

Новые технологии в экспериментальной нейробиологии: нейронные сети на мультиэлектродной матрице

И.В. Мухина, Л.Г. Хаспеков

Нижегородская Государственная медицинская академия (Нижний Новгород);
Научный центр неврологии РАМН (Москва)

Мультиэлектродная система (Multielectrode Arrays, или MEA система), регистрирующая in vitro нейронную активность в самоорганизующейся, функционально гетерогенной нейронной сети культивируемых клеток ЦНС, является новой уникальной технологией для выяснения закономерностей формирования межнейронных связей, а также исследования механизмов нейродеструктивных процессов и поиска способов их фармакологической коррекции. Основным преимуществом применения MEA систем в электрофизиологических экспериментах является возможность длительной (в течение месяцев) неинвазивной регистрации сигналов и стимуляции культивируемых клеток мозга, в сочетании с прижизненной структурной и функциональной визуализацией ионных токов в нейронах и глимальных клетках in vitro с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Культивирование ткани и клеток мозга на MEA системах позволяет в хроническом эксперименте тестировать соединения, оказывающие нейротоксический и нейропротекторный эффект. Большой объем и хорошая воспроизводимость получаемых результатов, а также возможность их количественной оценки позволяют отнести нейронные сети, культивируемые на MEA системах, к биосенсорам, с помощью которых можно проводить эффективный фармакологический скрининг при моделировании in vitro различных форм нейродегенеративных заболеваний, таких, как ишемия, травма, эпилепсия, болезнь Альцгеймера и др.

Ключевые слова: мультиэлектродные матрицы, культуры ткани и клеток мозга, нейронные сети *in vitro*, биосенсор, ишемия, травма, эпилепсия, болезнь Альцгеймера

Функционирование нейронных сетей является основой запоминания и хранения информации в ЦНС, что в конечном счете определяет формирование сознания. Изучение динамических процессов в нейронных сетях, так же как и их реакций на фармакологические воздействия, представляет собой одно из важных фундаментальных научных направлений в современной экспериментальной и практической неврологии.

При выборе способа исследования нарушенных функций нервной системы следует учитывать, что функциональные свойства нейронных сетей *in vivo* и *in vitro* обладают высокой степенью сходства. Общепринятая нейробиологическая методика «пэтч-кламп» (метод фиксации мембранного потенциала) подходит для тестирования соединений, воздействующих на одиночную и известную мишень – ионный канал. Срезы мозга наиболее пригодны для кратковременных исследований и наименее – для длительных экспериментов и общего скрининга токсических соединений. В то же время длительно культивируемые многоклеточные нейронные ансамбли могут использоваться для скрининга, основанного на применении спонтанно активных и самоорганизующихся сложных сетей с межнейронными связями, функционирующими в течение многих месяцев [17, 18].

В последние годы в исследованиях функциональных свойств и пластичности нейронных сетей в норме и патологии все более широкое распространение получают контактные мультиэлектродные методы внеклеточного отведения биоэлектрической активности и электростимуляции с применением мультиэлектродных матриц (*multielectrode array system, или MEA системы*).

В начале 70-х годов прошлого века были опубликованы первые статьи об использовании MEA систем для регистрации электрической активности нейронов в культуре нервных клеток [49] и ткани [46]. Позднее 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 [35]. Для регистрации электрической активности в срезе гиппокампа была применена 32-электродная матрица [56]. Этими же авторами было показано распространение эпилептиформной активности вдоль среза гиппокампа со скоростью 0,250 м/с. В 1989 г. была предложена 61-электродная матрица, основа которой состояла из тонкого стекла, что позволяло изучать структуру нейронных сетей и тканей в инвертированном микроскопе [40]. В 1991 г. MEA систему использовали для регистрации постсинаптических потенциалов при одновременном оптическом имиджинге (*voltage-sensitive dye recording*) [13]. В конце 1990-х годов группа японских ученых создала 64-электродную матрицу для экспериментов с диссоциированными культурами нейронов, а также срезами и эксплантатами гиппокампа [26].

Культивирование ткани и клеток различных структур мозга на MEA системах позволяет не только исследовать изменения морфофункциональных свойств живых нейронов в хроническом эксперименте, но и тестировать соединения, оказывающие нейротоксический и нейропротекторный эффект при моделировании различных патологических состояний ЦНС. Сформированные на мультиэлектродной матрице сети нейронов, выделенные из развивающихся структур ЦНС и культивируемые в течение длительного времени, обладают спонтанной активностью,

генерируя как одиночные спайки, так и их пачки. Эти сети представляют собой стабильные нейробиологические структуры, проявляющие на упрощенном уровне основные функциональные свойства нервной системы, что дает уникальную возможность проведения экспериментальных нейрофармакологических исследований. Основным преимуществом применения MEA систем является возможность длительной (в течение месяцев) неинвазивной регистрации сигналов и стимуляции культивируемых клеток мозга и проведение с ними фармакологических манипуляций, в том числе лекарственного скрининга. При этом появляется возможность одновременно вести прижизненную структурную и функциональную визуализацию с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, регистрирующей ионные токи в нейронах и глиальных клетках *in vitro* [48].

Для изготовления мультиэлектродных матриц в MEA системе используется фотолитографическая техника, распространенная в полупроводниковой индустрии. В стеклянное основание маленькой чашки Петри вмонтирована матрица, содержащая от 60 до 256 электродов (рис. 1). Постоянно контактируя с клетками на поверхности матрицы и не повреждая их, микроэлектроды неинвазивно осуществляют длительный мониторинг биоэлектрической активности в различных участках нейронной сети. Для культивирования используются как диссоциированные клетки, так и эксплантаты различных структур ЦНС.

Нейронные сети, культивируемые на MEA системах, будучи высокочувствительными к добавляемым в питательную среду нейроактивным соединениям, трансформируют их воздействие в регистрируемые паттерны спайковой активности гистотипически, т.е. характер их реакции зависит от типа структуры мозга, из ткани которой они приготовлены, а значит, и от набора в ней клеточных рецепторов. Таким образом, эти сети представляют собой своеобразные биологические сенсоры и могут использоваться для исследования свойств и особенностей фармакологического дей-

ствия новых нейроактивных соединений при моделировании *in vitro* различных форм патологии ЦНС [19, 27].

Диссоциированные и органотипические культуры ткани гиппокампа, коры, мозжечка, спинного мозга, культивируемые на MEA системах, в настоящее время широко используются для изучения эффектов нейромедиаторов и антагонистов их рецепторов, межклеточных регуляторов синаптической передачи, нейротоксинов и многих других биологически активных веществ [12, 57]. Например, печечная и спайковая активность нейронной сети может модулироваться специфическими агонистами, действующими на ионотропные глутаматергические рецепторы, что дает возможность исследовать вклад NMDA- и не-NMDA-рецепторов в спонтанную активность нейронной сети при аппликации низких концентраций различных фармакологических агентов, специфически влияющих на глутаматергические синапсы. В частности, активация высокоаффинных NMDA-рецепторов низкими, микромолярными концентрациями NMDA вызывает изменения в следовании печечных разрядов. Эти изменения коррелируются с эффектами глутаматергической передачи, опосредуемыми высвобождением нейромедиатора. При длительном культивировании к шестой неделе *in vitro* число спайков значительно возрастает и печечные разряды трансформируются из синхронизованных спайков в неупорядоченные. Ингибирование GABA-рецепторов биккукулином вызывает синхронизацию пачек во всех активных участках сети. Таким образом, тормозные GABA-нейроны ингибируют чрезмерную генерацию спонтанной активности главным образом на ранних стадиях развития, а позднее, по мере созревания сети, стабилизируют печечные разряды. Непрерывная длительная регистрация активности нейронов дает возможность выявить ответы нейронной сети на фармакологические воздействия в процессе ее развития.

MEA система позволяет также отличить необратимые повреждения нейронов, приводящие к их гибели, от функциональной нейротоксичности, которая сопровождается

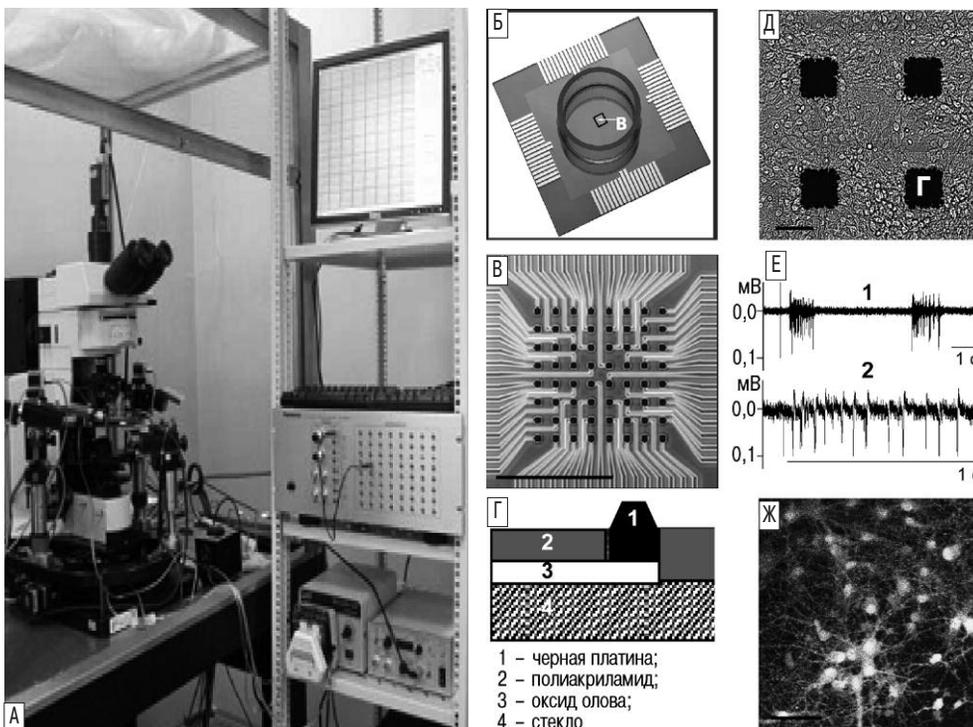


рис. 1: Мультиэлектродная система (Alpha MED Sciences, Japan) на основе 64-электродной матрицы в составе исследовательского комплекса

А – исследовательский комплекс, включающий микроскоп Olympus BX51WI, мультиэлектродную систему и системы регистрации и электростимуляции; Б – мультиэлектродная система со стеклянным основанием; В – мультиэлектродная матрица, содержащая 64 микроэлектрода (черные точки); Г – конструкция микроэлектрода; Д–Ж – культура клеток гиппокампа (20 дней *in vitro*) на поверхности мультиэлектродной матрицы [1]; Д – микрофотография в фазовом контрасте; Е – спонтанная печечная активность (1) и одиночная пачка (2), зарегистрированные с одного микроэлектрода; Ж – суммарное изображение каналов флуоресценции сульфорадомина 101 (маркер глии) и Oregon Green 488 BAPTA-1 (маркер внутриклеточного кальция) при регистрации кальциевых осцилляций на лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 510 NLO DuoScan. Масштаб 1 мм (В), 50 мкм (Д, Ж).
Примечание: цветную версию рис. 1X см. на обложке

либо обратимой блокадой пре- и постсинаптических механизмов синаптической передачи, либо изменением распространения потенциала действия. Нервная ткань генерирует паттерны электрической активности, являющиеся проявлением ее физиологической функции, и любое их изменение, вызываемое токсическим воздействием, может служить функциональным, специфическим для нейронов и достаточно точным признаком нейротоксичности [19]. Нарушение этих паттернов токсическими агентами может приводить к функциональным изменениям, наблюдаемым ранее любых других изменений. Однако прекращение электрической активности, даже если оно не сопровождается повреждением клеток (функциональная нейротоксичность), чревато гибелью всего организма [16]. Это состояние можно исследовать путем анализа тех или иных нарушений функциональных взаимодействий внутри многоклеточной нейронной сети, которые воспроизводятся именно в первичных культурах нейронов [4], поскольку перманентные нейрональные клеточные линии (опухоли) либо не обладают достаточной электрической активностью, либо не образуют функциональных сетей.

Обнаружены *in vivo* и *in vitro* типичные нормальные паттерны сетевой электрической активности и их изменения под влиянием различных потенциально нейротоксических соединений с хорошо известным механизмом действия, таких как наркотики, седативные средства, анестетики, анальгетики, опиоиды и другие рецепторные агонисты и антагонисты, а также блокаторы ионных каналов и аксонального транспорта [31].

Расширению перспективы исследований пластичности нейронных сетей с помощью МЭА технологий способствует предпринятое в последние годы культивирование на матрицах нейральных стволовых прогениторных клеток животных [5, 23, 24, 34] и человека [20, 37, 38], которое обнаружило способность этих клеток к самообновлению и дифференциации в функциональные нейронные сети, генерирующие спонтанную электрическую активность с разнообразными паттернами импульсных разрядов. Синхронизованные пачки импульсов в сетях нейронов животных и человека сходны между собой, регистрируются на протяжении четырех и более месяцев *in vitro* и специфически модулируются антагонистами NMDA-, AMPA- и GABAА-рецепторов, что указывает на формирование в сети функционирующих возбуждающих и тормозных синапсов.

Для количественной характеристики состояния нейронной сети используется ряд воспроизводимых параметров, таких как, общая активность (интенсивность спайков и пачек), активность самих пачек (их амплитуда), синхронизация пачек и спайков во времени, осцилляции и регулярность их воспроизведения, форма пачек и их внутренняя структура [8]. Используя эти параметры, каждое из исследуемых соединений можно охарактеризовать на основе его способности к подавлению активности, изменению характера пачек и их ритмичности, возбудимости нейронов и обратимости оказываемого эффекта [7, 43].

Экспериментальное исследование механизмов цитотоксического повреждения нейронов на биологических моделях, культивируемых на МЭА системе, способствует, с одной стороны, раскрытию этих механизмов, а с другой – поиску новых терапевтических подходов к лечению различных форм патологии ЦНС, в частности, таких, как ишемия, травма, эпилепсия, болезнь Альцгеймера.

Ишемия

Моделирование ишемии *in vitro* направлено на исследование воздействия различных ее факторов (эксайтотоксичности глутамата, глюкозной депривации, окислительного стресса, гипоксии, ацидоза и др.) на функциональную активность и жизнеспособность культивируемых клеток. Органотипическая культура гиппокампа на мультиэлектродной матрице использовалась в исследовании нейротоксичности агонистов глутаматных рецепторов и защитного эффекта их антагонистов [44]. Хроническое воздействие агонистов глутаматных рецепторов, NMDA (10 мкМ) и AMPA (1 мкМ), вызывало в течение 3 ч быстрое уменьшение амплитуды синаптических ответов нейронов, соответственно, на 85 и 55%, а через 24 ч после воздействия – на 90 и 75%, но не сопровождалось необратимым повреждением нейронов и поэтому могло быть следствием длительной деполяризации. Устранение агонистов почти полностью восстанавливало исходный уровень синаптической активности после их 40-минутного воздействия и частично – после 24-часового воздействия, после которого степень уменьшения амплитуды ответов нейронов в поле CA1 прямо коррелировала со снижением их вызываемости. Таким образом, низкие концентрации агонистов глутаматных рецепторов, не оказывающие быстрого нейротоксического эффекта, вызывают длительную деполяризацию, которая может быть важным фактором последующей гибели нейронов. Неконкурентные антагонисты NMDA-рецепторов, МК801 и мемантин, препятствовали как изменениям синаптических ответов под влиянием NMDA и AMPA, так и их нейротоксичности.

Использование нейронной сети, образованной на МЭА системе диссоциированными клетками гиппокампа, позволило исследовать влияние длительной кислородно-глюкозной депривации (КГД) на синаптическую активность [54]. КГД в течение 3 мин вызвала значительное возрастание частоты спайков, которая через 30 с возвращалась к исходному уровню. Тетродотоксин полностью блокировал генерацию спайков. Эти данные указывают, что самым ранним проявлением КГД является быстрое и преходящее усиление импульсной активности, которое может быть обусловлено ускоренной спонтанной реализацией глутамата.

Исследовано влияние альдолазы С (АльдС), специфического фермента, накапливающегося в цереброспинальной жидкости пациентов с инсультом, на нейронную сеть, сформированную на МЭА системе клетками новой коры крысиных эмбрионов [30]. При кратковременном воздействии низких концентраций АльдС (1 мкМ) происходило быстрое и обратимое снижение частоты спонтанных ритмических разрядов, а при воздействии 10 мкМ в течение 20 мин их генерация почти полностью и также обратимо прекращалась. Ингибирующее влияние АльдС на формирование потенциалов действия нейронной сети *in vitro* указывает на вероятность участия этого белка в патофизиологических механизмах инсульта, при котором он может высвободиться из ишемического очага ткани мозга, достигая во внеклеточном пространстве концентрации 30 мкМ и более, и отрицательно влияя на функциональное состояние нейронов, сохранившихся в зоне, окружающей ишемический очаг (пенумбре).

Травматическое повреждение нервной ткани

Травму центральных нейронов в культуре клеток новой коры моделировали на деформируемой матрице, конструкция которой позволяла путем кратковременного механического растяжения опорного субстрата вызывать резкое повышение ионной проницаемости цитоплазматических мембран нейронов, приводившее к последующему повреждению значительной части нейронной популяции [39]. Наиболее характерная реакция нейронной сети заключалась в быстром и вариабельном увеличении интервалов между пачками спайков, что отражало нарушение спонтанной синхронизованной активности, во многом сходное с электрофизиологическими показателями *in vivo* после травмы мозга. О важной роли нарушения проницаемости цитоплазматических мембран в изменениях спонтанной активности нейронной сети на МЕА системе свидетельствует их сходство с изменениями, наблюдаемыми при действии ионофоров, повышающем проницаемость мембран к катионам.

Возможности исследования механизмов нейротравмы расширяют длительное культивирование органотипических эксплантатов нервной ткани на поверхности матрицы, деформируемой растяжением, параметры которого могут строго контролироваться. При этом регистрация активности и стимуляция одного и того же участка эксплантата, а также компьютерный анализ результатов возможны в автоматическом режиме до, во время и после его механического повреждения [59, 60]. Сразу после повреждения в течение примерно 20 с возникали интенсивные спонтанные синхронизованные пачки импульсов, отсутствовавшие ранее, которые в течение дальнейших 3 мин сменялись редкими одиночными синхронизованными спайками, исчезающими в течение последующих девяти дней. Наряду с этим количество возбудимых нейронов в эксплантате в течение двух недель после травмы прогрессивно снижалось.

Для защиты мозга от травматического повреждения при хирургических вмешательствах часто применяется гипотермия [32]. Использование МЕА системы позволило на клеточном уровне исследовать последствия прямого влияния гипотермии на нейронную сеть. Воздействие температуры, сниженной с 37 °С до 19 °С, на культивируемую сеть нейронов новой коры крысиных эмбрионов сразу же приводило к резкому падению частоты синхронизованных пачечных разрядов и количества спайков в каждой пачке, сохранявшегося на всем протяжении гипотермии (20 ч) и сопровождавшегося постепенным уменьшением длительности пачек и числа спайков в пачке [41]. После гипотермии, несмотря на необратимое повреждение определенной части нейронов, функциональные характеристики нейронной сети возвращались к исходному уровню. Эти результаты служат доказательством способности нейронной сети как целостной системы переживать эффекты охлаждения и указывают на возможность применения данной модели для исследования последствий длительного воздействия на нервную систему низких температур. С другой стороны, ингибирование пачечной сетевой активности *in vitro* во время гипотермии позволяет объяснить результаты экспериментов, согласно которым охлаждение использовалось для прекращения эпилептических судорог у животных и человека [28, 58]. Кроме того, данные, полученные с использованием МЕА системы, указывают на возможность сети поддерживать

свои пространственно-временные паттерны в активном состоянии после ингибирования активности гипотермией, что, по-видимому, отражает на сетевом уровне отсутствие ее пагубного воздействия на сохранение памятных следов. Аналогичные результаты были получены и после более глубокого (до 12 °С) охлаждения нейронной сети, продолжавшегося в течение 1 ч [42].

Эпилепсия

Органотипическая культура ткани мозга, так же как и срезы мозга в остром эксперименте, позволяют воспроизвести синхронизованные эпилептиформные разряды нейронов путем разбалансировки активности нейронной сети блокадой тормозных GABA_A рецепторов [14]. При моделировании эпилепсии в различных участках эксплантата гиппокампа регистрируется пространственно-временная синхронизация активности нейронов. Этот переход между сбалансированной десинхронизованной спайковой и синхронизованной распространяющейся популяционной активностью представляет собой особенный интерес в связи с тем, что отражает начальную фазу развития эпилептических судорог, на которые можно оказывать терапевтическое воздействие до их генерализации.

Эпилептиформная пачечная активность в нейронной сети *in vitro*, аналогичная *status epilepticus* головного мозга *in situ*, индуцируется в срезах гиппокампа 4-аминопиридином или удалением из инкубационной среды ионов магния [21]. С увеличением срока культивирования частота следования пачек возрастает. Антиконвульсанты фелбамат и фенобарбитал уменьшают длительность пачек в поле СА1 гиппокампа и не изменяют ее в поле СА3, что позволяет обнаруживать регионально-специфический эффект этих соединений. Таким образом, мультиэлектродная регистрация одновременно с различных участков среза дает возможность достоверно выявить области гиппокампа, преимущественно вовлеченные в эпилептиформную активность, и идентифицировать пачки импульсов для их последующего количественного анализа, а также тестировать новые антиконвульсанты. К числу последних можно отнести и некоторые фитоканнабиноиды. Один из них, каннабидиол, в той же модели эпилепсии регионально-специфически снижает амплитуду пачек синхронной локальной активности сети, а также длительность пачек и их частоту, а *in vivo* облегчал тяжесть судорог, вызванных пентилентетразолом [25]. Аппликация другого фитоканнабиноида, D9-тетрагидроканнабаварина, как до, так и во время индукции стабильной эпилептиформной активности в срезах периформной коры крыс в безмагниевой среде сокращала число пачек, а также уменьшала амплитуду и частоту пароксизмальных разрядов по механизму, опосредуемому каннабиноидными рецепторами 1-го типа [22].

В патогенезе эпилепсии важную роль играет нарушение синтеза белков семейства синапсинов (Syn 1, 2 и 3). Эти белки вовлечены в ключевые физиологические процессы, происходящие как в возбуждающих, так и в тормозных синапсах, и, таким образом, участвуют в регуляции импульсной активности корковых нейронных сетей. Поэтому мутации генов Syn-белков приводят к нарушениям синаптической передачи и пластическим перестройкам синапсов и могут быть эпилептогенными. Возможно, что это единственные гены белков синаптических пузырьков (СП), с мутациями которых связана эпилепсия у человека [3]. Нейронная сеть клеток новой коры мышей,

нокаутных по гену *Syn1*, позволяет создать модель эпилепсии с непрерывным, в течение длительного времени, исследованием динамики сетевой активности. В культуре от нормальных мышей как спайковая, так и пачечная активность усиливается от очень низкого уровня на ранних стадиях развития (7–10 DIV) до максимального (18–20 DIV), после чего достигает стационарного состояния, при котором генерируются оба типа активности [9, 50, 53]. В сети нейронов нокауты происходит возрастание числа пачек и их длительности, которое становится наиболее выраженным на поздних стадиях развития (31–35 DIV), что сильно отличает параметры ее активности от таковых у нормальных мышей. Гипервозбудимость нейронов нокауты, заметная уже на ранних стадиях развития *in vitro*, подтверждается их непрерывными и длительными пачечными ответами на низкочастотную фокальную электростимуляцию.

При блокаде тормозных синапсов бикукулином в сети нейронов нормальных мышей происходит выраженная синхронизация разрядов с преобладанием пачечной активности, скоплением спайков в пачки и увеличением длительности пачек [11], что приводит к сходу параметров этой активности с параметрами, наблюдаемыми в сети нейронов нокауты. Таким образом, устранение гена белка *Syn1* вызывает диффузную гипервозбудимость в сети корковых нейронов. Такая комплексная разбалансировка функций возбуждающих и тормозных синапсов облегчает появление у животных и человека спонтанных или вызванных стимуляцией эпилептических судорог, обусловленных мутацией гена белка *Syn1*.

Хотя некоторые формы эпилепсии являются врожденными, значительное число случаев этого заболевания имеет известную причину и обозначается как «приобретенная эпилепсия». Одной из таких причин может быть инсульт. Локальное повреждение вследствие инсульта вызывает повышение концентрации внеклеточного глутамата, приводящее к гибели нейронов. В новой системе *in vitro* [47] культивируемые нейроны гиппокампа, подвергнутые кратковременному воздействию глутамата, претерпевают повреждение, сходное с их повреждением при инсульте, при этом в сети переживающих нейронов генерируются спонтанные повторяющиеся разряды эпилептиформного типа. По мере изменений ионной проницаемости мембран нейронов изменения в функциональной организации свойств нейронной сети в этой модели *in vitro*, так же как и в других экспериментальных моделях эпилепсии, приобретают характер, подобный генерации гиперсинхронизованной активности [45]. Импульсная активность нейронов регистрируется в виде популяционных спайков [10, 15, 50, 53]. В первую неделю *in vitro* эта активность характеризуется неупорядоченными всплесками спайков. Через 14–15 дней *in vitro* возникает синхронизованная спонтанная активность, которая отражает активность всей сети (сетевые пачки) и усиливается по мере ее дальнейшего развития [10, 50]. После аппликации глутамата нейронная сеть становится гипервозбудимой и гиперсинхронизованной и генерирует сетевые пачки импульсов с повышенной частотой и измененной топологией пачек. Графическое картирование пачечной активности, позволяющее понять закономерности взаимодействия отдельных нейронов в пачке, проводилось путем анализа последовательности спайков, с использованием кросс-ковариантного метода и теории графов. Этот анализ показал, что распределение параметров активности под действием глутамата трансформируется от экспоненциального к нормальному (гауссовскому).

Болезнь Альцгеймера

При болезни Альцгеймера (БА) тяжесть нарушений памяти и других когнитивных функций прямо коррелирует со степенью накопления в ткани мозга амилоидных β -пептидов (А β П), в частности, А β П₁₋₄₂. В эксперименте А П при введении в структуры ЦНС избирательно блокируют длительную посттетаническую потенциацию (ДПТП), которую считают синаптическим аналогом памяти, и быстро нарушают когнитивные функции. Механизмы, опосредующие дисфункцию синапсов и, возможно, связанную с нею последующую нейродегенерацию при БА, изучены недостаточно. Длительное культивирование сети нейронов новой коры [17] и гиппокампа [6, 51] позволило в хроническом эксперименте провести мультипараметрическое исследование влияния А β П₁₋₄₂ на спонтанную синхронизованную синаптическую активность функциональной нейронной сети. Действие сублетальных (менее 5 мкМ) концентраций А β П₁₋₄₂ вызывало быстрое преходящее ингибирование спонтанных осцилляций нейронной активности. Подавление спайков происходило на фоне снижения пачечной активности и увеличения межспайковых интервалов, причем эффект возник уже при концентрации 10–100 нМ и имел прямую концентрационную зависимость. Преинкубация культур с антителами к А β П₁₋₄₂ полностью устраняла эффект пептида.

Молекулярный механизм подавления активности сети, индуцированного А β П₁₋₄₂, имеет сложную природу. Нейронная сеть в культуре, как и *in vivo*, интегрирует комплексную функцию синапсов, дендритов и аксонов, отражающуюся в сложных формах спайковой и пачечной активности [29]. На клеточном уровне были показаны различные факторы воздействия А β П₁₋₄₂, в том числе оксидативный стресс [55], активация никотиновых ацетилхолиновых рецепторов [36] и усиление NMDA-токов, опосредованное изменениями локализации глутаматных рецепторов [52]. Показано ингибирование спонтанной синаптической активности, вызываемое А β П₁₋₄₂ в результате торможения P/Q-типа кальциевых токов [33]. Быстрый эффект А β П₁₋₄₂ в нейронной сети указывает на прямое участие в нем рецепторных ионных каналов. Кратковременность этого эффекта может быть обусловлена ферментативной нейтрализацией А β П₁₋₄₂ или другими формами его деградации, а также адаптационными механизмами (например, десенситизацией рецепторов). Независимо от того или иного механизма, снижение активности нейронной сети под влиянием А β П₁₋₄₂ может ограничивать в ней динамический контроль передачи сигналов и поэтому нарушать когнитивные процессы *in vivo*. Таким образом, нейронная сеть, образованная клетками новой коры на MEA системе, пригодна для исследования синаптических связей при моделировании БА *in vitro* на очень ранних стадиях ее развития и позволяет в течение длительного времени с помощью различных воздействий выявлять самые первые признаки дисфункции синапсов, а в перспективе – осуществлять подбор соответствующих нейротропных соединений. В качестве одного из таких соединений был испытан куркумин, ингибитор олигомеризации А β П₁₋₄₂ растительного происхождения, который устранял тормозное действие А β П₁₋₄₂ на синаптическую активность [51].

Другим типом культур, позволившим в MEA системе длительно моделировать воздействие патогенетических факторов БА на центральные нейроны, явились органотипические эксплантаты гиппокампа [2]. Возможность вводить

исследуемые соединения в течение длительного времени и вести одновременную регистрацию ответов с различных участков одного и того же эксплантата гиппокампа позволила осуществлять всесторонний анализ изменений синаптической активности с высоким пространственным разрешением. На этой модели, интегрированной с 64 электродами, была получена устойчивая и воспроизводимая ДПТП, индуцированная в поле СА1 высокочастотной стимуляцией коллатералей Шаффера и продолжавшаяся до 48 ч, и исследована синаптическая функция в течение кратковременного (30 мин) и длительного (24 ч) воздействия Аβ₁₋₄₂. Независимо от продолжительности, воздействие не влияло на параметры исходной синаптической активности (амплитуду вызванных ответов, крутизну полевых ВПСП, порог интенсивности как кратковременного, так и длительного стимула). Однако Аβ₁₋₄₂ оказывал ингибирующий эффект на механизмы, опосредующие ДПТП, в той же группе нейронов эксплантата гиппокампа, в которых она была до этого индуцирована. Использование МЕА системы позволило провести пространственный анализ изменения пластичности нейронов по всему эксплантату, получить информацию от множества его участков и одновременно оценить степень индукции в них ДПТП при стимуляции на всем протяжении коллатералей Шаффера. Таким образом, эта система предоставляет уникальную возможность длительно исследовать интенсивность и область индукции ДПТП в эксплантате гиппокампа и ее изменения под влиянием Аβ₁₋₄₂. Отсутствие ДПТП после воздействия Аβ₁₋₄₂ в каждом из нескольких участков поля СА1, контактирующих с электродами, позволяет судить о степени и распространенности вызванных этим пептидом изменений.

Приведенные выше данные, полученные с использованием МЕА системы, свидетельствуют о важной роли нарушения пластических свойств центральных нейронов в патогенезе БА и расширяют перспективу поиска и практического использования нейропротекторных соединений, препятствующих этим нарушениям.

Таким образом, мультиэлектродная система, регистрирующая *in vitro* нейронную активность в самоорганизующейся, функционально гетерогенной сети, содержащей возбуждающие и тормозные нейроны и глиальные клетки, является адекватной модельной системой для исследования многочисленных нейродеструктивных процессов и поиска способов их коррекции. Мультипараметрический анализ электрической и метаболической активности ансамблей нервных клеток позволяет определять механизмы токсического и терапевтического действия нейротропных средств. Большой объем и хорошая воспроизводимость получаемых результатов, а также возможность количественной оценки позволяют отнести нейронные сети к биосенсорам, с помощью которых можно проводить эффективный фармакологический скрининг при моделировании *in vitro* различных форм патологии ЦНС.

Работа поддержана грантами РФФИ (09-04-12254, 09-04-12304, 09-04-97090, 08-04-12213-офи) и аналитической ведомственной целевой программы Министерства образования и науки РФ 2.1.1/6223.

Список литературы

1. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г. и др. Мультиэлектродные матрицы – новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети. *Совр. технол. в медицине* 2009; 1: 6–15.
2. Ahuja T.K., Mielke J.G., Comas T. et al. Hippocampal slice cultures integrated with multi-electrode arrays: a model for study of long-term drug effects on synaptic activity. *Drug Devel. Res.* 2007; 68: 84–93.
3. Baldelli P., Fassio A., Valtorta F., Benfenati F. Lack of synapsin I reduces the readily releasable pool of synaptic vesicles at central inhibitory synapses. *J. Neurosci.* 2007; 27: 13520–13531.
4. Bal-Price A.K., Sunol C., Weiss D.G. et al. Application of *in vitro* neurotoxicity testing for regulatory purposes: Symposium III summary and research needs. *Neurotoxicology* 2008; 29: 520–531.
5. Ban J., Bonifazi P., Pinato G. et al. Embryonic stem cell-derived neurons form functional networks *in vitro*. *Stem Cells* 2007; 25: 738–749.
6. Benilova I., Kuperstein I., Broersen K. et al. MEA neurosensor, the tool for synaptic activity detection: acute amyloid-β oligomers synaptotoxicity study. In: IFMBE Proceedings, O. Dössel and W.C. Schlegel (eds.). Springer, 2009: 314–316.
7. Brette R., Rudolph M., Carnevale T. et al. Simulation of networks of spiking neurons: A review of tools and strategies. *J. Comput. Neurosci.* 2007; 23: 349–398.
8. Chen Y., Guo C., Lim L. et al. Compact microelectrode array system: tool for *in situ* monitoring of drug effects on neurotransmitter release from neural cells. *Anal. Chem.* 2008; 80: 1133–1140.
9. Chiappalone M., Boveb M., Vato A. et al. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during *in vitro* development. *Brain Res.* 2006; 1093: 41–53.
10. Chiappalone M., Novellino A., Vajda I. et al. Burst detection algorithms for the analysis of spatio-temporal patterns in cortical networks of neurons. *Neurocomputing* 2005; 65–66: 653–662.
11. Chiappalone M., Vato A., Berdondini L. et al. Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons. *Int. J. Neur. Syst.* 2007; 17: 87–103.
12. Chiappalone M., Vato A., Tedesco M. et al. Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications. *Biosens. Bioelectr.* 2003; 18: 627–634.
13. Chien C.B., Pine J. Voltage-sensitive dye recording of action potentials and synaptic potentials from sympathetic microcultures. *Biophys. J.* 1991; 60: 697–711.
14. Egert U. Networks on chips: Spatial and temporal activity dynamics of functional networks in brain slices and cardiac tissue. In: BioMEM, G. Urban (ed.), Springer 2006: 309–349.
15. Eytan D., Marom S. Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons. *J. Neurosci.* 2006; 26: 8465–8476.
16. Gopal K.V., Miller B.R., Gross G.W. Acute and sub-chronic functional neurotoxicity of methylphenidate on neural networks *in vitro*. *J. Neural Transm.* 2007; 114: 1365–1375.
17. Gortz P., Opatz J., Siebler M. et al. Transient reduction of spontaneous neuronal network activity by sublethal amyloid β (1–42) peptide concentrations. *Ibid* 2009; 116: 351–355.
18. Gramowski A., Jugelt K., Weiss D.G., Gross G.W. Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19: 2815–2825.

19. Gross G.W., Harsch A., Rhoades B.K., Gopel W. Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses. *Biosens. Bioelectr.* 1997; 12: 373–393.
20. Heikkilä T.J., Ylä-Outinen L., Tanskanen J.M.A. et al. Human embryonic stem cell-derived neuronal cells form spontaneously active neuronal networks in vitro. *Exp. Neurol.* 2009; 218: 109–116.
21. Hill A.J., Jones N.A., Williams C.M. et al. Development of multi-electrode array screening for anticonvulsants in acute rat brain slices. *J. Neurosci. Meth.* 2010; 185: 246–256.
22. Hill A.J., Weston S.E., Jones N.A. D9-Tetrahydrocannabinol suppresses in vitro epileptiform and in vivo seizure activity in adult rats. *Epilepsia* 2010; epub ahead.
23. Illes S., Fleischer W., Siebler M. et al. Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity. *Exp. Neurol.* 2007; 207: 171–176.
24. Illes S., Theiss S., Hartung H.-P. et al. Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations. *BMC Neurosci.* 2009; 10: 93–109.
25. Jones N.A., Hill A.J., Smith I. et al. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *J. Pharm. Exp. Ther.* 2010; 332: 569–577.
26. Kamioka H., Jimbo Y., Charlety P.J., Kawana A. Planar electrode arrays for long-term measurement of neuronal firing in cultured cortical slices. *Cellular Eng.* 1997; 2: 148–153.
27. Kang G., Lee J.-H., Leeb C.-S., Nam Y. Agarose microwell based neuronal micro-circuit arrays on microelectrode arrays for high throughput drug testing. *Lab. Chip.* 2009; 9: 3236–3242.
28. Karkar K.M., Garcia P.A., Bateman L.M. et al. Focal cooling suppresses spontaneous epileptiform activity without changing the cortical motor threshold. *Epilepsia* 2002; 43: 932–935.
29. Keefer E.W., Gramowski A., Gross G.W. NMDA receptor-dependent periodic oscillations in cultured spinal cord networks. *J. Neurophysiol.* 2001; 86: 3030–3042.
30. Linke S., Goertz P., Baader S.L. et al. Aldolase C/Zebulin II is released to the extracellular space after stroke and inhibits the network activity of cortical neurons. *Neurochem. Res.* 2006; 31: 1297–1303.
31. Madhavan R., Chao Z.C., Potter S.M. Plasticity of recurring spatiotemporal activity patterns in cortical networks. *Phys. Biol.* 2007; 4: 181–193.
32. McIntyre A.L., Ferguson A.D., Hebert C.P. et al. Prolonged therapeutic hypothermia after traumatic brain injury in adults: a systematic review. *JAMA* 2003; 22: 2992–2999.
33. Nimmrich V., Grimm C., Draguhn A. et al. Amyloid beta oligomers (A β 1–42) globulomer suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J. Neurosci.* 2008; 28: 788–797.
34. O'Shaughnessy T.J., Liu J.L., Ma W. Passaged neural stem cell-derived neuronal networks for a portable biosensor. *Biosens. Bioelectr.* 2009; 24: 2365–2370.
35. Pine J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J. Neurosci. Meth.* 1980; 2: 19–31.
36. Pettit D.L., Shao Z., Yakel J.L. Beta-amyloid (1–42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J. Neurosci.* 2001; 21: RC120: 1–5.
37. Pizzi R.M.R., Cino G., Gelain F. et al. Learning in human neural networks on microelectrode arrays. *Biosystems* 2007; 88: 1–15.
38. Pizzi R.M.R., Rossetti D., Cino G. et al. A cultured human neural network operates a robotic actuator. *Ibid* 2009; 95: 137–144.
39. Prado G.R., Ross J.D., DeWeerth S.P., LaPlaca M.C. Mechanical trauma induces immediate changes in neuronal network activity. *J. Neural Eng.* 2005; 2: 148–158.
40. Regehr W.G., Pine J., Cohan C.S. et al. Sealing cultured neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. *J. Neurosci. Meth.* 1989; 30: 91–106.
41. Rubinsky L., Raichman N., Baruch I. et al. Study of hypothermia on cultured neuronal networks using multi-electrode arrays. *Ibid* 2007; 160: 288–293.
42. Rubinsky L., Raichman N., Lavee J. Spatio-temporal motifs 'remembered' in neuronal networks following profound hypothermia. *Neural Netw.* 2008; 21: 1232–1237.
43. Ruaro M.E., Bonifazi P., Torre V. Toward the neurocomputer: image processing and pattern recognition with neuronal cultures. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2005; 52: 371–383.
44. Shimono K., Baudry M., Panchenko V., Taketani M. Chronic multi-channel recordings from organotypic hippocampal slice cultures: protection from excitotoxic effects of NMDA by noncompetitive NMDA antagonists. *J. Neurosci. Meth.* 2002; 120: 193–202.
45. Srinivas K.V., Jain R., Saurav S., Sikdar S.K. Small-world network topology of hippocampal neuronal network is lost, in an in vitro glutamate injury model of epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 2007; 25: 3276–3286.
46. Shtrik M.B., Ratushnyak A.S., Voskresenskaya L.V., Olenev S.N. A multielectrode perfusion chamber for tissue culture research. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1974; 78: 1090–1092.
47. Sun D.A., Sombati S., Blair R.E., DeLorenzo R.J. Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an in vitro model of stroke induced epilepsy. *Cell Calcium*, 2004; 35: 155–163.
48. Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y. Spontaneous calcium transients in cultured cortical networks during development. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2009; 56: 2949–2956.
49. Thomas C.A., Springer P.A., Loeb G.E. et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Res.* 1972; 74: 61–66.
50. Van Pelt J., Vajda I., Wolters P.S. et al. Dynamics and plasticity in developing neuronal networks in vitro. *Prog. Brain Res.* 2005; 147: 173–188.
51. Varghese K., Molnar P., Das M. et al. A new target for amyloid beta toxicity validated by standard and high-throughput electrophysiology. *PLoS One* 2010; 5: e8643.
52. Venkitaramani D.V., Chin J., Netzer W.J. et al. Beta-amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity. *J. Neurosci.* 2007; 27: 11832–11837.
53. Wagenaar D.A., Pine J., Potter S.M. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci.* 2006; 7: 11–29.
54. Wahl A.-S., Buchthal B., Rode F. Hypoxic/ischemic conditions induce expression of the putative pro-death gene *C1cl1* via activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci.* 2009; 158: 344–352.
55. Wang Q., Rowan M.J., Anwyl R. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J. Neurosci.* 2004; 24: 6049–6056.
56. 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.
57. Xiang G., Pan L., Huang L. et al. Microelectrode array-based system for neuropharmacological applications with cortical neurons cultured in vitro. *Biosens. Bioelectr.* 2007; 22: 2478–2484.
58. Yang X.F., Chang J.H., Rothman S.M. Long-lasting anticonvulsant effect of focal cooling on experimental neocortical seizures. *Epilepsia* 2003; 44: 1500–1505.
59. Yu Z., Graudejus O., Tsay C. et al. Monitoring hippocampus electrical activity in vitro on an elastically deformable microelectrode array. *J. Neurotrauma* 2009; 26: 1135–1145.
60. Yu Z., Tsay C., Lacour S.P. et al. Stretchable microelectrode arrays – a tool for discovering mechanisms of functional deficits underlying traumatic brain injury and interfacing neurons with neuroprosthetics. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2006; Suppl.: 6732–6735.

New technology in experimental neurobiology: neuronal networks coupled with multielectrode array

I.V. Mukhina, L.G. Khaspekov

*Nizhny Novgorod State Medical Academy (Nizhny Novgorod);
Research Centre of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences (Moscow)*

Key words: multielectrode array, brain cell and tissue cultures, neuronal network *in vitro*, biosensor, drug screening, neurodegenerative disorders

Multielectrode arrays (MEA) as the recording and stimulating system for self-organizing, functionally heterogeneous neuronal network formed by developing CNS cells *in vitro* is a new, unique technology for investigation of mechanisms of pathological neurodestructive processes and for searching the means of their pharmacological corrections. The principal advantages of the MEA are the precise noninvasive long-term network stimulation and measurement of the electric signals, pharmacological testing and drug screening, optical structural and functional imaging of

metabolic ionic current into neurons and glial cells using confocal laser scanning microscopy. The brain cells and tissues coupled *in vitro* with MEA enables neuroprotective and/or neurotoxic drug testing in different models of the central nervous system pathological states. Data-intensive part, good reproducibility and quantitative assessment capability make it possible to relate the neuron networks cultured to the MEA with biosensors, allowing to perform effective pharmacological screening *in vitro* for the models of ischemia, trauma, epilepsy, Alzheimer's disease, etc.

Контактный адрес: Хаспеков Леонид Георгиевич – докт. биол. наук, зав. лабораторией экспериментальной нейробиологии отдела исследований мозга НЦН РАМН. Москва 105064, пер. Обуха, д. 5. Тел./факс: +7 (495) 917-92-63; e-mail: khaspekleon@mail.ru (Москва)

И.В. Мухина – докт. мед. наук, проф., зав. кафедрой нормальной физиологии и ЦНИЛ НИИ прикладной и фундаментальной медицины НижГМА (Нижний Новгород)