

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
MATEMATIKOS IR INFORMATIKOS FAKULTETAS

# **Neuronų sialilinimo įtakos tinklo aktyvumui tyrimas taikant žmogaus smegenų audinį ir multielektrodų gardelę**

*Study of the influence of neuronal sialylation on network activity using human  
brain tissue and a multielectrode array*

Kursinis darbas

**Atliko:** 3 kurso Bioinformatikos studentas  
Kajus Merkeliūnas

**Darbo vadovė:** Dr. Ugnė Kuliešiūtė

Vilnius – 2025

Kajus Merkeliūnas

2025 m. birželio 19 d.

# Turinys

<b>Santrauka</b>	<b>2</b>
<b>1 Ivadas</b>	<b>3</b>
<b>2 Medžiagos ir metodai</b>	<b>4</b>
2.1 Žmogaus smegenų audinio paruošimas ir cheminis poveikis . . . . .	4
2.2 Duomenų apdorojimo seka . . . . .	5
2.3 Veikimo potencialų (spike) detekcija . . . . .	5
2.4 Proveržių ir tinklo aktyvumo analizė . . . . .	6
2.5 Funkcinio ryšio ir tinklo topologijos analizė . . . . .	6
2.6 Statistinė analizė . . . . .	7
<b>3 Rezultatai</b>	<b>8</b>
3.1 Hipersialilinimo poveikis: DANA sukeltas perėjimas į hipersynchronizuotą būseną . . . . .	8
3.1.1 Padidinto sialilinimo poveikis: vidutinio lygio tinklo jaudrumo padidėjimas . . . . .	8
3.1.2 Kiekybinė aktyvumo analizė: impulsų dažnio pokyčiai . . . . .	8
3.1.3 Funkcinės tinklo architektūros pokyčiai: moduliari struktūra ir sialilinimo poveikis	9
3.2 Sialilinimo slopinimo poveikis: FAX sukeltas jaudrumo padidėjimas išsaugant tinklo stabilumą . . . . .	11
3.2.1 Kiekybinė aktyvumo analizė: impulsų dažnio pokyčiai . . . . .	11
3.2.2 Aktyvumo padidėjimas be patologinių proveržių . . . . .	11
3.2.3 Funkcinės tinklo architektūros stabilumas: moduliacijos be destabilizacijos . . . . .	12
<b>4 Diskusija ir išvados</b>	<b>14</b>
4.1 Diskusija . . . . .	14
4.2 Išvados . . . . .	14
<b>A Priedai</b>	<b>17</b>
A.1 Priedas A: kodo repozitorija . . . . .	17
A.2 Priedas B: naudoti analizės parametrai . . . . .	17
A.3 Priedas C: papildomi grafikai . . . . .	17

## Santrauka

Šiame darbe tiriamas sialilinimo lygio poveikis neuronų tinklo aktyvumui taikant žmogaus smegenų audinio organotipinių kultūrų modelį ir multielektrodų gardelės (MEA) technologiją. Sialilinimas – tai glikoproteinų modifikacija sialo rūgštimi, kuri daro įtaką neuronų elektrinėms savybėms, ypač veikimo potencialų generavimui ir tinklo synchronizacijai.

Tyrime naudoti dviem skirtingais junginiais paveikti audinio mēginiai:

- **DANA** (2,3-dehidro-2-deoksi-N-acetilneuramino rūgštis) – sialidazės inhibitorius, didinantis sialilinimo lygi (hipersialilinimas),
- **FAX** ( $3F_{ax}$ -Neu5Ac) – sialittransferazės inhibitorius, mažinantis sialilinimo lygi (hiposialilinimas).

MEA įrašai buvo analizuojami Python kalba sukurta analitine sistema, apimančia impulsų detekciją, proveržių identifikavimą, funkcinio ryšio ir tinklo topologijos analizę.

Rezultatai parodė, kad:

- DANA poveikis padidino neuronų tinklo jaudrumą ir sukėlė synchronizuotą aktyvumą po glutamato stimuliacijos, rodančią galimą patologinę tinklo organizacijos būklę.
- FAX poveikis taip pat padidino neuronų aktyvumą, tačiau jis išliko toninis ir neperaugo į synchronizuotą ar patologinį režimą – tinklo struktūra išliko stabili.

Padaryta išvada, kad sialilinimo poveikis priklauso ne tik nuo jo krypties (hiper- ar hiposialilinimas), bet ir nuo intervencijos pobūdžio (ūmus ar lėtinis). Tyrimo duomenys patvirtina, kad manipuliacijos sialilinimu žmogaus audinyje gali paveikti tinklo dinamiką skirtingais mechanizmais nei tai rodo gyvūniniai modeliai, todėl būtinas tolimesnis tyrimas žmogaus audiniuose.

**Raktažodžiai:** sialilinimas, neuronų tinklas, žmogaus smegenų audinys, MEA, tinklo synchronizacija, DANA, FAX.

# 1 Įvadas

Neuronų gebėjimas generuoti veikimo potencialus ir perduoti signalą gretimiems neuronams per elektrines ar chemines sinapses yra gyvybiškai svarbus normaliai neuronų tinklų fiziologijai smegenyse ir periferijoje. Suderinta jonų kanalų ir transporterių, išskaitant įtampos valdomus jonų kanalus (VGIC), veikla yra atsakinga už veikimo potencijalo (VP) iniciavimą, laidumą bei sklaidą jaudriose ląstelėse, tokiose kaip neuronai. Neuronų ląstelės membranos išoriniame paviršiuje yra didelis kiekis neigiamai įkrautų sialo rūgšties liekanų, kurios prisideda prie membranos potencijalo palaikymo. Dėl neigiamo sialilintų glikanų krūvio, membrana aplink įtampos valdomus jonų kanalus yra lokalai depolarizuota ir prisideda prie VP generavimo [1]. Elektrostatiniai pokyčiai, tokie kaip lokalūs depolarizacijos poslinkiai, paruošia VGIC, didindami jų jautrumą membranos potencialui, reikalingam kanalo atidarymui [2].

Sialilinimo poveikis veikimo potencijalo bangų formoms ir neuronų jaudrumui buvo parodytas naudojant elektrofiziologinius viso ląstelės (whole-cell) registravimo metodus su CA3 neuronais ūmiose žiurkės smegenų hipokampo riekelėse (*ex vivo*). Pašalinus sialo rūgštį iš hipokampo CA3 neuronų membranos, padidėja veikimo potencijalo sužadinimo slenkstis, todėl sumažėja bendras neuronų jaudrumas [3]. Tinklo lygmeniu, lauko potencialų registravimas hipokampo riekelėse su ir be sialidazės apdorojimo rodo daugelio vienetų aktyvumo lauko dažnio sumažėjimą, kas rodo, kad desialilinimas mažina tinklo jaudrumą *ex vivo* [3]. Tas pats efektas buvo patvirtintas naudojant didelės kalio koncentracijos injekcija sukeltus priepliuolius. Maksimalus populiacijos impulsų (population spikes) dažnis, priepliuolių atsiradimas ir trukmė yra reikšmingai sumažinti sialidaze apdorotuose gyvūnuose, tuo tarpu sialidazės aktyvumo inhibitoriai sukelia persialilinimą ir reikšmingai padidina priepliuolių trukmę *in vivo* [3]. Panašūs tyrimai parodė, kad endogeninės sialidazės aktyvumo slopinimas didina neuronų jaudrumą ir keičia ilgalaike potenciaciją [4, 5]. Sialilinimo poveikis veikimo potencijalo bangų formoms ir neuronų jaudrumui buvo parodytas naudojant elektrofiziologinius viso ląstelės (angl. *whole-cell*) registravimo metodus ūmiose *ex vivo* žiurkės smegenų hipokampo CA3 neuronų riekelėse. Pašalinus sialo rūgštį iš šių neuronų membranos, padidėja veikimo potencijalo sužadinimo slenkstis ir atitinkamai sumažėja bendras neuronų jaudrumas [3]. Tinklo lygmeniu, lauko potencialų registravimas hipokampo riekelėse po apdorojimo sialidaze taip pat atskleidė daugelio vienetų (angl. *multi-unit*) aktyvumo sumažėjimą, o tai rodo, jog desialilinimas mažina tinklo jaudrumą *ex vivo* [3]. Panašus efektas stebėtas ir *in vivo* modeliuose, tiriant priepliuolius, sukeltus didelės kalio koncentracijos injekcija: populiacijos impulsų (angl. *population spikes*) dažnis, priepliuolių atsiradimas ir trukmė reikšmingai sumažėja sialidaze apdorotuose gyvūnuose. Priešingai, sialidazės aktyvumo inhibitoriai sukelia persialilinimą ir reikšmingai prailgina priepliuolių trukmę [3]. Vėlesni tyrimai taip pat patvirtino, kad endogeninės sialidazės aktyvumo slopinimas didina neuronų jaudrumą ir moduliuoja ilgalaike potenciaciją [4, 5].

Literatūros duomenys, gauti tiriant gyvūnų modelius, aiškiai rodo, kad didelis sialilinimo lygis didina tinklo jaudrumą ir skatina priepliuolių, dažniausiai epilepsijos simptomą, riziką. Tačiau, norint patvirtinti šios hipotezės klinikinį aktualumą, būtina ištirti šiuos procesus tiesiogiai žmogaus smegenų audinyje. Todėl, pasitelkiant unikalią sistemą – organotipines žmogaus smegenų audinio kultūras, paruoštas iš chirurgiškai pašalinto normalaus ir epilepsinio audinio, – šiame darbe tiriamas neuronų sialilinimo įtaka tinklo aktyvumui. Moduliuojant sialilinimo lygi junginiais, turinčiais priešingą poveikį: sialidazės inhibitoriumi 2,3-dehidro-2-deoksi-N-acetilneuramino rūgštimi (DANA), kuris padidina sialilinimo lygi, bei sialittransferazės inhibitoriumi 3F<sub>ax</sub>-Neu5Ac (FAX), kuris ji sumažina [6]. Registruojant tinklo

atsaką multielektrodų gardelėmis (angl. *multielectrode array*, MEA), siekiama tiesiogiai įvertinti, kaip šie pokyčiai veikia bazinį bei stimuliuotą tinklo aktyvumą.

Šio darbo pagrindinis tikslas – ištirti sialilinimo lygio įtaką neuronų tinklo aktyvumui žmogaus smegenų audinio modelyje. Remiantis literatūra, keliamas hipotezė, kad:

**Padidintas sialilinimo lygis (DANA poveikis) padidina neuronų tinklo jaudrumą ir sukelia sinchronizuotą aktyvumą, o sumažintas sialilinimo lygis (FAX poveikis) nesukelia sinchronizacijos ir palaiko fiziologinį aktyvumą.**

Siekiant patikrinti šią hipotezę, atlikta kiekybinė neuronų aktyvumo, sinchronizacijos bei tinklo architektūros analizė, taikant MEA duomenis ir specializuotą analizės įrankį, sukurtą Python kalba.

## 2 Medžiagos ir metodai

### 2.1 Žmogaus smegenų audinio paruošimas ir cheminis poveikis

Šiame darbe analizuoti duomenys, gauti tiriant žmogaus smegenų audinio mēginį (#328), gautą neurochirurginės operacijos metu iš epilepsijos židinio.

- **Audinio paruošimas ir kultivavimas:** Iš audinio buvo paruoštos  $300 \mu\text{m}$  storio riekelės, kurios buvo kultivuojamos kaip organotipinės žmogaus smegenų riekelų kultūros iki 21 dienos in vitro (DIV21).
- **Cheminio poveikio sąlygos:** Siekiant moduliuoti sialilinimo lygi, riekelų kultūroms buvo taikytos skirtinges cheminio poveikio sąlygos, lyginant jas su kontroline (Ctrl) grupe. Šiame darbe detaliau nagrinėjamos šios sąlygos:
  - **Kontrolė (Ctrl):** audinys be papildomo cheminio poveikio.
  - **DANA:** audinys 48 valandas iki eksperimento paveiktas sialidazės inhibitoriumi DANA.
  - **FAX:** audinys 24 valandas iki eksperimento paveiktas sialiltransferazės inhibitoriumi FAX.

**Naudotų cheminių junginių poveikis:** Siekiant moduliuoti sialilinimo lygi, naudoti šie junginiai [6]:

**DANA** (2,3-dehidro-2-deoksi-N-acetilneuramino rūgštis) – sialidazės inhibitorius (angl. *sialidase inhibitor*). Jis slopina sialidazes – fermentus, kurie šalina sialo rūgštį nuo lastelės paviršiaus. Šis desialilinimo slopinimas sukelia padidėjusį sialilinimo lygi (hipersialilinimą).

**FAX** ( $3\text{F}_{\text{ax}}$ -Neu5Ac) – sialiltransferazės inhibitorius (angl. *sialyltransferase inhibitor*). Jis slopina sialiltransferazes – fermentus, atsakingus už sialo rūgšties prijungimą prie glikanų. Taip sutrikdomas sialilinimo procesas ir pasiekiamas sumažėjės sialilinimo lygis (hiposialilinimas).

- **Elektrofiziologiniai įrašai ir analizuojami duomenys:** Tinklo aktyvumas buvo registruojamas naudojant 60 kanalų MEA sistemą, signalą diskretizuojant 20 kHz dažniu. Šiame darbe, siekiant įvertinti, kaip skirtinges cheminės sąlygos (sialilinimo lygio pokyčiai) veikia bazinį tinklo aktyvumą ir jo atsaką į stimuliaciją, iš kiekvieno eksperimentinio įrašo analizei buvo atrinkti du segmentai:

**Bazinio aktyvumo įrašas** (Rest): 20 minučių trukmės įrašas, atspindintis ramybės būseną. Rezultatuose ši būsena vadinama *Control*.

**Stimuliuoto aktyvumo įrašas** (Glut): 10 minučių trukmės įrašas iškart po ūmios stimuliacijos glutamatu. Rezultatuose ši būsena vadinama *Active*.

## 2.2 Duomenų apdorojimo seka

Dėl senų .mcd formato failų nesuderinamumo su moderniais įrankiais, buvo sukurta speciali duomenų analizės seka Python kalba. Duomenų apdorojimas vyko keliais etapais:

1. Originalūs binariniai .mcd failai, gauti iš nebepalaikomos MC\_Rack (v4.6.2) programos, buvo konvertuoti į tekstinius ASCII (.txt) failus naudojant seną, MC\_DataTool (v2.6.15) įrankį.
2. Dideli .txt failai buvo apdoroti specialiai parašytu Python skriptu, kuris juos suspaudė ir konvertavo į efektyvesnį, tabuliacija atskirtų verčių (.tsv) formatą.
3. Tolesniams duomenų apdorojimui ir giliajai tinklo analizei buvo sukurta išsami analizės sistema Python kalba, kurios pagrindą sudaro MEAAnalysis klasė. Ši sistema automatizavo visus analizės žingsnius, įskaitant proveržių, funkcinio ryšio ir tinklo topologijos analizę, bei generavovo atitinkamus grafikus ir statistines ataskaitas. Skaičiavimų efektyvumui užtikrinti buvo pasitelkti lygiagretūs skaičiavimai ir kodo kompliliavimo metodai (Numba). **Pastaba:** momentinio impulsų dažnio (angl. *instantaneous firing rate*) grafikams generuoti buvo sukurta atskira, specializuota Python programa.

## 2.3 Veikimo potencialų (spike) detekcija

Siekiant tiksliai identifikuoti neuronų impulsus skirtingo tipo triukšminguose signaluose, buvo lygiagrečiai taikomi du nepriklausomi metodai, leidžiantys palyginti ir patvirtinti rezultatus:

- **Vidurkio Absoliutaus Nuokrypio (MAD) Metodas:** Neapdorotas signalas buvo analizuojamas trumpomis, 2 sekundžių trukmės, dalimis. Kiekvienai daliai buvo apskaičiuojamos adaptivus triukšmo slenkstis, remiantis medianos absoliučiuoju nuokrypiu (MAD). Slenksčio jautrumas buvo reguliuojamas faktoriumi 0,9 (mad\_threshold\_factor). Impulsai (tieki teigiami, tieki neigiami), viršijantys šį slenkstį, buvo registruojami, o siekiant išvengti to paties impulso daugkartinio fiksavimo, buvo taikomas 2 ms refrakterinis periodas. Šis metodas yra atsparus staigiems triukšmo lygio pokyčiams.
- **Tolydžiosios Bangelių Transformacijos (CWT) Metodas:** Signalas buvo transformuotas naudojant ‘Mexican Hat’ (mexh) bangelę ties 8 skirtingais laiko masteliais, apimančiais nuo 0,5 iki 2,5 ms trukmės įvykius. Impulsai buvo identifikuojami tose vietose, kur transformacijos koeficientai viršijo adaptivų, statistiškai nustatyta slenkstį. Šio slenksčio jautrumas buvo reguliuojamas faktoriumi 0,7 (wavelet\_threshold\_factor). CWT metodas yra ypač tinkamas aptikti trumpus, neperiodinius signalus (kaip veikimo potencialai) triukšmingoje aplinkoje, nes jis analizuoją signalą tiek laiko, tiek dažnio domenose.

## 2.4 Proveržių ir tinklo aktyvumo analizė

Siekiant įvertinti aktyvumo dinamiką tiek atskirų neuronų, tiek viso tinklo lygmeniu, buvo analizuojami du pagrindiniai reiškiniai: vieno kanalo proveržiai ir sinchronizuoti tinklo proveržiai.

- **Vieno kanalo proveržiai (Bursts):** Individualių kanalų proveržiai buvo identifikuojami remiantis “Max-Interval Method” algoritmu [7]. Proveržis buvo apibrėžiamas kaip impulsų seka, atitinkanti tris kriterijus: ją turėjo sudaryti mažiausiai 3 impulsai (`burst_min_spikes`), intervalas tarp gretimų impulsų (angl. *inter-spike interval*, ISI) neturėjo viršyti 100 ms (`burst_max_isi_ms`), o bendra proveržio trukmė privalėjo būti ne trumpesnė nei 50 ms (`burst_min_duration_ms`).
- **Sinchronizuoti tinklo proveržiai (Network Bursts):** Viso tinklo sinchroniškam aktyvumui nustatyti taikyta metodika, kurią pasiūlė Eytan ir Marom [8]. Pirmiausia, viso tinklo aktyvumas buvo diskretizuotas, suskirstant ji į 5 ms trukmės laiko langelius (angl. *bins*). Sinchronizuotas tinklo proveržis buvo registruojamas tuomet, kai bent 4 skirtinių kanalų (`network_event_min_channels`) sugeneruodavo bent po vieną impulsą tame pačiame laiko langelyje.

## 2.5 Funkcinio ryšio ir tinklo topologijos analizė

Siekiant pereiti nuo atskirų kanalų aktyvumo prie tinklo organizacijos supratimo, buvo atlikta jo funkcinio ryšio ir topologinių savybių analizė.

- **Funkcinis Ryšys:** Siekiant nustatyti kryptingus funkcinius ryšius tarp neuronų populiacijų, buvo skaičiuojama jų impulsų sekų kryžminė koreliacija (angl. *cross-correlation*) [9]. Analizė atlikta  $\pm 100$  ms laiko lange, su 1 ms žingsniu. Kryptinis (efektyvus) ryšys iš kanalo A į B buvo laikomas egzistuojančiu, jei koreliogramos pike, esančiame 1–20 ms užlaikymo intervale (atitinkančiame galimą sinapsinį vėlavimą), normuotas stiprumas viršijo nustatyta slenkstį. Taip gautos jungčių matricos buvo traktuojamos kaip svertiniai, kryptingi grafai.
- **Tinklo topologinių savybių analizė:** Gauti funkcinio ryšio tinklai buvo analizuojami taikant grafų teorijos metrikas, siekiant kiekybiškai įvertinti jų struktūrines savybes [10]. Analizuoti šie rodikliai:
  - **Bendrieji tinklo rodikliai:** Tankis (angl. *density*), apibūdinantis esamų ryšių proporciją, ir vidutinis klasterizacijos koeficientas (angl. *average clustering coefficient*), parodantis tinklo tendenciją formuoti lokalius mazgų telkinius.
  - **Mazgų centralumo rodikliai:** Siekiant įvertinti kiekvieno kanalo svarbą tinkle, apskaičiuotas laipsnio (angl. *Degree*), tarpumo (angl. *Betweenness*), klasterizacijos (angl. *Clustering*) ir Eigenvector centralumas.
- **Bendruomenių Struktūra:** Siekiant identifikuoti funkcinės neuronų grupes (modulius), t.y., tankiau tarpusavyje susijusių mazgų grupes, buvo taikytas Louvain algoritmas. Analizė atlikta tik aktyvių kanalų suformuotame sub-tinkle. Aptiktos struktūros kokybė buvo įvertinta modularumo (angl. *modularity*) rodikliu.

- **Tinklo branduolio (angl. *Rich-Club*) analizė:** Analizuota, ar didelio laipsnio mazgai (centrai) yra linkę jungtis tarpusavyje ir formuoti tankų, integruotą tinklo branduolį. Šis reiškinys (angl. *rich-club phenomenon*) vertintas lyginant centrų jungimosi tankį su tuo, kuris būtų tikėtinas atsitiktiniame, panašios topologijos, tinkle.
- **Mazgų Kartografija (Node Cartography):** Siekiant detaliai klasifikuoti kiekvieno kanalo topologinę rolę tinkle, buvo atlikta mazgų kartografijos analizė. Kiekvieno mazgo vaidmuo apibrėžtas remiantis dviem pagrindiniais rodikliais:
  - **Dalyvavimo koeficientas ( $p$ ),** kuris kiekybiškai įvertina, kaip tolygiai mazgo ryšiai pasiskirsto tarp skirtinį bendruomenių. Aukšta  $P$  reikšmė rodo „jungiklio“ (angl. *connector*) rolę.
  - **Vidinis modilio laipsnis (z-score),** kuris parodo, ar mazgas yra stipriai susijęs su kitais savo bendruomenės nariais, palyginti su kitais tos pačios bendruomenės mazgais. Aukšta z-score reikšmė rodo „centro“ (angl. *hub*) rolę.

Remiantis šiais rodikliais, kiekvienas aktyvus kanalas buvo priskirtas konkrečiam funkciniam vaidmeniui (pvz., ‘Peripheral’, ‘Connector Hub’).

## 2.6 Statistinė analizė

Siekiant įvertinti skirtumus tarp Kontrolinės ir Aktyvios grupes, kanalų lygmens metrikos buvo lyginamos taikant neparametrinį **Mann-Whitney U testą**, kadangi duomenų pasiskirstymas neatitiko normalumo prielaidos. Siekiant kontroliuoti klaidingai teigiamų rezultatų atsiradimo tikimybę dėl daugkartinių palyginimų (vienas testas kiekvienai metrikai), gautos  $p$ -reikšmės buvo koreguotos taikant Benjamini-Hochberg (FDR) metodą. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai koreguota  $p$ -reikšmė ( $p_{adj}$ ) buvo mažesnė nei 0.05.

### 3 Rezultatai

Šiame skyriuje atliekamas išsamus dviejų kontrastingų būsenų palyginimas: kontrolinės (Ctrl), atspindinčios bazinę audinio fiziologiją, ir sukeltos hipersialilinimo būsenos (DANA). Analizės tikslas – kiekybiškai ir kokybiškai įvertinti, kaip padidintas sialilinimo lygis keičia neuronų tinklo aktyvumą ir funkcinę architektūrą žmogaus smegenų audinyje (#328 mėginys). Visi rezultatai gauti taikant tolydžiosios bangelių transformacijos (WAVELET) metodą.

#### 3.1 Hipersialilinimo poveikis: DANA sukeltas perėjimas į hipersynchronizuotą būseną

##### 3.1.1 Padidinto sialilinimo poveikis: vidutinio lygio tinklo jaudrumo padidėjimas

Norint įvertinti, kaip padidintas sialilinimo lygis veikia neuronų tinklą, buvo atliktas vizualus aktyvumo palyginimas tarp kontrolinės būklės (Ctrl) ir būklės, kai audinys buvo paveiktas sialidazės inhibitoriumi DANA, slopinančiu sialo rūgšties pašalinimą.

Ramybės būsenoje (Rest), DANA paveiktame audinyje fiksuojančios intensyvesnis foninis neuronų aktyvumas, lyginant su kontrole. Impulsų pasiskirstymas tarp kanalų yra tolygesnis, tačiau sinchronizuotų tinklo proveržių ar staigūs aktyvumo bangų neužfiksuota. Tam tikruose kanaluose įžvelgiamas dažnesnis aktyvumas, bet jo pobūdis lieka fragmentuotas.

Stimuliacijos metu (Glut), aktyvumas padidėja tiek Ctrl, tiek DANA sąlygose. DANA paveiktame audinyje stebimas platesnis aktyvių kanalų pasiskirstymas ir nežymiai tankesnė impulsų struktūra, tačiau ir čia nėra aiškių sinchronizuotų proveržių visame tinkle. Aktyvumo pobūdis išlieka gana difuzinis ir netolygus, o padidėjimas atrodo toninis, o ne fazinis.

Apibendrinant, padidintas sialilinimo lygis gali turėti įtakos neuronų tinklo jaudrumui, tačiau iš pateiktų įrašų nėra pakankamo pagrindo teigti apie ryškią sinchronizaciją ar patologinius aktyvumo modelius. Šie pokyčiai turėtų būti toliau vertinami remiantis kiekybine analize.

##### 3.1.2 Kiekybinė aktyvumo analizė: impulsų dažnio pokyčiai

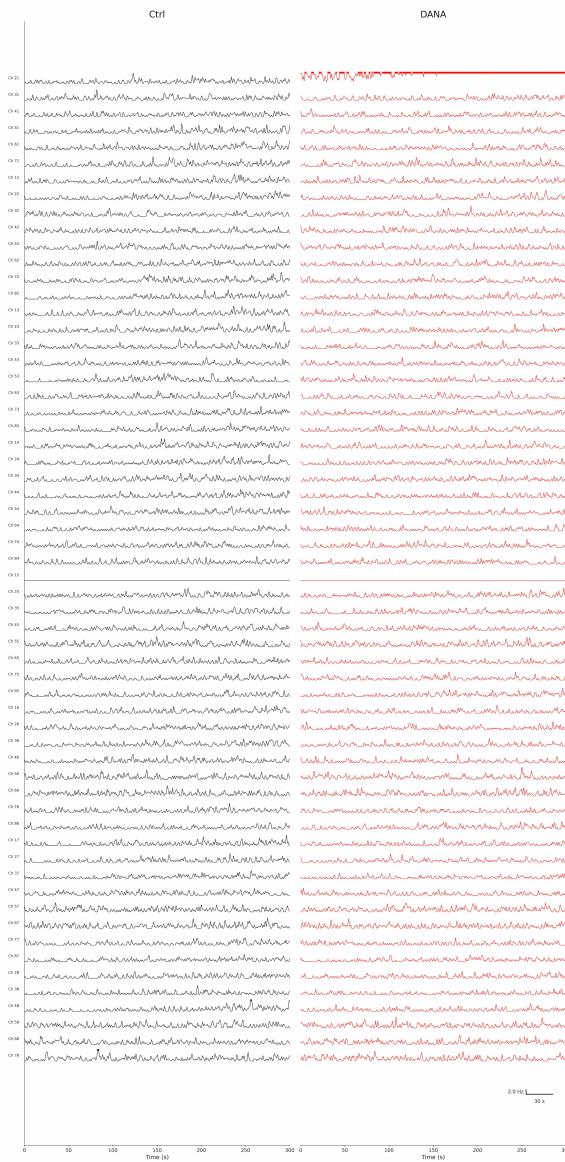
Kiekybinė analizė pagrindžia vizualiai stebėtus aktyvumo skirtumus tarp kontrolinės (Ctrl) ir DANA sąlygų. Grafikuose pateikiama vidutinis impulsų dažnis (Hz) kiekviename kanale, atskirai ramybės (mėlyna) ir stimuliuto (oranžinė) būsenos metu.

Abiem sąlygomis po glutamato stimuliacijos fiksuojančios impulsų dažnio padidėjimas daugumoje kanalų, tačiau DANA atveju šis padidėjimas yra nuoseklesnis ir šiek tiek didesnis visame tinkle ( $p_{adj} = 7.740 \times 10^{-10}$ ). Tai rodo, kad padidintas sialilinimo lygis skatina stipresnį tinklo atsaką į išorinį dirgiklį.

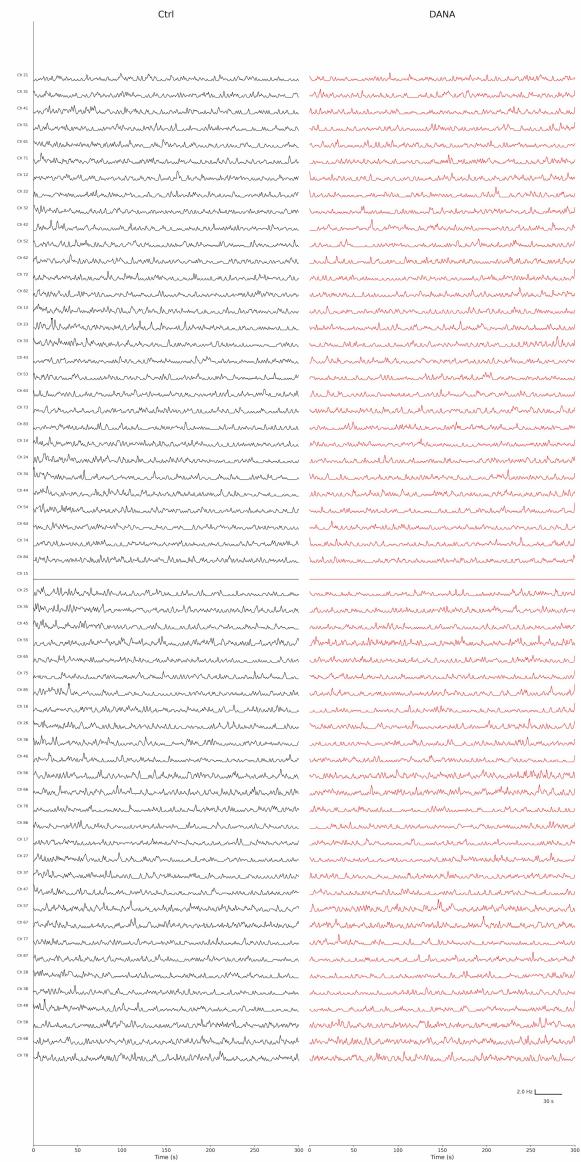
Svarbu atkreipti dėmesį, kad DANA grafiko vertikalės (Y ašys) skalė yra mažesnė nei kontrolinės sąlygos, todėl skirtumai gali atrodyti mažesni nei yra iš tikrųjų. Taip pat pastebimas ryškus aktyvumas viename kanale (Ch 21) DANA ramybės būsenoje, kas gali būti artefaktinis.

Apibendrinant, padidintas sialilinimas padidina vidutinį neuronų aktyvumą po stimuliacijos, tačiau padidėjimas yra toninio pobūdžio, be aiškių požymių, kad aktyvumas tampa sinchronizuotas ar proveržinis visame tinkle.

#328 Rest network activity comparison

(a) Tinklo aktyvumas **ramybės** būsenoje esant padidintam sialilinimui

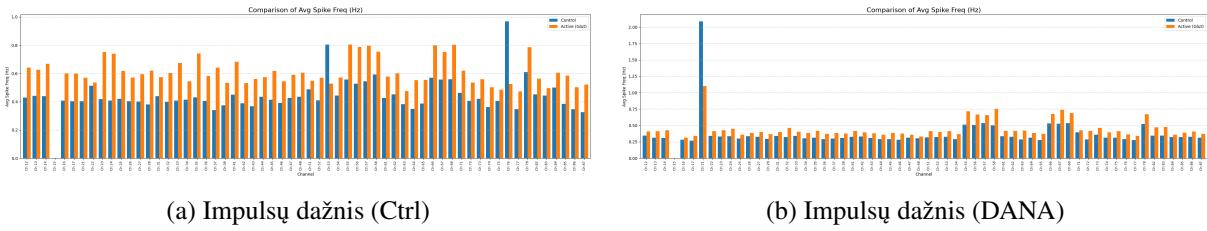
#328 Glut network activity comparison

(b) Tinklo aktyvumas **po glutamato** stimuliacijos esant padidintam sialilinimui

1 pav.: Momentinio tinklo aktyvumo įrašų palyginimas tarp kontrolinės (juoda) ir padidinto sialilinimo (raudona) sąlygų. (a) Ramybės būsenoje, padidinus sialilinimo lygi, matomas stipresnis foninis aktyvumas ir platesnis aktyvių kanalų išsidėstymas, palyginti su kontrole. (b) Po glutamato stimuliacijos impulsų dažnis dar labiau išauga, o aktyvumas tampa intensyvus visame tinkle. Šie pokyčiai rodo, kad padidintas sialilinimas didina neuronų tinklo jaudrumą.

### 3.1.3 Funkcinės tinklo architektūros pokyčiai: moduliari struktūra ir sialilinimo poveikis

Tinklo funkcinės architektūros analizė, pagrįsta bendruomenių struktūra ir globaliais tinklo rodikliais, parodė esminius skirtumus tarp kontrolinės (Ctrl) ir padidinto sialilinimo (DANA) sąlygų, tačiau šie skirtumai ne visada atitiko išankstines prielaidas apie patologinį tinklo reorganizavimą.



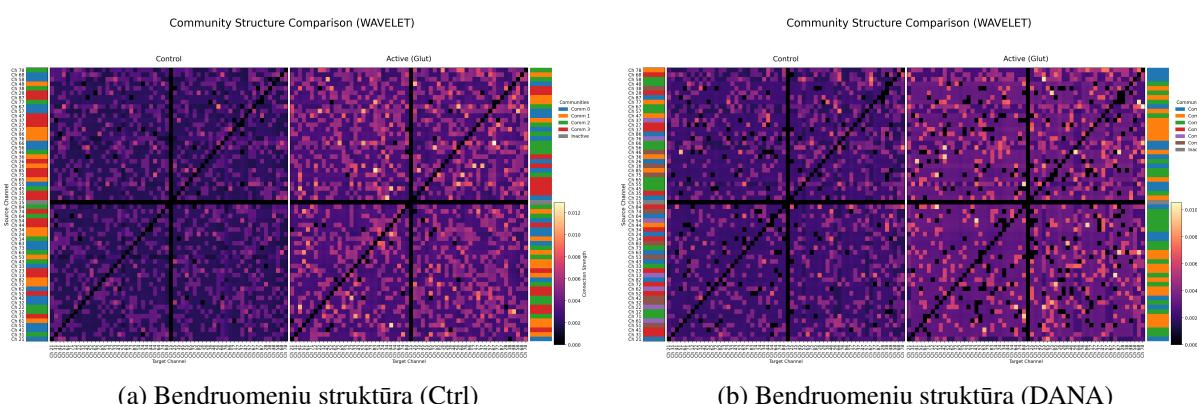
2 pav.: Vidutinio impulsų dažnio palyginimas tarp kontrolinės (a) ir DANA (b) sąlygų. Abiem atvejais matomas statistiškai reikšmingas aktyvumo padidėjimas po stimuliacijos (oranžinė spalva), palyginti su ramybės būseną (mėlyna). **Svarbu:** Y ašys grafikuose yra skirtingo mastelio. Nors DANA sąlygoje stebimas synchronizuotas aktyvumas, vidutinis impulsų dažnis nėra akivaizdžiai didesnis nei kontrolėje, kas gali būti paaiškinama ilgais tylos periodais tarp sinchroniškų proveržių.

Kontrolinėje būsenoje stebimas klasikinis moduliarios struktūros tinklas: bendruomenės (funkciškai susijusių kanalų grupės) yra aiškiai apibrėžtos ir išlieka stabilių net ir po glutamato stimuliacijos (fig. 3a). Tai atspindi sveikai organizuotą ir lankstų neuronų tinklą, gebantį išlaikyti struktūrą nepaisant funkcinio sužadinimo. Tai patvirtina ir modularumo koeficientas, kuris sumažėja nežymiai – nuo 0.0331 (ramybės būsenoje) iki 0.0281 po stimuliacijos.

DANA paveiktame tinkle matoma kiek kitokia situacija. Vizualiai bendruomenių struktūra atrodo mažiau segmentuota (fig. 3b), tačiau kiekybinė analizė rodo, kad modularumo sumažėjimas (nuo 0.0284 iki 0.0272) yra netgi mažesnis nei kontrolėje. Tai reiškia, kad, priešingai nei būtų galima tikėtis, padidintas sialilinimas nesukelia stipraus tinklo fragmentacijos ar bendruomenių nestabilumo. Iš dalies tai gali būti paaiškinama sumažėjusių tinklo jungčių tankiu po stimuliacijos (nuo 0.9605 iki 0.9334), rodančiu mažesnį tinklo integracijos lygi, o ne jo hiperjunglumą ar rigidiškumą.

Taigi, nors DANA paveiktame tinkle stebimi aktyvumo padidėjimai, jie nėra lydimi fundamentalių funkcinės architektūros griūčių. Tinklas išlaiko moduliarinę struktūrą, o bendruomenių reorganizacija po stimuliacijos yra nedidelė. Priešingai, kontrolinėje sąlygoje pokytis tarp ramybės ir aktyvios būsenos yra didesnis, kas rodo didesnį topologinį prisitaikymą prie dirgiklio.

Apibendrinant, padidėjęs sialilinimo lygis keičia tinklo jautrumą ir aktyvumo profili, tačiau neišbalansuoją pagrindinės funkcinės struktūros. Tai leidžia daryti išvadą, kad DANA poveikis išryškėja labiau per funkcinius nei struktūrinius tinklo aspektus.



3 pav.: Funkcinio ryšio ir bendruomenių struktūros palyginimas. (a) Kontrolinėje sąlygoje bendruomenės išlieka gana stabilios po stimuliacijos. (b) DANA sąlygoje bendruomenių sudėtyje matomi pokyčiai, tačiau bendra moduliari struktūra išlieka, o modularumo sumažėjimas yra net mažesnis nei kontrolėje.

### **3.2 Sialilinimo slopinimo poveikis: FAX sukeltas jaudrumo padidėjimas išsaugant tinklo stabilumą**

Antrasis palyginimas atliktas tarp kontrolinės sąlygos ir audinio, paveikto sialiltransferazės inhibitoriumi FAX, kuomet slopinamas sialo rūgšties prijungimas prie glikanų struktūrų, t. y. sumažėja neuronų tinklo sialilinimo lygis. Ši analizė parodė, kad, nors FAX padidina bendrą tinklo jaudrumą, jis, priešingai nei DANA, nesukelia patologinės tinklo reorganizacijos ir išlaiko esminius sveikos funkcinės architektūros bruožus.

#### **3.2.1 Kiekybinė aktyvumo analizė: impulsų dažnio pokyčiai**

Norint įvertinti sumažinto sialilinimo (FAX) poveikį neuronų aktyvumui, buvo atliktas kiekybinė momentinio impulsų dažnio analizė, lyginant ramybės (Rest) ir stimuliacijos (Glut) būsenas. Vertinimas atliktas WAVELET metodu, kuris pasižymi didesniu jautrumu trumpalaikiams, nepastoviems signalams.

Ramybės būsenoje FAX paveiktame audinyje stebėtas žemas, bet tolygiai pasklidęs impulsinis aktyvumas. Impulsų dažnis tarp kanalų buvo pasiskirstęs vienodžiau, be aiškių lokalizuotų aktyvumo židinių ar sinchronizuotų pliūpsnių. Šis foninis aktyvumas atspindi fiziologinę tinklo dinamiką, be požymiu, būdingų patologinei hiperjaudrai.

Po glutamato stimuliacijos fiksotas statistiškai reikšmingas vidutinio impulsų dažnio padidėjimas (nuo  $0.441 \pm 0.120$  Hz iki  $0.599 \pm 0.120$  Hz;  $p_{adj} = 2.433 \times 10^{-13}$ ). Šis padidėjimas pasireiškė daugelyje kanalų, tačiau aktyvumas išliko tolygas ir neperaugo į sinchronizuotą proveržinį režimą ( $p_{adj} = 2.197 \times 10^{-5}$ ).

Svarbu pažymėti, kad, skirtinai nei DANA sąlygoje, FAX poveikis tinklo architektūrai išlieka minimalus. Bendras tinklo moduliarumas pokyčio metu sumažėjo tik nežymiai (nuo 0.0331 iki 0.0281), o tai rodo, kad tinklas išlaiko funkcinį segmentavimą ir nesuyra į hiperintegruotą ar nestabilią būseną. Tinklo tankis netgi šiek tiek padidėjo (nuo 0.9868 iki 0.9898), o vidutinis klasterizacijos koeficientas – reikšmingai padidėjo ( $p_{adj} = 2.742 \times 10^{-13}$ ), kas rodo padidėjusią lokalią jungčių koncentraciją be globalios disorganizacijos.

Šie rezultatai leidžia daryti išvadą, kad FAX poveikis pasireiškia per toninį jaudrumo padidėjimą, išlaikant funkcinį tinklo stabilumą ir topologinį vientisumą. Skirtingai nei DANA sukeltas poveikis, kuris paskatino tinklo reorganizaciją ir sinchronizuotą aktyvumą, FAX veikiamas tinklas atsako į dirgiklį sustiprintu, bet fiziologiskai koordinuotu būdu.

#### **3.2.2 Aktyvumo padidėjimas be patologinių proveržių**

Vidutinio impulsų dažnio analizė rodo, kad FAX paveiktas audinys po glutamato stimuliacijos demonstravo tolygų, bet reikšmingą neuronų aktyvumo padidėjimą, išreikštą padidėjusių impulsų generavimo sparta daugumoje kanalų (fig. 5). Tačiau, skirtinai nei DANA atveju, aktyvumas išliko pasiskirstęs per visą tinklą.

Nepaisant statistiškai reikšmingo impulsų dažnio padidėjimo ( $p_{adj} = 2.4 \times 10^{-13}$ ), proverčius atspindinčios metrikos, tokios kaip bendras jų skaičius ( $p_{adj} = 0.1231$ ) ar proveržių trukmę, išliko stabilios. Aktyvumo dinamika nerodė perėjimo į fazinį, sinchronizuotą aktyvumą, būdingą epileptiforminiams modeliams. Tai leidžia teigti, kad FAX sukeliamas jaudrumo padidėjimas išlieka toninis ir fiziologiskai koordinuotas, skirtinai nei DANA sąlygoje, kurioje fiksuta aiški sinchronizacija.

#328 Rest network activity comparison

#328 Glut network activity comparison



(a) Momentinis impulsų dažnis ramybės būsenoje (Rest)

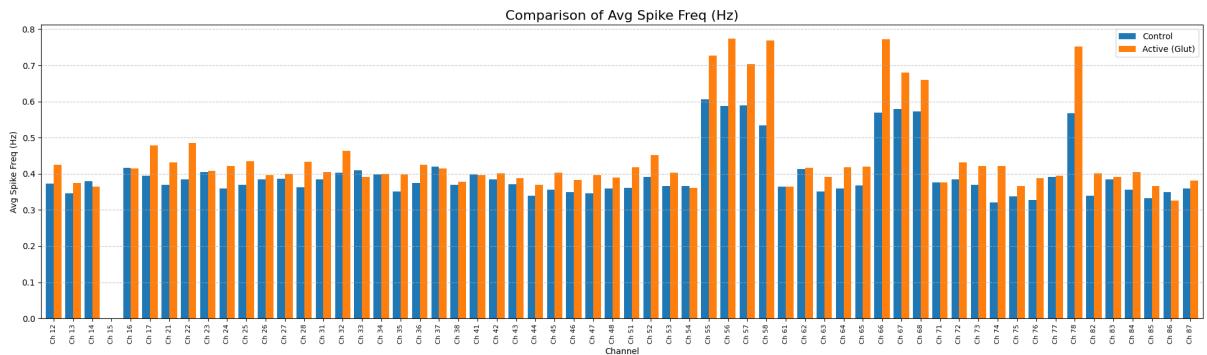
(b) Momentinis impulsų dažnis po glutamato stimuliacijos (Glut)

4 pav.: Impulsinio aktyvumo dinamika FAX sąlygoje. Po glutamato stimuliacijos (b) impulsų dažnis padidėja, tačiau aktyvumas išlieka tolygus, be patologinio sinchronizacijos.

### 3.2.3 Funkcinės tinklo architektūros stabilumas: moduliacijos be destabilizacijos

Funkcinio ryšio ir bendruomenių struktūros analizė rodo, kad FAX paveiktas tinklas, nepaisant padidėjusio neuronų aktyvumo, išlaiko stabilių moduliacinių organizuotumą. Louvain algoritmo identikuotos bendruomenės ramybės ir aktyvumo fazėse išlieka labai panašios, be esminių modulių persitvarkymų (fig. 6).

Statistinė analizė parodė, kad moduliarumo indeksas reikšmingai nesikeitė: nuo  $Q = 0.0331$  (Rest)

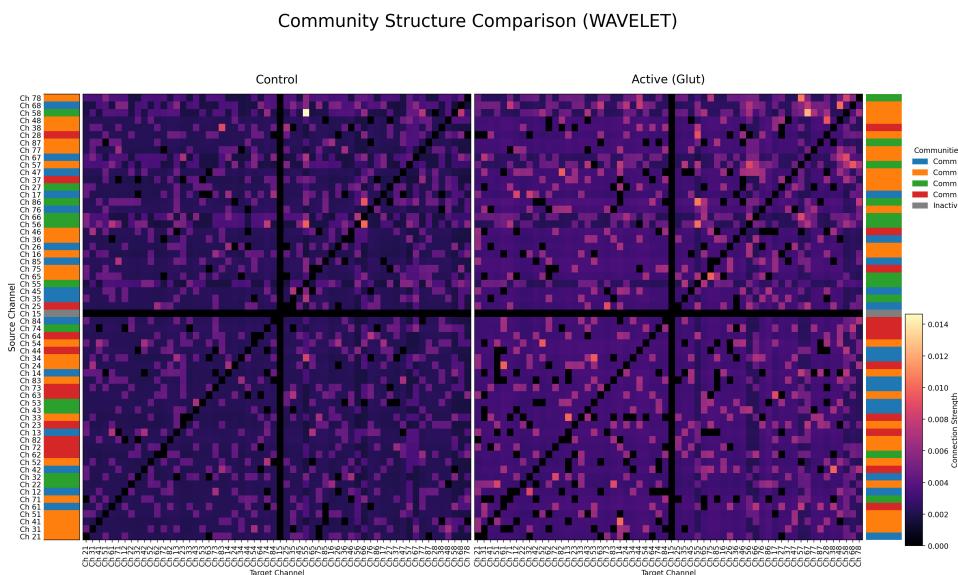


5 pav.: Vidutinio impulsų dažnio palyginimas FAX sąlygoje. Po glutamato stimuliacijos (oranžinė spalva) daugelyje kanalų stebimas aktyvumo padidėjimas, tačiau be lokalizuotų hiperaktyvumo židinių ar sinchronizuotų proveržių.

iki  $Q = 0.0281$  (Glut), o šis sumažėjimas nėra statistiškai reikšmingas ( $p_{adj} = 0.117$ ). Taip pat nepastebėta reikšmingo tinklo tankio pokyčio (Ctrl: 0.9868, Glut: 0.9898;  $p_{adj} = 0.39$ ), o vidutinis klasterizacijos koeficientas padidėjo ( $p_{adj} = 0.0025$ ), kas rodo padidėjusį lokalinių tarpusavio ryšį be globalios reorganizacijos.

Vizualiai, ryšių stiprumo šiluminės kortos atskleidžia tik nežymų bendrą tinklo aktyvumo padidėjimą, tačiau be per didelio sujungtumo ir be funkcinės struktūros išsibalansavimo. Kanalu priklausomybė moduliams (spalvoti žymekliai) beveik nesikeičia tarp fazų, o vidiniai modulių ryšiai lieka išreikšti.

Skirtingai nuo DANA sąlygos, kurioje po stimuliacijos fiksuojanamas ryškus funkcinės architektūros persitvarkymas bei modularumo sumažėjimas ( $Q$  nuo 0.0284 iki 0.0272), FAX atveju išlaikoma architektūrinė pusiausvyra. Tai leidžia daryti išvadą, kad sialilinimo slopinimas, nors ir padidina tinklo jaudrumą, nepažeidžia funkcinės tinklo segmentacijos ir nedestabilizuoją informacijos perdavimo struktūros.



6 pav.: Funkcinio ryšio ir bendruomenių struktūros palyginimas FAX sąlygoje (WAVELET metodas). Tinklo modulių sudėtis ir vidiniai ryšiai išlieka panašūs tarp ramybės ir aktyvios fazės, kas rodo architektūrinį stabilumą nepaisant padidėjusio neuronų aktyvumo.

## 4 Diskusija ir išvados

### 4.1 Diskusija

Šiame darbe, pasitelkus žmogaus smegenų audinio modelį ir multielektrodų gardelių (MEA) technologiją, buvo tirtas sialilinimo lygio poveikis neuronų tinklo aktyvumui ir funkcinei organizacijai. Rezultatai rodo, kad sialilinimas yra reikšmingas tinklo jaudrumo ir sinchronizacijos modulatorius, tačiau jo poveikis priklauso nuo intervencijos pobūdžio. Išryškėjo du skirtini veikimo mechanizmai: DANA sukeltas hipersialilinimas, siejamas su padidėjusia sinchronizacija, ir FAX sukeltas hiposialilinimas, siejamas su toniniu jaudrumu padidėjimu, išlaikant tinklo stabilumą.

Padidėjęs sialilinimo lygis, sukeltas sialidazės inhibitoriumi DANA, paskatino tinklo aktyvumo sustiprėjimą, ypač po glutamato stimuliacijos. Fiksuočių požymiai, būdingi perėjimui iš toninio į fazinį aktyvumo režimą, rodo padidėjusią tinklo sinchronizaciją. Tai atitinka ankstesnius tyrimus su gyvūnų modeliais, kur padidėjęs sialilinimas siejamas su sumažėjusi sužadinimo slenksčiu ir didesniu neuronų jaudrumu [3, 4]. Mechanistika tai gali būti siejama su lokalia depolarizacija, kurią sukelia sialo rūgšties krūvis aplink įtampos valdomus jonų kanalus [2, 1]. Nors aktyvumas padidėjo, moduliari tinklo struktūra iš esmės nebuvo suardyta. Tai gali rodyti, kad net esant ryškiai sinchronizacijai, išlieka homeostatiniai tinklo stabilumo mechanizmai.

Tuo tarpu sialiltransferazės inhibitorius FAX, mažinančio sialilinimo lygi, poveikis buvo netikėtas. Remiantis ankstesne literatūra, buvo tikėtasi jaudrumo sumažėjimo [3], tačiau fiksotas statistiškai reikšmingas aktyvumo padidėjimas. Svarbu, kad šis padidėjimas buvo toninis, be ryškios sinchronizacijos ar proveržių. Funkcinė tinklo architektūra – tankis, klasterizacija, moduliarumas – išliko stabili. Šis neatitikimas literatūrai gali būti aiškinamas skirtingu veikimo pobūdžiu: DANA veikia ūmiai, pašalindamas sialo rūgštį, o FAX veikia chroniškai, slopendamas jos sintezę. Galima hipotezė, kad lėtas sialilinimo mažėjimas skatina kompensacinius mechanizmus, pavyzdžiu, sužadinančių sinapsių sustiprinimą ar slopinimo sumažinimą. Tai galėtų lemti fiziologiskai koordinuotą jaudrumo padidėjimą be tinklo destabilizacijos.

Šio darbo duomenys, gauti iš žmogaus epilepsinio audinio, turi klinikinę svarbą. Jie rodo, kad manipuliacijos sialilinimo lygiu gali sukelti priešingus tinklo atsakus: DANA sukelia sinchronizacijos padidėjimą, o FAX – stabili aktyvumo padidėjimą be patologinių požymių. Tai leidžia daryti išvadą, kad ne tik sialilinimo lygis, bet ir jo moduliacijos dinamika turi esminės reikšmės. Ateities tyrimais tikslinga išplėsti mėginių spektrą, įtraukiant daugiau pacientų ir palyginant su neepilepsiniu audiniu. Taip pat tikslinga derinti MEA metodiką su molekuliniaisiais tyrimais, leidžiančiais tiesiogiai įvertinti sialilinimo pokyčius ir susieti juos su tinklo dinamika.

### 4.2 Išvados

1. **Iškeltos hipotezės analizės duomenys iš dalies patvirtina:** padidintas sialilinimo lygis (DANA) sukelia stipresnį neuronų aktyvumą ir sinchronizuotus proveržius, o sumažintas sialilinimo lygis (FAX) padidina aktyvumą be sinchronizacijos. Tai leidžia

daryti išvadą, kad sialilinimo poveikis tinklo dinamikai priklauso nuo jo sialilinimo lygio keitimas.

2. **Padidėjęs sialilinimo lygis, sukeltas DANA, padidina neuronų tinklo jaudrumą žmogaus smegenų audinyje.** Šis efektas ypač išryškėja po stimuliacijos, kai fiksuojami synchronizuoto aktyvumo požymiai.
3. **Sumažintas sialilinimo lygis, pasiektais FAX, taip pat sukelia aktyvumo padidėjimą, tačiau be patologinės synchronizacijos.** Aktyvumo pobūdis išlieka toninis, o tinklo funkcinė struktūra stabili.
4. **Sialilinimo poveikis priklauso ne tik nuo krypties (hiper- ar hipo-), bet ir nuo manipuliacijos pobūdžio (ūmus ar lėtinis).** Lėtas sialilinimo mažėjimas gali iniciuoti kompensacinius mechanizmus, leidžiančius išlaikyti tinklo pusiausvyrą.
5. **Naudojant Python sukurtą analizės sistemą, buvo sekmingai apdoroti senos formos MEA duomenys.** Sistema leido kiekybiškai įvertinti neuronų aktyvumą, funkcinį ryšį ir tinklo topologiją žmogaus smegenų audinyje.
6. **Žmogaus audinyje sialilinimo moduliacija sukelia kokybiškai skirtingą atsaką nei aprašyta gyvūniniuose modeliuose.** Tai rodo būtinybę tirti šiuos procesus tiesiogiai žmogaus audinyje, ypač vertinant epileptogenezės mechanizmus.

## Literatūra

- [1] A. R. Ednie ir E. S. Bennett. „Sialic acid and the sialic acid-binding lectins in the nervous system: A sweet mystery”. In: *Carbohydrate research* 356 (2012 m.), p. 145–159. DOI: [10.1016/j.carres.2012.03.027](https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.027).
- [2] E. S. Bennett ir kt. „Modulation of the voltage-dependent sodium channel by sialic acid”. In: *The Journal of biological chemistry* 272.39 (1997 m.), p. 24592–24601. DOI: [10.1074/jbc.272.39.24592](https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24592).
- [3] D. S. Isaev ir kt. „Desialylation of neuronal membranes enhances the inhibitory effect of carbamazepine on synaptic transmission in the rat hippocampus”. In: *Epilepsia* 48.8 (2007 m.), p. 1467–1474. DOI: [10.1111/j.1528-1167.2007.01077.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01077.x).
- [4] E. Isaeva ir kt. „Sialic acid content of neuronal membranes modulates the effect of the antiepileptic drug lamotrigine on synaptic transmission in the rat hippocampus”. In: *Epilepsy research* 88.2-3 (2010 m.), p. 241–245. DOI: [10.1016/j.epilepsyres.2009.11.016](https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.11.016).
- [5] A. Savotchenko, G. G. Skibo ir T. M. Vovk. „Changes in long-term synaptic potentiation in the hippocampus of rats in conditions of inhibition of sialidases”. In: *Neurophysiology* 47.3 (2015 m.), p. 208–214. DOI: [10.1007/s11062-015-9507-6](https://doi.org/10.1007/s11062-015-9507-6).
- [6] Ugne Kuliesiute ir kt. „Sialic acid metabolism orchestrates transcellular connectivity and signaling in glioblastoma”. In: *Neuro-Oncology* 25.11 (2023 m.), p. 1963–1975. DOI: [10.1093/neuonc/noad101](https://doi.org/10.1093/neuonc/noad101).
- [7] E. Cotterill ir kt. „A comparison of computational methods for detecting bursts in neuronal spike trains and their application to human stem cell-derived neuronal networks”. In: *Journal of neurophysiology* 116.2 (2016 m.), p. 306–321. DOI: [10.1152/jn.00093.2016](https://doi.org/10.1152/jn.00093.2016).
- [8] Danny Eytan ir Shimon Marom. „Dynamics and Effective Topology Underlying Synchronization in Networks of Cortical Neurons”. In: *Journal of Neuroscience* 26.33 (2006 m.), p. 8465–8476. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.1627-06.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1627-06.2006).
- [9] M. Garofalo ir kt. „Evaluation of the performance of information theory-based methods and cross-correlation to estimate the functional connectivity in cortical networks”. In: *PLoS ONE* 4.8 (2009 m.), e6482. DOI: [10.1371/journal.pone.0006482](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006482).
- [10] J. H. Downes ir kt. „Emergence of a small-world functional network in cultured neurons”. In: *PLoS Computational Biology* 8.5 (2012 m.), e1002522. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1002522](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002522).

## A Priedai

### A.1 Priedas A: kodo repozitorija

Nuoroda į GitHub repozitoriją: [MEA-analysis](#)

### A.2 Priedas B: naudoti analizės parametrai

Spike Detection (MAD):

- mad\_threshold\_factor: 0.9
- refractory\_period\_ms: 2.0

Spike Detection (Wavelet):

- wavelet\_scales\_ms: [0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5]
- wavelet\_threshold\_factor: 0.7
- refractory\_period\_ms: 2.0

Burst Detection:

- burst\_max\_isi\_ms: 100
- burst\_min\_duration\_ms: 50
- burst\_min\_spikes: 3

Network Event Detection:

- network\_event\_bin\_ms: 5
- network\_event\_min\_channels: 4

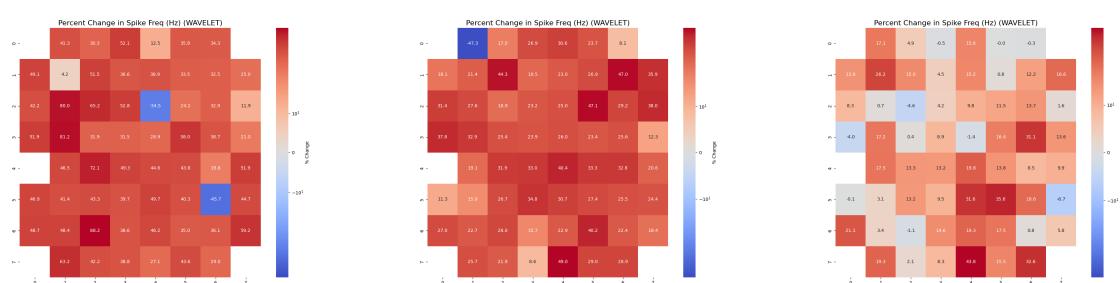
Functional Connectivity:

- corr\_bin\_ms: 1
- corr\_lag\_ms: 100
- corr\_min\_lag\_ms: 1
- corr\_max\_lag\_ms: 20

Node Cartography:

- hub\_z\_score\_threshold: 2.5
- connector\_participation\_threshold: 0.625

### A.3 Priedas C: papildomi grafikai



7 pav.: Procentinio impulsų dažnio pokyčio šilumos žemėlapiai po stimuliacijos (Wavelet metodas). (a) Ctrl – vidutiniai, difuziniai pokyčiai; (b) DANA – ryškūs lokalūs šuoliai, būdingi sinchronizuotam aktyvumui; (c) FAX – tolygus ir stipresnis nei Ctrl padidėjimas be sinchronizacijos.