

УСТОЙЧИВОСТЬ СПОНТАННОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ *IN VITRO*

И. С. Соколов^{1,2✉}, М. К. Татаринцев^{1,3}, Р. Ю. Хасанов^{1,4}, А. М. Азиева¹, Е. Ю. Макаренко², М. С. Бурцев^{1,3,5}

¹ Отдел нейронаук, Курчатовский центр НБИКС-технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

² Кафедра физиологии, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

³ Кафедра НБИКС-технологий, факультет нано-, био-, информационных и когнитивных технологий, Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

⁴ Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

⁵ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

С помощью нейро-компьютерных интерфейсов можно как считывать информацию с мозга, так и передавать ее в мозг. Однако эта информация — сигналы сенсорных систем, а не знание и опыт. Нейронные сети, представляющие собой основу когнитивной деятельности, способны *in vitro* воспроизводить процессы, аналогичные обучению. В работе проверена гипотеза о том, что нейронная сеть реализует обучение путем обнаружения отклонения от своей стереотипной активности и модификации ее таким образом, чтобы избавиться от внешней электрической стимуляции. Спонтанная активность нескольких нейрональных культур *in vitro* была проанализирована методом кластеризации. Результаты показали, что активность необученных культур остается стабильной на протяжении длительного времени, а внешняя электрическая стимуляция приводит к переключению между паттернами спонтанной активности.

Ключевые слова: нейрональные культуры, нейронные сети, обучение, спонтанная активность, кластерный анализ, анализ пачечной активности

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 15-11-30014.

✉ **Для корреспонденции:** Илья Сергеевич Соколов
117534, г. Москва, ул. Чертановская д. 49, к. 2, кв. 121; ilersokolov@gmail.com

Статья поступила: 01.04.2016 **Статья принята к печати:** 07.04.2016

STABILITY OF SPONTANEOUS ELECTRICAL ACTIVITY OF NEURAL NETWORKS *IN VITRO*

Sokolov IS^{1,2✉}, M Tatarintsev MK^{1,3}, Khasanov RY^{1,4}, Azieva AM¹, Makarenko EYu², Burtsev MS^{1,3,5}

¹ Department of Neurosciences, Kurchatov Complex of NBICS Technologies, National Research Centre Kurchatov Institute, Moscow, Russia

² Department of Physiology, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Department of NBIC Technologies, Faculty of Nano-, Bio-, Information and Cognitive Technologies, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

⁴ Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

Using brain-computer interfaces, one can both read data from and transmit them to the brain. However, these data are only a set of sensor system signals and not the knowledge or experience. Neural networks are a basis for cognitive activity and can simulate processes similar to learning *in vitro*. In this work we tested the hypothesis of a neural network's ability to learn by detecting deviations from its stereotypical activity and modifying them in a way that allows it to get rid of external electrical stimulation. Spontaneous activity of several neuronal cultures *in vitro* was analyzed by clustering method. The results showed that activity of untrained cultures remained stable for a long time, and external electrical stimulation led to switching between various spontaneous activity patterns.

Keywords: neuronal cultures, neural networks, learning, spontaneous activity, cluster analysis, bursting activity analysis

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation, grant no. 15-11-30014.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ilya Sokolov
ul. Chertanovskaya, d. 49, k. 2, kv. 121, Moscow, Russia, 117534; ilersokolov@gmail.com

Received: 01.04.2016 **Accepted:** 07.04.2016

Нейро-компьютерные интерфейсы используют в медицине для создания нейропротезов, сопоставимых по отзывчивости на ментальные команды пользователя со здоровыми органами тела [1–3]. Возможна передача информации и в обратном направлении, от компьютера к мозгу: с помощью электрической стимуляции восстанавливают утраченные сенсорные функции, например слуховую [4] или зрительную [5]. Однако интересной исследовательской задачей является передача информации как таковой — знаний и опыта. Было показано, что использование нелинейной динамической модели с множественными входами/выходами позволяет осуществлять «передачу» определенного пространственно-временного паттерна, зарегистрированного в гиппокампе одной крысы, в гиппокамп другой, что приводит к достоверному изменению поведения второго животного [6].

Известно, что нейронные сети, составляющие основу когнитивной деятельности, не имеют четкой локализации в структурах головного мозга, а распределены в них [7, 8]. В связи с этим возникает потребность в перепрограммировании нейронных сетей. Опубликованные работы, посвященные изучению характера спонтанной активности в нейросетях *in vitro* и возможностям ее внешней модификации [9–13], свидетельствуют о способности сетей первичных диссоциированных культур нейронов из области коры и гиппокампа на мультиэлектродных матрицах (multielectrode array, MEA) управлять отключением внешней стимуляции посредством изменения своей активности на выбранном экспериментатором электроде. Впервые такое обучение нейрональной культуры было продемонстрировано Shahaf и Marom [14], а затем успешно воспроизведено другими исследователями [15–18].

По мере формирования сети из диссоциированной культуры нейронов возникает спонтанная биоэлектрическая активность, регистрируемая электродами матрицы. Так, в первые дни развития культуры в условиях отсутствия внешней стимуляции регистрируются только отдельные потенциалы действия, но с течением времени они группируются, образуя пачки [19]. В настоящей работе мы предположили, что спонтанная пачечная активность должна сводиться к небольшому числу стереотипных паттернов и применение кластерного анализа позволит идентифицировать один или несколько доминантных. Поскольку внешняя стимуляция нарушает сложившуюся последовательность активаций, сеть изменит активность, чтобы отключить стимуляцию и вернуться к типичному паттерну. Тогда кластерный анализ после стимуляции (обучения) должен будет выявить возвращение исходного типа активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры

Первичную культуру готовили из тканей гиппокампа новорожденных мышей линии C57BL/6. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации». Эксперимент был одобрен постановлением локального этического комитета по вопросам биомедицинских исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (протокол № 1 от 09.07.2015).

Клетки культивировали на 60-канальных мультиэлектродных матрицах 60StimMEA200/30-ITO (Multichannel

Systems, Германия). Предварительно дно чашек обрабатывали поли-L-лизинном для лучшей адгезии клеток. Исходная плотность культуры составила 300 000 клеток/мм². Их диссоциирование достигалось путем обработки 0,25 % трипсином (Invitrogen 25200-056, США). Поддержание жизнеспособности нейронов осуществляли в культуральной нейробазальной среде NeurobasalTM (Invitrogen 21103-049) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen 17504-044), глутамином (Invitrogen 25030-024) и пенициллин-стрептомицином (Life Technologies 15140122, США) в инкубаторе GALAXY 170S (New Brunswick Scientific, США) при постоянных условиях: температуре 37 °C, 100 % влажности и содержании 5 % CO₂ в воздухе. Развитие глии не подавляли, поскольку глиальные клетки были необходимы для длительного сохранения жизнеспособности культуры в условиях *in vitro*. Половину объема среды меняли на новую каждые три дня.

Биоэлектрическую активность клеток регистрировали с помощью установки MEA1060-Up-BC-Standard (Multichannel Systems). Для получения данных использовали программное обеспечение, поставляемое производителем с установкой.

Для регистрации динамики спонтанной пачечной активности использовали две культуры. Регистрацию осуществляли с 4-го дня жизни (*day in vitro*, DIV) до гибели культур. Для дальнейшей обработки использовали данные с момента появления спонтанной пачечной активности до ее прекращения. Для обучения использовали одну культуру в возрасте 24 DIV.

Протокол обучения нейрональной культуры *in vitro*

1) Фоновая регистрация биоэлектрической активности культуры в течение 1 ч.

2) Стимуляция одиночными импульсами биполярной прямоугольной формы амплитудой от –300 до 300 мВ отдельно по каждому электроду для выбора электрода, вызвавшего наиболее интенсивный ответ культуры.

3) 5 циклов стимуляции по выбранному в п. 2 электроду. Каждый цикл состоит из пятиминутной серии прямоугольных импульсов с двухминутными перерывами. Задержка между импульсами в серии подбирается для каждого эксперимента таким образом, чтобы каждый импульс вызывал популяционную пачку активности. По результатам стимуляции выбирается регистрирующий электрод, для которого электрическая активность в течение 30–80 мс после подачи стимула была наименьшей.

4) Регистрация спонтанной биоэлектрической активности культуры в течение 1 ч.

5) 20 циклов обучения. Критерием успешности обучения является увеличение в два раза вероятности зарегистрировать спайковую активность на заданном временном интервале на выбранном в п. 3 электроде. Обучение заключается в стимуляции в соответствии с п. 3, но с условием, что при достижении критерия успешности обучения стимуляция прекращается и дается двухминутный отдых.

6) Регистрация спонтанной биоэлектрической активности культуры в течение 1 ч.

Детекция спайков и пачечных событий

Исходный сигнал подвергали цифровой обработке высокочастотным фильтром Баттерворта 2-го порядка с полкой пропускания сигнала от 200 Гц, что позволяло исключить низкочастотные помехи. Присутствие потенциала

действия детектировали, если амплитуда сигнала превышала 4 стандартных отклонения. В этом случае находили максимум амплитуды, что и считали временем возникновения спайка.

Пачечное событие (пачка) возникает на одном электроде, и характеризуется взрывной генерацией импульсов в течение непродолжительного времени (0,1–3,0 с в зависимости от возраста культуры и плотности ее посадки) и обычно сопровождается низкочастотной (1–5 Гц) компонентой сигнала. Детекцию пачек осуществляли путем выявления низкочастотной компоненты в заданном окне и детекции спайков в окрестностях этой компоненты. Началом и концом пачки считали время возникновения первого и последнего спайка соответственно.

Популяционными пачечными событиями называют пачки, которые наблюдаются синхронно (с небольшими задержками — порядка 0,002–0,05 с) более чем на половине всех активных электродов. Началом популяционной пачки считается время возникновения первого пачечного события.

Анализ паттернов

В качестве вектора признаков пачечного события V_k использовали фронт активации пачек (activation pattern) [10]. Размерность вектора V_k равна количеству активных электродов (т. е. электродов, на которых наблюдалась хотя бы одна пачка):

$$V_k = \{t_k(i) - t_{start}^k\}_{i=0}^N = (c_{k0} \dots c_{kN}), \quad (1)$$

где $t_k(i)$ — начало активности на i -том электроде, t_{start}^k — время начала популяционного пачечного события. Если при данной пачке на электроде не было зафиксировано активности, но при других пачках она присутствовала, то

соответствующая компонента вектора принимает среднее значение остальных компонент вектора.

В качестве метрики использовали коэффициент корреляции Пирсона, а метода кластеризации — метод взвешенного попарного среднего [20].

Для получения кластеров необходимо в упорядоченной последовательности векторов признаков найти расстояния между соседними векторами, после чего на основании полученных расстояний определить пороговое значение th . Соседние векторы, расстояния между которыми меньше порогового, образуют кластеры.

Пороговое значение th , определяли следующим образом. Строили график зависимости максимальной удаленности кластеров D от числа кластеров n в порядке возрастания. Тогда

$$th = D(\operatorname{argmax}(\frac{d^2 D}{dn^2})+2),$$

где argmax — функция, вычисляющая максимальное значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кластерный анализ спонтанной пачечной активности нейронов двух культур в возрасте 10...30 DIV (рис. 1) показал, что в обоих случаях более чем 50 % фронтов активации пачек принадлежали к одному доминирующему кластеру (№ 7 на рис. 1, А и № 5 на рис. 1, В). Большинство прочих популяционных пачек (40 %) распределились по двум равным по размеру кластерам (№ 6 и 9 на рис. 1, А и № 4 и 6 на рис. 1, В). Доминирующие паттерны пачечной активности нейронов были стабильны, несмотря на внешние воздействия на культуру, связанные со сменой среды и перемещением культуры из инкубатора к регистрирующей установке и обратно.

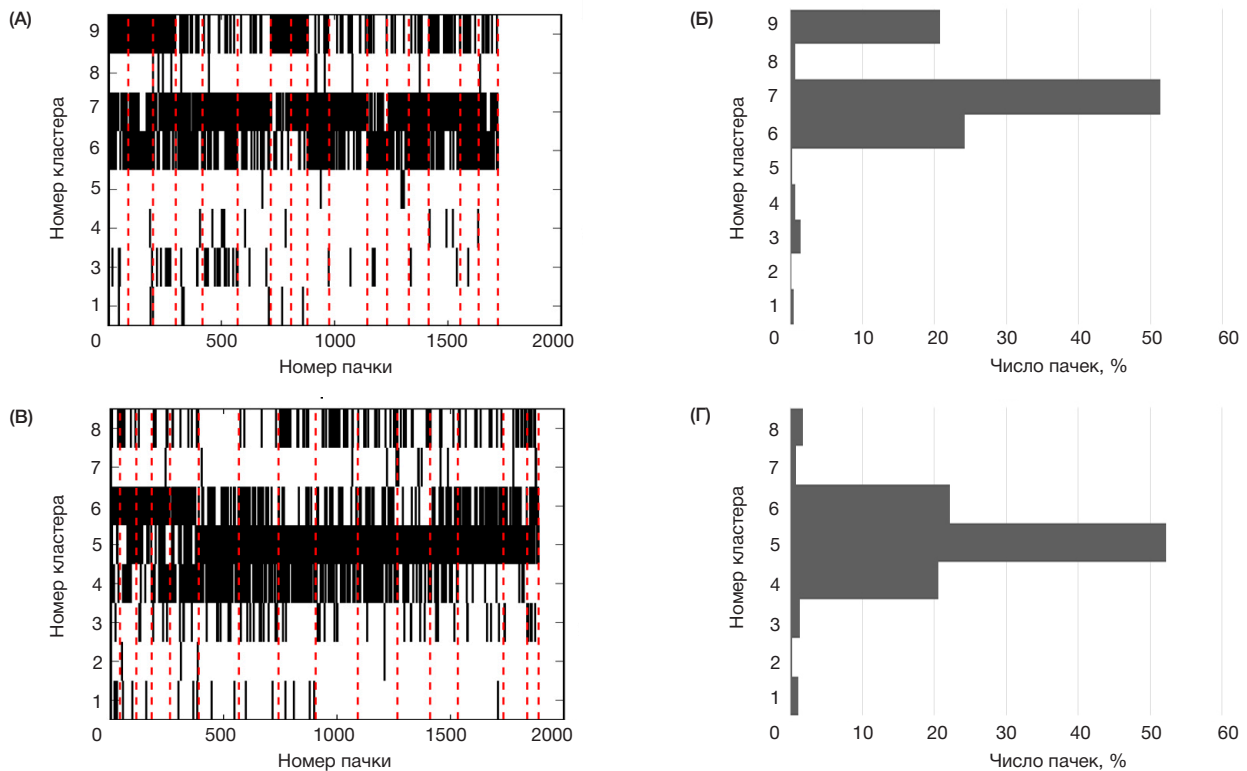


Рис. 1. Кластеризация динамики спонтанной пачечной активности для двух нейрональных культур *in vitro* с идентификаторами 3035 (А) и 3040 (В) и процентное соотношение числа пачек в кластерах с идентификаторами 3035 (С) и 3040 (Д). Пачки представлены в порядке появления. Красными пунктирными линиями отделены дни развития культуры

В эксперименте по обучению нейрональной сети для стимуляции (п. 2 протокола обучения) был выбран 22-й электрод, а для прекращения стимуляции (п. 3 протокола обучения) — 12-й. Условием завершения стимуляции являлось обнаружение 5 и более спайков в окне 50-80 мс после стимулирующего импульса.

Результаты кластерного анализа спонтанной пачечной активности, зарегистрированной на этапах 1, 4 и 6 протокола обучения, приведены на рисунке 2. Перед стимуляцией (этап 1) популяционные пачки формировали два больших кластера № 15 и 18. После стимуляции без обратной связи (этап 4) число пачек, соответствовавших кластерам № 15 и 18, уменьшилось, а кластерам № 2 и 4 — увеличилось. После стимуляции с обратной связью (этап 6) число пачек в доминирующих кластерах № 15 и 18 осталось на промежуточном уровне, а остальная часть активности переклучилась из кластеров № 2 и 4 в кластер № 3.

Доминирующая спонтанная пачечная активность до стимуляции и таковая после стимуляции имели различные паттерны активаций (рис. 3). Кластеры № 3 и 4 были схожи между собой, но отличались от кластеров № 15 и 18, которые в значительной степени перекрывались. Кластер № 2 сочетал в себе черты тех и других.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно нашей гипотезе, спонтанная пачечная активность нейронных сетей *in vitro* должна характеризоваться самоорганизацией и повторением паттернов активности. Наш эксперимент и результаты других исследователей [13, 21, 22] подтверждают, что самоорганизация нейронов при созревании культуры приводит к появлению

ограниченного числа динамических режимов, каждый из которых представлен своим собственным типом активности — аттрактором. Таким образом, нейроны *in vitro* способны производить и поддерживать некоторую последовательность активаций, что необходимо для сохранения памятного следа.

Второе предположение высказанной гипотезы — устойчивость паттернов спонтанной пачечной активности к внешним воздействиям, в том числе внешней электрической стимуляции. Наши результаты показывают, что состав паттернов не зависит от наличия обратной связи при стимуляции и изменяется только частота их встречаемости. Это позволяет предположить, что обучение в живых нейронных сетях является результатом генерации вариаций существующих паттернов с последующим выбором подходящего шаблона для решения «проблемы». Так, в протоколе, использованном нами в исследовании, «проблема» была определена с помощью внешней стимуляции, которую можно отключить, предоставив «решение».

ВЫВОДЫ

Исследование спонтанной пачечной активности нейронных сетей *in vitro* показало, что динамика активности сети сводится к небольшому числу аттракторов. Изменение пачечной активности при внешней стимуляции показало, что доминирующий аттрактор спонтанной активности не разрушается, однако увеличивается разнообразие паттернов. Можно предположить, что обучение осуществляется в основном через переключение между существующими динамическими аттракторами нейрональной активности.

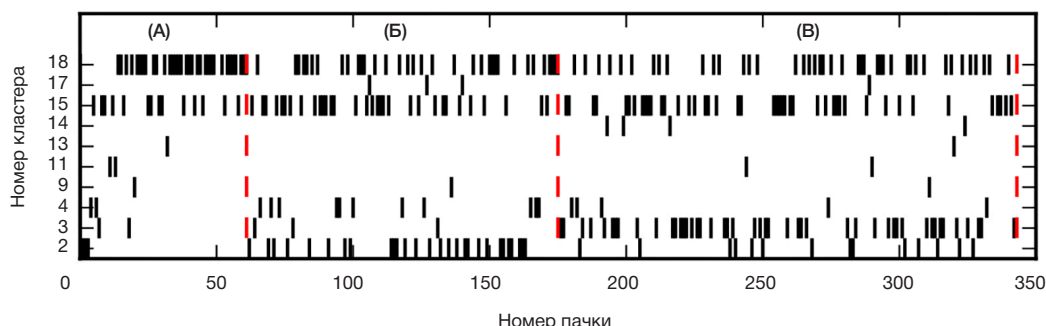


Рис. 2. Переключения паттернов активности после стимуляции без обратной связи и с обратной связью. (А) До стимуляции. (Б) После стимуляции без обратной связи. (В) После стимуляции с обратной связью

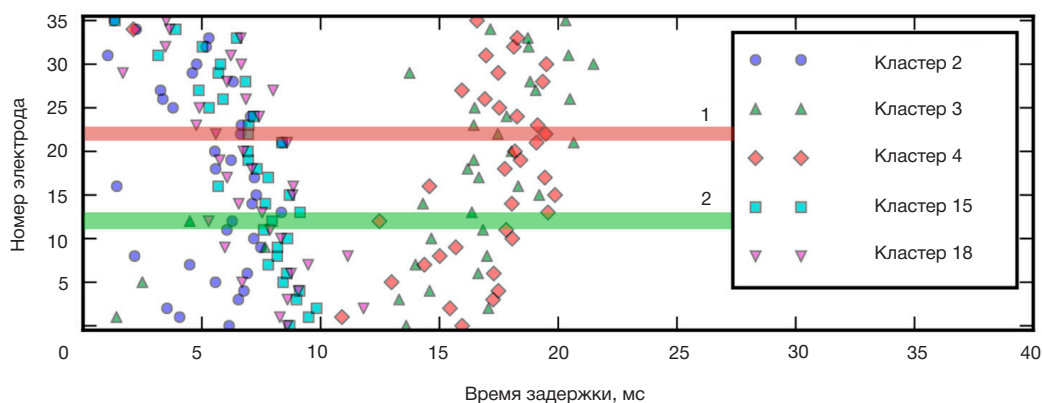


Рис. 3. Усредненные векторы признаков пачек для кластеров, содержащих не менее 5 % всех событий, показанных на рис. 2. Зеленой линией (1) отмечен электрод № 12, по которому культуру обучали, красной (2) — электрод № 22, по которому осуществляли стимуляцию

Литература

- Velliste M, Perel S, Spalding MC, Whitford AS, Schwartz AB. Cortical control of a prosthetic arm for self-feeding. *Nature*. 2008 Jun 19; 453 (7198): 1098–101.
- Wessberg J, Stambaugh CR, Kralik JD, Beck PD, Laubach M, Chapin JK, et al. Real-time prediction of hand trajectory by ensembles of cortical neurons in primates. *Nature*. 2000 Nov 16; 408 (6810): 361–5.
- Serruya MD, Hatsopoulos NG, Paninski L, Fellows MR, Donoghue JP. Instant neural control of a movement signal. *Nature*. 2002 Mar 14; 416 (6877): 141–2.
- Shannon RV. Advances in auditory prostheses. *Curr Opin Neurol*. 2012 Feb; 25 (1): 61–6.
- Fernandes RA, Diniz B, Ribeiro R, Humayun M. Artificial vision through neuronal stimulation. *Neurosci Lett*. 2012 Jun 25; 519 (2): 122–8.
- Hampson RE, Song D, Chan RH, Sweatt AJ, Riley MR, Gerhardt GA, et al. A nonlinear model for hippocampal cognitive prosthesis: memory facilitation by hippocampal ensemble stimulation. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 2012 Mar; 20 (2): 184–97.
- Josselyn SA, Kohler S, Frankland PW. Finding the engram. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Sep; 16 (9): 521–34.
- Quiroga RQ, Mukamel R, Isham EA, Malach R, Fried I. Human single-neuron responses at the threshold of conscious recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 4; 105 (9): 3599–604.
- Kermany E, Gal A, Lyakhov V, Meir R, Marom S, Eytan D. Tradeoffs and constraints on neural representation in networks of cortical neurons. *J Neurosci*. 2010 Jul 14; 30 (28): 9588–96.
- Raichman N, Ben-Jacob E. Identifying repeating motifs in the activation of synchronized bursts in cultured neuronal networks. *J Neurosci Methods*. 2008 May 15; 170 (1): 96–110.
- Shahaf G, Eytan D, Gal A, Kermany E, Lyakhov V, Zrenner C, et al. Order-based representation in random networks of cortical neurons. *PLoS Comput Biol*. 2008 Nov; 4 (11): e1000228.
- Xydas D, Downes JH, Spencer MC, Hammond MW, Nasuto SJ, Whalley BJ, et al. Revealing ensemble state transition patterns in multi-electrode neuronal recordings using hidden Markov models. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 2011 Aug; 19 (4): 345–55.
- Pimashkin A, Kastalskiy I, Simonov A, Koryagina E, Mukhina I, Kazantsev V. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures. *Front Comput Neurosci*. 2011; 5: 46.
- Shahaf G, Marom S. Learning in networks of cortical neurons. *J Neurosci*. 2001 Nov 15; 21 (22): 8782–8.
- Marom S, Shahaf G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. *Q Rev Biophys*. 2002 Feb; 35 (1): 63–87.
- Li Y, Zhou W, Li X, Zeng S, Luo Q. Dynamics of learning in cultured neuronal networks with antagonists of glutamate receptors. *Biophys J*. 2007 Dec 15; 93 (12): 4151–8.
- Stegenga J, Le Feber J, Marani E, Rutten WL. The effect of learning on bursting. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2009 Apr; 56 (4): 1220–7.
- le Feber J, Stegenga J, Rutten WL. The effect of slow electrical stimuli to achieve learning in cultured networks of rat cortical neurons. *PloS One*. 2010; 5 (1): e8871.
- Wagenaar DA, Pine J, Potter SM. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci*. 2006; 7: 11.
- Sokal R, Michener C. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 1958; 38 (22): 1409–38.
- Лебедев П. Д., Бурцев М. С. Кластеризация пачек спонтанной активности нейрональной культуры. В сборнике: Сборник научных трудов Всероссийской научно-технической конференции «Нейроинформатика 2010» в 2-х частях. ч. 1. М.: НИЯУ МИФИ; 2010. с. 296–303.
- Burtsev MS, Lebedev RD. Evolution of bursts onsets during the development of cortical cultures. *FENS Abstr*, vol. 5, 130.12, 2010.

References

- Velliste M, Perel S, Spalding MC, Whitford AS, Schwartz AB. Cortical control of a prosthetic arm for self-feeding. *Nature*. 2008 Jun 19; 453 (7198): 1098–101.
- Wessberg J, Stambaugh CR, Kralik JD, Beck PD, Laubach M, Chapin JK, et al. Real-time prediction of hand trajectory by ensembles of cortical neurons in primates. *Nature*. 2000 Nov 16; 408 (6810): 361–5.
- Serruya MD, Hatsopoulos NG, Paninski L, Fellows MR, Donoghue JP. Instant neural control of a movement signal. *Nature*. 2002 Mar 14; 416 (6877): 141–2.
- Shannon RV. Advances in auditory prostheses. *Curr Opin Neurol*. 2012 Feb; 25 (1): 61–6.
- Fernandes RA, Diniz B, Ribeiro R, Humayun M. Artificial vision through neuronal stimulation. *Neurosci Lett*. 2012 Jun 25; 519 (2): 122–8.
- Hampson RE, Song D, Chan RH, Sweatt AJ, Riley MR, Gerhardt GA, et al. A nonlinear model for hippocampal cognitive prosthesis: memory facilitation by hippocampal ensemble stimulation. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 2012 Mar; 20 (2): 184–97.
- Josselyn SA, Kohler S, Frankland PW. Finding the engram. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Sep; 16 (9): 521–34.
- Quiroga RQ, Mukamel R, Isham EA, Malach R, Fried I. Human single-neuron responses at the threshold of conscious recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 4; 105 (9): 3599–604.
- Kermany E, Gal A, Lyakhov V, Meir R, Marom S, Eytan D. Tradeoffs and constraints on neural representation in networks of cortical neurons. *J Neurosci*. 2010 Jul 14; 30 (28): 9588–96.
- Raichman N, Ben-Jacob E. Identifying repeating motifs in the activation of synchronized bursts in cultured neuronal networks. *J Neurosci Methods*. 2008 May 15; 170 (1): 96–110.
- Shahaf G, Eytan D, Gal A, Kermany E, Lyakhov V, Zrenner C, et al. Order-based representation in random networks of cortical neurons. *PLoS Comput Biol*. 2008 Nov; 4 (11): e1000228.
- Xydas D, Downes JH, Spencer MC, Hammond MW, Nasuto SJ, Whalley BJ, et al. Revealing ensemble state transition patterns in multi-electrode neuronal recordings using hidden Markov models. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 2011 Aug; 19 (4): 345–55.
- Pimashkin A, Kastalskiy I, Simonov A, Koryagina E, Mukhina I, Kazantsev V. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures. *Front Comput Neurosci*. 2011; 5: 46.
- Shahaf G, Marom S. Learning in networks of cortical neurons. *J Neurosci*. 2001 Nov 15; 21 (22): 8782–8.
- Marom S, Shahaf G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. *Q Rev Biophys*. 2002 Feb; 35 (1): 63–87.
- Li Y, Zhou W, Li X, Zeng S, Luo Q. Dynamics of learning in cultured neuronal networks with antagonists of glutamate receptors. *Biophys J*. 2007 Dec 15; 93 (12): 4151–8.
- Stegenga J, Le Feber J, Marani E, Rutten WL. The effect of learning on bursting. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2009 Apr; 56 (4): 1220–7.
- le Feber J, Stegenga J, Rutten WL. The effect of slow electrical stimuli to achieve learning in cultured networks of rat cortical neurons. *PloS One*. 2010; 5 (1): e8871.
- Wagenaar DA, Pine J, Potter SM. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci*. 2006; 7: 11.
- Sokal R, Michener C. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 1958; 38 (22): 1409–38.
- Lebedev RD, Burtsev MS. Klasterizatsiya pachek spontannoy aktivnosti neyronal'noy kul'tury. In: Sbornik nauchnykh trudov Vserossiyskoy nauchno-tehnicheskoy konferentsii «Neyroinformatika 2010» v 2-kh chastyakh. P. 1. Moscow: MEPhI; 2010. p. 296–303. Russian
- Burtsev MS, Lebedev RD. Evolution of bursts onsets during the development of cortical cultures. *FENS Abstr*, vol. 5, 130.12, 2010.