

УДК 004.032.26+612.822

А.А. ДЕНИСОВ, П.М. БУЛАЙ, Т.А. КУЛАГОВА, П.Г. МОЛЧАНОВ, Т.Н. ПИТЛИК, С.Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ОТКЛИК БИОЛОГИЧЕСКИХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ НА ВНЕШНИЕ МОДУЛИРУЮЩИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

Functioning of biological neuronal ensembles at the cellular and network levels in conditions of external electrical and chemical modulating influences has been investigated. Multichannel electrical stimulation was shown to induce functional processes associated with neural network learning in neural tissue *in vitro*. Mathematical models were used to establish characteristics of extracellular electrical signals formation and rules of competitive learning in hippocampal neural ensembles. Features of neural and glial cells functioning in conditions of induced pathological states with involvement of reactive oxygen species have been analyzed. New mechanisms of hydrogen peroxide regulatory action associated with adenosine receptors activation have been proposed.

Для получения новых знаний о фундаментальных законах функционирования мозга и эффективного решения биомедицинских задач необходимо как проведение междисциплинарных исследований механизмов функционирования нервной ткани на молекулярном, клеточном, межклеточном, нейросетевом и организменном уровнях, так и разработка новых высокоинформативных методик исследования на основе автоматизированных аппаратных интерфейсных систем и методов численного моделирования биофизических и биохимических механизмов нейроинформационных процессов. Важным методическим условием для решения таких задач является создание новых модельных систем, позволяющих осуществлять мониторинг различных параметров состояния нервной ткани при функциональных и модулирующих внешних воздействиях. Проведение научных исследований в данном направлении перспективно для решения медицинских проблем целенаправленной коррекции нарушенных функций мозга при различных заболеваниях и травмах, а также для более глубокого понимания механизмов памяти и обучения. В рамках развития этого направления нами получены новые данные о функционировании нервных клеток на клеточном, межклеточном и нейросетевом уровнях в условиях внешних воздействий с применением разработанных аппаратных и методических решений.

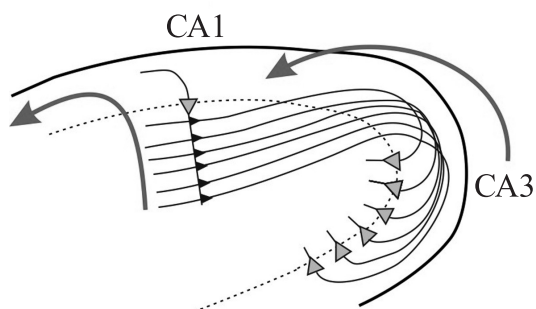


Рис. 1. Схема основных синаптических связей между областями CA1 и CA3 гиппокампа

Основными исследованиями проводили на модельной системе – инкубируемом срезе гиппокампа крысы *in vitro*. Гиппокамп – отдел мозга, играющий важную роль в процессах обучения и памяти [1]. В поперечном срезе гиппокампа с точки зрения нейросетевой структуры четко выделяются слои нейронов (рис. 1). Благодаря возможности ясной интерпретации регистрируемых в области CA1 сигнала-

Основные исследования проводили на модельной системе – инкубируемом срезе гиппокампа крысы

in vitro. Гиппокамп – отдел мозга, играющий важную роль в процессах обучения и памяти [1]. В поперечном срезе гиппокампа с точки зрения нейросетевой структуры четко выделяются слои нейронов (рис. 1). Благодаря возможности ясной интерпретации регистрируемых в области CA1 сигнала-

лов срез гиппокампа используется как при изучении особенностей межнейронных взаимодействий и нейрональной возбудимости, так и для скрининга эффектов нейрофармакологических препаратов.

Уникальными функциональными свойствами нервной ткани являются ее способность к генерации, распространению и межнейронной передаче электрических сигналов посредством синаптических контактов, а также к изменению эффективности синаптической передачи – синаптической пластичности. Одним из основных явлений, связанных с процессами хранения информации в мозге, считается длительная потенциация – форма синаптической пластичности, проявляющаяся в долговременном увеличении синаптической проводимости [2]. Длительная потенциация является формой пластичности, определяемой параметрами электрической активности нейронов. Таким образом, электрическая активация нейронов эндогенного или экзогенного характера выступает фактором, модулирующим состояние нейронной сети. Одна из основных задач при исследовании функционирования нервной ткани – определить, в зависимости от каких параметров и каким образом изменяется синаптическая проводимость при этих процессах, т. е. найти правило обучения и выявить закономерности формирования межнейронных коммуникаций.

В экспериментах со срезами гиппокампа крысы нами установлено, что формирование комплексных спайков в области СА1 при внеклеточной электрической активации пресинаптических аксонов надпороговыми импульсами с частотой 5 Гц и синхронно подпороговыми импульсами сопровождается индуцированием ассоциативной длительной потенции. После развития длительной потенции десинхронизация подпороговых и надпороговых стимулов сопровождается депотенциацией синапсов. Таким образом, получен протокол электрической стимуляции клеток области СА1 гиппокампа крысы, позволяющий индуцировать разнонаправленные изменения синаптической проводимости при небольших вариациях параметров стимулирующих последовательностей. Изучение особенностей индуцирования потенции при различных временных параметрах стимуляции позволило сформулировать правило обучения для области СА1 гиппокампа: при синхронной электрической активации пресинаптических и постсинаптических нейронов на частоте тета-ритма синаптическая проводимость увеличивается при условии формирования комплексных спайков, десинхронизация активации приводит к депотенциации ранее потенцированных синапсов. С применением методов компьютерного моделирования установлено, что сформулированное на основании анализа экспериментальных данных правило обучения обеспечивает синаптическую конкурентность: увеличение проводимости одних групп синапсов сопряжено с уменьшением проводимости других групп, что является условием формирования селективности в нейронных сетях. С использованием разработанного аппаратного комплекса, включающего многоканальный автоматизированный стимулятор электрической активности нейронов и планарный микроэлектродный массив, проведено экспериментальное исследование конкурентных межнейронных взаимодействий. Получено, что при многоканальной стимуляции случайными последовательностями импульсов происходит потенциация синапсов с наибольшей проводимостью и депотенциация синапсов с наименьшей проводимостью. Данные эффекты являются свидетельством существования конкурентных синаптических взаимодействий в области СА1 гиппокампа.

В настоящее время окислительный стресс рассматривается как один из наиболее значительных факторов патогенеза различных заболеваний, в том числе и нейродегенеративных. Известно, что, помимо токсического действия, активные формы кислорода (АФК) могут выполнять сигнальную функцию из-за наличия в клетках редоксзависимых сигнальных путей [3]. Показано, что в центральной нервной системе АФК участвуют в регуляции функциональной активности нервных клеток [4]. Основными механизмами редоксрегуляции функциональной активности нейронов являются: сдвиг трансмембранного потенциала и изменение параметров генерируемых электрических сигналов в результате модификации ионного гомеостаза нейронов; модификация кальциевого гомеостаза нейронов, взаимодействие редоксзависимых и кальцийзависимых сигнальных путей; АФК-индуцированное изменение активности ряда ферментов, участвующих в реализации механизмов синаптической передачи и длительной потенции. Таким образом, АФК должны рассматриваться не только как побочные продукты аэробного метаболизма, но и как универсальные вторичные мессенджеры, а исследование механизмов действия АФК на клеточном уровне в настоящее время является актуальной задачей.

Нервная ткань состоит из нейронов и нейроглии, обеспечивающей специфическое микроокружение для нейронов. Популяция глиальных клеток в центральной нервной системе представлена аст-

роглией, олигодендроглией и микроглией. Олигодендроциты формируют миелиновую оболочку и поддерживают гомеостаз нейронов, клетки микроглии выполняют иммунную и защитную функции. Астроциты являются многофункциональными динамическими регуляторами гомеостаза, обеспечивают структурную целостность и развитие мозга, модулируют активность нейрональных и глиальных клеток, принимают участие в инициации и регуляции иммунного и воспалительного ответов при повреждении и патологических состояниях мозга. Поэтому важным вопросом представляется выявление механизмов влияния пероксида водорода как фактора патологических процессов на функционирование астроглиальных клеток.

Было установлено, что цитотоксический эффект пероксида водорода в концентрациях, превышающих $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, на астроглиальные клетки линии С6 выражается в нарушении целостности и плотности клеточного монослоя, снижении индекса пролиферации, продукции NO и способности астроглиоцитов генерировать супероксидные анион-радикалы при действии менадиона. Пероксид водорода в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-8} \div 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л модифицирует морфологические характеристики и функциональную активность астроглиальных клеток в культуре: наблюдается реактивация клеток, что проявляется в гипертрофии клеточных тел, увеличении индекса пролиферации, повышении индуцируемого менадионом выхода супероксидных анион-радикалов, накоплении оксида азота и секретируемого интерлейкина-1 β . При сочетании действия пероксида водорода ($5 \cdot 10^{-8} \div 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л) и липополисахарида снижается индекс пролиферации астроглиоцитов, уменьшается количество секретируемого интерлейкина-1 β и повышается выход NO [5].

В литературе имеются разрозненные данные о влиянии H₂O₂ на астроглиальные клетки. Показано, например, что при действии пероксида водорода в миллимолярных концентрациях в первичных астроцитах происходит перекисное окисление липидов, снижение внутриклеточной концентрации глутамата и АТФ, изменение митохондриального трансмембранного потенциала [6], нарушается процесс утилизации глутамата посредством ингибирования активности EAAT1/2 транспортеров [7]. В микромолярном диапазоне концентраций H₂O₂ индуцирует синтез фактора роста нервов, интерлейкина-8 в первичных астроцитах крысы [8]. Таким образом, в присутствии пероксида водорода астроглиальные клетки продуцируют провоспалительные факторы, угнетают метаболизм одних и стимулируют синтез других нейротрансмиттеров, что, несомненно, отражается на функционировании нервных клеток. Следовательно, проводя исследования срезов мозга, необходимо учитывать и модулирующее влияние глиоцитов на процессы, происходящие в нейронах.

Нами было исследовано влияние пероксида водорода на эффективность синаптической передачи в гиппокампе. Установлено, что пероксид водорода в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-4} \div 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л вызывает зависимое от концентрации обратимое уменьшение амплитуды полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП), регистрируемых в области СА1 гиппокампа крысы. С применением методов ингибиторного анализа установлено, что уменьшение эффективности синаптической передачи при действии пероксида водорода опосредовано увеличением внеклеточной концентрации аденозина и последующей активацией аденозиновых рецепторов типа А1.

Вместе с тем есть основания полагать, что АФК могут оказывать регуляторное действие на функциональную активность нейронов в микромолярных концентрациях, сравнимых с концентрациями АФК *in vivo* [9, 10]. В связи с этим нами было исследовано влияние пероксида водорода в микромолярном диапазоне концентраций на эффективность синаптической передачи в гиппокампе. Показано, что в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-6} \div 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л пероксид водорода вызывает увеличение амплитуды пВПСП, причем зависимость имеет сигмоидальный вид. С применением ингибиторного анализа установлено, что возрастание эффективности синаптической передачи при действии пероксида водорода в концентрации 50–200 мкмоль/л обусловлено увеличением цитозольной концентрации свободных ионов кальция в результате окислительной модификации риадиночувствительных рецепторов внутриклеточных кальциевых депо. Кроме того, установлено, что в индуцированном пероксидом водорода изменении эффективности синаптической передачи принимает участие фосфолипаза С [11].

Одним из методов исследования биофизических механизмов функционирования нейронов как электрически активных клеток является метод математического моделирования внутриклеточных и внеклеточных электрических сигналов. Результаты математического моделирования применяются для анализа экспериментальных данных.

Для установления механизмов формирования внеклеточных электрических групповых возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) и потенциалов действия (ПД) пирамидальных кле-

ток области CA1 гиппокампа нами разработана биофизическая модель клетки и прилегающей внеклеточной среды. Модель представляет собой систему компарментов сомы клетки, нейритов и внешней среды, соединенных между собой резистивными и емкостными эквивалентными электрическими элементами. Для описания проводимости мембраны сомы использованы уравнения Ходжкина – Хаксли. Эквивалентной схеме модели соответствует начальная задача для системы дифференциальных уравнений первого порядка. Задача решалась многошаговым методом численного дифференцирования Клопфинштейна переменного порядка. При решении использовались интегрированные алгоритмы среды моделирования MATLAB 7.0. Геометрия и относительное расположение цилиндрических компарментов показаны на рис. 2. В результате моделирования рассчитаны амплитуда и форма внешних электрических сигналов при подпороговой и надпороговой стимуляции для каждого компармента. Результаты моделирования представлены на рис. 3 и 4.

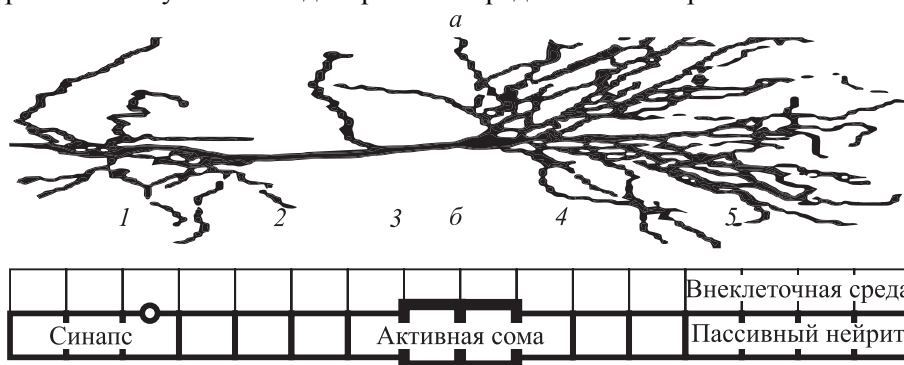


Рис. 2. Структура пирамидального нейрона области CA1 гиппокампа: *a* – схема биологической клетки, *б* – компарментная модель нейрона. Здесь и на рис. 3, 4: 1–5 – области регистрации внеклеточных сигналов

Из рис. 3 следует, что ВПСП соответствует один пик, который в области синаптического контакта имеет отрицательную амплитуду (и повторяет форму синаптического тока). По мере распространения подпорогового сигнала от синапса к окончанию нейрита происходит изменение полярности пика с отрицательной на положительную.

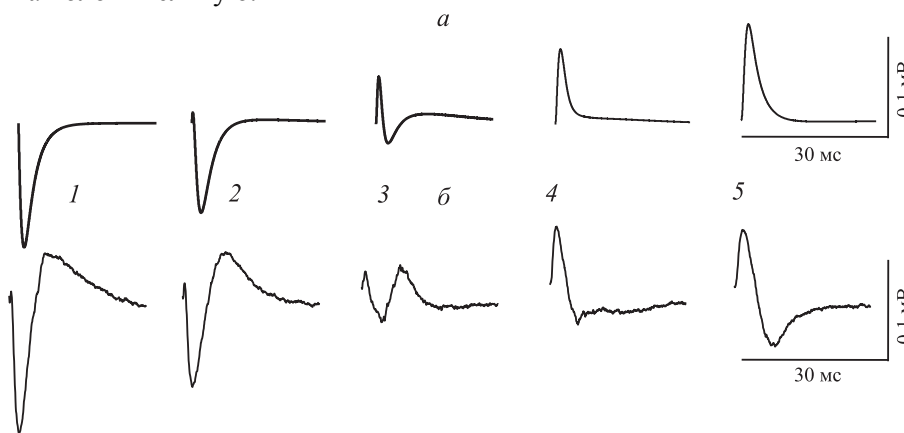


Рис. 3. Внеклеточные электрические сигналы пирамидальных клеток области CA1 гиппокампа при подпороговой стимуляции: *a* – рассчитанные, *б* – измеренные

Форма внеклеточных сигналов при надпороговой стимуляции представляет собой суперпозицию ВПСП и ПД (рис. 4). Такой механизм формирования сигнала объясняется комбинацией пассивных свойств нейритов и активных свойств сомы пирамидальных клеток. Кроме того, амплитуда сигнала возрастает в области сомы, что объясняется увеличением площади активной мембраны в этой области и уменьшением расстояния между сомами клеток. Как и в случае с ВПСП, происходит инвертирование формы сигнала по мере его распространения от синаптического окончания.

Форма и амплитуда рассчитанных сигналов совпадает с формой и амплитудой сигналов, зарегистрированных экспериментально в слое пирамидальных клеток области CA1. Явление инвертирования сигнала объясняется изменением продольного входного сопротивления в нейрите при распространении сигнала от начала или к окончанию нейрита. Этот эффект связан с отражением сигнала от окончаний нейрита.

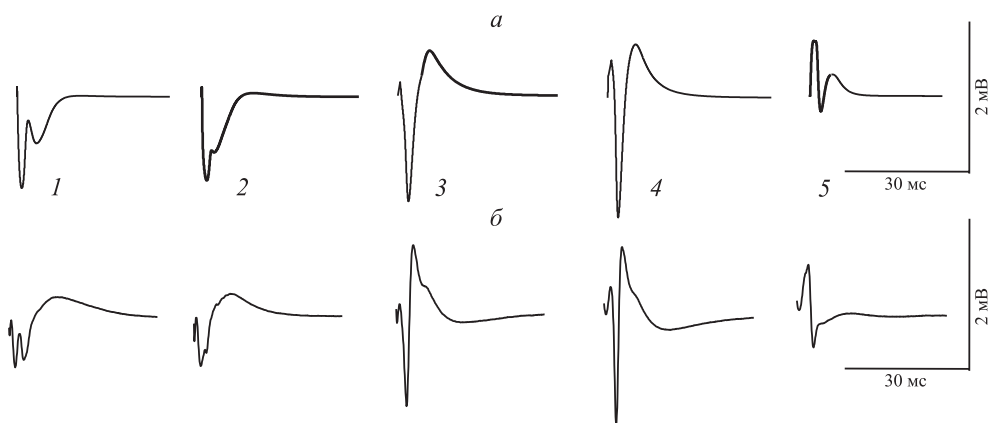


Рис. 4. Внеклеточные электрические сигналы пирамидальных клеток области CA1 гиппокампа при надпороговой стимуляции: *а* – рассчитанные, *б* – измеренные

Компьютерное моделирование может применяться не только для изучения особенностей генерации внеклеточных электрических сигналов и фундаментальных свойств новых форм синаптической пластичности, но и в исследованиях прикладного характера, связанных с нейромодуляторным влиянием различных препаратов на протекание функциональных процессов в биологических нейронных сетях.

В настоящее время активация аденозиновых A1-рецепторов считается одним из триггерных механизмов процессов депотенциации за счет наработки аденозина в условиях повышенной нейрональной активности. Предполагается, что основной механизм депотенцирующего действия продолжительной низкочастотной стимуляции связан с выделением аденозина [12, 13]. Депотенцирующее действие аденозина при определенных условиях может приводить к нейропротекторным эффектам, направленным на снижение уровня нейрональной активности при патологических состояниях.

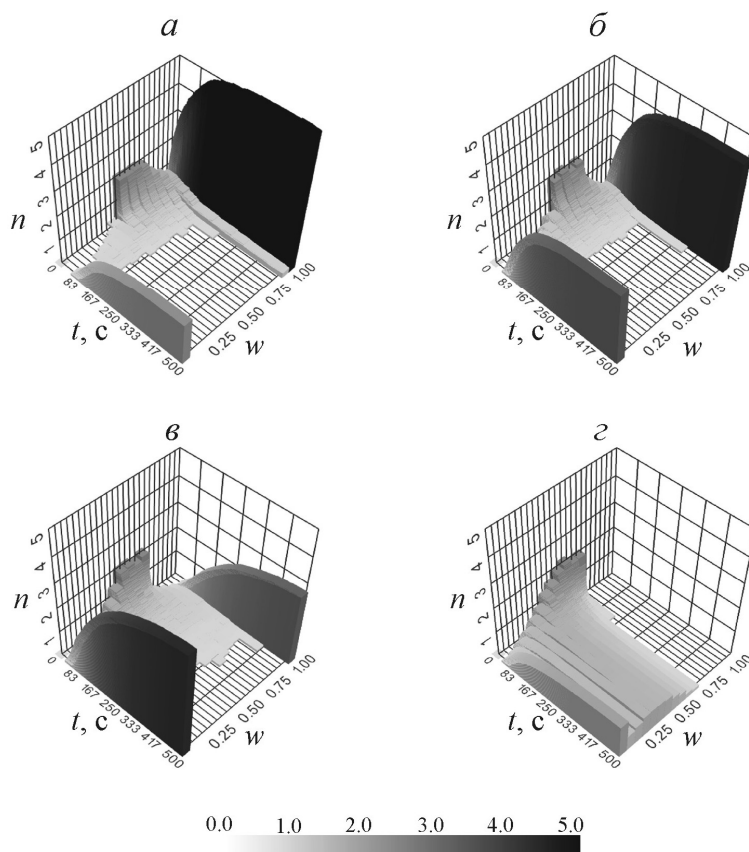


Рис. 5. Динамика распределения числа синапсов n с проводимостью w в зависимости от времени t при конкурентном обучении в нейросети при соотношении параметров депотенциации и потенциации: $kD = 0,28$ (*а*) и при увеличении значений коэффициента депотенциации, соответствующих действию пероксида водорода: $kD = 0,30$ (*б*), $0,33$ (*в*), $0,35$ (*г*)

Поскольку повышенные концентрации пероксида водорода характерны для многих патологических процессов, нами проведено моделирование функциональной активности нейронной сети области СА1 гиппокампа в патологических условиях при активации аденозиновых рецепторов в результате действия пероксида водорода. Активации аденозиновых рецепторов в данном случае соответствует увеличение коэффициента депотенциации kD – соотношения составляющих депотенциации и потенциации в правиле обучения.

На рис. 5 представлены зависимости распределения числа синапсов n с проводимостью w от времени t при конкурентном обучении в нейросети при различных значениях kD . Каждый график является усреднением результатов 500 численных экспериментов. Как следует из приведенных зависимостей, увеличение значений kD , соответствующее активации аденозиновых рецепторов, приводит к смещению распределения проводимостей в сторону наименьших значений и снижению частоты активности нейронов. При высоких значениях kD происходит снижение проводимости синапсов вплоть до подпороговых значений, когда частота генерации выходного нейрона уменьшается до нуля и процесс обучения останавливается. Данный эффект может отсутствовать в случае ограничения минимальных значений синаптической проводимости, что характерно для явления депотенциации. Таким образом, пероксид водорода может обладать регуляторным эффектом при функциональных процессах в нервной ткани, связанных с обучением на нейросетевом уровне в условиях патологии.

* * *

Полученные результаты расширяют и углубляют представления о фундаментальных механизмах функционирования нейронов и глиальных клеток при выполнении функциональных задач в норме и при патологии. С применением новых разработанных методик для многоканальной регистрации и стимуляции электрической активности нейронов экспериментально *in vitro* получены эффекты разнонаправленного изменения проводимости групп синапсов, стимулируемых последовательностями импульсов с различными параметрами, что является аналогом процессов формирования областей с неоднородными характеристиками синаптической проводимости *in vivo* при развитии различных участков нервной системы. На основе анализа этих процессов перспективным будет создание новых методик тестирования нейро- и психофармакологических препаратов, позволяющих судить о влиянии этих веществ непосредственно на скорость обучения нейронной сети.

Разработанные численные модели функционирования нейронов в составе нейронных сетей позволяют повысить эффективность проведения соответствующих экспериментальных исследований. Полученные при моделировании данные могут указать, например, оптимальный диапазон концентраций препарата и, таким образом, существенно сократить количество трудоемких и длительных экспериментов с биологической нервной тканью. В связи с этим численное моделирование биологических нейронных сетей в последнее время начинает применяться при решении не только фундаментальных, но и прикладных задач, в частности, в фармакологии [14].

Функционирование мозга – следствие скоординированной работы нейронов, глиальных клеток, межклеточного матрикса. Эта деятельность зависит от состояния гемодинамики, функции дыхания, гормональной и иных систем организма. При патологии, сопровождающейся, например, кровоизлиянием в мозг (геморрагический инсульт), нервная ткань начинает функционировать в иных условиях. Клетки крови, попадая в мозг при патологических состояниях, индуцируют каскад процессов, ассоциируемых с воспалительными. Глиальные клетки мозга реагируют даже на незначительные метаболические отклонения синтезом различных регуляторных про- и противовоспалительных молекул, что также отражается на функционировании мозга. В связи с этим актуальна разработка новых модельных гетерогенных клеточных систем (с участием нейронов, глиальных клеток и клеток крови), моделирующих процессы межклеточных взаимодействий в мозге для изучения действия воспалительных факторов, которые в зависимости от концентрации и редокс-состояния клеток могут оказывать как цитотоксическое, так и регуляторное действие на функционирование нервной ткани.

1. Burgess N., Maguire E.A., O'Keefe J. // *Neuron*. 2002. Vol. 35. № 4. P. 625.
2. Whitlock J.R., Heynen A.J., Shuler M.G., Bear M.F. // *Science*. 2006. Vol. 313. № 5790. P. 1093.
3. Dröge W. // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82. P. 47.
4. Питлик Т.Н. и др. // *Нейрохимия*. 2009. Т. 26. № 2. С. 104.
5. Kulahava T. A. et al. // *Cell and Tissue Biol.* 2007. Vol. 1. № 1. P. 8.
6. Rohrdanz E. et al. // *Arch. Toxicol.* 2001. Vol. 75. P. 150.
7. Chen Y. et al. // *J. Neurochem.* 2000. Vol. 75. P. 939.
8. Miura I. et al. // *Life Sci.* 2002. Vol. 70. P. 821.
9. Lei B., Arai T. // *Brain Res Protoc.* 1998. Vol. 1. P. 33.

10. Hyslop P. A. et al. // Brain Res. 1995. Vol. 671. № 2. P. 181.
11. Питлик Т.Н., Булай П.М., Денисов А.А., Черенкевич С.Н. и др. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2010. № 2. С. 53.
12. Huang C.C., Liang Y.C., Hsu K.S. // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. № 22. P. 9728.
13. Cunha R. A. et al. // J. Neurochem. 1996. Vol. 67. № 5. P. 2180.
14. Ferrante M. et al. // Curr. Med. Chem. 2008. Vol. 15. № 24. P. 2456.

Поступила в редакцию 24.06.11.

Андрей Анатольевич Денисов – кандидат биологических наук, заведующий НИЛ клеточной инженерии и нанобиотехнологий кафедры биофизики. Занимается исследованиями синаптической пластичности и процессов обучения в биологических нейронных сетях, разработкой сенсоров электрической активности нейронов. Опубликовал более 80 научных работ.

Павел Михайлович Булай – старший преподаватель кафедры биофизики. Основные направления научной работы – ионные каналы, электрические явления в биосистемах, биофизика сложных систем, клеточные биосенсоры. Опубликовано более 50 научных работ.

Татьяна Александровна Кулагова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ клеточной инженерии и нанобиотехнологий кафедры биофизики. Основные направления научной работы – редокс-регуляция клеточных процессов, межклеточная и внутриклеточная сигнализация, нейроиммунология и нейроонкология. Опубликовала более 80 научных работ.

Павел Геннадьевич Молчанов – научный сотрудник НИЛ клеточной инженерии и нанобиотехнологий кафедры биофизики. Основные научные интересы – разработка биосенсоров и нейросенсоров, исследования в области биоэлектроники и обработки биологических сигналов. Автор и соавтор более 50 публикаций.

Тарас Николаевич Питлик – младший научный сотрудник НИЛ клеточной инженерии и нанобиотехнологий кафедры биофизики. Занимается исследованиями механизмов редокс-регуляции функциональной активности нейронов. Опубликовал более 20 научных работ.

Сергей Николаевич Черенкевич – академик НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики, лауреат Государственной премии Республики Беларусь в области науки и техники. Основные направления научной работы – биофизика клетки, клеточная инженерия, клеточная информатика, биофизическое образование. Опубликовал более 550 научных работ, соавтор 5 монографий и 4 учебных пособий.