

Р. Д. ЛЕБЕДЕВ¹, М. С. БУРЦЕВ^{2,3}

¹НИЯУ МИФИ, ²ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Москва; ³НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва
rnn.lebedev@gmail.com

КЛАСТЕРИЗАЦИЯ ПАЧЕК СПОНТАННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Исследование спонтанной пачечной активности культур нейронов является актуальной задачей на пути понимания принципов адаптации биологических нейронных сетей. Одним из важнейших параметров, характеризующих рассматриваемую активность, является фронт пачки, так как эксперименты по обучению культур указывают на его возможную пластичность. В работе предлагается метод поиска повторяющихся паттернов во фронтах пачек спонтанной нейрональной активности в культуре с последующей кластеризацией. Результаты тестирования метода на данных мультиэлектродной регистрации активности в культуре, демонстрируют его адекватность поставленной задаче.

Введение

Эксперименты по обучению культур нейрональных клеток [1,2] показывают, что даже вне целостного организма сети нейронов могут демонстрировать целенаправленную адаптацию. Параллельные исследования гибридных нейроэлектронных устройств, в которых нейрональная культура управляет симулятором или реальным роботом, и теоретических моделей нейросетей должны принести новые знания о работе мозга и позволить разработать новые - нейроморфные принципы искусственного интеллекта.

Эксперименты по исследованию культур нейронов проводятся на мультиэлектродных подложках, позволяющих, как регистрировать активность клеток, так и стимулировать их. Сегодня, наиболее ясной экспериментальной моделью обучения сети является модель управления стимуляцией, предложенная в [1]. В этой модели нейрональная культура решает задачу выключения внешней стимуляции за счет изменения активности, на выбранном экспериментатором электроде. Важной особенностью является то, что обучение проводится в культурах, проявляющих спонтанную пачечную активность, когда кратковременные периоды высокой частоты

спайков (bursts), регистрируемых по большинству электродов, сменяется практически полным отсутствием активности нейронов. В процессе обучения происходит изменения фронта активации пачки, вызванной подачей напряжения на стимулирующий электрод.

Таким образом, для того чтобы лучше понять принципы обучения нейрональных культур, необходимо исследовать процесс формирования в них спонтанной пачечной активности и ее характеристики. Так как обучение происходит за счет изменения фронта пачки, то на первое место выходит задача выделения и анализа паттернов активности в нем. Для решения этой задачи на основе подходов, изложенных в [3,4], нами был разработан метод выделения паттернов фронтов пачек спонтанной активности и классификации пачечных событий по соответствующим кластерам.

Описание метода выделения паттернов и кластеризации

Исходными данными для алгоритма является множество спайков, зарегистрированных при помощи мультиэлектродной матрицы, где информация о каждом спайке содержит:

- время спайка;
- электрод, на котором спайк был зарегистрирован.

Рассмотрим пошагово работу алгоритма.

1. Поиск пачечных событий

Перед поиском паттернов необходимо выделить пачечные события в зарегистрированной активности культуры, для этого мы модифицировали алгоритм предложенный в [3].

Сначала производится поиск малых пачечных событий (МПС, burstlet): примем f_c за среднюю интенсивность активности нейронной сети на электроде c , т.е. общее количество зарегистрированных спайков на этом электроде, деленное на продолжительность записи. Затем определим пороговые межспайковые интервалы (ПМИ), τ_c , для каждого электрода c :

$$\tau_c = \min\left[\frac{1}{4f_c}; 100.\text{мс}\right] \quad (1)$$

Выражение (1) значит, что только те спайки, которые следуют друг за другом в 4 раза быстрее нормы, могут считаться МПС. Для каждого электрода ищется последовательность четырех или более спайков с ПМИ меньшим τ_c . После того, как были найдены эти «центральные» МПС,

они расширяются в «прошлое» и «будущее», чтобы включить также спайки, у которых ПМИ менее , чем

$$\min\left[\frac{1}{3f_c}; 200.\text{мс}\right]$$

Таким образом МПС состоит из центральных, по крайней мере четырех близко расположенных во времени спайков, с «окружением» из любого количества менее близких спайков. После того, как все МПС на всех электродах найдены, они упорядочиваются по времени. Затем проводится поиск моментов времени в которых присутствуют МПС на не менее чем половине электродов. Для этого множества, пересекающихся во времени МПС, определяется время начала первого МПС t_{start} и время конца последнего МПС t_{end} . Пачечное событие (ПС, пачка, burst) определяется, как множество спайков во временном окне $[t_{start}; t_{end}]$.

2. Формирование векторов признаков

После нахождения пачек, для каждой из них составляется вектор признаков, имеющий размерность, равную количеству электродов. Каждая компонента вектора равна задержке спайка на соответствующем электроде от начала пачки t_{start} . Если на каком-либо электроде в рассматриваемой пачке активность не зарегистрирована, то значение соответствующей компоненты принимается равным NULL.

3. Расчет расстояния между векторами признаков

Определим меру схожести между найденными векторами признаков. Пусть $V_1(c_{11}, \dots, c_{1n})$ и $V_2(c_{21}, \dots, c_{2n})$ – вектора признаков двух пачечных событий, причем N_1 и N_2 – количество активных электродов (т.е. количество координат, значения которых не равны NULL) каждого события соответственно. Тогда расстояние S между V_1 и V_2 :

$$S(V_1, V_2) = \frac{\sum_{\substack{i=1 \\ c_{1i} \neq \text{NULL} \\ c_{2i} \neq \text{NULL}}}^N (c_{1i} - c_{2i})^2}{\max(N_1, N_2)} \quad (2)$$

4. Упорядочение векторов признаков

Для того чтобы провести кластеризацию необходимо сгруппировать похожие пачки. Для этого находится минимальное расстояние из всех

посчитанных $\min_{i \neq j} S(V_i, V_j)$, в найденном минимальном расстоянии V_i будет первым вектором V_1^* в упорядоченной последовательности векторов, V_j – вторым V_2^* . Далее определяется порядок оставшихся векторов. Итеративно во множестве оставшихся векторов ищется вектор, имеющий минимальное расстояние от последнего вектора, добавленного к упорядоченной последовательности.

5. Объединение в кластеры

На заключительном этапе пачечные события объединяются в кластеры. Для этого от конца упорядоченной последовательности отбрасываются 10% от числа всех векторов последовательности. Такая процедура убирает из рассмотрения пачки заведомо не образующие кластеры из-за высокой степени их отличия от других. Затем устанавливается порог th , равный среднему оставшихся векторов:

$$th = \frac{\sum_{i=1}^{[0.9M]} S(V_i^*, V_{i+1}^*)}{[0.9M]}, \quad (3)$$

где M – количество обнаруженных пачечных событий. Множества соседних векторов признаков в упорядоченной последовательности объединяются в кластеры, если расстояние между соседними векторами признаков в их упорядоченной последовательности, расстояние S между которыми меньше порога th (см. рис. 4).

6. Получение эталона кластера

Для получения эталона кластера, рассчитывается вектор признаков, каждая из компонент которого равна среднему значению данной компоненты по всем векторам кластера.

Результаты кластеризации активности культуры

При помощи, изложенного в предыдущем разделе, алгоритма было проведено исследование спонтанной пачечной активности нейрональной культуры в экспериментальных данных, предоставленных авторами статьи [5]. Запись активности была проведена на 60 канальной мультиэлектродной матрице в течение 38 дней по 30-50 минут в день.

Для каждого дня было найдено количество малых пачечных событий (рис. 1а), число их пересечений во времени (рис. 1б) и количество пачек (рис. 2). Оказалось, что начиная с 5-го дня культура начинает демонстрировать пачечную активность на отдельных электродах (МПС) (рис.1). Затем до 20-го дня общее количество детектированных МПС меняется слабо, а пачки практически не наблюдаются (рис.2). После 20 дня активность нейронов в культуре становится все более и более синхронизованной. Число пачек увеличивается (рис.2), как и число МПС (рис.1а), при этом количество наблюдаемых пересечений МПС во времени снижается (рис.1б), что указывает на увеличение концентрации МПС внутри пачек, т.к. при меньшем числе пересечений в пачке принимает большое число МПС.

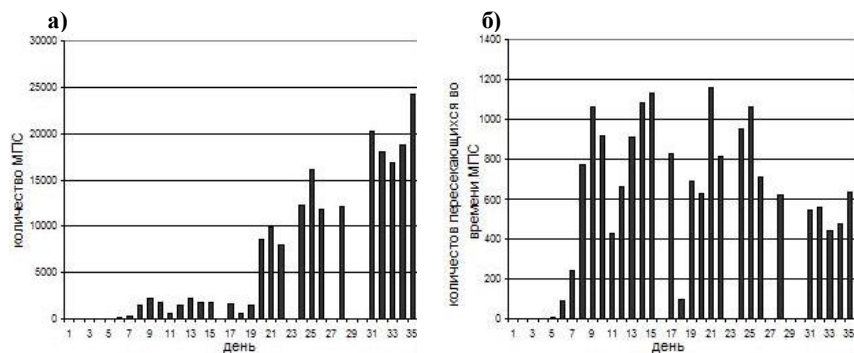


Рис. 1. Количество малых пачечных событий растет с возрастом культуры (а), число их пересечений во времени слабо зависит от возраста культуры (б).

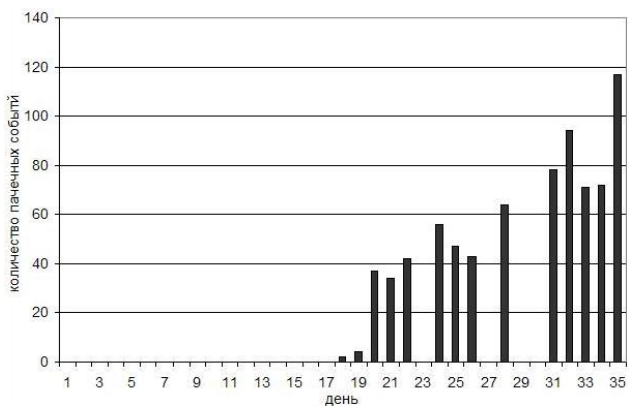


Рис. 2. С возрастом культуры количество пачек увеличивается.

Мы выбрали 33 день демонстрирует типичную для взрослой культуры пачечную активность, поэтому он был выбран для дальнейшего анализа. В записи активности 33-го дня алгоритм нашел 72 пачечных события. Для них были рассчитаны попарные расстояния (рис. 3а), и проведено упорядочивание (рис. 3б). Как видно из карты, после упорядочивания вдоль диагонали появилась последовательность темных квадратов, которые соответствуют кластерам пачек с похожими фронтами активности.

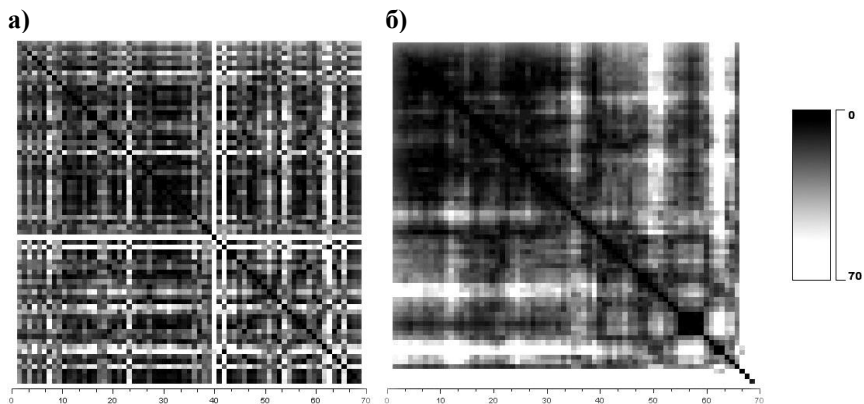


Рис. 3. Карта расстояний между пачками, а) до упорядочивания, б) после.

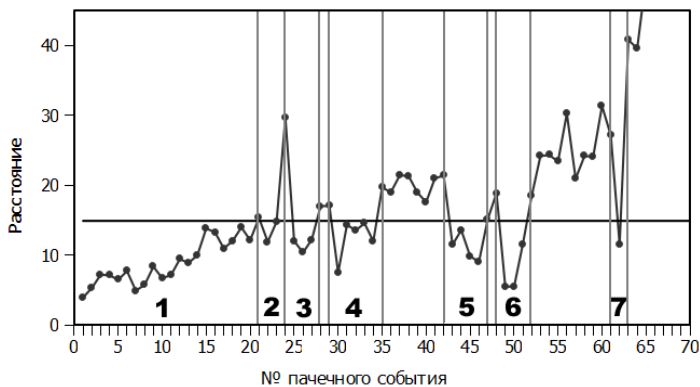


Рис. 4. Расстояния между упорядоченными векторами признаков пачек и порог. Пары пачек, для которых расстояние между векторами признаков лежит ниже порога, объединяются в кластеры. Вертикальные линии показывают границы кластеров.

После исключения из упорядоченной последовательности последних 7 (10% от общего количества) векторов пачечных событий значение порога составило $th=14.91542$ (рис. 4), что дало 7 паттернов, среди которых первый паттерн состоит из 21 пачечного события, остальные 6 состоят из 2-5 пачечных событий.

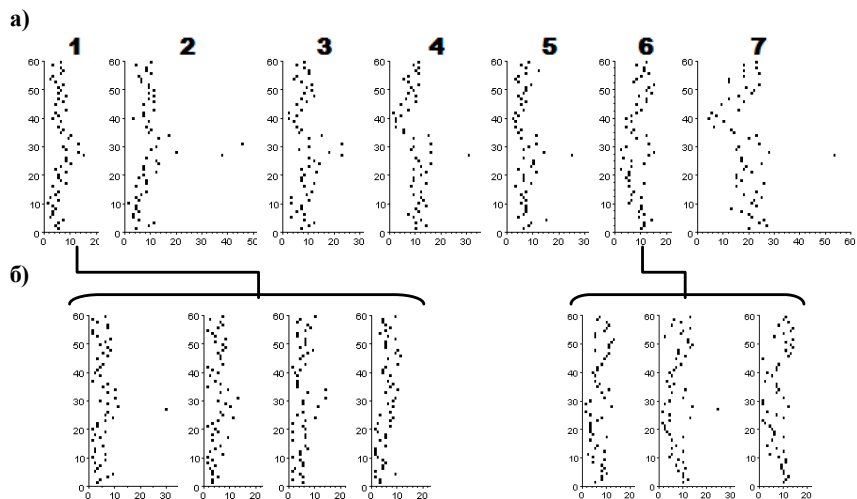


Рис. 5. Растрограммы эталонов выделенных кластеров (а) и пачек представителей 1-го и 6-го кластеров (б). По оси ординат отложен номер электрода, по оси абсцисс время в миллисекундах, точки соответствуют первому спайку от начала пачки.

Результаты кластеризации приведены на рисунке 5. Эталонные паттерны для найденных кластеров представлены на рисунке 5а, а паттерны для отдельных представителей классов на рисунке 5б. Видно, что пачки больше похожи на представителей своего кластера.

Чтобы понять, как пачки, принадлежащие разным кластерам, распределены по времени, нами была построена растрограмма пачечной активности (рис.б.). Растрограмма позволяет увидеть, что пачки 1-го кластера довольно равномерно распределены по всему времени записи, пачки 6-го и 3-го кластеров наблюдаются в первой половине регистрации, а 7-го и 2-го во второй. При этом четкой тенденции в смене одних паттернов спонтанной активации другими не наблюдается.

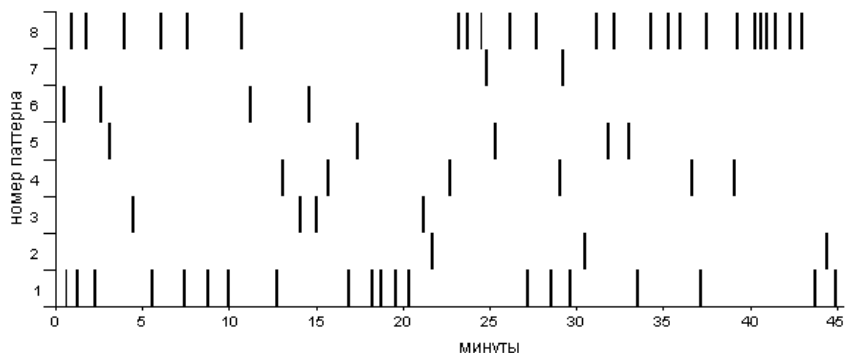


Рис. 6. Зависимость активации пачек разных классов от времени. Активации пачек, не входящих ни в один из кластеров, объединены в паттерн номер 8.

Заключение

В данной работе нами предложен метод поиска паттернов в данных мультиэлектродной регистрации активности нейрональных культур. Являясь развитием предыдущих работ [3,4], разработанный алгоритм позволяет не только находить пачки, и выделять типичные паттерны их фронтов, но и проводить кластеризацию пачек.

Поиск паттернов активности в экспериментальных данных при помощи разработанного метода показал, что спонтанная пачечная активность формируется по мере взросления культуры (рис. 1-2). Также был подтвержден результат, полученный в работе [4], что пачки спонтанной активности имеют несколько повторяющихся паттернов фронта активации (рис. 5). В дополнение к этому, введение возможности кластеризации пачек по типам фронта активации позволило построить зависимость активации пачек разных типов от времени (рис. 6).

В дальнейшем планируется применить описанный подход для исследования изменения спонтанной активности в нейрональных культурах в зависимости от их возраста и плотности.

Список литературы

1. Shahaf G, Marom S. Learning in networks of cortical neurons // J Neurosci. 2001 Nov 15;21(22):8782-8.

2. DeMarse, T. B., & Dockendorf, K. P. Adaptive flight control with living neuronal networks on microelectrode arrays // *Proceedings of the International Journal of Computation and Neural Networks*, 3, 2005. 1548-1551.
3. Wagenaar, D. A. and S. M. Potter. Real-time multi-channel stimulus artifact suppression by local curve fitting. // *J. Neurosci. Methods* 120: 113-120, 2002.
4. Nadav Raichman, Eshel Ben-Jacob, Identifying repeating motifs in the activation of synchronized bursts in cultured neuronal networks // *Journal of Neuroscience Methods* 170, C.96–110, 2008.
5. Wagenaar, D. A., Pine, J. and Potter, S. M. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures // *BMC Neuroscience* 7:11 (2006).