

МУЛЬТИЭЛЕКТРОДНЫЕ МАТРИЦЫ — НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ИССЛЕДОВАНИИ ПЛАСТИЧНОСТИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТИ

УДК 612.821.6/8.25:621.38

Поступила 2.06.2009 г.



И.В. Мухина*, д.м.н., профессор, зав. ЦНИЛ НИИ ПФМ и кафедрой нормальной физиологии¹;

В.Б. Казанцев, д. ф.-м. н., руководитель лаборатории нелинейной динамики²;

Л.Г. Хаспеков, д.б.н., руководитель лаборатории нейрцитологии;³

Ю.Н. Захаров, к. ф.-м. н., доцент кафедры общей физики⁴;

М.В. Ведунова, к.б.н., научный сотрудник ЦНИЛ НИИ ПФМ¹;

Е.В. Митрошина, младший научный сотрудник НИИ ПФМ¹;

С.А. Коротченко, студент¹;

Е.А. Корягина, студент¹

¹ Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород;

² Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород;

³ Научный центр неврологии РАМН, Москва;

⁴ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

English

Multielectrode matrices — new possibilities in investigation of the neuronal network plasticity

I.V. Mukhina, MD, professor, head of the applied and fundamental medicine (AFM) SRI CSRL and a normal physiology chair¹;

V.B. Kazantsev, PhD, head of the nonlinear dynamics laboratory²;

L.G. Khaspekov, BD, head of the neurocytology laboratory³;

Yu.N. Zakharov, c. phm. s., assistant professor of a general physics chair⁴;

M.V. Vedunova, c.b.s., scientific worker¹;

E.V. Mitroshina, junior scientific worker of the AFM SRI¹;

S.A. Korotchenko, student¹;

E.A. Koryagina, student¹

¹Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod;

²The RAS applied physics Institute, N. Novgorod;

³The RAMS scientific center of neurology, Moscow;

⁴The N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod state university, N. Novgorod

Investigation is dedicated to important problem of the brain neuronal network plasticity mechanism revealing. One of the key moments for that problem solution is a possibility of the functional process noninvasive monitoring in brain at life from a molecular and cellular level to a systemic organization level. Such a possibility is realized in multielectrode systems, used in neurophysiology and characterized by many advantages: a cellular noninvasiveness; a possibility of a simultaneous registration of signals and the cell stimulation; a chronic experiment

* Мухина Ирина Васильевна, тел. раб. 8(831)465-53-06; e-mail: muchinaiv@mail.ru

(months); a possibility of pharmacologic manipulations, including a medicinal screening; a structural and functional neurovisualization at life. A combination of the cell culture with a multielectrode system of registration and a stimulation of the neuron activity permit to simulate in dynamics the different stages of the neuronal chain development. An alteration of that activity pattern, the mechanisms of which are still not clear, takes place depending on a culture age, the cultivation conditions and pharmacologic effects.

The aim of investigation is a study of the hippocamp neuron spontaneous bioelectrical activity appearance conditions in vitro depending on time of development and the cell density in culture.

Materials and methods. The experiments are made on dissociated cultures of the mouse embryo hippocamp embryonal cells (E18). A combination of the MED64 neuron activity extracellular registration multielectrode system (Alpha MED Sciences, Japan) with the methods of the intracellular calcium alteration visualization at life with a use of a fluorescent stain Oregon Green 488 WARTA-1 and a laser scanning confocal microscope Zeiss LSM510 NLO Duoscan has permitted to investigate in dynamics the different stages of the neuronal network development.

Results. It is established, that a functional activity of culture, registered both at extracellular electrodes MED64 and with a use of a confocal microscopy (the calcic oscillations) compared to the morphologic imaging investigation data, is actually an indicator of forming in a process of the active neuroglial network cultivation. An appearance of the neuron spontaneous activity in a network depends on age and density of the hippocamp cell culture.

Key words: dissociated multielectrode matrices, culture of hippocamp, plasticity of neuronal network.

Успешным экспериментальным исследованиям механизмов, лежащих в основе процессов формирования функциональных свойств и пластичности центральных нейронов, в последние десятилетия способствовало использование лазерной сканирующей конфокальной микроскопии для регистрации ионных токов в нейронах и глиальных клетках *in vitro* в сочетании с неинвазивными мультиэлектродными методами отведения биоэлектрической активности и электростимуляции культивируемых нейронов.

Применение метода мультиэлектродной регистрации потенциалов в нейронных сетях имеет почти 30-летнюю историю. В 1972 г. Thomas с соавторами опубликовали первую статью об использовании мультиэлектродной матрицы, содержащей 15 электродов с площадью каждого 7 мкм², расположенных на расстоянии 100 мкм друг от друга, для регистрации электрической активности нейронов в культуре клеток заднего рога спинного мозга крысы [1]. Позднее Pine (1980) удалось зарегистрировать потенциалы амплитудой около 50 мкВ у единичных нейронов в одно- и трехнедельной культуре, а также стимулировать их импульсами с амплитудой 0,5 В и длительностью 1 мс [2]. Wheeler and Novak (1986) использовали 32-электродную матрицу для регистрации электрической активности в срезе гиппокампа [3]. Этими же авторами было показано распространение эпилептиформной активности вдоль среза гиппокампа со скоростью 0,250 м/с. В 1989 г. Regehr and Pine создали 61-электродную матрицу, основа которой состояла из тонкого стекла и поэтому позволяла изучать структуру нейронных сетей и тканей в инвертированном микроскопе [4]. В 1991 г. Chien and Pine использовали мультиэлектродную матрицу Pine lab MEA для регистрации постсинаптических потенциалов при одновременном оптическом имиджинге (voltage-sensitive dye recording) [5]. В конце 1990-х годов группа японских ученых под руководством Kawana и Taketani создали 64-электродную матрицу для экспериментов с диссоциированными культурами нейронов и срезами гиппокампа [6]. Преимуществами применения мультиэлектродных

матриц в электрофизиологических экспериментах являются: клеточная неинвазивность; возможность одновременной регистрации сигналов и стимуляции клеток; изучение сетевой нейрофизиологии; хронический эксперимент (месяцы); возможность фармакологических манипуляций, в том числе лекарственный скрининг; прижизненная структурная и функциональная нейровизуализация. Культура нейронов может быть использована для изучения на клеточном и сетевом уровне таких свойств нервной системы, как научение и память [7, 8]. Совмещение культуры клеток с мультиэлектродной системой регистрации и стимуляции активности нейронов позволяет моделировать в динамике различные стадии развития нейронных цепей. Через несколько дней в культуре клеток мозга возникают синаптические связи, формирующие нейронную цепь, о чем свидетельствует появление спонтанной биоэлектрической активности. В зависимости от возраста культуры, условий культивирования, фармакологических воздействий происходит изменение паттерна этой активности [9—12], механизмы которого остаются до сих пор не выясненными.

Экспериментальные данные могут стать основой для проверки существующих теоретических гипотез и математических моделей работы нейронных сетей, что расширяет представления о пластичности ткани мозга и формировании функциональных систем, направленных на достижение адаптивного результата. Кроме того, культивирование клеток различных структур головного мозга на мультиэлектродной матрице дает уникальную возможность исследования изменений морфофункциональных свойств живых нейронов в хроническом эксперименте и поиска соединений, оказывающих нейропротекторный эффект при моделировании различных патологических состояний ЦНС.

Одним из многообещающих направлений получения фундаментальных результатов является использование культур диссоциированных клеток мозга для искусственного формирования нейронной сети, сигналы которой используются в качест-

ве биологической модели мозга — робота-анимата. Современные экспериментальные образцы гибридных нейроэлектронных систем представляют собой диссоциированную культуру нейрональных клеток, объединенную с электромеханическим устройством или его виртуальной моделью. Поведение нейроанимата определяется активностью клеток культуры, преобразуемой в управляющие сигналы для эффекторной электромеханической части. Обратная связь с окружающей средой, необходимая для контроля динамики поведения, реализуется посредством трансляции информации, поступающей от сенсоров, в воздействия на нейроны.

Цель исследования — изучить условия возникновения спонтанной биоэлектрической активности нейронов гиппокампа *in vitro* в зависимости от времени развития и плотности клеток в культуре.

Материалы и методы. Мультиэлектродная система MED64 (Alpha MED Sciences, Япония) представляет собой электрофизиологический комплекс, состоящий из зонда MED-P5155, усилителя и соединяющего устройства. Зонд имеет стеклянное основание $50 \times 50 \times 0,7$ мм с центральной цилиндрической камерой диаметром 22 мм и высотой 5 мм (рис. 1, а), в центре которой на площади 1 мм^2 расположена 64-электродная матрица (рис. 1, б) для записи спонтанной активности и электрической стимуляции. Квадратные микроэлектроды (рис. 1, в) состоят из прозрачного оксида олова (ITO, 0,15 мкм), покрытого черной платиной, и имеют размер каждой стороны 50 мкм. Межэлектродное расстояние в матрице составляет 100 мкм. Изолирующее покрытие полиакриламид покрывает дно зонда пленкой толщиной 1,4 мкм. На рис. 1, г видны культивируемые клетки,

образующие монослой на поверхности матрицы, в том числе и на электродах.

В исследовании использованы культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов белых беспородных мышей. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, указанным в приказе Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации». Диссоциирование клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0,25% трипсином (Invitrogen 25200-056). Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде Neurobasal™ (Invitrogen 21103-049) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen 17504-044), глутамином (Invitrogen 25030-024), эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко K055) [13] и культивировали на мультиэлектродной матрице системы MED64 в течение 28 сут *in vitro*. Предварительно матрицу стерилизовали УФ-облучением и обрабатывали полиэтиленимином (Sigma P 3143), служившим опорным субстратом для клеток, плотность которых была различной: 200, 600 и 1200 кл./мм^2 . Поддержание жизнеспособности культуры осуществлялось в условиях CO_2 -инкубатора при температуре $35,5^\circ\text{C}$ и газовой смеси 95% O_2 и 5% CO_2 . Смена культуральной среды происходила через сутки после посадки на матрицу и далее 1 раз в двое суток. Регистрация спонтанной активности осуществлялась при стабильных параметрах (температура, влажность, содержание CO_2 и O_2) окружающей среды. Для получения и анализа данных использовался набор программного обеспечения Conductor™ (Alpha MED Sciences, Япония), а также пакет прикладных программ Matlab.

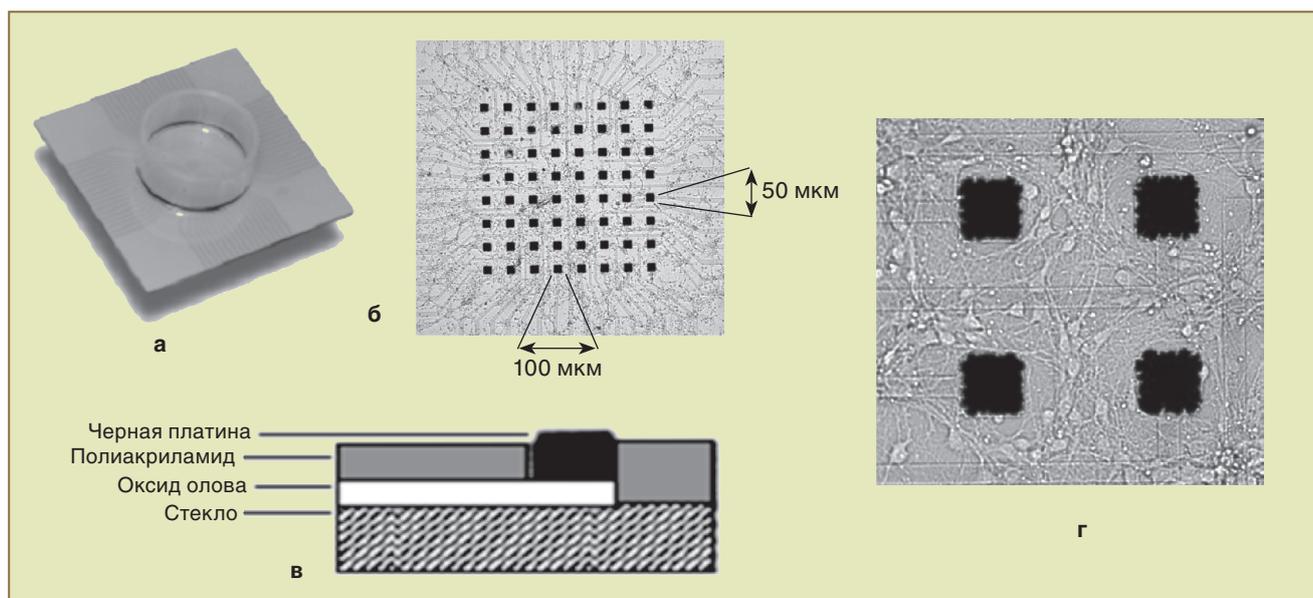


Рис. 1. Строение мультиэлектродной системы MED64 (Alpha MED Sciences, Япония): а — стеклянное основание; б — мультиэлектродная матрица; в — внеклеточный электрод; г — микрофотография культуры диссоциированных клеток гиппокампа (5 сут *in vitro*, 600 кл./мм^2) на поверхности мультиэлектродной матрицы, полученная в фазовом контрасте с помощью инвертированного микроскопа Leica DMIL HC

Для имиджинговых исследований спонтанных кальциевых осцилляций, отражающих состояние кальциевого гомеостаза клеток, формирующих *in vitro* нейроглиальную сеть, использовался лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 510 NLO DuoScan. В качестве флуоресцентных зондов использовали специфический кальциевый краситель Oregon Green 488 BAPTA-1, возбуждаемый линией излучения аргонового лазера с длиной волны 488 нм (полоса пропускания фильтра фотоприемника — 500—530 нм) и Ca^{2+} -нечувствительный краситель Sulforhodamine 101 (SR101), возбуждаемый излучением гелиево-неонового лазера 543 нм (полоса пропускания фильтра фотоприемника — 650—710 нм), селективно маркирующий глиальные клетки [14]. Таким образом, осуществлялось разделение каналов регистрации флуоресценции красителей Oregon Green 488 BAPTA-1 и Sulforhodamine 101. Кальциевые осцилляции в нейронах и глии измерялись по изменению интенсивности флуоресценции Oregon Green 488 BAPTA-1 относительно среднего базового уровня ($\Delta F/F$).

Результаты и обсуждение. На 3—5-е сутки *in vitro* в культуре диссоциированных клеток гиппо-

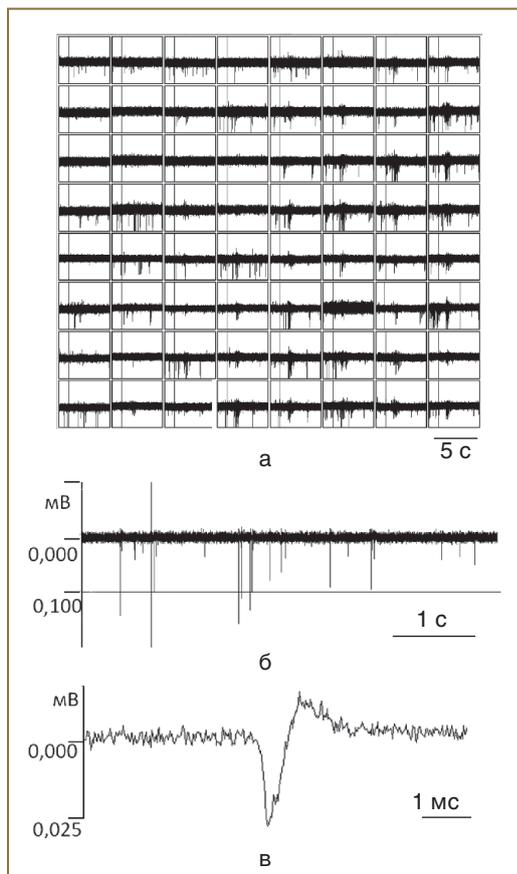


Рис. 2. Спонтанная активность нейронов: а — фрагмент записи, регистрируемой одновременно со всех 64 микроэлектродов в культуре клеток гиппокампа на матрице MED64 (Alpha MED Sciences, Япония), 5-е сутки *in vitro*; б — регистрируемая с одного микроэлектрода; в — одиночный спайк (внеклеточный потенциал)

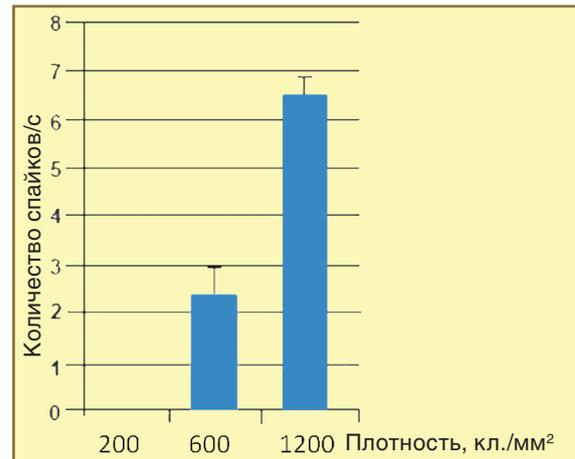


Рис. 3. Зависимость спонтанной активности нейронов гиппокампа от плотности клеток в культуре, 5-е сутки *in vitro*

кампа регистрировалась спонтанная активность нейронов в виде единичных спайков (внеклеточных потенциалов) длительностью 1,0—1,5 мс и амплитудой $25,0 \pm 2,4$ мкВ (рис. 2).

Средняя частота появления одиночных спайков зависела от плотности клеток в культуре (рис. 3).

Появление сравнительно редких некоррелированных между собой спонтанных спайков вызвано, вероятно, различными шумовыми возмущениями. Несмотря на случайный характер событий, их генерация носит пороговый характер и возникает только на определенном этапе развития культуры.

Развитие клеточных процессов (в частности, рост дендритов и аксона) приводит к увеличению эффективной площади, с которой клетка может получать сигналы, в частности внеклеточные шумовые возмущения. Интеграция таких возмущений на определенном этапе приводит к возможности генерации спонтанных потенциалов действия и, как следствие, наблюдаемых внеклеточных спайков. Динамика случайных (некоррелированных) спайков в культуре иллюстрируется на рис. 4 по фрагменту одной из записей внеклеточных потенциалов.

Дальнейшее развитие культуры гиппокампа обусловлено формированием межнейронных связей и появлением сетевой (коррелированной) активности. Такая активность в общем случае должна характеризоваться появлением функциональных взаимосвязей (синхронизации) между разрядами, регистрируемыми на различных внеклеточных электродах. Для внеклеточной активности в культурах типично возникновение так называемой сетевой пачечной активности — высокочастотных последовательностей спайков, возникающих на сравнительно больших временных интервалах [15]. Такие разряды синхронно возникают на различных электродах и состоят из нескольких спайков со сравнительно коротким интервалом следования (1—50 мс). Сетевая пачечная активность — моментальная пространственно-временная последова-

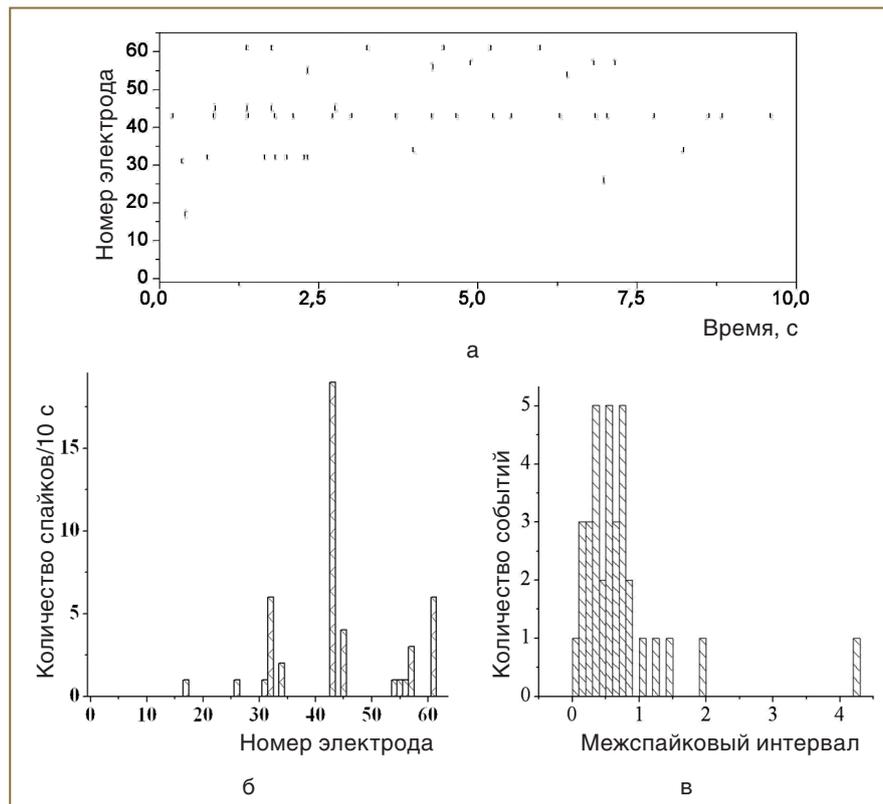


Рис. 4. Активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа мышиных эмбрионов, 7-е сутки *in vitro*; а — растровая диаграмма активности электродов; б — число спайков на электрод, в — распределение межспайковых интервалов случайных событий

тельность спайков одного или нескольких нейронов, детектируемая на внеклеточных электродах с короткими межспайковыми интервалами (рис. 5).

Пачка внеклеточно регистрируемых спайков

характеризуется следующими признаками:

количество спайков в пачке — не менее 4;

межспайковый интервал — не более 100 мс (частота более 10 Гц);

наличие пространственной и временной синхронизации пачечной активности в нейрональной сети.

Режим сетевой пачечной активности иллюстрируется на рис. 6. Число событий, регистрируемых на электродах, существенно возрастает (рис. 6, б), что свидетельствует об активации достаточно большого числа клеток сети.

Наличие взаимосвязи активности на различных электродах иллюстрирует растровая диаграмма, где видны три синхронизованных участка пачечной активности (рис. 6, а). Характерный интервал следования пачек составляет 2—3 с (рис. 5, в). Отметим, что синхронизация отдельных спайков внутри пачки, длящаяся 1—1,5 с, отсутствует, а активность представляет собой спайковые последовательности.

Такие последовательности можно трактовать как передачу возбуждения между элементами сформированной в культуре нейронной сети и, как следствие, возникновение коррелированных спайков в различных ее участках, ре-

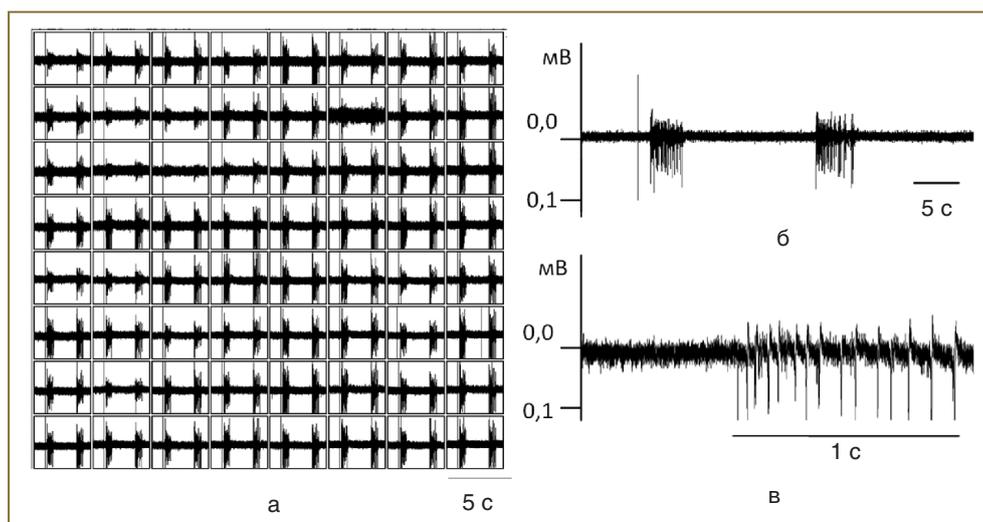


Рис. 5. Активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа мышиных эмбрионов, 9-е сутки *in vitro*: а — спонтанная активность нейронов, регистрируемая одновременно со всех 64 микроэлектродов в культуре клеток гиппокампа на матрице MED64 (Alpha MED Sciences, Япония); б — спонтанная пачечная активность, регистрируемая с одного микроэлектрода; в — одиночная пачка, зарегистрированная с одного электрода

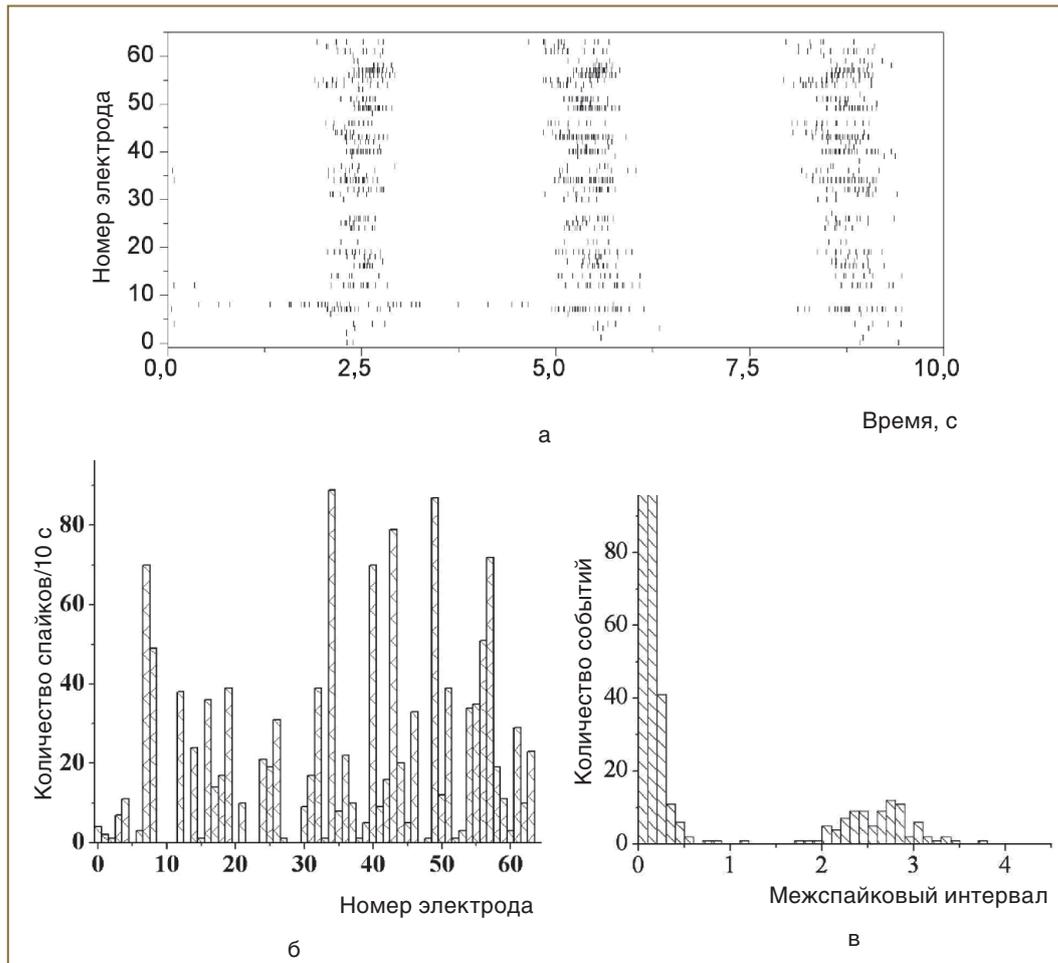


Рис. 6. Активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа мышиных эмбрионов, 9-е сутки *in vitro*: а — ратровая диаграмма сетевой пачечной активности; б — число спайков на электрод; в — распределение межспайковых интервалов случайных событий

гистрируемых на различных электродах. Отметим также, что спайковые паттерны в пределах пачки являются в определенном смысле самоподдерживающимися. Другими словами, в течение сравнительно длительного интервала времени (1—2 с) спайковые возбуждения «циркулируют» по сети без специфического воздействия извне и при отсутствии пейсмекерных клеток. Этот факт также свидетельствует о присутствии в культуре диссоциированных клеток гиппокампа с определенного этапа развития нейросетевой архитектуры с наличием активных межнейронных взаимодействий.

Параллельная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия выявила в процессе культивирования нарастающую динамику формирования *de novo* дендритных шипиков и зрелых синаптических межнейронных связей. Кроме того, начиная с 9-х суток *in vitro* были выявлены спонтанные кальциевые осцилляции, проявляющиеся в изменении интенсивности флуоресценции Oregon Green 488 BAPTA-1, которые свидетельствуют об активном функциональном состоянии нейроглиальной сети культивируемых клеток. На рис. 7 дана иллюстра-

ция записи флуоресценции клеток культуры гиппокампа на 9-е сутки развития *in vitro*. На изображении первого канала регистрации (рис. 7, а) отображены глиальные клетки, отмеченные SR 101. На изображении второго канала (рис. 7, б) видны все клетки, содержащие свободные ионы кальция. На суммарном изображении (рис. 7, в) зеленый цвет соответствует Ca^{2+} -активным нейронам, а желтый — Ca^{2+} -активной глие.

На верхних графиках рис. 7, г, д представлены зависимости относительной интенсивности флуоресценции Oregon Green 488 BAPTA-1($\Delta F/F$) от времени для нейрона (г) и астроцита (д). На соответствующих нижних графиках более подробно выделен фрагмент записи с 240-й по 300-ю с, показывающий различие форм Ca^{2+} -сигналов в нейронах и астроцитах. Медленные Ca^{2+} -осцилляции длительностью $11,0 \pm 0,5$ с, генерируемые нейронами (рис. 7, г), вероятно, в ответ на накопление глутамата в межклеточном внесинаптическом пространстве вследствие пачечной электрической активности следовали с частотой 0,5—1 мин⁻¹, $\Delta F/F$ для нейронов составляла 17—20%. У глиальных клеток

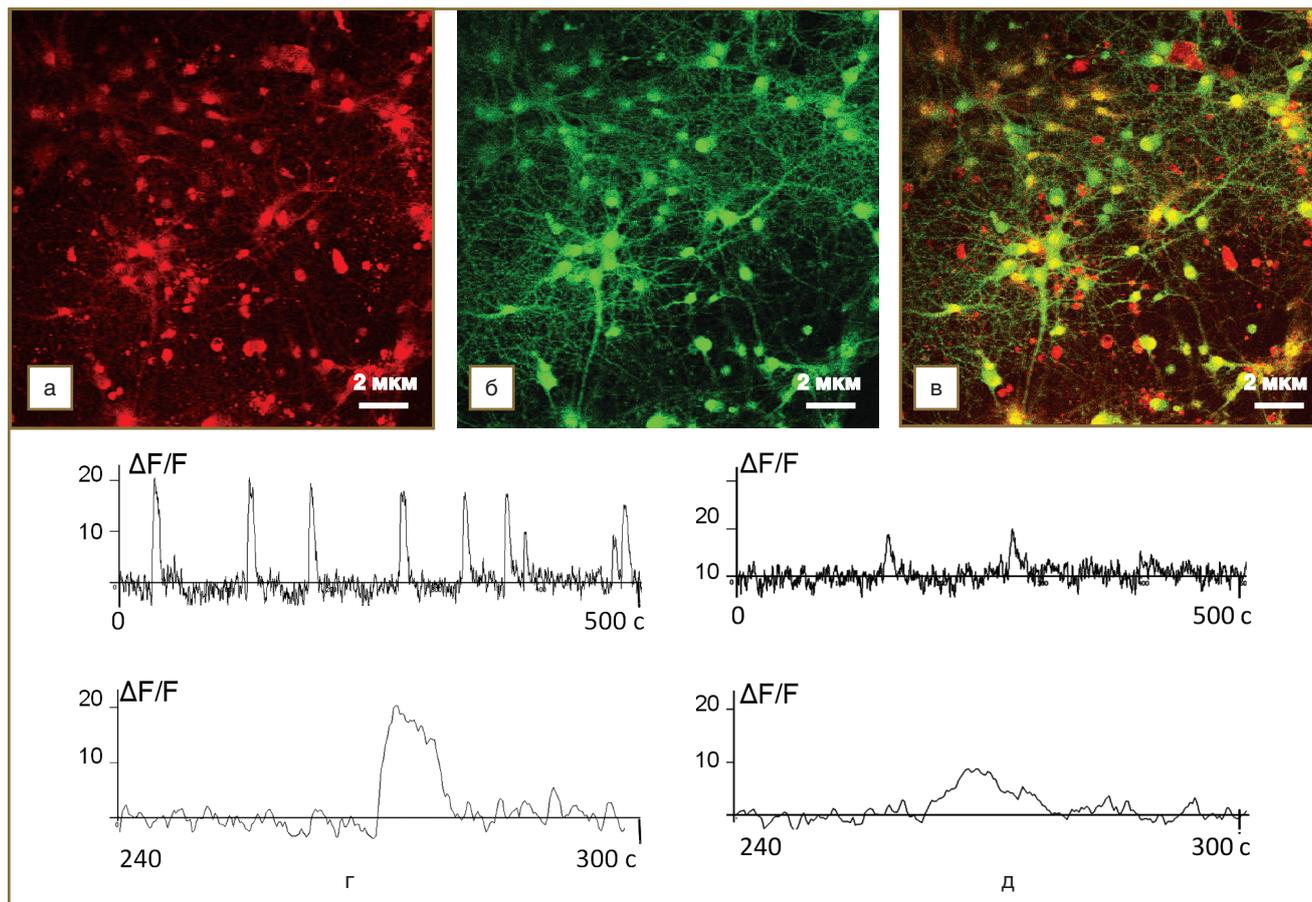


Рис. 7. Спонтанные кальциевые осцилляции в культуре клеток гиппокампа, 9-е сутки *in vitro*. Изображены каналы регистрации флуоресценции SR 101 (а), Oregon Green 488 BAPTA-1 (б) и суммарного изображения (в); г, д — характерные записи спонтанной кальциевой активности нейрона и астроцита соответственно. По оси ординат — относительная интенсивность флуоресценции красителя Oregon Green 488 BAPTA-1

$\Delta F/F$ составляла 7—10%, а осцилляции длительностью $18,0 \pm 0,37$ с следовали с частотой 0,5—0,8 мин⁻¹ (рис. 7, д). Синхронизация между спонтанной кальциевой активностью у нервных и глиальных клеток отсутствовала.

Заключение. Функциональная активность культуры, регистрируемая как на внеклеточных электродах MED64, так и с помощью конфокальной микроскопии (кальциевые осцилляции), в сопоставлении с данными морфологического имиджингового исследования, является фактически индикатором формирования в процессе культивирования активной нейроглиальной сети.

Впоследствии под действием повторяющихся стимулов (например, с определенных стимулирующих электродов MED64) сеть будет способна эволюционировать как морфологически, так и в плане нейропластических изменений в направлении формирования простейших функциональных систем, «целью» которых будет адаптация к заданным модельным условиям стимуляции. Культуры клеток, полученные в этой системе, могут быть использованы для исследования изменений морфофункциональных свойств нейронов при действии ишеми-

ческих и нейродегенеративных патогенетических факторов в хроническом эксперименте, а также для тестирования новых нейропротекторов.

Работа поддержана грантами РФФИ (08-02-00724, 08-04-97109, 08-04-12213), Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и аналитической ведомственной целевой программой «Развитие научного потенциала высшей школы (2009—2010 годы)», Министерством образования и науки РФ.

Литература

1. Thomas C.A., Springer P.A., Loeb G.E., Berwald-Netter Y., Okun L.M. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp Cell Res* 1972; 74: 61—66.
2. Pine J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J Neurosci Meth* 1980; 2: 19—31.
3. Wheeler B.C., Novak J.L. Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation. *IEEE Trans Biomed Eng* 1986; 33: 1204—1212.
4. Regehr W.G., Pine J., Cohan C.S., Mischke M.D., Tank

- D.W.* Sealing cultured neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. *J Neurosci Meth* 1989; 30: 91—106.
5. *Chien C.B., Pine J.* Voltage-sensitive dye recording of action potentials and synaptic potentials from sympathetic microcultures. *Biophys J* 1991; 60: 697—711.
 6. *Kamioka H., Jimbo Y., Charley P.J., Kawana A.* Planar electrode arrays for long-term measurement of neuronal firing in cultured cortical slices. *Cellular Eng* 1997; 2: 148—153.
 7. *Thomas C.A., Springer P.A., Loeb G.E., Berwald-Netter Y., Okun L.M.* A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp Cell Res* 1972; 74: 61—66.
 8. *Li Y., Zhou W., Li X., Zeng S., Liu M., Luo Q.* Characterization of synchronized bursts in cultured hippocampal neuronal networks with learning training on microelectrode arrays. *Biosens Bioelectron* 2007; 22: 2976—2982.
 9. *Boehler M., Wheeler B.C., Brewer G.J.* Added astroglia promotes greater synapse density and higher activity in neuronal networks. *Neuron Glia Biology* 2007; 3: 127—140.
 10. *Xiang G., Pan L., Huang L., Yu Z., Cheng J., Xing W., Zhou Y.* Microelectrode array-based system for neuropharmacological applications with cortical neurons cultured in vitro. *Biosens Bioelectron* 2007; 22: 2478—2484.
 11. *Rolston J.D., Wagenaar D.A., Potter S.M.* Precisely timed spatio-temporal patterns of neural activity in dissociated cortical culture. *Neuroscience* 2007; 148: 294—303.
 12. *Bakkum D.J., Chao Z.C., Potter S.M.* Spatio-temporal electrical stimuli shape behavior of an embodied cortical network in a goal-directed learning task. *J Neural Eng* 2008; 5(3): 310—323.
 13. *Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K., Price P.J.* Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 1993; 35: 567—576.
 14. *Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Kerr J.N., Helmchen F.* Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 2004; 1 (1): 31—37.
 15. *Wagenaar D.A., Madhavan R., Pine J., Potter S.M.* Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *J Neurosci* 2005; 25: 680—688.