

DOI: 10.7868/S0869813918060175

**СИСТЕМА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ
ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
В ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

© Е. Ю. Смирнова,^{1, 2} А. И. Ерофеев,³ О. Л. Власова,³
А. В. Чижов,^{1, 2} А. В. Зайцев¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

E-mail: elena.smirnova@mail.ioffe.ru

Одним из перспективных вариантов лечения фармакорезистентных форм эпилепсии является низкочастотная стимуляция мозга. Чтобы избежать побочных эффектов стимуляции, необходимо минимизировать внешнее воздействие на мозг. Этого можно добиться, если включать стимуляцию только в момент повышенной вероятности иктального разряда и если оказывать специфическое воздействие только на один тип клеток. Выполнить эти два условия возможно в случае реализации системы биологической обратной связи с сетью нейронов в оптогенетическом эксперименте. Данная работа направлена на разработку такой системы. Нами был реализован механизм обратной связи с использованием двух *in vitro* моделей. В первом случае система обратной связи была протестирована на срезах энторинальной коры и гиппокампа трехнедельных крыс линии Вистар в 4-аминопиридиновой модели эпилепсии с использованием низкочастотной электрической стимуляции. Во втором случае возможность реализации обратной связи в оптогенетическом эксперименте была показана на первичной культуре гиппокампа, в нейронах которой были экспрессированы каналородопсины. Интериктальные события в 4-аминопиридиновой модели эпилепсии детектировали автоматически по появлению потенциалов действия у нейронов, после чего системой обратной связи запускалась низкочастотная стимуляция. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной эффективности данного подхода для подавления иктальных событий.

Ключевые слова: система биологической обратной связи, оптогенетика, низкочастотная стимуляция мозга, 4-аминопиридиновая модель эпилепсии, височная эпилепсия.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 731—737. 2018

E. Yu. Smirnova,^{1, 2} A. I. Erofeev,³ O. L. Vlasova,³ A. V. Chizhov,^{1, 2} A. V. Zaitsev.¹ A BIOLOGICAL CLOSED-LOOP SYSTEM IN OPTOGENETIC EXPERIMENTS FOR SUPPRESSION OF EPILEPTIC ACTIVITY. ¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia; ² Ioffe Institute, St. Petersburg, Russia; ³ Peter the Great St. Petersburg State Polytechnic University, St. Petersburg, Russia; e-mail: elena.smirnova@mail.ioffe.ru.

One of the promising options for treating pharmacoresistant forms of epilepsy is low-frequency stimulation of the brain. However, to avoid the side effects, it is required to minimize the stimulation of the brain. This can be achieved if stimulation occurs only at the time of increased proba-

bility of the ictal discharge and if it has a specific action on only one type of cells. A way to meet these conditions is to use a closed-loop system between the nervous tissue and a computer in the optogenetic experiment. We have developed a closed-loop system in the optogenetic experiment for effective and harmless suppression of epileptic activity and implemented it in slices of the rat hippocampus and the entorhinal cortex as well as in the primary hippocampal culture. First, we tested the closed-loop system in slices in 4-aminopyridine model of epilepsy. Epileptic activity was detected automatically via monitoring of spiking activity of a representative neuron in the entorhinal cortex. Since a neuron is firing only in response to synaptic input in the used epilepsy model, the spike threshold is a valid indicator of the beginning of epileptic discharge. The software realizing the closed-loop system starts the low-frequency stimulation in response to detection of an epileptic event. Next, we tested the developed system in an optogenetic experiment in culture after expression of channelrhodopsins. These results indicate the potential effectiveness of this approach for the suppression of ictal events.

Key words: closed-loop system, optogenetics, low-frequency stimulation, 4-aminopyridine model, epilepsy.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 731—737. 2018

Применение биологической обратной связи в оптогенетическом эксперименте может быть с успехом использовано как при изучении фундаментальных проблем нейробиологии, например выяснении механизмов генерации потенциалов действия, так и для более эффективного решения прикладных задач, например подавления эпилептической активности путем стимуляции очага генерации в случае повышения вероятности возникновения иктального разряда.

В электрофизиологическом эксперименте система обратной связи компьютера с нейроном была впервые реализована в начале 90-х годов [9] и названа динамическим пэтч-кларпом. В данном методе внутриклеточная стимуляция нейрона током зависит от текущего состояния клетки. Стимуляция происходит в режиме реального времени. Поскольку разрешающая способность определяется частотой оцифровки сигнала, то при использовании современных карт оцифровки это время обычно составляет 30 мкс, что позволяет воздействовать практически на любую электрическую активность нейронов.

За последние 10 лет электрофизиология поднялась на качественно новый уровень в связи с развитием оптогенетического подхода [3]. Оптогенетика позволяет деполяризовать (возбудить) или гиперполяризовать (ингибировать) нейрон, воздействуя лучом света определенной длины волны на различные типы родопсинов. За счет правильно подобранного промотора можно обеспечить экспрессию нужного родопсина только в определенной группе клеток.

Целью настоящей работы было совместить два подхода и реализовать систему биологической обратной связи в оптогенетическом эксперименте. Разрабатываемая система ориентирована на изучение и подавление эпилептической активности в ЦНС. Одной из альтернатив медикаментозному методу лечения эпилепсии является низкочастотная стимуляция мозга. Однако непрерывная стимуляция мозга может иметь побочные действия: ухудшение памяти, нежелательные эмоциональные реакции, нейроэндокринные расстройства. Поэтому для уменьшения побочных эффектов необходимо сократить длительность стимуляции, запуская ее только в случае высокой вероятности возникновения эпилептического приступа. Еще большую эффективность воздействия может обеспечить применение оптогенетического подхода, позволяющего стимулировать только необходимый тип клеток. В данной работе мы сосредоточились на разработке собственно системы обратной связи для оптогенетического эксперимента. Наши усилия были направлены на решение следующих задач:

- 1) разработать детектор эпилептической активности (на примере *in vitro* модели эпилепсии);
- 2) написать программное обеспечение, реализующее мониторинг сетевой активности и детекцию эпилептических событий;

3) реализовать выход управляющего сигнала с разработанного программного обеспечения на электрический стимулятор и на драйвер светодиода, используемого для воздействия светом на каналородопсины;

4) протестировать работу системы сначала в режиме электрической стимуляции срезов мозга, а затем в режиме воздействия светом на первичную культуру клеток гиппокампа.

МЕТОДИКА

Переживающие срезы энторинальной коры и гиппокампа. Эксперимент проводился на пирамидных нейронах в срезах энторинальной коры и гиппокампа 21-дневных крыс линии Вистар методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока. Метод приготовления срезов подробно описан в работе [2], эксперименты проводились на горизонтальных срезах энторинальной коры и гиппокампа толщиной 350 мкм. Срезы после нарезки находились при 35 °С в аэрируемом (95 % O₂ + 5 % CO₂) физиологическом растворе следующего состава (мМ): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgSO₄, 2 CaCl₂, 24 NaHCO₃, 10 D-глюкозы. Эксперимент проводился при 30 °С в 4-аминопиридиновом (4-AP) растворе следующего состава (мМ): 150 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 0.25 MgSO₄, 2 CaCl₂, 24 NaHCO₃, 10 D-глюкозы, 0.10 4-AP.

Для регистрации активности сети выбирались пирамидные нейроны глубоких слоев энторинальной коры. Стимулирующий биполярный электрод располагали в области коллатералей Шаффера параллельно пирамидному слою зоны CA1. Коллатерали Шаффера имеют возбуждающий вход на нейроны пирамидного слоя поля CA1, которые в свою очередь имеют возбуждающий вход на нейроны глубоких слоев энторинальной коры [4]. В используемой 4-аминопиридиновой модели эпилепсии с нормальной концентрацией калия отсутствует спонтанная активность нейрона, все потенциалы действия вызваны синаптическим входом, обусловленным синхронизацией нейронов. Эта синхронизация и является иктальным или интериктальным событием. Таким образом, превышение порога первого спайка репрезентативного нейрона является свидетельством начала эпилептической активности и может служить детектором. Более подробно метод детекции описан в результатах. Через 30 мкс после детекции эпилептического события включалась электрическая стимуляция коллатералей Шаффера (10 импульсов с частотой 1 Гц, амплитудой 0.1 мА и длительностью 0.1 мс).

Первичная культура гиппокампа. Методика приготовления первичной диссоциированной культуры нейронов гиппокампа мышей описана в работе [1]. Для внедрения в нейроны культуры гена светочувствительного катионного канала использовалась плаزمида FCK-ChR2-GFP (Addgene, #15814). Введение плазмиды осуществлялось методом кальций-фосфатной трансфекции. Данная процедура проводилась на 7-й день после получения первичной культуры при помощи набора (Clontech Laboratories Inc., #631312) по протоколу производителя с рекомендациями согласно статье [6]. Однако краситель GFP не использовался из-за совпадения длины волны возбуждения его и каналородопсина. В качестве маркера использовался краситель td-Tomato (Addgene, #30530), ген которого был введен методом ко-трансфекции с плазмидой pCSCMV: tdTomato.

Программное обеспечение. Компьютерная программа для реализации системы обратной связи была написана на языке Pascal в среде Delphi, доступна по ссылке <https://drive.google.com/open?id=1JWQbI6VbQjmI4xrz1AQLC7k3h-51iQg4>. Работа программы успешно протестирована с картой оцифровки NI PCI-6221.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Появление интериктальных или преиктальных событий является достаточно надежным предвестником возникновения иктальных событий, поэтому их ре-

гистрация может свидетельствовать о высоком риске развития эпилептического приступа [5]. Стимуляция только в этот период времени может оказаться достаточной, чтобы предотвратить возникновение иктального события и не вызвать серьезных побочных последствий.

В данной работе была разработана система с обратной связью для подавления иктальной активности в экспериментах *in vitro* с электрической и оптогенетической стимуляцией. Сначала был разработан алгоритм детекции интериктальных и иктальных событий, а также написано программное обеспечение, реализующее мониторинг сетевой активности и детекцию эпилептических событий.

Детекция эпилептических событий производилась при помощи внутриклеточной регистрации активности нейрона из глубоких слоев энторинальной коры при использовании 4-аминопиридиновой модели эпилепсии *in vitro*. Активность одного нейрона в этой модели отражает поведение всей нейронной сети [2]. Спайковая активность нейрона наблюдается только в случае синхронизации синаптических входов нейронов сети, поэтому генерация первого потенциала действия может служить надежным индикатором начала иктального или интериктального разряда. Интериктальное событие представляет собой одну короткую пачку спайков, тогда как иктальное событие — это пачка пачек потенциалов действия с суммарной длительностью около 20—50 с, которая обычно развивается после интериктальных разрядов (рис. 1).

Был предложен следующий алгоритм детекции эпилептических событий в режиме реального времени: при постоянном мониторинге мембранного потенциала

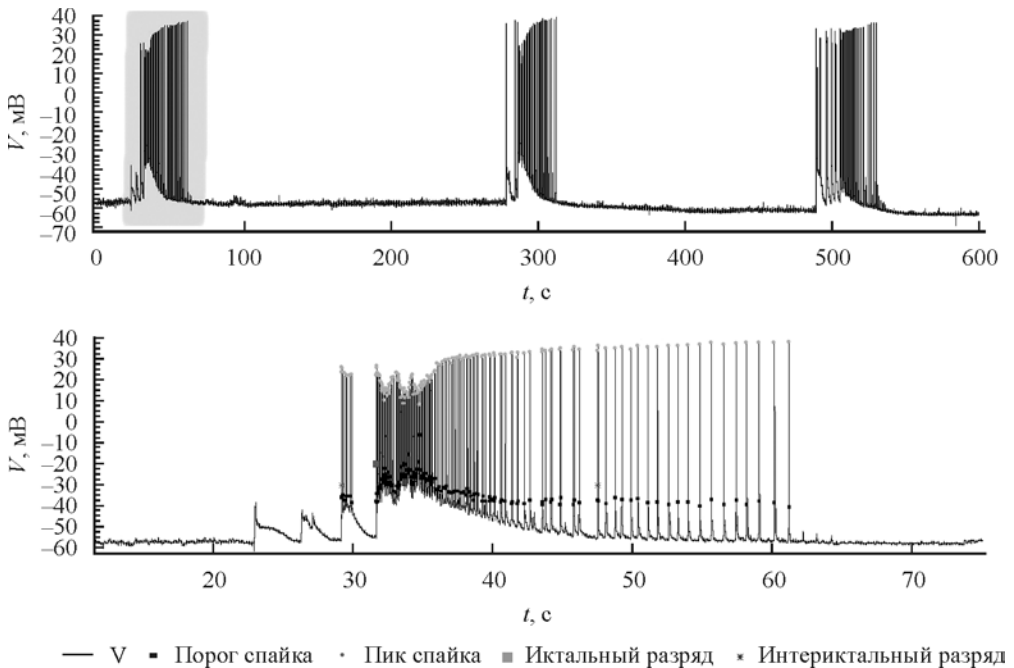


Рис. 1. Эпилептическая активность в 4-аминопиридиновой модели *in vitro*, продемонстрированная динамикой мембранного потенциала (V) репрезентативного нейрона глубоких слоев энторинальной коры.

Верхний график — три иктальных события, зарегистрированные за 600 с. Нижний график — в увеличенном масштабе запись первого иктального события (пороги спайков помечены *мелкими квадратами*), интериктальных событий (начало отмечено *звездочкой* на уровне потенциала -30 мВ) и иктальных событий (начало отмечено *большим квадратом* на уровне потенциала -20 мВ). По оси абсцисс приведено время (t).

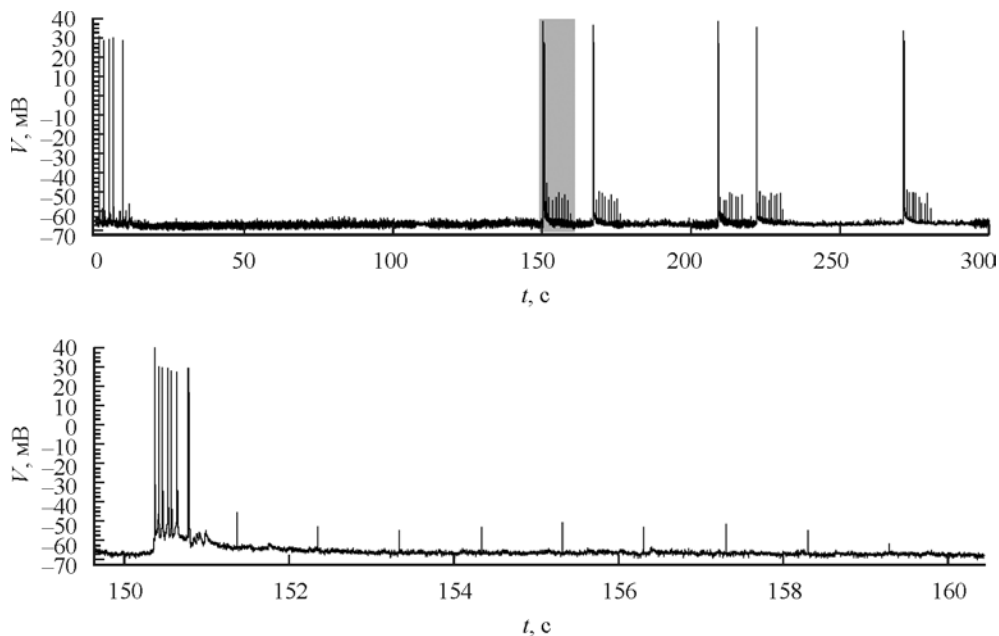


Рис. 2. Биологическая обратная связь с сетью нейронов энторинальной коры в 4-аминопиридиновой модели эпилепсии (электрическая низкочастотная стимуляция).

По оси абсцисс — время (t), с; по оси ординат — мембранный потенциал (V), мВ.

нейрона глубоких слоев энторинальной коры рассчитывается прирост мембранного потенциала за шаг оцифровки сигнала (30 мкс). Превышение порогового значения в 10 мВ/мс свидетельствует о возникновении потенциала действия нейрона, т. е. о начале иктального или интериктального разряда в сети. Для реализации алгоритма детекции эпилептических событий была написана программа в среде Delphi (программа успешно протестирована с картой оцифровки National Instruments PCI-6221). Программа считывает мембранный потенциал нейрона с частотой оцифровки 20 кГц (допустимые значения — до 33.3 кГц) и рассчитывает скорость прироста мембранного потенциала.

В случае детекции эпилептического события программа запускает режим стимуляции с заданными заранее параметрами. После завершения стимуляции программа вновь переходит в режим детекции эпилептических событий. Выход управляющего сигнала с разработанного программного обеспечения передается на электрический стимулятор Isostim A320 (электрическая стимуляция) либо на драйвер DC4104 четырехканального светодиода фирмы Thorlabs (оптогенетическая стимуляция). В случае зашумленного сигнала, чтобы избежать ложного детектирования эпилептической активности, использовался RC-фильтр. Минусом фильтрации сигнала на уровне программного обеспечения является дополнительная задержка детекции события.

Разработанная программа для реализации биологической обратной связи с сетью нейронов была апробирована на переживающих срезах мозга (энторинальной коры и гиппокампа) трехнедельных крыс. Использовалась электрическая стимуляция коллатералей Шаффера в зоне CA1 гиппокампа, начало эпилептических событий отслеживалось по мембранному потенциалу. С задержкой в 50 мкс после превышения порога спайка включалась низкочастотная электрическая стимуляция с частотой 1 Гц (10 импульсов) с целью предотвратить возникновение иктальных событий. На рис. 2 приведен результат теста системы

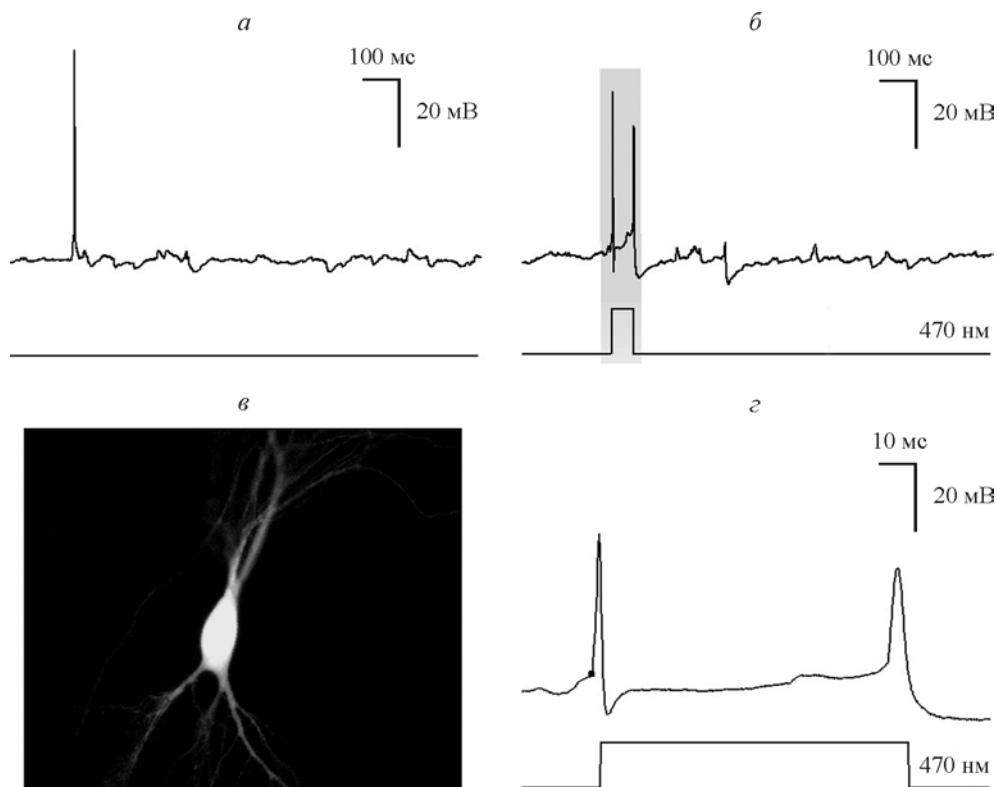


Рис. 3. Биологическая обратная связь с нейроном первичной культуры гиппокампа (инициация второго спайка за счет воздействия светом на каналородопсины).

a — спонтанно возникший потенциал действия нейрона в отсутствие световой стимуляции. У нейрона наблюдается спонтанная активность из-за деполяризованного состояния (-45 мВ); *б* — дублет, имитированный системой обратной связи, он же в увеличенном масштабе приведен на графике (*г*). На графиках *a*, *б* и *г* сверху приведена динамика мембранного потенциала во времени, а снизу — динамика света длиной волны 470 нм, включаемого в режиме обратной связи; *в* — фотография экспериментального нейрона, флуоресцирующего за счет маркера tdTomato.

обратной связи, которая успешно запускалась в момент детекции интериктальных разрядов (о стимуляции среза биполярным электродом свидетельствует артефакт порядка 15 мВ). В дальнейшем планируется применить разработанную систему обратной связи для детального изучения зависимости эффективности низкочастотной стимуляции от таких параметров, как задержка начала стимуляции и ее продолжительность.

Система биологической обратной связи была также протестирована на первичной культуре клеток гиппокампа после ко-трансфекции FCK-ChR2-GFP и pCSCMV: tdTomato плазмид. Фотография нейрона в культуре, полученная с помощью флуоресцентного красителя td-Tomato, приведена на рис. 3, *в*. Так как в культуре мы не смогли надежно воспроизвести 4-аминопиридиновую модель судорожных состояний, то для проверки работы системы обратной связи в оптогенетическом эксперименте упростили задачу. Задачей было после спонтанно возникшего спайка вызвать второй потенциал действия посредством воздействия светом с длиной волны 470 нм. Для этого детектировали порог спонтанного спайка, а затем с задержкой, зависимой от характеристик нейрона, с помощью системы обратной связи включался светодиод. Воздействие светом длиной волны 470 нм на каналородопсины приводило к дополнительной деполяризации

нейрона и генерации второго потенциала действия (рис. 3), в результате чего наблюдалось изменение паттерна спайковой активности нейрона (свет подавался с задержкой в 2 мс и продолжительностью 100 мс).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была реализована биологическая обратная связь с нейроном или сетью нейронов при электрической и оптогенетической стимуляции. На данном этапе система биологической обратной связи была протестирована на срезах энторинальной коры и гиппокампа с электрической стимуляцией и на первичной гиппокампальной культуре клеток, экспрессирующих каналородопсин, со стимуляцией светом длиной волны 470 нм. Мы предполагаем, что эффективность данного метода для подавления эпилептической активности может быть существенно повышена при использовании срезов мозга с избирательной экспрессией археородопсинов (протонных помп, открытие которых приводит к гиперполяризации клетки) в парвалбуминовых интернейронах в момент повышенной вероятности возникновения эпилептической активности.

Ранее для подавления эпилептической активности в оптогенетическом эксперименте система обратной связи была реализована при мониторинге ЭЭГ-сигнала [7]. Предложенный в данной работе критерий детекции эпилептического события при мониторинге внутриклеточной записи мембранного потенциала репрезентативного нейрона по порогу первого спайка в пачке позволяет определять эпилептическое событие в момент самого зарождения. Также впервые предложен способ стимуляции с низкой частотой только в период повышенной вероятности эпилептического события.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ (проект № 17-75-10082).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Ерофеев А. И., Захарова О. А., Терехин С. Г., Плотникова П. В., Беспрозванный И. Б., Власова О. Л. Оптогенетическое исследование электрофизиологических особенностей нейронов гиппокампа трансгенных мышей линии PS1-M146V (модель болезни Альцгеймера). *Нейробиофотоника и нейрогенетика. Журн. высш. нерв. деятельности.* 67(5): 63—74. 2017.
- [2] Amakhin D. V., Ergina J. L., Chizhov A. V., Zaitsev A. V. Synaptic conductances during interictal discharges in pyramidal neurons of rat entorhinal cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 10(233). 1—15. 2016.
- [3] Boyden E. S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8(9): 1263—1268. 2005.
- [4] Canto C. B., Wouterlood F. G., Witter M. P. What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plasticity.* 381243. 2008.
- [5] de Curtis M., Jefferys J. G. R., Avoli M. Interictal epileptiform discharges in partial epilepsy: Complex neurobiological mechanisms based on experimental and clinical evidence. In: Noebels J. L., Avoli M., Rogawski M. A., et al. (eds). *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). 2012.
- [6] Jiang M., Chen G. High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nature Protocols.* 1(2):695—700. 2006.
- [7] Paz J. T., Davidson T. J., Frechette E. S., Delord B., Parada I., Peng K., Deisseroth K., Huguenard J. R. Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. *Nat. Neurosci.* 16(1):64—70. 2013.
- [8] Staley K. J., Dudek F. E. Interictal Spikes and Epileptogenesis. *Epilepsy Currents.* 6(6): 199—202. 2006.
- [9] Sharp A. A., Abbott L. F., Marder E. Artificial electrical synapses in oscillatory networks. *J. Neurophysiol.* 67(6):1691—1694. 1992.

Поступила 19 IV 2018