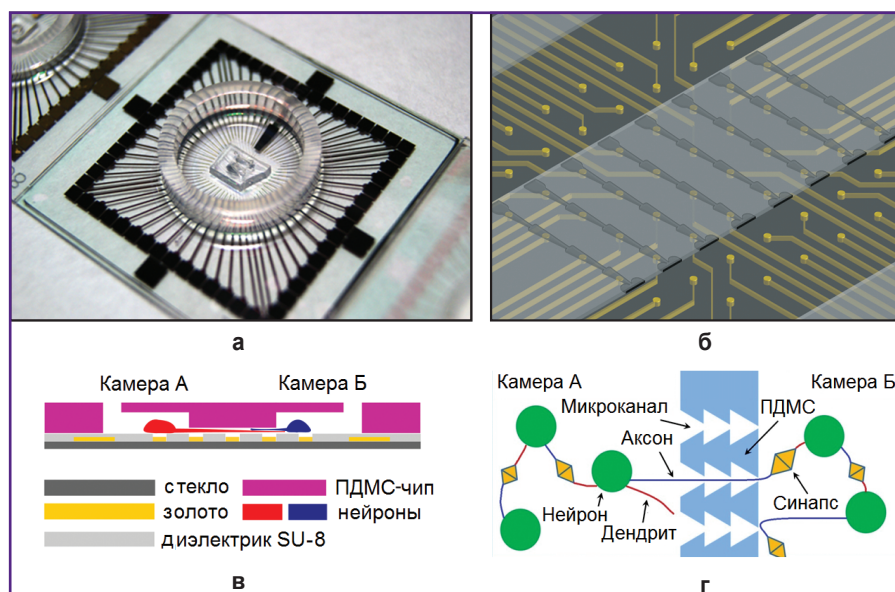
Два компонента «Sylgard 184 silicone elastomer base» и «Sylgard 184 silicone elastomer curing agent» (DowCorning, США) смешивали в соотношении 10:1 для изготовления ПДМС-микрочипов. Неотвержденный ПДМС дегазировали в эксикаторе, заливали на мастер-форму, а затем отверждали при температуре 70°C в течение 4 ч. После этого ПДМС-чипы отделяли от мастер-формы и на месте камер в чипах пробивали отверстия пробойником. Каждый ПДМС-чип позиционировался и монтировался на поверхность микроэлектродной матрицы (МЭМ) (рис. 1, а). Перед высеванием клеток на МЭМ ее поверхность предварительно обрабатывали молекулами полиэтиленimina (Sigma P3143, США), усиливающими клеточную адгезию.

Клеточная культура. Диссоциированные клетки гиппокампа получали из эмбрионов мышей (E18) и помещали в камеры ПДМС-чипа на матрице, предвари-

тельно обработанной молекулами полиэтиленimina с итоговой плотностью 8000–10 000 кл./мм² [3]. Мышей линии C57B1/6 (беременные самки) умерщвляли методом дислокации шейных позвонков в соответствии с протоколами, утвержденными Министерством здравоохранения РФ по уходу и использованию лабораторных животных, Этическим комитетом НижГМА. Эмбрионы извлекали из матки и декапитировали. Все гиппокампы, отделенные от коры головного мозга, мозжечка и ствола мозга, измельчали в стерильных условиях в фосфатно-буферном физиологическом растворе. После ферментативного расщепления в течение 20 мин в 0,25% трипсине (Invitrogen 25200-056) при 35,5°C клетки суспендировали с помощью наконечника пипетки диаметром 1 мм. Затем раствор центрифугировали при 1000 об./мин в течение 4 мин. Осадок клеток немедленно ресуспендировали в среде Neurobasal (Invitrogen 21103-049) с 2% биоактивной добавкой B-27 (Invitrogen 17504-044), глутамином (Invitrogen 25030-024), 5% эмбриональной телячьей сывороткой (PanEco K055) и гентамицином. Диссоциированные клетки в капле объемом 8 мкл добавляли в камеры ПДМС-чипа. Клетки оседали и формировали плотный монослой на электродной области МЭМ. После прикрепления клеток (обычно в течение 15 мин) чашки заполняли 1 мл среды Neurobasal с 2% B-27, 0,5% глутамина и 5% эмбриональной телячьей сыворотки. Спустя 24 ч половина питательной среды заменялась средой Neurobasal, содержащей 1% глутамина, 2% B-27 и 0,4% эмбриональной телячьей сыворотки, но без антибиотиков. Глиальный рост не подавляли, потому что глиальные клетки необходимы для сохранения жизнеспособности культуры в течение длительного времени. Половина среды менялась каждые 2 дня. Клетки культивировали при постоянных условиях: 35,5°C, 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе

Рис. 1. Экспериментальная модель культуры диссоциированных клеток гиппокампа на микрофлюидном устройстве:

а — микроэлектродная матрица с микрофлюидным ПДМС-чипом; б — схема расположения микрофлюидного чипа на электродах матрицы; 8 микроканалов (600 мкм) соединяют две камеры; в — фронтальный вид микрофлюидного чипа, прикрепленного к микроэлектродной матрице; две нейронные субкультуры связаны друг с другом микроканалами; г — специфическая структура микроканалов обеспечивает односторонний рост нейритов



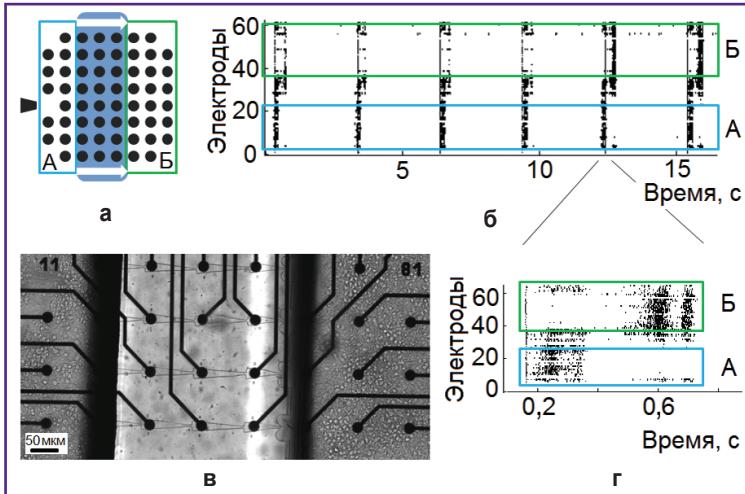


Рис. 2. Запись сетевой активности:

а — схема микроэлектродной матрицы с микрофлюидным чипом; камера А с пресинаптическими (зелеными) и камера В с постсинаптическими (синими) нейронами, соединенными микроканалами; б — растровые графики ответов на стимул; в — клетки гиппокампа, культивируемые на микроэлектродной матрице с 60 электродами в камерах и нейритами в микроканалах; г — растровый график сигнала, передаваемого из камеры А в камеру В после воздействия стимула на камеру А

для культур клеток (MCO-18AIC; SANYO Electric Co., Япония).

Фазово-контрастные изображения культур получали еженедельно для регистрации статуса культуры с использованием инвертированного микроскопа Leica DMIL HC (Leica Microsystems, Германия) с объективом 10x/0.2Ph1. Эксперименты проводили после культивирования нейронных сетей в течение 3–5 нед. Использовалось 5 культур.

Запись и стимуляция электрофизиологической активности. Запись биоэлектрической активности культуры производили спустя 20 дней после высевания *in vitro* с помощью системы USB-MEA120-2-Inv-BC (Multichannel Systems, Германия). Сигналы регистрировали на МЭМ с 59 плоскими электродами диаметром 30 мкм и межэлектродным расстоянием 200 мкм. Электрическую стимуляцию производили с помощью стимулятора STG-4004 (Multichannel Systems, Германия). Биоэлектрические импульсы регистрировали с использованием ранее разработанного метода порогового детектирования [21] в каждом канале отдельно. Амплитуды биоэлектрических импульсов находились в диапазоне 10–80 мкВ. Весь статистический анализ сигналов выполняли с использованием авторского программного обеспечения, созданного в MATLAB [3]. Биоэлектрические импульсы, зарегистрированные на электродах и соответствующие нейронам, выращенным в отдельных камерах А и В, анализировались отдельно (рис. 2).

Протокол стимуляции. Электрическая стимуляция состояла из двухфазных импульсов напряже-

нием ± 800 мВ и длительностью 600 мкс. Она включала низкочастотную контрольную стимуляцию для вызова и оценки сетевых ответных реакций и высокочастотную тетаническую стимуляцию для индуцирования синаптической пластичности. Контрольная стимуляция осуществлялась через три различных электрода в камере А и состояла из 60 стимулов на каждый электрод с интервалом между стимулами 3 с. Тетаническую стимуляцию подавали через два набора электродов — 4 «пресинаптических» электрода в камере А и 4 «постсинаптических» электрода в камере В (рис. 3). Протокол был основан на свойстве STDP [8, 9] и состоял из 150 серий по 20 стимулов с интервалом между импульсами 100 мс и интервалом между сериями 6 с. Для индуцирования потенцирования нейронов, связанных между собой и находящихся в камерах А и В, задержка в тетанической стимуляции между «пресинаптическим» и «постсинаптическим» электродами составляла 10 мс.

Анализ вызванных ответов. Стимуляция каждого электрода индуцировала ответ в виде пачки биоэлектрических импульсов на группе электродов. Растровые графики отве-

тов показаны на рис. 2, б. Для характеристики индуцированных пачек мы использовали гистограмму частоты импульсов после стимулов (PSTH — *post stimulus time histogram*) [1, 10]. Для каждого 20-мс интервала времени в ответе на стимул мы вычислили общее количество биоэлектрических импульсов, зарегистрированных на каждом электроде. Величину PSTH на электродах камеры А (PSTH А) и камеры В (PSTH В) мы проанализировали отдельно (рис. 4).

Для оценки распространения пачек импульсов, вызванных электрическими бифазными стимулами (± 800 мВ, 260 мкс на фазу, первая фаза — положитель-

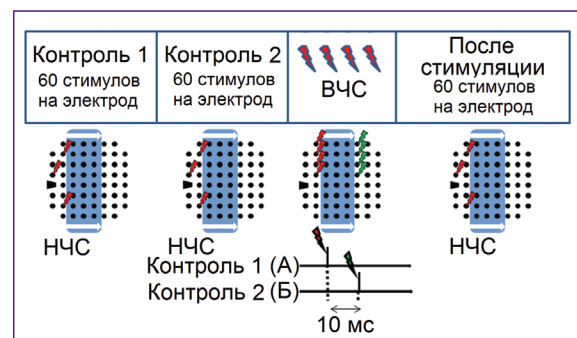


Рис. 3. Схема экспериментального протокола стимуляции: две контрольные серии низкочастотной стимуляции (НЭС) через электроды в камере А по 60 стимулов на электрод, тетаническая высокочастотная стимуляция (ВЧС) по протоколу STDP и посттетаническая стимуляция (см. «Материалы и методы»)

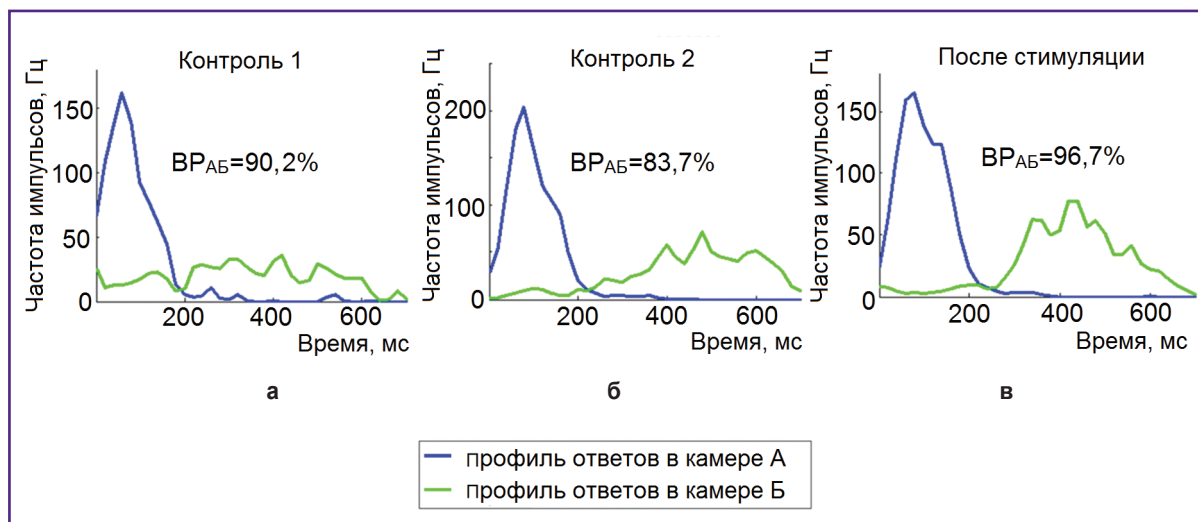


Рис. 4. Частота импульсов в пачках, вызванных низкочастотными электрическими стимулами, в пресинаптической камере А (синяя кривая) и постсинаптической камере Б (зеленая кривая) в двух контрольных (а, б) и посттетанической (в) сериях стимуляции. VP_{AB} указывает процент вызванных ответов, переданных от пресинаптической подсети к постсинаптической подсети. Увеличение VP_{AB} после тетанической стимуляции указывает на потенцирование синаптических путей между нейронами в камерах А и Б

ная, интервалы между стимулами — 3 с), подавали серию из 60 стимулов через один электрод, выбранный в камере А. Ответ сети регистрировали в диапазоне 10–600 мс после стимула. Вероятность распространения сетевых пачек из камеры А в камеру Б, вызванных стимулами через электрод в камере А (VP_{AB}), оценивали как процент пачек импульсов, вызванных в камере А и вызвавших пачку импульсов в камере Б, от общего количества вызванных стимулом пачек в камере А. Спонтанно генерируемые пачки импульсов в нестимулируемой камере могут случайно попадать в интервал времени, соответствующий ответу на стимул.

Чтобы проверить гипотезу о том, что наблюдаемые после стимула пачки импульсов в камере Б отражают истинное распространение сетевой активности по направленной связи, а не случайное появление спонтанно генерируемых пачек импульсов в нестимулируемой камере, был проведен анализ с использованием суррогатных данных. Генерировали суррогатные данные пачек в камере Б, в которых сохраняли число пачек, их длительность и интервалы между пачками, как в исходных данных. Затем вычисляли количество импульсов после стимула (от 10 до 600 мс) в 20-мс интервалах. Если в исходных данных количество импульсов в камере Б после стимула в 20-мс интервалах оказывалось выше, чем среднеквадратическое отклонение, умноженное на 5 в суррогатных данных, считали, что наблюдается распространение сетевой активности по направленной связи.

Для дальнейшего анализа отбирали только такие экспериментальные данные, в которых значения VP_{AB} превышали значения, рассчитанные по суррогатным данным, т.е. выбирали только такие культуры, в кото-

рых наблюдалось распространение пачек импульсов между двумя подсетями.

Результаты

Культуры в микрофлюидном чипе. Микрофлюидные конструкции из ПДМС содержали 8 микроканалов длиной 600 мкм с четырьмя узкими местами по 8 мкм [22]. Высота микроканалов составляла 4,5 мкм, что позволяло проникать в каналы только отросткам нейронов, но не телам клеток (см. рис. 1, б, в). Специальная конструкция была разработана для обеспечения роста нейритов преимущественно в одном направлении от камеры А к камере Б (рис. 1, в). ПДМС-чип совмещали с коммерческими МЭМ таким образом (см. рис. 1, а), чтобы 13 электродов находились в камере А, 24 электрода — на месте каналов и 22 электрода — в камере Б. Схема расположения частей чипа на электродах показана на рис. 1, б и 2, а. Диссоциированные клетки гиппокампа (E18) культивировали в обеих камерах (см. «Материалы и методы»).

Через несколько дней две субпопуляции были связаны нейритами через микроканалы (рис. 2, в). Через 3 нед *in vitro* активность спонтанной сетевой пачки распространялась преимущественно в одном направлении — от камеры А в камеру Б. Электрический бифазный стимул (± 800 мВ, 260 мкс, начиная с положительной фазы) через электрод в камере А инициировал сетевые ответы, которые передавались из камеры А в камеру Б (рис. 2, б, в). Свойства распространения этого сигнала в ответ на стимул использовали в качестве индикатора функционального состояния соединения двух камер.

Экспериментальный протокол состоял из двух контрольных серий низкочастотной стимуляции 3

электродов в камере А (60 стимулов на электрод с интервалом 3 с) для оценки стабильности свойств ответа на стимул и серии низкочастотной стимуляции этих же электродов после тетанической стимуляции (см. рис. 3).

Проросшие через микроканалы аксоны образуют синаптические контакты с ближайшими нейронами в камере Б, поэтому в качестве участков с пре- и постсинаптическими нейронами были выбраны места культуры в области, находящейся в непосредственной близости к микроканалам: в камере А — пресинаптический участок, в камере Б — постсинаптический. При тетанической стимуляции 4 электрода в камере А и 4 электрода в камере Б стимулировали с задержкой 10 мс. Первой стимулировали камеру А (см. «Материалы и методы»), чтобы индуцировать пластичность STDP в возбуждающих синапсах клеток гиппокампа [23, 24].

Потенцирование. Количество стимулов, вызвавших ответ в виде сетевой пачки импульсов, рассчитывалось отдельно для камер А и Б. Мы оценивали вероятность распространения VP_{AB} как процент пачек импульсов, вызванных в камере-источнике, в свою очередь вызвавших пачку импульсов в камере-приемнике, от общего количества вызванных стимулом пачек в камере-источнике. Этот параметр указывает на эффективность передачи биоэлектрического сигнала между пре- и постсинаптическими субпопуляциями нервных клеток.

VP_{AB} оценивали независимо для каждого стимулирующего электрода. Обнаружено, что VP_{AB} для одного из стимулирующих электродов в двух сериях контрольной стимуляции и после тетанической стимуляции составлял 90,2; 83,7 и 96,7% соответственно. Другими словами, спонтанное изменение составило 7,3% (разница между VP_{AB} второй и первой контрольной стимуляций), в то время как индуцированное изменение

было весьма значительным — 15,5% (разница между VP_{AB} после высокочастотной стимуляции и VP_{AB} во второй контрольной стимуляции). Пример индуцированных изменений показан на рис. 4. Высокочастотная тетаническая стимуляция индуцировала потенцирование функциональных связей между двумя подсетями. Такой эффект усиления связи ожидался после применения протокола стимуляции сначала пресинаптических нейронов, затем постсинаптических согласно эффекту STDP [23].

Депрессия. В экспериментах на других культурах мы обнаружили депрессию синаптических путей, величина VP_{AB} ответов на стимулы в камере А уменьшилась после тетанической стимуляции (рис. 5). В двух сериях контрольной стимуляции и после тетанической стимуляции она составила 47,37; 49,21 и 29,51% соответственно. Другими словами, спонтанное изменение составило 3,9% (разница между второй и первой контрольной стимуляцией), индуцированное изменение — 40,0% (разница между ответами после высокочастотной стимуляции и второй контрольной стимуляции).

Лишь в одной из 5 культур наблюдалось увеличение значения VP_{AB} после высокочастотной стимуляции, что говорит о потенциации связи (рис. 6). В трех культурах наблюдалось уменьшение значения VP_{AB} . Еще в одной культуре для всех стимулирующих электродов спонтанные колебания VP_{AB} были соразмерны с изменениями VP_{AB} после высокочастотной стимуляции.

Типы ответов нейронной сети на стимулы. В ходе анализа было обнаружено, что ответные реакции на стимул состоят из двух разных типов активности в зависимости от общего числа импульсов в вызванных пачках (рис. 7). Такая сетевая активность с двумя типами пачек обнаруживалась отдельно в камерах А и Б. Мы разделили ответы на два кластера — большие и малые ответы, используя алгоритм

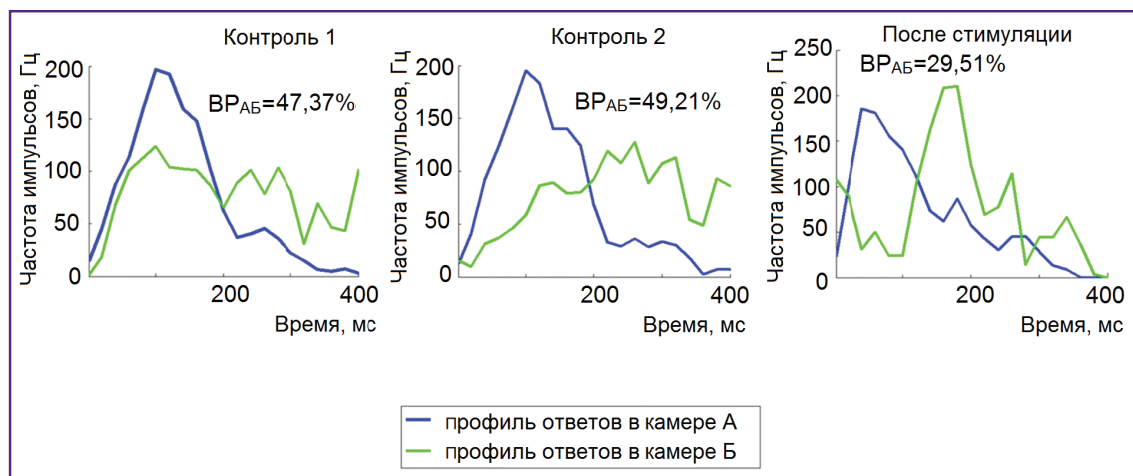


Рис. 5. Пример депрессии после тетанической стимуляции на пресинаптические и постсинаптические нейроны в сети; значение VP_{AB} значительно уменьшилось только после тетанической стимуляции

Рис. 6. Влияние высокочастотной стимуляции двух популяций клеток с задержкой 10 мс на вероятность распространения сетевых пачек импульсов, вызванных низкочастотными стимулами, между двумя связанными популяциями нервных клеток. Одной точке соответствует один стимулирующий электрод в камере А (всего 11 электродов, 5 культур). Красной линией отмечены значения, при которых спонтанное колебание BP_{AB} равно изменению BP_{AB} после высокочастотной стимуляции

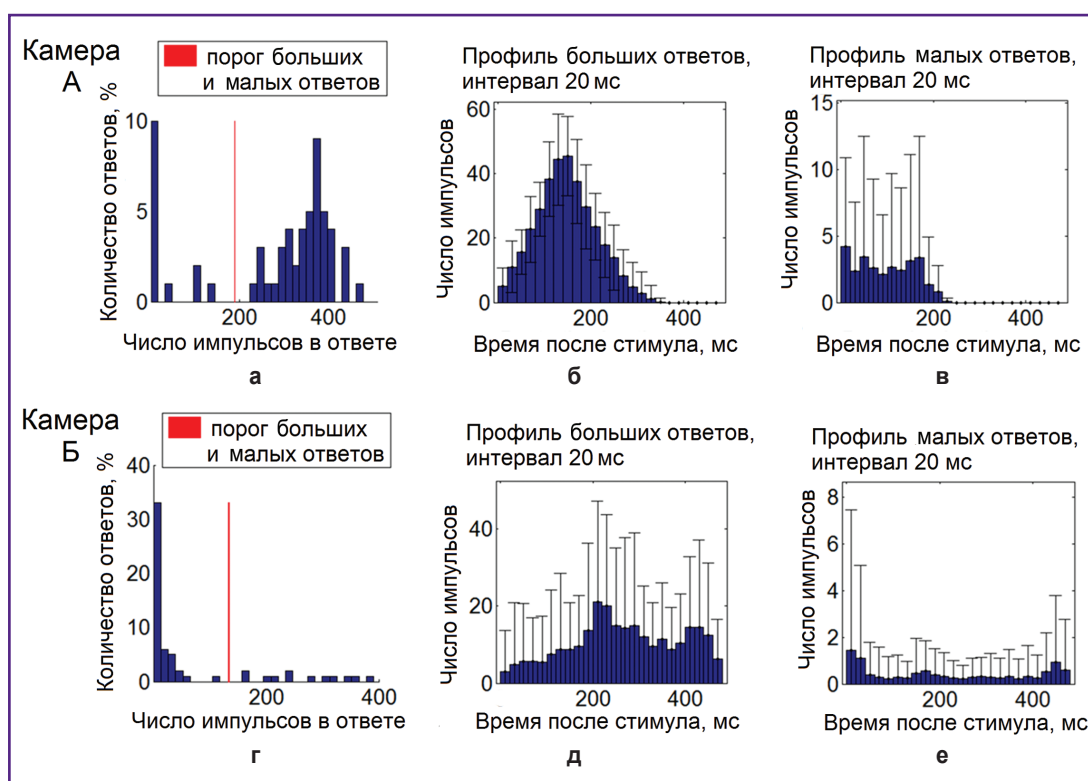
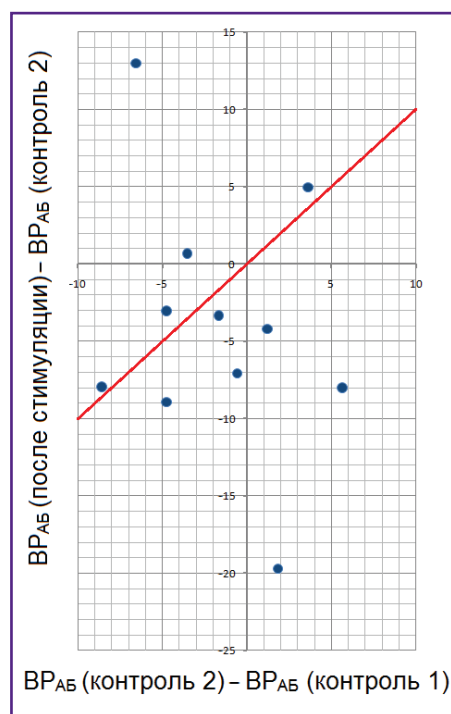


Рис. 7. Два типа ответов в культивируемой нейронной сети на низкочастотные стимулы через выбранный электрод, расположенный в камере А:

а — распределение ответов на стимулы в камере А в зависимости от общего количества импульсов в ответе; красная линия показывает порог для определения больших и малых ответов; б — гистограммы сетевой активности после стимула для больших ответов сети в камере А (PSTH А); в — PSTH А для малых ответов; г — распределение ответов на стимулы в камере Б в зависимости от общего количества импульсов в ответе; красная линия показывает порог для определения больших и малых ответов; д — гистограммы сетевой активности после стимула для больших ответов сети в камере Б (PSTH Б); е — PSTH Б для малых ответов

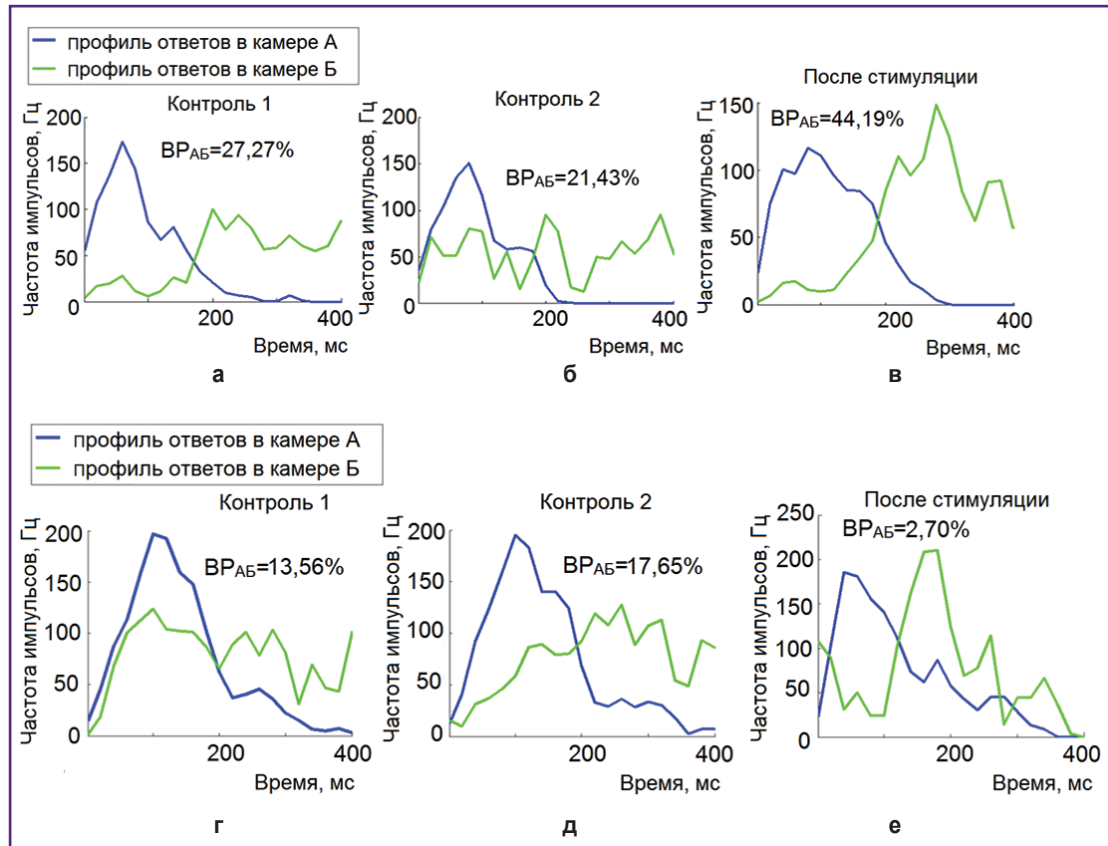


Рис. 8. Разделение вызванных пачек на кластеры больших ответов (а–в) и малых ответов (г–е): профили ответов на стимул в пресинаптической камере выделены синим цветом, а в постсинаптической камере — зеленым цветом; диаграммы а, б, г, д представляют собой ответы после двух серий контрольной стимуляции, а диаграммы в, е — ответы после тетанической стимуляции

кластеризации К-средних. Анализ был выполнен для каждой подсети в камерах А и Б (рис. 7, а–в и г–е). Примечательно, что два типа ответов (см. рис. 7, б и в, д и е) существенно отличались по профилю частоты импульсов (количество импульсов в каждом 20-мс интервале времени).

Далее мы проанализировали, как различные типы ответов (большие и малые) отражают изменения в сети (пластичность), вызванные высокочастотной тетанической стимуляцией, на примере культур, где наблюдалось увеличение и уменьшение значений VP_{AB} . Для больших ответов значения VP_{AB} в течение первых двух контрольных серий стимуляции и после тетанической стимуляции составили 27,27; 21,43 и 44,19%. Другими словами, спонтанное изменение вероятности распространения вызванной пачки между камерами (разница между первой и второй контрольной стимуляцией) составило 21,42%, а вызванное высокочастотной стимуляцией изменение (разница между ответами после высокочастотной стимуляции и второй контрольной стимуляцией) — 106% для больших ответов. Значения VP_{AB} для малых ответов составили 0 и 22,2% в контрольных сериях стимуляции и 33,3% — после высокочастотной стимуляции. Такие

данные рассматривались нами как нестабильная активность, по которой невозможно судить об эффекте. Сравнение VP_{AB} больших и малых ответов в отдельных камерах приведено на рис. 8.

Обсуждение. В работе предложен новый метод изучения синаптической пластичности в диссоциированной культивируемой нейронной сети, выращенной на микроэлектродной матрице с разработанным микрофлюидным чипом. Такой чип состоит из двух камер, соединенных специальными микроканалами, которые способствуют росту аксонов между камерами в одностороннем направлении, обеспечивают определенный контроль над синаптическими путями в культуре. Эффекты синаптической пластичности на сетевом уровне ранее изучались в нейрональных культурах с однородной архитектурой синаптической сети [9, 10]. Мы с этой целью использовали ранее разработанный метод и технологию для выращивания аксональных ветвей между двумя культурами нейронов гиппокампа через микроканалы [22] и теперь впервые представляем метод исследования синаптической пластичности в гетерогенной структуре сети с определенным расположением пресинаптических и постсинаптических нейронов (см. рис. 1, а).

Для исследования синаптической пластичности мы применили тетаническую стимуляцию с задержкой 10 мс для двух групп электродов в камерах А и Б в соответствии с протоколом индукции пластичности STDP [23, 24]. Обнаружено, что характеристики индуцированного стимулом распространения сетевой пачки между пре- и постсинаптическими популяциями нейронов значительно изменяются после высокочастотной тетанической стимуляции с задержкой в 10 мс (см. рис. 5–8). В одной культуре из пяти используемых стимуляция индуцировала потенцирование синаптических путей в микроканалах, что приводило к увеличению вероятности распространения пачек импульсов между камерами. Удивительно, но в других трех культурах мы обнаружили эффект депрессии, вызванной стимулом активности после тетанической стимуляции. Наблюдавшиеся в экспериментах случаи уменьшения вероятности распространения сетевого сигнала между популяциями предположительно могут быть связаны с тем, что часть нейронов в культуре клеток гиппокампа — тормозные (10–20%) [25, 26]. При стимуляции связей тормозных нейронов с задержкой ± 10 мс наблюдается увеличение тормозного эффекта [27]. Также ослабление функциональной связи может быть вызвано истощением запаса медиаторов после высокочастотной стимуляции или свойством гомеостатической пластичности.

Данные эксперименты показали эффективность применения разработанной экспериментальной модели для вызова функциональных изменений в культивируемой нейронной сети.

Заключение. Предложенный экспериментальный метод изучения синаптической пластичности обеспечивает надежный контроль морфологии культивируемой сети с целью индуцирования зависящей от времени импульса пластичности. Такой подход может быть использован для изучения сетевых эффектов синаптической пластичности в процессах памяти, обучения, обработки информации и восстановления нервной ткани в головном мозге.

Благодарность. Авторы благодарят Евгения Малышева за его ценный вклад в разработку микрофлюидных чипов, изготовление мастер-формы, оптимизацию методологии и обсуждение результатов исследования.

Финансирование исследования. Работа поддержана грантом Президента РФ (МК-8731.2016.4).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Marom S., Shahaf G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. *Q Rev Biophys* 2002; 35(01): 63–87, <https://doi.org/10.1017/s0033583501003742>.
2. 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; 5(1): e8871, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008871>.
3. Pimashkin A., Gladkov A., Mukhina I., Kazantsev V. Adaptive enhancement of learning protocol in hippocampal cultured networks grown on multielectrode arrays. *Front Neural Circuits* 2013; 7: 87, <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00087>.
4. Li Y., Zhou W., Li X., Zeng S., Luo Q. Dynamics of learning in cultured neuronal networks with antagonists of glutamate receptors. *Biophys J* 2007; 93(12): 4151–4158, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.111153>.
5. Bologna L.L., Nieuws T., Tedesco M., Chiappalone M., Benfenati F., Martinoia S. Low-frequency stimulation enhances burst activity in cortical cultures during development. *Neuroscience* 2010; 165(3): 692–704, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.018>.
6. Brewer G.J., Boehler M.D., Ide A.N., Wheeler B.C. Chronic electrical stimulation of cultured hippocampal networks increases spontaneous spike rates. *J Neurosci Methods* 2009; 184(1): 104–109, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.07.031>.
7. Jimbo Y., Robinson H.P.C., Kawana A. Strengthening of synchronized activity by tetanic stimulation in cortical cultures: application of planar electrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng* 1998; 45(11): 1297–1304, <https://doi.org/10.1109/10.725326>.
8. Jimbo Y., Tateno T., Robinson H.P.C. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophys J* 1999; 76(2): 670–678, [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(99\)77234-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(99)77234-6).
9. Wagenaar D.A., Pine J., Potter S.M. Searching for plasticity in dissociated cortical cultures on multi-electrode arrays. *J Negat Results Biomed* 2006; 5(1): 16, <https://doi.org/10.1186/1477-5751-5-16>.
10. Chiappalone M., Massobrio P., Martinoia S. Network plasticity in cortical assemblies. *Eur J Neurosci* 2008; 28(1): 221–237, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06259.x>.
11. Chiappalone M., Bove M., Vato A., Tedesco M., Martinoia S. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res* 2006; 1093(1): 41–53, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.049>.
12. Feber J. le, Rutten W.L.C., Stegenga J., Wolters P.S., Ramakers G.J.A., Pelt J. van. Conditional firing probabilities in cultured neuronal networks: a stable underlying structure in widely varying spontaneous activity patterns. *J Neural Eng* 2007; 4(2): 54–67, <https://doi.org/10.1088/1741-2560/4/2/006>.
13. Taylor A.M., Blurton-Jones M., Rhee S.W., Cribbs D.H., Cotman C.W., Jeon N.L. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2005; 2(8): 599–605, <https://doi.org/10.1038/nmeth777>.
14. Kanagasabapathi T.T., Ciliberti D., Martinoia S., Wadman W.J., Decré M.M. Dual-compartment neurofluidic system for electrophysiological measurements in physically segregated and functionally connected neuronal cell culture. *Front Neuroeng* 2011; 4: 13, <https://doi.org/10.3389/fneng.2011.00013>.
15. Takayama Y., Kotake N., Haga T., Suzuki T., Mabuchi K. Formation of one-way-structured cultured neuronal networks in microfluidic devices combining with micropatterning techniques. *J Biosci Bioeng* 2012; 114(1): 92–95, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.02.011>.
16. Bisio M., Bosca A., Pasquale V., Berdondini L., Chiappalone M. Emergence of bursting activity in connected

neuronal sub-populations. *PLoS One* 2014; 9(9): e107400, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107400>.

17. Le Feber J., Postma W., de Weerd E., Weusthof M., Rutten W.L.C. Barbed channels enhance unidirectional connectivity between neuronal networks cultured on multi electrode arrays. *Front Neurosci* 2015; 9: 412, <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00412>.

18. Pan L., Alagapan S., Franca E., Leondopoulos S.S., DeMarse T.B., Brewer G.J., Wheeler B.C. An in vitro method to manipulate the direction and functional strength between neural populations. *Front Neural Circuits* 2015; 9: 32, <https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00032>.

19. Yoshizumi Y., Honegger T., Berton K., Suzuki H., Peyrade D. Micromotors: trajectory control of self-propelled micromotors using AC electrokinetics (Small 42/2015). *Small* 2015; 11(42): 5629–5629, <https://doi.org/10.1002/smll.201570255>.

20. Habibey R., Golabchi A., Latifi S., Difato F., Blau A. A microchannel device tailored to laser axotomy and long-term microelectrode array electrophysiology of functional regeneration. *Lab Chip* 2015; 15(24): 4578–4590, <https://doi.org/10.1039/c5lc01027f>.

21. 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, <https://doi.org/10.3389/fncom.2011.00046>.

22. Malishev E., Pimashkin A., Gladkov A., Pigareva Y.,

Bukatin A., Kazantsev V., Mukhina I., Dubina M. Microfluidic device for unidirectional axon growth. *J Phys Condens Matter* 2015; 643: 01202, <https://doi.org/10.1088/1742-6596/643/1/012025>.

23. Bi G.Q., Poo M.M. Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 1998; 18(24): 10464–10472.

24. Debanne D., Gähwiler B.H., Thompson S.M. Asynchronous pre- and postsynaptic activity induces associative long-term depression in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(3): 1148–1152, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1148>.

25. Woodin M.A., Ganguly K., Poo M. Coincident pre- and postsynaptic activity modifies gabaergic synapses by postsynaptic changes in Cl⁻ transporter activity. *Neuron* 2003; 39(5): 807–820, [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00507-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00507-5).

26. Chen X., Dzakpasu R. Observed network dynamics from altering the balance between excitatory and inhibitory neurons in cultured networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2010; 82(3): 031907, <https://doi.org/10.1103/physreve.82.031907>.

27. Jinno S., Kosaka T. Stereological estimation of numerical densities of glutamatergic principal neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus* 2010; 20(7): 829–840, <https://doi.org/10.1002/hipo.20685>.