

Обсуждения, статистику и профили авторов этой публикации см. по адресу: <https://www.researchgate.net/publication/49760521>

Эфаптическая связь корковых нейронов

Статья Nature Neuroscience · Февраль 2011 г.

DOI: 10.1038/nn.2727 · Источник: PubMed

ЦИТАТЫ

546

ЧИТАЕТ

2,025

4 автора:



Костас Анастасиу

Медицинский центр Cedars-Sinai

64 ПУБЛИКАЦИИ 9,134 ЦИТАТЫ

[СМОТРЕТЬ ПРОФИЛЬ](#)



Родриго Перин

Федеральная политехническая школа Лозанны

31 ПУБЛИКАЦИИ 3,389 ЦИТАТЫ

[СМОТРЕТЬ ПРОФИЛЬ](#)



Генри Маркрам

Федеральная политехническая школа Лозанны

347 ПУБЛИКАЦИИ 44,463 ЦИТАТЫ

[СМОТРЕТЬ ПРОФИЛЬ](#)



Кристоф Кох

Институт Аллена по изучению мозга

984 ПУБЛИКАЦИИ 123,592 ЦИТАТЫ

[СМОТРЕТЬ ПРОФИЛЬ](#)

Эфаптическая связь корковых нейронов

Костас А Анастасиу^{1,2,5}, Родриго Перинз^{3,5}, Генри Маркрамзи Кристоф Кох^{1,4}

Электрохимические процессы, лежащие в основе нейронной функции, проявляются в непрерывных пространственно-временных колебаниях поля. Однако внеклеточные поля возвращаются к электрическому потенциалу через нейронную мембрану через эфаптическое сопряжение, независимо от синапсов. Степень, в которой такое эфаптическое сопряжение изменяет функционирование нейронов в физиологических условиях, остается неясной. Чтобы ответить на этот вопрос, мы стимулировали и регистрировали пирамидальные нейроны коры крыс в срезах с помощью 12-электродной установки. Мы обнаружили, что внеклеточные поля вызывали эфаптически опосредованные изменения в соматическом мембранном потенциале, которые были менее 0,5 мВ в подпороговых условиях. Несмотря на свой небольшой размер, эти поля могли сильно увлекать потенциалы действия, особенно для медленных (<8 Гц) колебаний внеклеточного поля. Наконец, мы одновременно измеряли до четырех заплатанных нейронов, расположенных проксимально друг к другу. Наши результаты показывают, что эндогенная активность мозга может причинно влиять на нейронную функцию через полевые эффекты в физиологических условиях.

Нейроны общаются через специализированные молекулярные машины, синапсы. Такая дискретная, точечная синаптическая связь, химическая или электрическая, важна для обработки информации в мозге^{1–3}. Однако такие интегративные процессы не происходят в вакууме. Вместо этого нейроны находятся в проводящей среде, внеклеточном пространстве. Синаптические входы, их интеграция и генерация спайков вызывают изменения электрического потенциала в являющейся, которые распадаются с расстоянием от источника тока. Измеренные в являющейся наложенными вкладки всех клеточных процессов в любой заданной точке. Локальный потенциал поля (ЛПФ) является низкочастотным компонентом (обычно ниже 300 Гц)^{4,5}. Хотя внеклеточная сигнатура отдельных нейронов, такая как внеклеточные потенциалы действия, имеет скромную и пространственно ограниченную амплитуду^{4,5}, скоординированный синаптический вход в определенной области мозга, например, кортикальные медленные волны^{6,7}, гиппокамп тета-8–11 или резкие волны/рябь^{12,13}, приводит к более выраженным пространственно-временным колебаниям LFP. Их отдаленные отголоски могут быть уловлены вне черепа с помощью электродов ЭЭГ. Как в отличие от места к месту, электрическое поле отрицательный пространственный градиент в возникает. Такие поля, в свою очередь, вызывают изменения мембранного потенциала в через эфаптическое сопряжение^{14–20} (термин «эпапс» был придуман¹⁴ для описания взаимодействий электрического поля, происходящих между соседними нейронными элементами; мы используем его для описания эффектов, вызванных изменениями напряжения и поля вдоль клеточной мембраны в целом¹⁷). Другими словами, группы клеток изменяют свою локальную электрическую среду, которая в свою очередь возвращает электрическую активность всех ее членов. Эти эфаптические эффекты происходят в дополнение к любой прямой синаптической связи между клетками. Хотя эфаптически вызванные изменения в в физиологических условиях не может вызывать потенциалы действия, когда в

вокруг отдыха^{16,20}, эфаптические события могут влиять на время спайка отдельных нейронов, получающих надпороговый синаптический вход^{16,18,21,22}, а также нейронные популяции, активирующиеся при патологических состояниях^{19,23–25}. Более того, экстракраниальное применение медленно меняющихся токов может

влиять на поведение, например, усиливая консолидацию памяти во время сна у людей²⁶. Широко наблюдаются прочные связи между колебанием LFP и всплесками.^{27–32} Однако они были приписаны исключительно прямым синаптическим взаимодействиям. Мы исследовали, в какой степени эфаптическая связь с LFP-подобными колебаниями изменяет подпороговый и надпороговый ответ нейронов. Мы обнаружили, что изменения в электрическом поле, как обычно измеряется во время в естественных условиях Активность ЛФП существенно изменила электрический ответ пирамидальных нейронов коры грызунов.

Эндогенная активность электрического поля в живом мозге обычно вызывает изменения внеклеточного напряжения менее 0,5 мВ и поля менее 5 мВ мм.^{–1} (ссылки 12,33,34). Достаточно ли этого для модуляции активности отдельных нейронов, было нелегко решить из-за сложности разделения синаптических эффектов от эфаптических. Большинство исследований были сосредоточены на сетевых взаимодействиях путем применения постоянных полей вдоль параллельных пластин за пределами подготовки среза, хотя такие внеклеточные поля не имеют в естественных условиях-подобные пространственные особенности³⁵. Кроме того, для мониторинга использовался только один внеклеточный электрод. В не менее 50 мкм от сомы, делая оценку реального в индуцированный Э на проблемной соматической мембране. Хотя эти пионерские эксперименты были критически важны для демонстрации того, что постоянные поля умеренной амплитуды, простирающиеся на миллиметры, могут влиять на нейронную активность, они не могли и не решают эфаптическое сопряжение на уровне одного отсека (соматической мембраны). Это, однако, необходимо для надлежащего механистического понимания влияния LFP на отдельные клетки во время когнитивных задач у обоих животных^{27–29,36–38} и людей^{32,39,40}.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электрическая стимуляция внутри и снаружи отдельных нейронов при одновременном мониторинге индуцированного внеклеточного поля в определенных местах (например, сразу за пределами сомы) требует нескольких пипеток в ограниченном пространстве. Мы разработали установку из 12 пипеток, которая

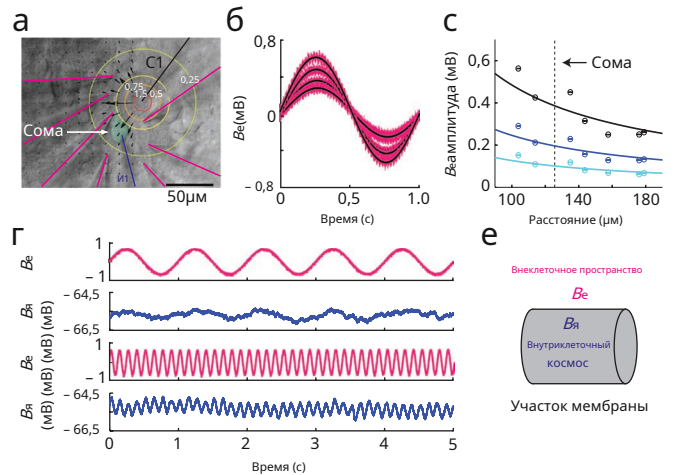
¹Отделение биологии, Калифорнийский технологический институт, Пасадена, Калифорния, США.²Факультет биоинженерии, Имперский колледж, Лондон, Великобритания.³Лаборатория нейронной микросхемы, EPFL, Лозанна, Швейцария.⁴Кафедра мозговой и когнитивной инженерии, Корейский университет, Сеул, Южная Корея.⁵Эти авторы внесли равный вклад в работу. Корреспонденцию следует направлять в САА (costas@caltech.edu).

Получено 6 октября 2010 г.; принято 30 ноября 2010 г.; опубликовано онлайн 16 января 2011 г.; doi:10.1038/nn.2727

Рисунок 1 Одновременная запись до 12 электродов внутри и снаружи одного нейрона в срезе крысы во время внутри- и внеклеточной стимуляции. **а)** Униполярная стимуляция ($\lambda = 200$ нА при 1 Гц) в срезе через внеклеточную пипетку (S1) вблизи сомы запятого пирамидального нейрона (внутриклеточная пипетка, I1). **б)** Семь внеклеточных пипеток были размещены близко к соме запятого нейрона для мониторинга V_e (пурпурный, V_e записи; черный, средняя форма волны после 9-секундной стимуляции). Изопотенциалы показаны на a_0 (синий, сток; красный, источник). **в)** V_e амплитуда как функция расположения пипетки для $\lambda = 50$ (голубой), 100 (синий) и 200 (черный) нА (круги, среднее; планки погрешностей, sd). Расстояние рассчитывается от кончика внеклеточного стимулирующего электрода S1. Сплошные линии указывают на приближение точечного источника (подгонка по методу наименьших квадратов; обычно внеклеточное сопротивление $\rho = 2,5\text{--}3,8 \text{ Ом}$, ссылка 41). **г)** Возмущающий V_e (пурпурный) через внеклеточную стимуляцию от пипетки S1, вызванную V_m изменить (синий) через эфепическое сопряжение (верхние следы, $\lambda = 100$ нА и $\phi = 1$ Гц; нижние следы, $\lambda = 100$ нА и $\phi = 8$ Гц). **е)** Мембранный потенциал V_m был определен как $V_m = V_a - V_e$.

позволяет независимо позиционировать каждую пипетку под визуальным контролем с точностью до микрометра, с гибкостью использования произвольного числа из них в качестве патчирующих, внеклеточно стимулирующих или внеклеточно регистрирующих пипеток. Мы стимулировали слой 5 неокортикальных пирамидальных нейронов в срезах, одновременно регистрируя внутри и снаружи их клеточных тел. Обычно один внеклеточный стимулирующий электрод (S1) располагался на расстоянии 50–150 $\mu\text{м}$ от тела клетки (**Рис. 1а**). Сому целиком зафиксировали одним внутриклеточным электродом и окружили рядом внеклеточных пипеток, контролирующих V_e . Индуцированное электрическое поле как функция расстояния от S1 оценивалось с помощью пространственного градиента наилучшего соответствия всех V_e следы (подгонка по методу наименьших квадратов; **Рис. 1б, в**; **Дополнительный рис. 1**) предполагая приближение точечного источника⁴¹. V_e принимался за потенциал на внеклеточном участке регистрации, ближайшем к телу клетки, обычно в пределах 15 $\mu\text{м}$. Соответствующий V_m было определено путем вычитания V_e от V_a (**Рис. 1г, е**). Синаптическая активность всегда фармакологически подавлялась с помощью D(-)-2-амино-5-фосфоновалериановой кислоты (AP5) для блокирования рецепторов NMDA, габазина или биккуллина для блокирования рецепторов GABA и 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-диона (CNQX) для блокирования рецепторов AMPA (см. Онлайн-методы и ссылку 19). Щелевые контакты вряд ли внесут какой-либо существенный вклад в наши результаты, поскольку они оба редки среди нейронов слоя 5 на 14-й день постнатального развития (ссылка 42), минимальный возраст развития наших животных, и оставляя явный признак колосков, которые мы искали, но не смогли найти (**Дополнительный рис. 2**). Таким образом, любые наблюдаемые изменения в V_m можно отнести исключительно к эффекту поля, а не к синапсам. Наконец, внеклеточные стимулы, которые мы применяли, всегда были (по крайней мере) в 25–50 раз слабее самой низкой зарегистрированной амплитуды стимуляции (5–10 $\mu\text{А}$) требуется для непосредственного запуска потенциалов действия в нейронах коры из состояния покоя⁴³.

Сначала мы ввели колебательный ток переменной частоты ϕ , $\phi = \lambda \sin(2\pi f t)$, через внеклеточный стимулирующий электрод S1, в то время как V_e и V_a были проверены и V_m был рассчитан путем вычитания V_e от V_a , то есть, $V_m = V_a - V_e$ (продолжительность 5 с, 1–2 повторения в 23 ячейках; **Рис. 1а–в**). В идеально однородной резистивной среде точечный источник индуцирует V_e который колеблется с той же частотой ϕ , и распадается с $1/r$ где r — расстояние между S1 и точкой измерения⁴¹. Это также вызывает V_m который колеблется в ϕ и распадается с $1/r$. Примечательно, в естественных условиях Внеклеточная активность не приводит к появлению отличительных полос частот, а вместо этого масштабируется как $1/f$, где показатель степеней приблизительно равен 1 во всей частотной области⁴⁴. Тем не менее, линейное разложение ЛФП на их отдельные синусоидальные компоненты по теореме Фурье, хотя и является приближением, очень распространено и не лишено смысла. Мы выбрали λ для создания профилей поля и напряжения, аналогичных измеренным LFP в естественных условиях. Для внеклеточной стимуляции на частоте 1 Гц $\lambda = 25, 50, 100$ и



200 нА, мы измерили поля $0,74 \pm 0,53, 1,49 \pm 1,06, 2,96 \pm 2,11$ и $5,86 \pm 4,25$ мВ мм⁻¹ и V_e амплитуды $0,07 \pm 0,04, 0,14 \pm 0,08, 0,28 \pm 0,16$ и $0,55 \pm 0,32$ мВ соответственно (среднее \pm sd; см. также **Дополнительный рис. 1**).

Каковы характеристики V_m вовлечение в эти пространственно-временные Э и V_e колебания? Мы впервые количественно оценили эфепическое сопряжение, когда V_m охватывались подпороговыми (то есть не пиковыми). Частоты 1, 8, 30, 60 и 100 Гц, эмулирующие частоты LFP, которые охватывают дельта, тета, бета и гамма диапазоны, не оказали существенного влияния на индуцированный Э и V_e характеристики (**Рис. 2б, в**; **Дополнительный рис. 2**)⁴¹. Подпороговые колебания мембранного потенциала, вызванные внеклеточным колебательным полем через эфепическое взаимодействие, сохраняются с одинаковой силой до 100 Гц ($\lambda = 100$ нА; для $\phi = 1$ Гц, V_m амплитуда $0,16 \pm 0,005$ мВ с фазой $165^\circ \pm 1^\circ$ между V_m и V_e ; для $\phi = 100$ Гц, V_m амплитуда $0,14 \pm 0,007$ мВ и фаза $179^\circ \pm 3^\circ$; среднее \pm стандартная ошибка среднего; **Рис. 2б, г**). Как и ожидалось, это привело к противофазным отношениям между V_e (и V_a) и V_m (ссылка 45), как определено средними свойствами (**Рис. 2б**) и кросс-корреляционный анализ (**Рис. 2г**). Эти результаты контрастируют с результатами экспериментов с параллельными пластинами, которые обнаружили сильное ослабление подпороговых V_m амплитуды с увеличением частоты внеклеточного стимула¹⁹. Мы приписываем это несоответствие ограниченному доступу предыдущих экспериментальных исследований к пространству непосредственно за пределами сомы из-за параллельной геометрии пластины и выборки поля одним электродом. Это сделало оценку вовлечения мембраны в поле проблематичной, в частности, учитывая наличие локальных неоднородностей ткани¹⁹. Примечательно, что эфепическая связь сохраняется для высокочастотных стимулов в отличие от прямых внутриклеточных (подпороговых) инъекций тока (**Рис. 2б**), чье воздействие на V_m существенно ослаблено в результате емкостной фильтрации¹.

Мы проверили, сохраняются ли характеристики эфепической связи при различных уровнях поляризации мембраны путем прямой инъекции подпороговых токов (I_{inj}) в ячейку (**Рис. 2а**). Мы обнаружили, что противофазное соотношение между V_e (и V_a) и V_m охватывало (**Рис. 2с, е**) для всех уровней поляризации мембраны ($\phi = 8$ Гц и $\lambda = 100$ нА; для I_{inj} инъекция $= 150$ пА, индуцированная эфепическая амплитуда составила $0,13 \pm 0,01$ мВ при фазе $170^\circ \pm 4^\circ$; для I_{inj} инъекция $= 100$ пА, V_m амплитуда составила $0,13 \pm 0,01$ мВ при фазе $151^\circ \pm 5^\circ$; среднее \pm сем; **Рис. 2с, е**). Мы приходим к выводу, что внеклеточная полевая активность, подобная LFP, легко увлекает за собой подпороговый мембранный потенциал в стократном диапазоне частот и на всех протестированных уровнях поляризации мембраны.

Затем мы исследовали влияние эфепической связи на спайки в 25 клетках. Мы вводили постоянный ток в течение 9 с в тело клетки, которое

Рисунок 2 Подпороговое вовлечение внеклеточного поля. (а) B_e (первая строка пурпурного цвета, средняя — черного), B_a (второй ряд синего цвета) и B_m (третий ряд зеленого цвета) для одного нейрона для трех режимов стимуляции: медленная и быстрая внеклеточная стимуляция без внутриклеточной деполаризации (слева и посередине соответственно) и медленная внеклеточная стимуляция в сочетании с постоянной внутриклеточной инъекцией тока (справа).

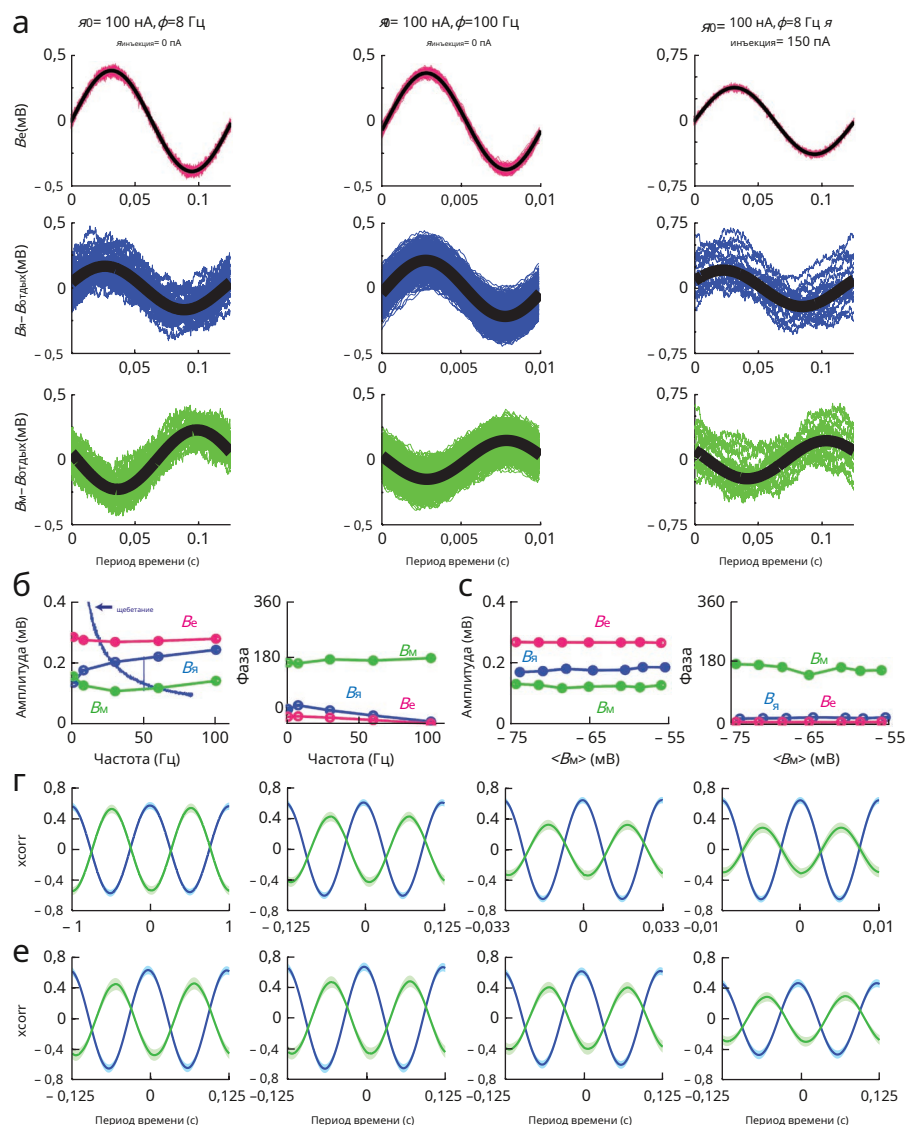
(б) Амплитуда и фаза (круги, среднее; полосы погрешности, sem) B_e (пурпурный), B_a (синий) и B_m отклонение (зеленый) для частот внеклеточной стимуляции 1–100 Гц и постоянной $I_{inj} = 100$ нА ($n = 23$ ячейки). B_e затухание внутриклеточного чирпа без какого-либо внеклеточного поля (синяя линия; амплитуда чирпа 75 пА; частота $\phi = 3\pi$ де (s) — это время). (с) Амплитуда и фаза B_e (пурпурный), B_a (синий) и B_m отклонение (зеленый) как функция поляризации мембраны ($n = 17$ клеток; круги — среднее значение; полосы погрешности — sem; частота стимуляции $\phi = 8$ Гц). (г) Нормализованная кросс-корреляция (xcorr) между B_m и B_e (синий) а также B_m и B_a (зеленый) данных, показанных на б (линия, среднее; затененная область, sem) для (слева направо) $\phi = 1, 8, 30$ и 100 Гц. Разница между xcorr(B_m, B_e) и xcorr(B_m, B_a) для каждой частоты в одну, две и три четверти обратной частоты стимуляции всегда была весьма значимой ($p < 0,001$; парный тест Бонферрони с поправкой на множественные сравнения). (е) xcorr(B_m, B_e ; синий) и xcorr(B_m, B_a ; зеленый) для данных вс (линия, среднее; затененная область, sem) для (слева направо) I_{inj} = -150, 0, 50 и 100 пА при $\phi = 8$ Гц.

индуцированные всплески (обычно 2–4 Гц; **Рис. 3а**). **Дополнительный рис. 3**. Эксперименты были разделены на две группы: контрольная, в которой внутриклеточная стимуляция давалась без какого-либо внеклеточного поля, и внеклеточная стимуляция, в которой одновременно применялись как внутриклеточные, так и внеклеточные стимулы (**Рис. 3а–с**). Контрольный эксперимент мы проводили непосредственно перед каждым экстрацеллюлярным

Эксперимент по стимуляции люлярного нерва с использованием того же шага внутриклеточного тока. Каждая пара (контроль, внеклеточная стимуляция) была повторена 4–6 раз для каждой конфигурации поля на 1, 8 и 30 Гц.

Хотя наложенное внешнее поле не изменило существенно количество импульсов, вызванных текущим шагом (**Дополнительный рис. 3**), это действительно сдвинуло их время. Мы использовали анализ популяционно-векторного анализа (**Рис. 3д** и **Дополнительные рисунки 4–9**) для изучения того, были ли вызваны спайки в предпочтительной фазе B_e . Мы использовали критерий Рэлея, чтобы проверить, является ли фаза скачков относительно B_e , были распределены неравномерно в круговом фазовом пространстве ($0^\circ, 360^\circ$). Действительно, увеличение напряженности поля приводило к увеличению деформации распределения фазы спайка. Увеличение увлечения проявилось в длине вектора популяции. При частоте стимуляции 1 Гц и амплитуде 25, 50, 100 или 200 нА нормализованная длина вектора популяции составляла 0,046, 0,060, 0,098 и 0,145 соответственно, а его направление составляло $266^\circ, 250^\circ, 242^\circ$ и 241° соответственно. Обратите внимание, что предпочтительная фаза спайка для $\phi = 1$ Гц был очень похож на фазу B_m пик в подпороговых экспериментах (**Рис. 2а–с**).

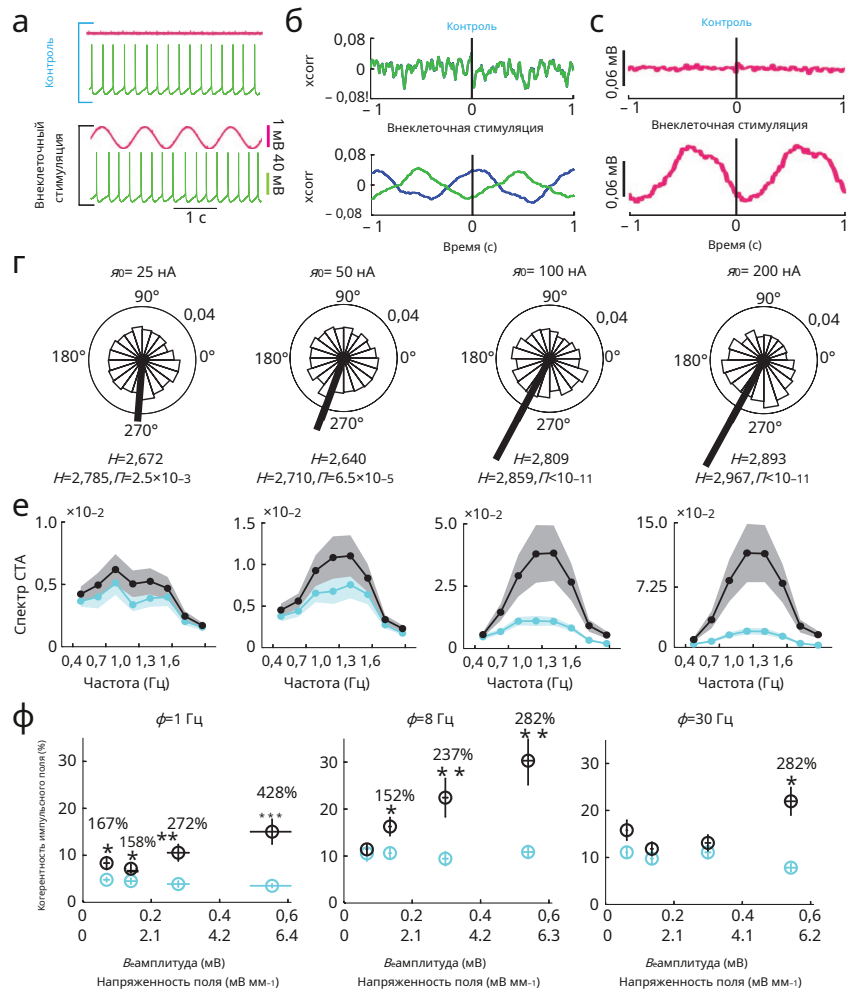
В качестве дальнейшего измерения вовлечения мы количественно оценили среднее значение, вызванное спайком (STA), для всех нейронов (**Рис. 3с**). Мы рассчитали спектр мощности STA как функцию частоты (**Рис. 3д**



Дополнительные рисунки 4–9. Увеличение поля усилило фазовую синхронизацию спайков с приложенным полем. Чтобы подтвердить, что это увеличение обусловлено исключительно наличием поля, мы предположили (виртуальное) B_e идентичным последующему приложенному внеклеточному полю, так что фазы можно было бы приписать временам спайков контрольных экспериментов. Увеличение среднего спектра STA при ϕ полем (внеклеточная стимуляция) всегда была больше, чем без него (контроль) (**Рис. 3д**).

Кросс-корреляция и STA зависят не только от степени фазовой синхронизации спайков с полем, но и от амплитуды B_e . Мы использовали когерентность импульсного поля (SFC), модифицированную версию анализа STA_{28,32}, для количественной оценки связи между спайками и внеклеточным стимулом. SFC определяется как спектр STA, нормализованный по спектрам мощности всех B_e сегменты, которые были усреднены для получения STA₂₈. Последнее определяется как мощность, вызванная спайком (STP). SFC находится в диапазоне от 0 до 100%, где 0% указывает на отсутствие фазовой связи между спайками и наложенным полем, а 100% указывает на полную фазовую синхронизацию всех спайков с одной конкретной фазой. SFC является точным индикатором величины стереотипии времени спайка относительно B_e колебания₂₈. Учитывая, что эфapticкая связь увеличила спектр STA на ϕ (**Рис. 3д** и **Дополнительные рисунки 4, 6 и 8**), мы сравнили SFC между контролем и экспериментами на ϕ для каждого поля

Рисунок 3 Слабые электрические поля вызывают импульсную активность отдельных нейронов. **а)** V_e (пурпурный) и V_m (зеленый) без (контроль) и с внеклеточным полем ($\phi=1$ Гц). **б)** Нормализованная кросс-корреляция ($xcorr$) между V_m и V_e (синий) и V_m и V_e (зеленый) низкочастотных (<100 Гц) надпороговых данных отдельного нейрона без (вверху) и с внеклеточной стимуляцией (внизу) при $\phi=1$ Гц и $i_{\text{inj}}=200$ нА. **в)** Спектры СТА (те же данные, что и в **б**; вверху, контроль; внизу, внеклеточная стимуляция). **г)** Анализ векторов популяции для $\phi=1$ Гц (слева направо, $i_{\text{inj}}=25, 50, 100$ и 200 нА; $n=25$ нейронов). Полевое увлечение спайков привело к неравномерному распределению спайк-фазы (ρ значения по тесту Рэля), которые не были связаны с изменениями в количестве спайков (H (вверху) контроль; H (внизу) внеклеточная стимуляция). **Дополнительный рис. 3.** **е)** Спектры СТА (круги, среднее; затененные области, sem) для данных в **г**. Предполагалось, что это идентично последующему эксперименту по внеклеточной стимуляции. **ф)** SFC (круги, среднее; полосы погрешности, sem) для внеклеточной стимуляции (черный) и контрольные (голубые) эксперименты при (слева направо) 1, 8 и 30 Гц в зависимости от силы стимуляции (x ось: первая строка, кружки обозначают среднее значение V_e амплитуда в соме и планки погрешностей указывают на стандартную ошибку; во втором ряду кружки указывают на среднее значение Δ амплитуда в соме). Звездочки указывают на статистическую значимость различия SFC между контролем и внеклеточной стимуляцией (парные t тест, fdr -скорректированный для множественных сравнений; $^*p<0,05$, $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,001$). Процентное увеличение SFC относительно контроля показано для статистически значимых изменений. STP, STA и SFC показаны для четырех отдельных нейронов для всех амплитуд и частот стимуляции в **Дополнительные рисунки 5, 7 и 9**.



конфигурация (Рис. 3е и **Дополнительные рисунки 4, 6 и 8**). Действительно, внешнее поле явно увеличило SFC посредством эфипической связи. Примечательно, что значимость увлечения, как было оценено через парный тест (коэффициент ложного обнаружения (fdr) с поправкой на множественные сравнения), уменьшался при увеличении частоты стимула ($i_{\text{inj}}=50$ нА; $\phi=1$ Гц, $p=6,5 \times 10^{-5}$; $\phi=8$ Гц, $p=0,019$; $\phi=30$ Гц, $p>0,05$). Таким образом, хотя внешнее поле величиной всего $0,74$ мВ мм $^{-1}$ (V_e амплитуда $0,07$ мВ) привело к статистически значимому захвату при 1 Гц ($p=6,5 \times 10^{-5}$), поле должно было быть почти на порядок больше ($5,58$ мВ мм $^{-1}$, с V_e амплитуда $0,54$ мВ) для захвата на 30 Гц, чтобы стать значительным. Эфипически индуцированная фазовая синхронизация спайков, таким образом, более эффективна и происходит при более низких напряженностях поля, для медленных, а не для быстрых модуляций V_e .

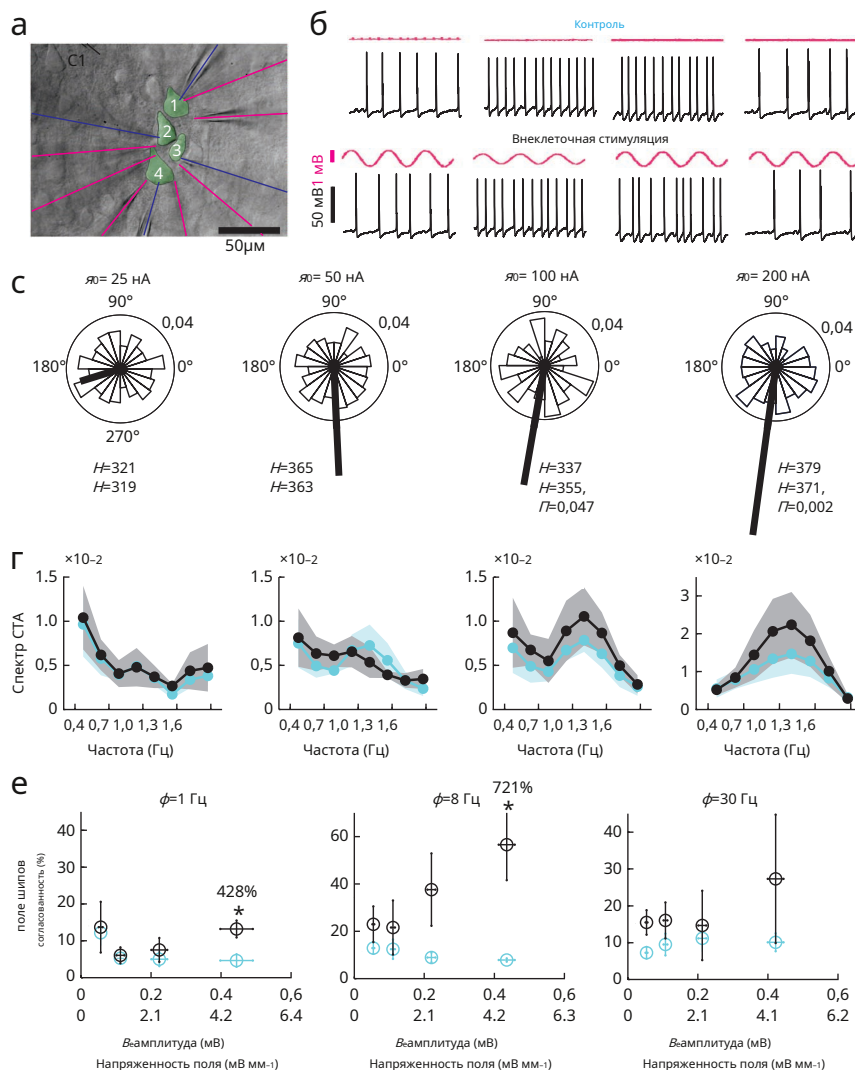
Усиление фазовой синхронизации спайков с внешним полем не было результатом изменений в частоте срабатывания. Это было подтверждено парными тестами (Бонферрони с поправкой на множественное сравнение), который не показал статистически значимых изменений (на уровне $p=0,05$) по количеству спайков или частоте спайков между экспериментами со стимуляцией и контрольными экспериментами (Рис. 3д и **Дополнительный рис. 3**). Тот же нулевой результат был получен и при вычислении STP для процедур стимуляции и контроля (**Дополнительные рисунки 4, 6 и 8**). STP количественно определяет колебания, которые присутствуют в V_e сигнал независимо от того, связаны ли они с возникновением всплесков или нет, и рассчитывается путем усреднения спектра мощности каждого отдельного V_e сегмента, центрированный на каждом шипе 2π . Хотя средний STP всех нейронов показал

сильное присутствие колебаний (**Дополнительные рисунки 4–9**), мощность STP на фоне различали внеклеточную стимуляцию и контрольные эксперименты (парные тест; для всех частот стимуляции все сравнения между STP контрольных и внеклеточных экспериментов по стимуляции привели к $p>0,58$). Таким образом, увеличение фазовой синхронизации объясняется эфипическим захватом спайков, а не изменением частоты импульсации или вариациями STP.

Наши результаты показывают, что колебания внеклеточного потенциала, подобные колебаниям LFP, V_e , легко захватывают как подпороговый мембранный потенциал, так и импульсные последовательности. Поскольку LFP простирается на сотни микрометров, эти поля могут служить для синхронизации тысяч нейронов, которые в противном случае работали бы независимо. Чтобы напрямую проверить это, мы одновременно запатчили четыре нейрона и расположили электрод внеклеточной стимуляции S1 рядом, так что все четыре испытали одновременный и похожий V_e флуктуация в их клеточных телах. Семь внеклеточных регистрирующих электродов контролировали V_e близко к соматам четырех нейронов и пространству между ними (Рис. 4а). Мы одновременно вводили сверхпороговый шаг тока (длительностью 9 с) во все четыре ячейки с внешним полем или без него (Рис. 4б). Хотя степень, в которой мембранный потенциал каждой клетки модулировался полем, варьировалась (в основном из-за различного расстояния от S1), спайковые последовательности во всех клетках были увлечены внеклеточным полем, что оценивалось по отклонению фаз спайков от однородности. В соответствии с данными по отдельным нейронам, поле, колеблющееся с частотой 1 Гц, синхронизировало спайки во всех четырех клетках таким образом, что

Рисунок 4 Эфепическая связь приводит к скоординированной импульсной активности среди близлежащих нейронов.

(а) Четыре нейрона с соматами, расположенные в пределах 100 мкм ткани были залатаны внутриклеточными электродами (синие). Семь внеклеточных электродов контролировались Δ колебания (пурпурный). Электрод внеклеточной стимуляции (S1) был 50–80 мкм из четырех сомат. (б) Внутриклеточная (черная) и внеклеточная (пурпурная) активность во время одновременной внутриклеточной инъекции тока в четыре нейрона (вверху, контроль; внизу, внеклеточная стимуляция Δ с Δ = 100 нА и ϕ = 1 Гц). (в) Анализ вектора популяции всех спайков от нейронов 1–4 для (слева направо) Δ = 25, 50, 100 и 200 нА и ϕ = 1 Гц. По мере увеличения напряженности поля спайки от всех нейронов группировались вокруг 270° (слева направо, средний угол вектора популяции, 197°, 272°, 260°, 262°), а распределение фаз значительно отклонилось от однородности (Δ значения по тесту Рэлея). Не было никаких существенных изменений в частоте стрельбы ($P > 0,1$) (H (вверху) контроль; H (ниже), внеклеточная стимуляция). (г) Спектры STA (круги, среднее; затененные области, sem) для данных вс (голубой, контроль; черный, внеклеточная стимуляция). (е) SFC (круги, среднее; полосы погрешности, sem) для экспериментов с внеклеточной стимуляцией (черный) и контролем (голубой) при (слева направо) 1, 8 и 30 Гц как функция силы стимуляции (хось: первая строка, кружки обозначают среднее значение Δ амплитуда в соме, планки погрешностей указывают на стандартную погрешность; второй ряд, кружки указывают на среднее значение Δ амплитуда в соме). Звездочки указывают на значительную разницу в SFC между контрольными и внеклеточными экспериментами по стимуляции (парные тест, t -корректированный для множественных сравнений; * $P < 0,05$). Процентное увеличение SFC относительно контроля показано для статистически значимых изменений. STP, STA и SFC для каждого нейрона по отдельности показаны в **Дополнительные рисунки 11–13**.



предпочтительная пиковая фаза, близкая к 270°, появилась с увеличением напряженности поля (**Рис. 4с–е**). Примечание что все это произошло без какой-либо синаптической передачи (

Дополнительный рис. 10), как результат синаптических блокаторов, которые мы использовали. Это предпочтение фазы не может быть отнесено к различиям в частоте срабатывания между двумя условиями (**Дополнительные рисунки 11–13**). Мы наблюдали тот же результат при одновременном исправлении тройняшек (**Дополнительный рис. 14**) и пары (**Дополнительный рис. 15**) нейронов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подпороговый Δ колебания, которые мы обнаружили, которые находятся в синхронизме с наложенными Δ колебания во внеклеточном поле имеют признаки эфепических потенциалов. Это были изменения мембранного потенциала Δ вдоль протяженного нейронного кабеля, вызванного внешним электрическим полем и являющегося простым следствием законов цепи Кирхгофа. Их амплитуда была ниже 0,5 мВ, что согласуется с теоретическими оценками. Эти потенциалы оставались неизменными на частотах до 100 Гц и не зависели от синаптического входа, поскольку все рецепторы были фармакологически заблокированы. Учитывая небольшую амплитуду эфепических потенциалов относительно порога спайкинга, который составляет примерно 25 мВ выше покоя, неясно, как они могли играть какую-либо существенную роль в жизни спайкового нейрона. Чтобы оценить, могут ли они это сделать, мы побудили пирамидальные нейроны генерировать потенциалы действия на частоте 2–4 Гц (**Дополнительный**

Рис. 3) путем прямой инъекции тока. Действительно, скромное (по амплитуде) электрическое поле не вызвало никаких дополнительных потенциалов действия. Однако оно вызвало существенные сдвиги во времени этих потенциалов действия. Даже очень малые и медленно меняющиеся поля, которые вызвали Δ изменения ниже 0,2 мВ привели к фазовой синхронизации спайков с внешним полем и к значительному повышению синхронности спайк-поле. Эта высокая чувствительность синхронизации спайков к небольшим, но постоянным колебаниям, которые действуют по всему объему, должна быть сопоставлена с внутренним, то есть несинаптическим, шумом в пирамидальных нейронах слоя 5 в 0,2–0,4 мВ и к гораздо большему шуму, если синаптическая фоновая активность принимается во внимание. Примечательно, что величина минимальных электрических полей, причинно эффективных (приблизительно 1 мВ мм⁻¹) сопоставимо с внутричерепными полями, создаваемыми электродами вне черепа в исследованиях на людях²⁶. Колебания, вызывающие наибольший эффект (1 Гц), имитировали частоту корковых медленных волн, распространенный ритм, наблюдаемый во время естественного сна и под наркозом^{6,7,26}. Хотя эти эффекты сохранялись для частот до 8 Гц, то есть тета-полосы пропускания, они постепенно уменьшались по мере увеличения частоты поля. При 30 Гц только самое большое внешнее поле все еще оказывало влияние, почти утроив SFC.

Какой механизм может быть ответственным за вовлечение спайков в умеренные (по силе) и медленные (по временной частоте) внеклеточные колебания поля? Одно из объяснений может включать

резонансные свойства нейронов. Отдельные нейроны могут иметь частотные предпочтения, которые позволяют им лучше всего реагировать на входные сигналы в узком частотном окне⁴⁷. При наличии надпорогового внутриклеточного постоянного тока, колебания могут вызывать такие частотно-специфические всплески. Однако при исследовании *В*мреакция, вызванная сверхпороговым постоянным током без внеклеточного поля (контрольные эксперименты), в результате *В*мколебания были значительными, и их амплитуда значительно превышала амплитуду, вызванную эфаптической связью (**Дополнительный рис. 16**). Таким образом, мембранный резонанс на слабые колебательные внеклеточные стимулы кажется маловероятным механизмом, учитывая сильные внутриклеточные колебания, вызванные прямой внутриклеточной инъекцией постоянного тока.

Альтернативное объяснение состоит в том, что для медленных стимулов нейронную мембрану можно описать простой феноменологической моделью с постоянным порогом активации^{18,20}. Если синаптический входной сигнал достигает порога спайка в 10 мВ за 100 мс, то эфаптический потенциал в 0,5 мВ сдвинет фазу следующего спайка на 5 мс (**Дополнительное обсуждение и Дополнительный рис. 17**). Колебательное внеклеточное поле вдоль нейрона, получающего сильный внутриклеточный сигнал, приводит к периодической поляризации мембраны и возникновению предпочтений в фазе спайка²⁰. Для более быстрых внеклеточных стимулов возможная комбинация различных токов, связанных со спайками, и дифференциальное вовлечение различных нейронных отсеков приводит к постепенной потере такого предпочтения фазы спайка²⁰.

Наши результаты показывают, что периодическая поляризация мембраны, возникающая в результате эфаптической связи с медленными частотами LFP, определяет временные окна повышенной возбудимости в клетках, испытывающих это поле^{20,30,31}. Было показано, что такое фазовое кодирование с учетом медленного (1–8 Гц) текущего сигнала LFP обеспечивает существенное улучшение взаимной информации при сосуществовании с другими кодами, такими как пространственные и временные паттерны спайков, а также повышенную надежность^{27,36,48,49}. Используя установку, которая позволяла нам контролировать и измерять электрические поля и потенциалы в 12 точках внутри и снаружи отдельного нейрона с высокой точностью, мы изучили, каким образом внешнее поле приводит к фазовой синхронизации отдельных нейронов, а также к синхронности спайков среди квартетов, триплетов и пар соседних нейронов.

Насколько релевантна эфаптическая связь, полученная здесь в искусственных (срезовых) условиях, живому мозгу? Амплитуды наших внеклеточных потенциалов (до 0,6 мВ) и полей (до 6 мВ мм⁻¹) были сопоставимы с амплитудами LFP, измеренными в естественных условиях. Более того, наши изменения в SFC были такими же большими или большими, чем те, которые наблюдались в коре. Например, успешное формирование памяти у людей предсказывается тесной координацией времени спайков в нейронах гиппокампа с локальными тета-колебаниями, с увеличением SFC примерно на 50% по сравнению с неудачными попытками³². Эти изменения полностью соответствуют нашей измеренной эфаптической связи с LFP и были связаны с *В*м. Амплитуды 0,1 мВ и 1 мВ мм⁻¹ (**Рис. 3е**). Наконец, поля, индуцированные в наших экспериментах, были сопоставимы с полями, приложенными снаружи черепа, которые, как было показано, изменяют когнитивные процессы у людей²⁶.

Наши результаты подтверждают идею о том, что эфаптические потенциалы, вызванные осциллирующими электрическими полями, присутствующими во всем сером веществе, служат для синхронизации нейронной активности, независимо от того, возбуждающая она или тормозящая. Такая синхронизация может оказывать существенное влияние на обработку нейронной информации и пластичность.

МЕТОДЫ

Методы и все связанные с ними ссылки доступны в онлайн-версии статьи по адресу <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Примечание: дополнительная информация доступна на сайте *Nature Neuroscience*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим G. Buzsáki, U. Rutishauser и E. Schomburg за комментарии и обсуждения, а также J. Bastiaansen за помощь. Эта работа финансировалась Советом по исследованиям в области инженерных физических наук (CAA), Фондом Слоуна-Шварца (CAA), Швейцарским национальным научным фондом (CAA), EU Synapse (RP), Национальный научный фонд (СК и CAA), Фонд Mathers (СК и CAA) и программа World Class University через Национальный исследовательский фонд Кореи, финансируемая Министерством образования, науки и технологий (R31-10008, СК).

ВКЛАД АВТОРОВ

CAA и СК разработали эксперименты. CAA и RP провели эксперименты. AAR написал коды и проанализировал данные. CAA, RP, HM и СК написали рукопись.

КОНКУРЕНТНЫЕ ФИНАНСОВЫЕ ИНТЕРЕСЫ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта финансовых интересов.

Опубликовано на сайте <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Информация о перепечатках и разрешениях доступна на сайте <http://www.nature.com/reprintsandpermissions/>.

1. Кох, К. *Биофизика вычислений* (Издательство Оксфордского университета, 1999).
2. Стюарт Г., Спрустон Н. и Хауссер М. *Дендриты* (Издательство Оксфордского университета, 2008).
3. Хайдер, Б. и МакКормик, Д.А. Быстрая неокортикальная динамика: клеточные и сетевые механизмы. *Нейрон* **62**, 171–189 (2009).
4. Голд, К., Хенце, Д.А., Кох, К. и Бужаки, Г. О происхождении формы волны внеклеточного потенциала действия: модельное исследование. *Журнал нейрофизиологии* **95**, 3113–3128 (2006).
5. Петтерсен, К. Х. и Эйневолл, Г. Т. Изменчивость амплитуды и внеклеточная низкочастотная фильтрация нейронных импульсов. *Биофиз. Дж.* **94**, 784–802 (2008).
6. Стериаде, М., Нуньес, А. и Амзика, Ф. Новые медленные (< 1 Гц) колебания нейронов неокортекса в естественных условиях: деполаризующие и гиперполяризующие компоненты. *Журнал неврологии* **13**, 3252–3265 (1993).
7. Стериаде, М., Нуньес, А. и Амзика, Ф. Внутриклеточный анализ связей между медленными (< 1 Гц) неокортикальными колебаниями и другими ритмами сна электроэнцефалограммы. *Журнал неврологии* **13**, 3266–3283 (1993).
8. Вандервольф, К. Х. Электрическая активность гиппокампа и произвольные движения у крыс. *Электроэнцефалография, клиническая нейрофизиология* **26**, 407–418 (1969).
9. Бужаки, Г., Леунг, Л. В. и Вандервольф, К. Х. Клеточные основы гиппокампальной ЭЭГ у поведенческих крыс. *Мозговое исследование* **287**, 139–171 (1983).
10. Бужаки, Г. Тета-колебания в гиппокампе. *Нейрон* **33**, 325–340 (2002).
11. Любенов, Е.В. и Сиапас, А.Г. Тета-колебания гиппокампа представляют собой бегущие волны. *Природа* **459**, 534–539 (2009).
12. Бужаки, Г., Хорват, З., Уриосте, Р., Хетке, Й. и Вайс, К. Высоочастотные сетевые колебания в гиппокампе. *Наука* **256**, 1025–1027 (1992).
13. Юлинен, А. и др. Высоочастотные колебания (200 Гц), связанные с острыми волнами, в интактном гиппокампе: сетевые и внутриклеточные механизмы. *Журнал неврологии* **15**, 30–46 (1995).
14. Арванитики, А. Эффекты, вызываемые в аксоне активностью смежного аксона. *Журнал нейрофизиологии* **5**, 89–108 (1942).
15. Трауб, Р.Д., Дудек, Ф.Е., Тейлор, К.П. и Ноулз, В.Д. Моделирование послеразрядов гиппокампа, синхронизированных электрическими взаимодействиями. *Нейробиология* **14**, 1033–1038 (1985).
16. Чан, С.У. и Николсон, С. Модуляция активности клеток Пуркинье и звездчатых клеток в изолированном мозжечке черепахи с помощью приложенных электрических полей. *J. Physiol. (Лондон)* **371**, 89–114 (1986).
17. Джефферис, Дж. Г. Несинаптическая модуляция нейронной активности в мозге: электрические токи и внеклеточные ионы. *Физиол. Преп.* **75**, 689–723 (1995).
18. Радман, Т., Су, Й., Ан, Дж. Х., Парра, Л. К. и Биксон, М. Синхронизация спайков усиливает воздействие электрических полей на нейроны: последствия для эффектов эндогенных полей. *Журнал неврологии* **27**, 3030–3036 (2007).
19. Динс, Дж. К., Пауэлл, А. Д. и Джефферис, Дж. Г. Чувствительность когерентных колебаний в гиппокампе крысы к переменным электрическим полям. *Журнал физиологии* **583**, 555–565 (2007).
20. Анастасиу, К.А., Монтомери, С.М., Барахона, М., Бужаки, Г. и Кох, К. Влияние пространственно неоднородных внеклеточных электрических полей на нейроны. *Журнал неврологии* **30**, 1925–1936 (2010).
21. Чан, С.У., Хаунсгаард, Дж. и Николсон, К. Влияние электрических полей на трансмембранный потенциал и возбудимость клеток Пуркинье мозжечка черепахи в пробирке. *J. Physiol. (Лондон)* **402**, 751–771 (1988).
22. Озен, С. и др. Транскраниальная электрическая стимуляция вовлекает популяции корковых нейронов у крыс. *Журнал неврологии* **30**, 11476–11485 (2010).
23. Нобельс, Дж. Л. и Принс, Д. А. Развитие фокальных припадков в коре головного мозга: роль разрыва аксонных терминалей. *Журнал нейрофизиологии* **41**, 1267–1281 (1978).

24. Джефферис, Дж. Г. и Хаас, Х. Л. Синхронизированный взрыв пирамидальных клеток гиппокампа CA1 при отсутствии синаптической передачи. *Природа***300**, 448–450 (1982).
25. Гай, Р.С., Биксон, М. и Дюран, Д.М. Влияние приложенных электрических полей на эпилептиформную активность с низким содержанием кальция в области CA1 срезов гиппокампа крысы. *Журнал нейрофизиологии***84**, 274–280 (2000).
26. Маршалл, Л., Хельгадоттир, Х., Молле, М. и Борн, Дж. Усиление медленных колебаний во время сна усиливает память. *Природа***444**, 610–613 (2006).
27. О'Киф, Дж. и Рекке, М.Л. Фазовая связь между единицами места гиппокампа и тета-ритмом ЭЭГ. *Гиппокамп***3**, 317–330 (1993).
28. Фрайз, П., Рейнольдс, Дж. Х., Рори, А. Е. и Десимон, Р. Модуляция колебательной нейронной синхронизации посредством избирательного зрительного внимания. *Наука***291**, 1560–1563 (2001).
29. Уомельсдорф, Т., Фрайз, П., Митра, П. и Десимон, Р. Синхронизация гамма-диапазона в зрительной коре предсказывает скорость обнаружения изменений. *Природа***439**, 733–736 (2006).
30. Вомельсдорф, Т. и др. Модуляция нейронных взаимодействий посредством нейронной синхронизации. *Наука***316**, 1609–1612 (2007).
31. Колгин, Л.И. и др. Частота гамма-колебаний направляет поток информации в гиппокампе. *Природа***462**, 353–357 (2009).
32. Рутискаузер, У., Росс, И.Б., Мамелак, А.Н. и Шуман, Э.М. Сила человеческой памяти предсказывается с помощью фазовой синхронизации тета-частоты отдельных нейронов. *Природа***464**, 903–907 (2010).
33. Камонди, А., Аксади, Л., Ванг, Х. и Бужаки, Г. Тета-колебания в соматических клетках и дендритах пирамидальных клеток гиппокампа в естественных условиях: фазовая прецессия потенциалов действия, зависящая от активности. *Гиппокамп***8**, 244–261 (1998).
34. Вайс, С.А. и Фабер, Д.С. Полевые эффекты в ЦНС играют функциональную роль. *Передние нейронные цепи***4**, 15 (2010).
35. Манн, Э.О. и Паульсен, О. Локальные колебания потенциала поля как монолог коры головного мозга. *Нейрон***67**, 3–5 (2010).
36. Пасталкова, Э., Ицков, В., Амарасингхам, А. и Бужаки, Г. Внутренне генерируемые последовательности сборки клеток в гиппокампе крысы. *Наука***321**, 1322–1327 (2008).
37. Крейман, Г. и др. Объектная селективность локальных полевых потенциалов и спайков в нижней височной коре макаки. *Нейрон***49**, 433–445 (2006).
38. Харви, К. Д., Коллман, Ф., Домбек, Д. А. и Танк, Д. В. Внутриклеточная динамика клеток гиппокампа во время виртуальной навигации. *Природа***461**, 941–946 (2009).
39. Крейман, Г., Кох, К. и Фрид, И. Категорически-специфические зрительные реакции отдельных нейронов в медиальной височной доле человека. *Нация. Нейросоци***3**, 946–953 (2000).
40. Кирога, Р. К., Редди, Л., Крейман, Г., Кох, К. и Фрид, И. Инвариантное визуальное представление отдельными нейронами в человеческом мозге. *Природа***435**, 1102–1107 (2005).
41. Логотетис Н.К., Кайзер К. и Олтерманн А. В естественных условиях Измерение спектра коркового импеданса у обезьян: значение для распространения сигнала. *Нейрон***55**, 809–823 (2007).
42. Монторо, Р. Дж. и Юсте, Р. Щелевые контакты в развивающемся неокортексе: обзор. *Brain Res. Brain Res. Rev.***47**, 216–226 (2004).
43. Хистед, М.Х., Бонин, В. и Рид, Р.К. Прямая активация редких, распределенных популяций корковых нейронов с помощью электрической микростимуляции. *Нейрон***63**, 508–522 (2009).
44. Мильштейн, Дж., Морманн, Ф., Фрид, И. и Кох, К. Нейронный дробовой шум и броуновское поведение $1/f^2$ в локальном потенциале поля. *ПЛОС ОДИН***4**, e4338 (2009).
45. Холт, Г. Р. и Кох, К. Электрические взаимодействия через внеклеточный потенциал вблизи тел клеток. *Журнал вычислительной техники и нейронауки***6**, 169–184 (1999).
46. Якобсон, Джорджия и др. Подпороговый шум напряжения пирамидальных нейронов неокортекса крысы. *Журнал физиологии***564**, 145–160 (2005).
47. Хатчеон, Б. и Яром, Й. Резонанс, колебания и внутренние частотные предпочтения нейронов. *Тенденции Нейросоци***23**, 216–222 (2000).
48. Кайзер, К., Монтемулло, М., Логотетис, Н.К. и Панцери, С. Кодирование спайковой фазы усиливает и стабилизирует информацию, переносимую пространственными и временными паттернами спайков. *Нейрон***61**, 597–608 (2009).
49. Табаро, Н., Слотин, Дж. Дж. и Фам, К. К. Как синхронизация защищает от шума. *PLOS Comput. Biol.***6**, e1000637 (2010).

ОНЛАЙН МЕТОДЫ

Приготовление срезов и идентификация клеток. Мы быстро обезглавили 14–18-дневных крыс Wistar в соответствии с институциональными и швейцарскими федеральными ветеринарными инструкциями, с разрешения Office vétérinaire cantonal du canton de Vaud. Мозг был осторожно извлечен и помещен в ледяную искусственную спинномозговую жидкость (ACSF). Мы отрезали 300-мкПарасагитальные срезы толщиной м первичной соматосенсорной коры (область задних конечностей) на вибраторе HR2 (Sigmann Elektronik). Срезы инкубировали при 37 °C в течение 30–60 мин, а затем оставляли при 25 °C до регистрации. Клетки визуализировали с помощью инфракрасной дифференциально-интерференционной контрастной видеомикроскопии с использованием камеры VX55 (Till Photonics), установленной на вертикальном микроскопе BX51WI (Olympus). Толстый пучок 5 пирамидальных нейронов отбирали в соответствии с их большим размером сомы (15–25µm) и большой ствол апикального дендрита. Были приняты меры, чтобы использовать только «параллельные» срезы, то есть срезы, которые имели плоскость среза, параллельную ходу апикальной дендритов и первичного аксонального ствола. Это гарантировало достаточную сохранность как аксональных, так и дендритных разветвлений пирамидальных нейронов.

химикаты и растворы. Срезы непрерывно промывали ACSF, содержащим 125 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ и 25 mM d-глюкозы, пропущенной через 95% O₂/5% CO₂. Внутриклеточный пипеточный раствор содержал 110 mM глюконата калия, 10 mM KCl, 4 mM АТФ-Mg, 10 mM фосфокреатина, 0,3 mM ГТФ, 10 mM HEPES и 13 mM биоцитина, отрегулированный до pH 7,3–7,4 с помощью 5 M KOH. Осмолярность была отрегулирована до 290–300 мосм с помощью d-маннита (25–35 mM). Приведенные значения мембранного потенциала не были скорректированы с учетом потенциала жидкостного соединения, который составлял приблизительно –14 мВ. Габазин был приобретен у Tocris, динариевая соль CNQX была приобретена у Biotrend, а AP5 и биксуллин были приобретены у Sigma-Aldrich. Все эксперименты проводились с использованием 20µM габазин или 20µM биксуллин, 40µM AP5 и 10µM CNQX для предотвращения помех синаптической передаче с эфепическими сигналами¹⁹.

электрофизиологические записи. Множественные соматические записи целых клеток (1–4 клетки одновременно) были выполнены с помощью усилителей Multiclamp 700B (Molecular Devices) в режиме токового зажима. Только записи с сопротивлением уплотнения более 2 Гс/были рассмотрены (в среднем ±сд, 4.4±1,9 ГΩ). Нейроны с потенциалом покоя более –60 мВ были исключены из анализа. Сопротивление клеток с заплатками составило 74,9±19,4 млн.Ω. Референтный электрод во всех экспериментах располагался примерно в 1 см от среза в ванне с АФЖ, чтобы не подвергаться влиянию внеклеточного стимула. Температура составляла 35±0,5 °C во время записи. Компенсация баланса моста непрерывно выполнялась во время всех записей. Сбор данных осуществлялся с помощью платы ITC-1600 (Instrutech), подключенной к персональному компьютеру, на котором выполнялась специально написанная процедура в IgorPro (Wavemetrics). Частота дискретизации составляла 10 кГц, а сигнал напряжения фильтровался фильтром Бесселя 1,2 кГц. Пипетки-патчи вытягивались с помощью микропипеточного съемника Flaming/Brown (универсальный съемник DMZ, Zeitz-Instrumente GmbH) и имели начальное сопротивление 4–8 МΩ для патч-записей и 1–3 МΩ для внеклеточных записей.

Внутриклеточная стимуляция применялась усилителями MultiClamp 700B, а внеклеточная стимуляция — усилителем MultiClamp 700B (до 200 нА) или через изолированный импульсный стимулятор (AM Systems 2100) для более высоких токов в экспериментах по характеристике. Обратите внимание, что мы проверили экспериментальную установку (как электроды, так и усилители) на наличие перекрестных помех.

Анализ данных. Все анализы данных проводились с использованием специально написанных программ MATLAB 7.9.0 (Mathworks).

Подпороговый анализ. Для расчета амплитуды, частоты и фазы V_m , V_{ei} и V_m колебания, вызванные внеклеточным стимулом $y = \text{ягрех}(2\pi f t)$, с $y_0(\text{нА})$ - амплитуда и $f(\text{Гц})$ частота внеклеточного стимула, мы рассчитали среднее V_m , V_{ei} и V_m Форма волны (как показано на Рис. 2а) путем выравнивания [0, T]-временные интервалы сырой нефильтованной трассы с $T(s)$ период внеклеточного стимула определяется как $T=1/f$. Длительность каждого эксперимента составляла 5 с. Например, для изучения подпорогового поведения мембраны при введении внеклеточного стимула с $f=8$ Гц, мы разделили временной ход V_m , V_{ei} и V_m на интервалы продолжительности $T=0,125$ с $s_{\text{интерв}} = (5 \text{ с}) / T = 40$. На следующем этапе мы определили среднюю форму волны, вычислив среднее значение $s_{\text{интерв}}$ трассы от 0 до T Амплитуда, частота и фаза средней формы волны каждого нейрона использовались для показанного статистического анализа.

Рисунок 26. $s_{\text{интерв}}$ измерялся через внутриклеточный электрод, в то время как $V_{\text{след}}$ был зарегистрирован внеклеточным электродом, наиболее близким к коме (обычно в пределах 15µm).

Для проведения нормализованного анализа взаимной корреляции между двумя сигналами мы сначала применили фильтр нижних частот Баттерворта пятого порядка к V_m , V_{ei} и V_m трассы с ограничением частоты 100 Гц. Затем мы использовали функцию MATLAB xcorr для вычисления несмещенной оценки функции взаимной корреляции, нормализованной по sd двух сигналов. Статистическое сравнение между функцией взаимной корреляции $\text{xcorr}(V_m, V_{ei})$ и $\text{xcorr}(V_m, V_m)$ был выполнен с использованием парного t-тест с поправкой Бонферрони для множественных сравнений $d < 0,05$.

Сверхпороговый анализ. Для расчета фазы скачка V_m Сначала трасса была подвергнута полосовой фильтрации с использованием фильтра Баттерворта второго порядка с частотными ограничениями ($\phi_{\text{мин}}$, $\phi_{\text{макс}}$) = (0,2 ф, 2 ф) с f являясь частотой стимуляции внеклеточного стимула. Таким образом, мы смогли специально изучить фазовую синхронизацию спайковой активности с внеклеточным стимулом. Чтобы определить фазу спайка, например, фазу гармонического внеклеточного стимула V_m когда потенциал действия вызывается, мы использовали два разных метода. Во-первых, преобразование Гильберта использовалось для расчета мгновенной фазы V_m ближе всего к коме спайкового нейрона. Во-вторых, на основе среднего гармонического V_m форма волны, измеренная в коме путем построения графика всех V_m волны вдоль одного периода и вычисляя среднее значение, фаза определялась путем присвоения каждому моменту времени среднего значения V_m Форма волны (см. подпороговый анализ). Время спайка определялось как максимум производной второго порядка по времени внутриклеточного потенциала V_m прямо перед максимальным отклонением V_m . Фаза спайка затем была определена как V_m фаза во время спайка. Два метода определения V_m фаза дала очень похожие результаты, но мы решили использовать преобразование Гильберта, поскольку это мгновенная мера, которая определяет фазу на основе мгновенного V_m колебания в коме, а не предполагать среднее V_m форма волны.

Фаза измерялась (в градусах) в диапазоне [0°, 360°], где 90° - пик, а 270° - впадина V_m Форма волны. Чтобы проверить, был ли нейрон значительно фазово-синхронизирован, мы сравнили фазовые углы с однородностью, используя тест Рэлея для статистики круговых переменных. Тест Рэлея (принятый из ссылки 50) проводился при каждой амплитуде стимула и частота f для всех нейронов ($n=25$ ячеек).

STA рассчитывалась путем извлечения для каждого пика сегмента V_m след измеряется в коме, центрированной во время спайка. Длина V_m сегмент зависел от частоты стимуляции f . Поскольку мы хотели иметь по крайней мере два цикла STA для каждого f (видеть Рис. 3с) было выбрано временное окно вокруг каждого пика ± 1 с, ±0,5 с и ±0,1 с для $f=1$, 8 и 30 Гц соответственно. Мы использовали фильтр нижних частот Баттерворта пятого порядка с частотными пределами 2, 14 и 50 Гц для f = Данные 1, 8 и 30 Гц соответственно для удаления артефакта в виде спайка из анализов STA и STP (Дополнительные рисунки 4–9).

SFC определяется как отношение между спектром мощности STA и спектром мощности всех спектров мощности всех V_m сегменты, которые были усреднены для получения STA₂₈. Последнее часто называют STP. STP количественно определяет колебания, которые присутствуют в V_m сигнал независимо от того, связаны ли они с возникновением скачков или нет²⁸. STP показан на **Дополнительные рисунки 4с, 6с и 8с**, а также в **Дополнительные рисунки 5, 7 и 9** для четырех отдельных нейронов. Мы также нашли STP каждого отдельного нейрона для эксперимента с четырьмя нейронами (Рис. 4) в **Дополнительные рисунки 11–13**. Пик STP в f объясняется тем, что внешний стимул имеет одну частоту.

Мы сохраняли количество спайков постоянным для каждого условия при сравнении SFC между различными внеклеточными стимуляциями. Мы делали это, случайным образом выбирая подвыборку спайков из большей группы с помощью генератора случайных чисел MATLAB. Эта процедура применялась ко всем STA и STP. Разница между SFC контрольных и внеклеточных экспериментов по стимуляции сохранялась независимо от количества используемых спайков.

Все статистические сравнения различий между SFC для различных конфигураций внеклеточной стимуляции (y_0, f) были скорректированы для множественных сравнений с использованием процедуры fdr $\text{q} < 0,05$. Сравнения между контрольными и внеклеточными экспериментами по стимуляции для спектров STA и значений SFC для различных конфигураций поля (y_0, f) (Рис. 3) были выполнены с использованием парных t-тесты.

50. Беренс, П. CircStat: набор инструментов MATLAB для круговой статистики. *J. Стат. Программное обеспечение*. **31**, 1–21 (2009).