

ISSN 0044-4677

Том 73, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



ЖУРНАЛ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

имени И.П. Павлова



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 73, номер 6, 2023

Физиология высшей нервной (когнитивной) деятельности человека

- Связь ритмической альфа-активности субталамического ядра с нарушениями двигательного контроля у пациентов с болезнью Паркинсона
А. А. Незвинский, Е. М. Белова, К. Э. Сайфулина, А. А. Гамалея, А. А. Томский, А. С. Седов 725
- Вызванные потенциалы мозга человека на выключение звука в условиях пространственной маскировки
Е. А. Петропавловская, Л. Б. Шестопалова, Д. А. Саликова, В. В. Семенова 735
- Вклад вербальных обозначений в процессы быстрого картирования и явного кодирования
Е. И. Перикова, М. Г. Филиппова, Д. Н. Макарова, Д. С. Гнедых 749
- Продление мозговой активации в ответ на стимул как вероятный механизм ассоциативной пластичности при семантическом научении
Б. В. Чернышев, А. А. Павлова, А. М. Рытикова, А. В. Буторина, Т. А. Строганова 764
- Восстановление моторных и когнитивных функций при форсированном пробуждении из третьей стадии дневного сна
А. К. Соловьева, Н. К. Соловьев, А. О. Мокроусова, Ю. В. Украинцева 785
- Распознавание устной речи по данным МЭГ с использованием ковариационных фильтров
В. М. Верхлютов, Е. О. Бурлаков, К. Г. Гуртовой, В. Л. Введенский 800
-

Физиологические механизмы поведения животных: восприятие внешних стимулов, двигательная активность, обучение и память

- Increase in histone acetylation rescues a weak remote fear memory in rats
A. Kh. Vinarskaya, P. M. Balaban, and A. B. Zuzina 809
-

Экспериментальная патология высшей нервной деятельности

- Нарушения двигательной активности на модели расстройств аутистического спектра
А. Е. Хайруллин, Д. В. Ефимова, Д. В. Иванова, Т. В. Балтина, М. Э. Балтин, С. Н. Гришин, А. У. Зиганин 819
- Влияние хлоралгидрата на морфологические особенности неокортекса и функциональное состояние старых самцов крыс
Н. С. Щербак, Г. Ю. Юкина, А. Г. Гурбо, Е. Г. Сухорукова, А. Г. Саргсян, В. В. Томсон 833
- Эффекты различных режимов интервальных гипоксических тренировок в экспериментальных моделях тревожно-депрессивных состояний на грызунах
М. Ю. Зенько, К. А. Баранова, М. В. Кукина, Е. А. Рыбникова 845
-

Методика

- WEEGIT – software for visualization and annotation of the electrophysiological activity registration data
D. S. Suchkov, V. V. Shumkova, V. R. Sitdikova, V. M. Silaeva, A. E. Logashkin, A. R. Mamleev, and M. G. Minlebaev 857
-
-

Contents

Vol. 73, No. 6, 2023

Physiology of higher nervous (mental) activity in humans

- Correlation between subthalamic alpha rhythmic activity and motor control impairment in Parkinsonian patients
A. A. Nezvinskiy, E. M. Belova, K. E. Sayfulina, A. A. Gamaleyeva, A. A. Tomskiy, and A. S. Sedov 725
- Offset responses in conditions of auditory spatial masking in humans
E. A. Petropavlovskaya, L. B. Shestopalova, D. A. Salikova, and V. V. Semenova 735
- The labeling benefit in fast mapping and explicit encoding
E. I. Perikova, M. G. Filippova, D. N. Makarova, and D. S. Gnedykh 749
- Prolongation of stimulus representation in the brain as a probable mechanism of associative plasticity implementation during semantic learning
B. V. Chernyshev, A. A. Pavlova, A. M. Rytikova, A. V. Butorina, and T. A. Stroganova 764
- Motor control and cognitive functions recovery during forced awakening from slow-wave daytime sleep
A. K. Soloveva, N. K. Solovev, A. O. Mokrousova, and Yu. V. Ukraintseva 785
-

Methods

- Recognition of oral speech according to MEG data by covariance filters
V. M. Verkhlyutov, E. O. Burlakov, K. G. Gurtovoy, and V. L. Vvedensky 800
-

Physiology of behavior: perception, locomotion, learning and memory

- Increase in histone acetylation rescues a weak remote fear memory in rats
A. Kh. Vinarskaya, P. M. Balaban, and A. B. Zuzina 809
-

Experimental pathology of higher nervous activity

- Disorders of motor activity on the model of autism spectrum disorders
A. E. Khairullin, D. V. Efimova, D. V. Ivanova, T. V. Baltina, M. E. Baltin, S. N. Grishin, and A. U. Ziganshin 819
- Effect of chloral hydrate on morphological changes in the neocortex and functional state of old male rats
N. S. Shcherbak, G. Yu. Yukina, A. G. Gurbo, E. G. Sukhorukova, A. G. Sargsian, and V. V. Thomson 833
- The effects of various modes of interval hypoxic training in experimental models of anxiety and depression in rats
M. Y. Zenko, K. A. Baranova, M. V. Kukina, and E. A. Rybnikova 845
-

Methods

- WEEGIT – software for visualization and annotation of the electrophysiological activity registration data
D. S. Suchkov, V. V. Shumkova, V. R. Sitdikova, V. M. Silaeva, A. E. Logashkin, A. R. Mamleev, and M. G. Minlebaev 857
-
-

ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ (КОГНИТИВНОЙ)
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.82

СВЯЗЬ РИТМИЧЕСКОЙ АЛЬФА-АКТИВНОСТИ СУБТАЛАМИЧЕСКОГО
ЯДРА С НАРУШЕНИЯМИ ДВИГАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ У ПАЦИЕНТОВ
С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

© 2023 г. А. А. Незвинский^{1, *}, Е. М. Белова¹, К. Э. Сайфулина¹,
А. А. Гамалея², А. А. Томский², А. С. Седов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва, Россия

*e-mail: nezvinskii@phystech.edu

Поступила в редакцию 09.09.2022 г.

После доработки 26.06.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Повышенная осцилляторная бета-активность в базальных ганглиях считается одним из основных электрофизиологических биомаркеров нарушения двигательного контроля при болезни Паркинсона. При этом функциональная роль динамических процессов ритмической активности при выполнении движений до сих пор не до конца изучена. Методом микроэлектродной регистрации мы исследовали ритмическую активность нейронов субталамического ядра у 9 пациентов с болезнью Паркинсона во время проведения нейрохирургических операций для установки систем глубокой стимуляции мозга. Мы показали значимую положительную корреляцию амплитуды альфа- (7–12 Гц) и низкой бета- (12–20 Гц) активности в субталамическом ядре с общими показателями двигательных нарушений у пациентов с болезнью Паркинсона. Также мы показали, что амплитуда ритмической альфа-активности, в отличие от бета-ритмов, значительно снижалась при выполнении пациентами двигательных тестов. Более того, степень снижения альфа-активности напрямую коррелировала с выраженностью симптома брадикинезии. Полученные результаты позволяют предположить, что наряду с бета-активностью в двигательном контроле пациентов с болезнью Паркинсона играет роль также альфа-ритмическая активность нейронов субталамического ядра.

Ключевые слова: нейронная ритмическая активность, брадикинезия, микроэлектродная регистрация, субталамическое ядро, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S0044467723060059, EDN: IDVTUV

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, приводящее к различным двигательным нарушениям, таким как замедленность движений (брадикинезия), неконтролируемо увеличенный тонус (ригидность), а также тремор покоя (Galvan, Wichmann, 2008). Общепринятым электрофизиологическим маркером болезни Паркинсона является повышенная осцилляторная нейронная активность в базальных ганглиях, в частности, в субталамическом ядре (СТЯ), на частотах 8–30 Гц (Hammond et al., 2007). Для облегчения симптомов паркинсонизма используется медикаментозное лече-

ние (препараты леводопы) (Kühn et al., 2006; Kühn et al., 2009; Tinkhauser, 2017a) и глубокая стимуляция субталамического ядра (DBS) (Kühn et al., 2008; Oswal et al., 2016; Horn et al., 2017; Tinkhauser et al., 2017b), которые снижают патологические осцилляции.

Исследования, направленные на более подробное выявление патологических частот, показали наибольшую корреляцию осцилляций на частоте 10–14 Гц с обобщенными показателями двигательных нарушений в записях локальных потенциалов (local field potentials, LFP) у пациентов с болезнью Паркинсона (Neumann et al., 2016). В наших предыдущих исследованиях локальных потенциалов субталамиче-

ского ядра мы также показали, что с брадикинезией в большей степени коррелирует амплитуда осцилляций в диапазоне 8–14 Гц (Belova et al., 2021). Такой частотный диапазон выбивается из определения “классического” бета-диапазона и пересекается с альфа-частотой.

Основные данные о роли осцилляций в патофизиологии БП получены в исследованиях локальных потенциалов — сигналов, отражающих комплексную активность от многих нейронных источников со сложной геометрией, оказывающей существенное влияние на характеристики получаемого сигнала (Herreras, 2016). Источником патологических осцилляций в локальных потенциалах, вероятнее всего, является синхронная активность больших нейронных популяций. Действительно, в субталамическом ядре наблюдаются ритмические нейроны, разряжающиеся с частотой, совпадающей с осцилляциями LFP (Kühn et al., 2006; Scherer et al., 2022). Рассмотрение спектральных характеристик “множественной” или “ансамблевой” активности нейронов СТЯ также приводит к частотной корреляции как с LFP, так и с разрядами отдельных нейронов и позволяет изучать динамику изменения патологических ритмов (Moran et al., 2010; Drebitz et al., 2019).

В ряде исследований была показана краткосрочная десинхронизация бета-активности в базальных ганглиях при выполнении произвольных движений (Steiner et al., 2017; Bichsel et al., 2018). Динамика альфа-активности при выполнении движений замечена в первую очередь в свете корреляций с сигналами в коре больших полушарий у пациентов с болезнью Паркинсона. Предшествующая движениям десинхронизация локальных потенциалов в альфа-диапазоне (7–12 Гц), аналогичная десинхронизации в височной доле коры, наблюдается также и в локальных потенциалах субталамического ядра при нажатиях клавиш пациентами (Oswal et al., 2013). В литературе встречается описание снижения ритмической активности отдельных нейронов в альфа-диапазоне при инициации сжатия руки в кулак у пациентов с высокой спонтанной альфа-активностью в субталамическом ядре (Alegre et al., 2005). На основании этого авторы высказывают предположение, что для успешной реализации движения патологически повышенная “альфа-бета” активность должна подавляться.

Несмотря на изучение альфа- и бета-ритмов прежде всего как потенциальных био-

маркеров для систем адаптивной стимуляции (Little et al., 2013; Feldmann et al., 2022), вопрос о связи этих ритмов с патологическими и физиологическими процессами двигательного контроля пациентов с болезнью Паркинсона остается неразрешенным. При этом исследования, анализирующие ритмические характеристики активности небольших нейронных групп/ансамблей в области регистрации внутри моторных зон СТЯ при выполнении движений, в литературе отсутствуют.

Задачами настоящей работы было исследование связи ритмической активности нейронных ансамблей в субталамическом ядре с выраженностью симптомов паркинсонизма, исследование изменений ритмической активности при выполнении двигательных тестов, а также корреляция этих реакций с клиническими проявлениями болезни Паркинсона.

МЕТОДИКА

Получение данных

В исследование были включены 9 пациентов (3 женщины и 6 мужчин, средний возраст 53.3 ± 7.4 года, от 44 до 65 лет), правши, с акинетико-ригидной формой болезни Паркинсона. Выраженность двигательных нарушений пациентов в OFF-состоянии (спустя не менее 12 часов после последнего приема препаратов леводопы) оценивалась неврологами по шкале UPDRS-III (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) за день до проведения операции. Клинические данные о пациентах представлены в табл. 1. Все пациенты были ознакомлены с процедурой исследования и дали свое письменное согласие. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Центра нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Нейрохирургические операции по вживлению электродов для стимуляции глубинных структур мозга (DBS) осуществлялись в Научном Центре нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. Все операции проводились под местной анестезией. Расчет координат точки цели в СТЯ определялся нейрохирургами по T2-взвешенным МРТ снимкам. Для уточнения границ субталамического ядра осуществляли запись микроэлектродного исследования с помощью вольфрамовых микроэлектродов ($R = 500\text{--}1000$ кОм, AlphaProbe, Alpha Omega Engineering, Israel). Регистрация нейронной активности начинали с 10 мм до расчетной точки цели и осуществляли с шагом 0.1–0.2 мм. На

Таблица 1. Информация о пациентах, участвовавших в исследовании
Table 1. Information about PD patients included in the study

Пациент пол	Возраст во время операции	Длительность болезни	UPDRS-III off	Бради- кинезия л/п	Кол-во глубин со спонтанной активностью (л/п)	Кол-во глубин с вызванной активностью (л/п)
1 м	48	9	51	8/9	7 (5/2)	5 (4/1)
2 м	48	14	52	10/7	5 (3/2)	2 (0/2)
3 ж	62	16	57	12/11	15 (7/8)	6 (3/3)
4 ж	51	12	78	11/14	13 (10/3)	6 (3/3)
5 ж	60	22	54	8/12	11 (10/1)	4 (4/0)
6 м	50	12	46	9/11	28 (21/7)	12 (8/4)
7 м	65	13	18	1/6	11 (7/4)	9 (6/3)
8 м	44	7	78	16/13	7 (2/5)	3 (1/2)
9 м	51	14	26	0/3	4 (0/4)	3 (0/3)

каждой глубине погружения регистрировали спонтанную нейронную активность длительностью около 20 с, пока пациент находится в покое.

Для определения моторной зоны субталамического ядра проводили двигательные тесты рукой, контралатеральной к исследуемому полушарию, запускаемые с помощью речевых команд. Тест инициировался командой “Сожмите руку в кулак!”, через 2–3 с предъявлялась команда “Разожмите руку!”, после которой была пауза 2–3 с. Такая последовательность повторялась 3–5 раз.

Одновременно с записью нейронной активности осуществляли регистрацию фонограммы речевых команд и ЭМГ мышц сгибателей и разгибателей пальцев рук для определения точного момента времени начала выполнения движения, а также чтобы убедиться в отсутствии движений в записи фоновой активности (пример фрагмента записи ЭМГ изображен на рис. 1). После уточнения границ субталамического ядра проводили тестовую стимуляцию для исключения побочных эффектов.

Анализ данных

Первичный анализ микроэлектродных записей осуществляли в программе Spike2 (CED, UK), он состоял в проверке нейрограмм на наличие артефактов и отборе информативных записей для дальнейшего анализа. К отфильтрованным выше 100 Гц (high-pass filter) записям применяли метод полной спайковой активности (entire spiking activity, ESA) (Drebitz et al., 2019), который состоял в расчете абсолютного значения по всей нейрограмме. Далее для модифицированных таким образом нейрограмм проводили вычисление спектральной плотности мощности (СПМ) в диапазоне 1–100 Гц по всему периоду записи на данной глубине методом Уэлча. Затем получали нормированные значения %СПМ: СПМ, деленные на общее значение мощности в этом частотном диапазоне. При обнаружении на спектре пиков с амплитудой, как минимум в три раза превышающей уровень шума, глубина обозначалась как “ритмическая” и включалась в дальнейший анализ.

Спектральный анализ проводили отдельно для периода покоя – спонтанной активности и для периода выполнения двигательных тестов – вызванной активности. Вычислялись средние значения процента спектральной

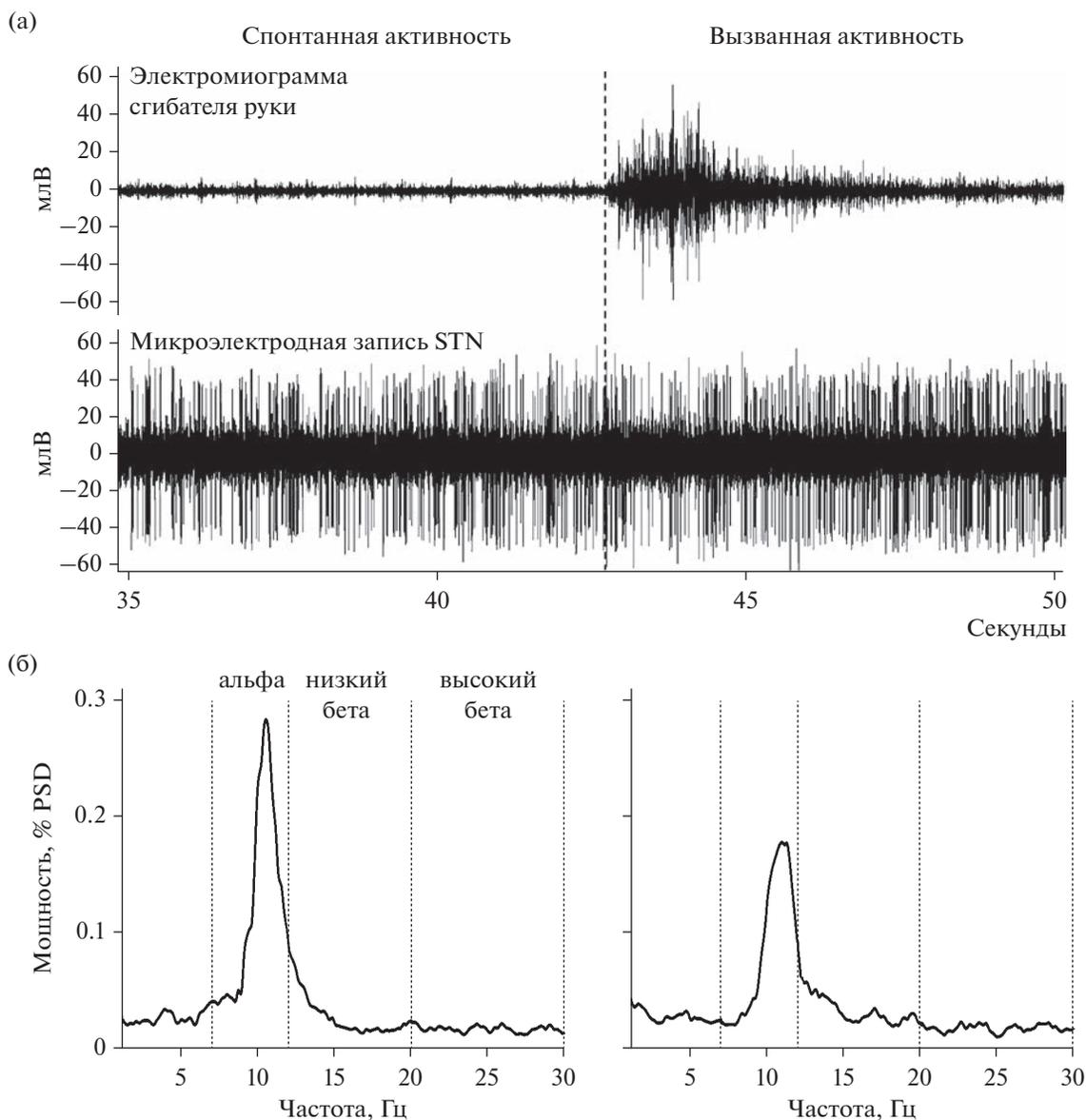


Рис. 1. (а) – Фрагмент записи электромиограммы мышцы сгибателя и нейрограммы при переходе от спонтанной активности к вызванной. (б) – Разделение спектра нейрограммы, взятой по абсолютному значению, на частотные диапазоны: альфа (7–12 Гц), низкий бета (12–20 Гц) и высокий бета (20–30 Гц) отдельно для спонтанной и вызванной активностей.

Fig. 1. (a) – An example of an electromyogram recording of the forearm muscle extensor and a microelectrode neurogram recording, capturing the transition from rest to movement. (б) – Power spectral density plot of a rectified neurogram is divided into alpha (7–12 Hz), low beta (12–20 Hz) and high beta (20–30 Hz) frequency bands.

плотности мощности (%СПМ) спонтанной и вызванной активности в трех частотных диапазонах: альфа (7–12 Гц), низком бета (12–20 Гц) и высоком бета (20–30 Гц) для каждой записи. Затем, для глубин с двигательными тестами вычисляли разности %СПМ между вызванной и спонтанной активностями для каждой глубины в трех частотных диапазонах. В

результатах приведены значения %СПМ, умноженные на 100.

На рис. 1 представлен пример фрагмента записи ритмической нейронной активности субталамического ядра в покое и при выполнении движения, соответствующие им электромиограммы, а также спектры нейрограмм этих временных отрезков. Спектральный

анализ нейронной активности проводился в программе NeuroExplorer (Nex Technologies, USA).

Статистическая обработка

Зависимости значений %СПМ спонтанной активности от значений балла UPDRS-III пациента, а также разностей %СПМ спонтанной и двигательной ритмической активности субталамического ядра от значений брадикинезии контралатеральной стороны были рассчитаны при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена (из-за распределения значений ритмической активности, не соответствующего нормальному).

Чтобы определить, как выполнение движений отражается на ритмической активности СТЯ в различных частотных диапазонах, мы использовали линейные модели со смешанными эффектами. Каждый интересующий нас частотный диапазон (альфа, низкий и высокий бета) анализировался отдельно. Зависимой переменной в моделях был процент спектральной плотности мощности ритмической активности в выбранном диапазоне. В модели был включен один фиксированный эффект – тип активности (спонтанная, то есть в отсутствие движений; и вызванная, то есть привязанная к движению). Для учета фактора влияния индивидуальной изменчивости мы вводили в модель случайный эффект – фактор пациента. Значимость факторов в модели оценивали с помощью метода оценки степеней свободы Саттертуэйта (package lmerTest, function anova) (Kuznetsova et al., 2017). Значения %СПМ были логарифмированы для обеспечения нормального распределения остатков модели. Нормальность распределений проверяли тестом Шапиро–Уилка.

Статистический анализ проводился в программах Statistica 12.0. и R software v 4.1.0, пакет lme4 (Bates et al., 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Всего были выделена и проанализирована 101 нейрограмма субталамического ядра у 9 пациентов с болезнью Паркинсона, которые характеризовались наличием ритмической активности. Эти нейрограммы получены на глубинах внутри моторной зоны 17 полушарий. Координаты установки стимулирующего электрода в исследованных ядрах относительно срединной точки СА-СР в среднем составили

5.66 ± 1.05 мм аксиально; 11.81 ± 1.20 латерально; 2.41 ± 0.79 вертикально. Средняя длина траектории внутри субталамического ядра составила 5.24 ± 0.86 мм. Расстояние от нижней границы ядра (точки установки стимулирующего электрода) до глубин записей, активность в которых включена в анализ, в среднем составило 2.96 ± 1.22 мм. В среднем длина записи спонтанной активности составила 19.0 ± 10.2 с (3.5–52.0). Информация о пациентах, в том числе количество проанализированных записей, приведена в табл. 1.

Корреляция спонтанной активности с выраженностью симптомов паркинсонизма

Медианные значения процента спектральной плотности мощности 101-ой микроэлектродной записи периода покоя (умноженных на 100) с перцентилем 25–75% составили 5.24 (3.49–10.15) для альфа-диапазона, 4.65 (3.20–6.59) для низкой бета-активности и 2.74 (2.00–3.54) для высокой бета-активности.

Непараметрический статистический анализ показал значимую корреляцию между мощностью спонтанной ритмической активностью и показателем двигательных нарушений UPDRS-III для альфа диапазона ($r = 0.343$, $p < 0.001$) и низкого бета диапазона ($r = 0.204$, $p < 0.05$). В высоком бета диапазоне значимой линейной зависимости не наблюдалось ($r = 0.113$, $p > 0.05$) (рис. 2 (а)).

Сравнение активности в покое и при выполнении движений

Из всех нейрограмм, включенных в исследование, в 50 записях помимо периодов спонтанной активности присутствовали также фрагменты записи активности во время выполнения двигательных тестов.

Их расположение относительно точки вживления стимулирующего электрода составляет 3.20 ± 1.29 мм.

Длина записи фоновой нейронной активности в этих записях в среднем составила 18.5 ± 9.3 (от 4.5 до 45.5 с), а длительность выполнения двигательной программы – 16.7 ± 7.2 с (от 7.5 до 41.0 с).

Анализ взаимосвязи между движениями и ритмической активностью с использованием линейных смешанных моделей показал, что спонтанная и вызванная активность значимо отличаются в альфа-диапазоне ($F(1,90) = 6.2164$, $p = 0.01448$). В низком бета-диапа-

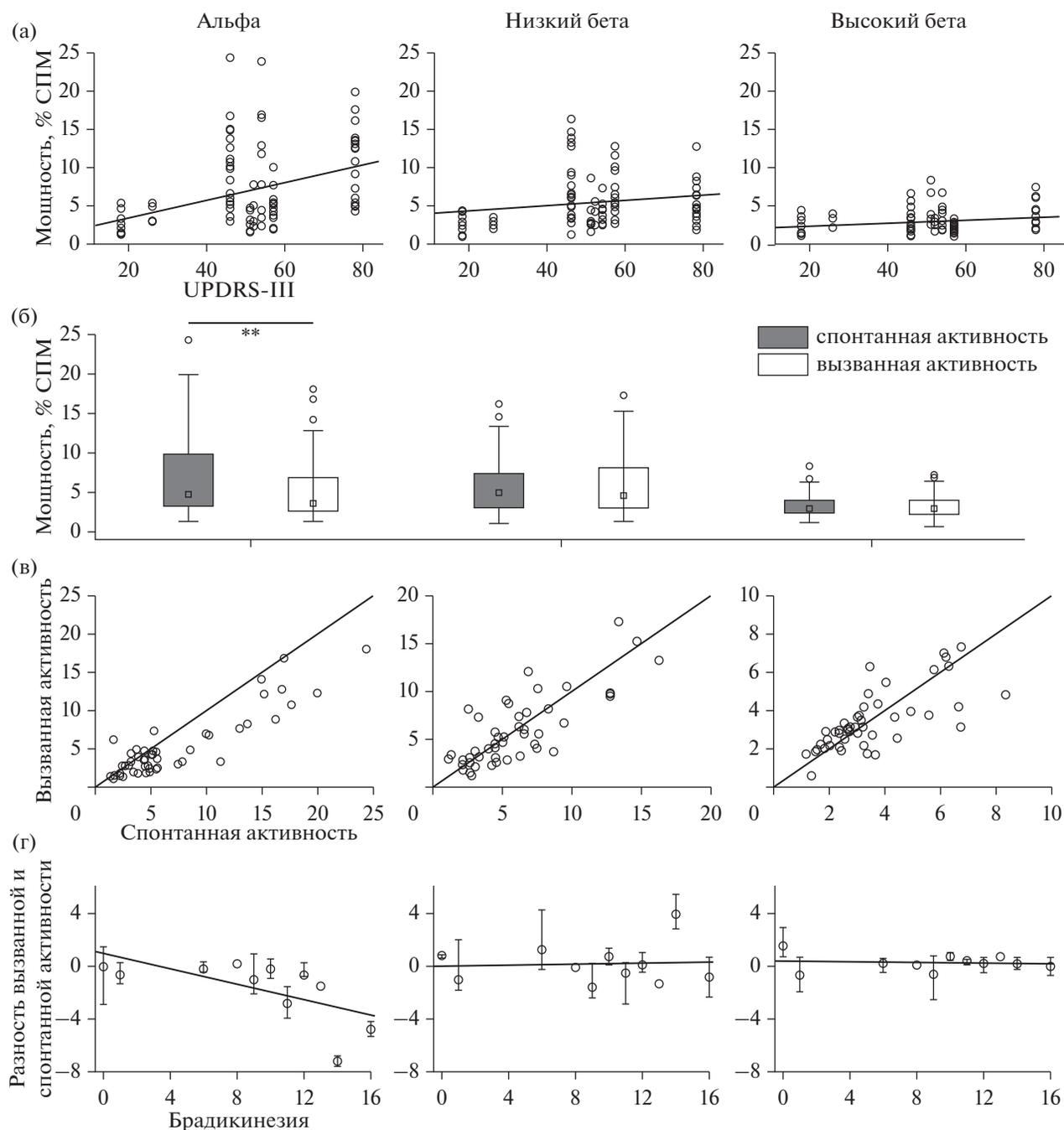


Рис. 2. Для трех частотных диапазонов: альфа, низкий бета и высокий бета (а) – Зависимость мощности нейронной активности СТЯ от выраженности двигательных нарушений. (б) – Сравнение мощности спонтанной и вызванной активности. (в) – Сопоставление мощности спонтанной и вызванной активностей на каждой глубине (значимость различий **, соответствующая $p < 0.01$ приведена для логарифмированных единиц, сами значения %СПМ указаны в исходных величинах). (г) – Зависимость разностей мощности вызванной и спонтанной активности от проявления симптома брадикинезии в контралатеральной руке.

Fig. 2. For three frequency bands: alpha, low beta and high beta (a) – Correlation between STN neuronal activity power and motor impairment severity. (б) – Comparison of rhythmic activity power at rest and during motor tests. (в) – Plot of rhythmic activity power at rest against during motor tests at each recording site (significance level ** corresponding to $p < 0.01$ is given for logarithmic units while %PSD values are in original scales). (г) – Correlation plot showing difference between oscillatory activity power at rest and during motor tests on the y-axis and bradykinesia scores on the x-axis.

зоне значимых различий не было обнаружено ($F(1.90) = 0.0055$, $p = 0.9409$), как и в высоком бета-диапазоне ($F(1.90) = 0.0094$, $p = 0.9231$). Таким образом, медианное значение (с перцентилем 25–75%) %СПМ (умноженное на 100) альфа-активности снижается с 4.79 (3.17–9.89) в покое до 3.68 (2.60–6.92) на интервале выполнения двигательных тестов. Значения в низком бета-диапазоне составили 5.00 (2.99–7.41) для спонтанной активности и 4.63 (2.98–8.18) для вызванной, в высоком бета-диапазоне 3.03 (2.35–4.06) и 2.98 (2.20–3.99), соответственно (рис. 2 (б)). При этом важно отметить, что наибольшая выраженность подавления альфа-активности при выполнении движения наблюдалась на глубинах записи с высокими значениями спонтанной ритмической активности (рис. 2 (в)).

Кроме того, мы показали значимую корреляцию ($r = -0.488$, $p < 0.001$) между значением снижения альфа-ритмов при выполнении движений с выраженностью симптома брадикинезии у исследуемых пациентов (рис. 2 (г)). При этом зависимости подавления низкой ($r = -0.030$, $p > 0.1$) и высокой бета- ($r = -0.052$, $p > 0.1$) активности от клинических показателей не наблюдалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы показали, что ансамблевая ритмическая активность нейронов субталамического ядра пациентов с болезнью Паркинсона характеризуется альфа- и бета-частотными пиками. При этом ритмическая активность в альфа- и низком бета-диапазонах коррелировали с обобщенным показателем двигательных нарушений пациентов, что согласуется с результатами, полученными на уровне локальных потенциалов (Neumann et al., 2016; Belova et al., 2021).

Исследование вызванной активности показало статистически значимое снижение мощности ритмической активности в СТЯ у пациентов с БП при выполнении движений только в альфа-диапазоне. Эти данные находятся в согласии с десинхронизацией альфа-активности в локальных потенциалах субталамического ядра, аналогичной десинхронизации в коре больших полушарий (Oswal et al., 2013). Важно отметить, что как и в работе Алегре (Alegre et al., 2005), такой характер снижения ритмической активности наблюдался у нейронов с высокими значениями спонтанной альфа-активности. В отличие от

авторов, сравнивающих параметры бета-осцилляций (Lofredi et al., 2019), мы не обнаружили статистических изменений мощности в низком (12–20 Гц) и высоком бета- (20–30 Гц) диапазонах при исследовании многократных двигательных тестов.

В наших результатах, полученных при анализе спектральных характеристик множественной нейронной активности, наблюдается сохранение пиков бета-активности в субталамическом ядре во время выполнения движений, описанное также в исследовании осцилляций локальных потенциалов (Neuville et al., 2021). Полученные нами результаты согласуются с данными предшествующих исследований, где было показано, что осцилляции в альфа-диапазоне способны точнее предсказывать момент инициации движения, чем бета-осцилляции (Khawaldeh et al., 2020).

Мы показали, что выраженность подавления альфа-активности при выполнении двигательных тестов значимо коррелирует с выраженностью симптомов брадикинезии, в отличие от подавления “широкого” бета диапазона (12–30 Гц), исследуемого другими авторами (Eisinger et al., 2020). Схожая десинхронизация локальных потенциалов альфа-бета активности (10–20 Гц) во время двигательных тестов была показана в недавнем исследовании субталамического ядра, в котором утверждается, что явление десинхронизации характерно для пациентов с тремор-доминантной формой болезни Паркинсона (Godinho et al., 2021). В отличие от упомянутого выше исследования, наши данные косвенно указывают на то, что подавление ритмической альфа-активности наблюдается и в случае акинетико-ригидных проявлений болезни Паркинсона.

Отсутствие значимых изменений бета-активности при выполнении движений в нашем исследовании может быть обусловлено тем, что мы не учитываем динамические изменения ритмической активности на разных фазах движения, анализируя весь период записи при выполнении двигательных тестов. Ритмическая активность в бета-диапазоне может иметь двухфазную природу изменений внутри этих интервалов, подобно реакциям на движения в коре больших полушарий, а именно снижение активности непосредственно перед движением и увеличение через некоторое время после инициации движения (Alegre et al., 2005). Кроме того, необходимо

учитывать, что в разных участках субталамического ядра реакции на выполнение движения могут различаться. Так, в одном из исследований в дорсо-латеральном отделе после движения наблюдалось увеличение нейронной активности, в то время как в вентро-медиальном отделе такого увеличения не было обнаружено (Marmor et al., 2020). Синхронизация внутри отдельных частотных диапазонов (Geng et al., 2018), а также их когерентность с моторной корой (van Wijk et al., 2022) варьируют в разных зонах внутри субталамического ядра. Несмотря на то, что альфа-ритм считается “биомаркером немоторных отделов” субталамического ядра, в моторном отделе спонтанная альфа-активность также явно выражена (Rappel et al., 2020). Вероятно, более детальное изучение паттернов реакций при выполнении движений требует пространственного анализа ритмических характеристик нейронной активности внутри субталамического ядра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Корреляция амплитуды ритмической активности альфа- и низкого бета-диапазона в субталамическом ядре со степенью выраженности симптомов паркинсонизма указывает на возможную патофизиологическую роль этого диапазона в двигательных нарушениях при БП. Выраженное снижение альфа-активности при многократных двигательных тестах, а также связь амплитуды десинхронизации с выраженностью клинических симптомов указывает, с одной стороны, на вовлечение альфа-активности субталамического ядра в патологию болезни Паркинсона, с другой стороны, свидетельствует о функциональном различии альфа- и бета-ритмических процессов при осуществлении движений в условиях гипокинетических нарушений моторного контроля.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00344).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alegre M., Alonso-Frech F., Rodríguez-Oroz M.C., Guridi J., Zamarbide I., Valencia M., Manrique M., Obeso J.A., Artieda J.* Movement-related changes in oscillatory activity in the human subthalamic nucleus: ipsilateral vs. contralateral movements. *Eur J Neurosci.* 2005. 22 (9): 2315–2324.
- Bate D., Mächler M., Bolker B., Walker S.* Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Soft.* 2015. 67 (1): 1–48.
- Belova E.M., Semenova U., Gamaleya A.A., Tomskiy A.A., Sedov A.* Is there a single beta oscillation band interfering with movement in Parkinson’s disease? *Eur J Neurosci.* 2021. 54 (1): 4381–4391.
- Bichsel O., Gassert R., Stieglitz L., Uhl M., Baumann-Vogel H., Waldvogel D., Baumann C.R., Imbach L.L.* Functionally separated networks for self-paced and externally-cued motor execution in Parkinson’s disease: Evidence from deep brain recordings in humans. *NeuroImage.* 2018. 177: 20–29.
- Drebitz E., Schledde B., Kreiter A.K., Wegener D.* Optimizing the Yield of Multi-Unit Activity by Including the Entire Spiking Activity. *Front Neurosci.* 2019. 13: 83. 745
- Eisinger R.S., Cagle J.N., Opri E., Alcantara J., Cernera S., Foote K.D., Okun M.S., Gunduz A.* Parkinsonian Beta Dynamics during Rest and Movement in the Dorsal Pallidum and Subthalamic Nucleus. 2020. *J. Neurosci.* 40 (14): 2859–2867.
- Feldmann L.K., Lofredi R., Neumann W.-J., Al-Fatly B., Roediger J., Bahners B.H., Nikolov P., Denison T., Saryyeva A., Krauss J.K., Faust K., Florin E., Schnitzler A., Schneider G.-H., Kühn A.A.* Toward therapeutic electrophysiology: beta-band suppression as a biomarker in chronic local field potential recordings. *Npj Park Dis.* 2022. 8 (1): 44.
- Galvan A., Wichmann T.* Pathophysiology of Parkinsonism. *Clin Neurophysiol.* 2008. 119 (7): 1459–1474.
- Geng X., Xu X., Horn A., Li N., Ling Z., Brown P., Wang S.* Intra-operative characterisation of subthalamic oscillations in Parkinson’s disease. *Clin Neurophysiol.* 2018. 129 (5): 1001–1010.
- Godinho F., Fim Neto A., Bianqueti B.L., Luccas J.B., Varjão E., Terzian Filho P.R., Figueiredo E.G., Almeida T.P., Yoneyama T., Takahata A.K., Rocha M.S., Soriano D.C.* Spectral characteristics of subthalamic nucleus local field potentials in Parkinson’s disease: Phenotype and movement matter. *Eur J. Neurosci.* 2021. 53 (8): 2804–2818.
- Hammond C., Bergman H., Brown P.* Pathological synchronization in Parkinson’s disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci.* 2007. 30 (7): 357–364.
- Horn A., Neumann W.-J., Degen K., Schneider G.-H., Kühn A.A.* Toward an electrophysiological “sweet spot” for deep brain stimulation in the subthalamic nucleus. *Hum Brain Mapp.* 2017. 38 (7): 3377–3390.
- Khawaldeh S., Tinkhauser G., Shah S.A., Peterman K., Debove I., Nguyen T.A.K., Nowacki A., Lachenmayer M.L., Schuepbach M., Pollo C., Krack P., Woolrich M., Brown P.* Subthalamic nucleus activity

- dynamics and limb movement prediction in Parkinson's disease. *Brain*. 2020. 143 (2): 582–596.
- Kuhn A.A., Kempf F., Brucke C., Gaynor Doyle L., Martinez-Torres I., Pogosyan A., Trottenberg T., Kupsch A., Schneider G.-H., Hariz M.I., Vandenberghe W., Nuttin B., Brown P.* High-Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus Suppresses Oscillatory Activity in Patients with Parkinson's Disease in Parallel with Improvement in Motor Performance. *J. Neurosci*. 2008. 28 (24): 6165–6173.
- Kühn A.A., Kupsch A., Schneider G.-H., Brown P.* Reduction in subthalamic 8–35 Hz oscillatory activity correlates with clinical improvement in Parkinson's disease: STN activity and motor improvement. *Eur. J. Neurosci*. 2006. 23 (7): 1956–1960.
- Kühn A.A., Trottenberg T., Kivi A., Kupsch A., Schneider G.-H., Brown P.* The relationship between local field potential and neuronal discharge in the subthalamic nucleus of patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2005. 194 (1): 212–220.
- Kühn A.A., Tsui A., Aziz T., Ray N., Brücke C., Kupsch A., Schneider G.-H., Brown P.* Pathological synchronisation in the subthalamic nucleus of patients with Parkinson's disease relates to both bradykinesia and rigidity. *Exp Neurol*. 2009. 215 (2): 380–387.
- Kuznetsova A., Brockhoff P.B., Christensen R.H.B.* lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J Stat Soft*. 2017. 1 (13): 1–26.
- Little S., Pogosyan A., Neal S., Zavala B., Zrinzo L., Hariz M., Foltynie T., Limousin P., Ashkan K., Fitz-Gerald J., Green A.L., Aziz T.Z., Brown P.* Adaptive deep brain stimulation in advanced Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2013. 74 (3): 449–457.
- Lofredi R., Tan H., Neumann W.-J., Yeh C.-H., Schneider G.-H., Kühn A.A., Brown P.* Beta bursts during continuous movements accompany the velocity decrement in Parkinson's disease patients. *Neurobiol Dis*. 2019. 127: 462–471.
- Marmor O., Rappel P., Valsky D., Bick A.S., Arkadir D., Linetsky E., Peled O., Tamir I., Bergman H., Israel Z., Eitan R.* Movement context modulates neuronal activity in motor and limbic-associative domains of the human parkinsonian subthalamic nucleus. *Neurobiol Dis*. 2020. 136: 104716.
- Moran A., Bar-Gad I.* Revealing Neuronal Functional Organization through the Relation between Multi-Scale Oscillatory Extracellular Signals. *J Neurosci Methods*. 2010. 186 (1): 116–129.
- Neumann W.-J., Degen K., Schneider G.-H., Brücke C., Huebl J., Brown P., Kühn A.A.* Subthalamic synchronized oscillatory activity correlates with motor impairment in patients with Parkinson's disease: Correlation of Subthalamic B Oscillations and PD Symptoms. *Mov Disord*. 2016. 31 (11): 1748–1751.
- Neuville R.S., Petrucci M.N., Wilkins K.B., Anderson R.W., Hoffman S.L., Parker J.E., Velisar A., Bronte-Stewart H.M.* Differential Effects of Pathological Beta Burst Dynamics Between Parkinson's Disease Phenotypes Across Different Movements. *Front Neurosci*. 2021. 15: 733203.
- Oswal A., Beudel M., Zrinzo L., Limousin P., Hariz M., Foltynie T., Litvak V., Brown P.* Deep brain stimulation modulates synchrony within spatially and spectrally distinct resting state networks in Parkinson's disease. *Brain*. 2016. 139 (5): 1482–1496.
- Oswal A., Brown P., Litvak V.* Movement related dynamics of subthalamo-cortical alpha connectivity in Parkinson's disease. *NeuroImage*. 2013. 70: 132–142.
- Rappel P., Grosberg S., Arkadir D., Linetsky E., Abu Snineh M., Bick A.S., Tamir I., Valsky D., Marmor O., Abo Foul Y., Peled O., Gilad M., Daudi C., Ben-Naim S., Bergman H., Israel Z., Eitan R.* Theta-alpha Oscillations Characterize Emotional Subregion in the Human Ventral Subthalamic Nucleus. *Mov Disord*. 2020. 35 (2): 337–343.
- Scherer M., Steiner L.A., Kalia S.K., Hodaie M., Kühn A.A., Lozano A.M., Hutchison W.D., Milosevic L.* Single-Neuron Bursts Encode Pathological Oscillations in Subcortical Nuclei of Patients with Parkinson's Disease and Essential Tremor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022. 119 (35).
- Sharott A., Gulberti A., Zittel S., Tudor Jones A.A., Fickel U., Munchau A., Koppen J.A., Gerloff C., Westphal M., Buhmann C., Hamel W., Engel A.K., Moll C.K.E.* Activity Parameters of Subthalamic Nucleus Neurons Selectively Predict Motor Symptom Severity in Parkinson's Disease. *J Neurosci*. 2014. 34 (18): 6273–6285.
- Steiner L.A., Neumann W.-J., Staub-Bartelt F., Herz D.M., Tan H., Pogosyan A., Kuhn A.A., Brown P.* Subthalamic beta dynamics mirror Parkinsonian bradykinesia months after neurostimulator implantation: STN Beta Dynamics Mirror Parkinsonian Bradykinesia. *Mov Disord*. 2017. 32 (8): 1183–1190.
- Tinkhauser G., Pogosyan A., Tan H., Herz D.M., Kühn A.A., Brown P.* Beta burst dynamics in Parkinson's disease OFF and ON dopaminergic medication. *Brain*. 2017a. 140 (11): 2968–2981.
- Tinkhauser G., Pogosyan A., Little S., Beudel M., Herz D.M., Tan H., Brown P.* The modulatory effect of adaptive deep brain stimulation on beta bursts in Parkinson's disease. *Brain*. 2017b. 140 (4): 1053–1067.
- van Wijk B.C.M., Neumann W.-J., Kroneberg D., Horn A., Irmén F., Sander T.H., Wang Q., Litvak V., Kühn A.A.* Functional connectivity maps of theta/alpha and beta coherence within the subthalamic nucleus region. *NeuroImage*. 2022. 257: 119320.

CORRELATION BETWEEN SUBTHALAMIC ALPHA RHYTHMIC ACTIVITY AND MOTOR CONTROL IMPAIRMENT IN PARKINSONIAN PATIENTS

A. A. Nezvinskiy^{a, #}, E. M. Belova^a, K. E. Sayfulina^a, A. A. Gamaleya^b, A. A. Tomskiy^b, and A. S. Sedov^a

^a*Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow, Russia*

^b*Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: nezvinskii@phystech.edu*

Increased oscillatory beta activity in basal ganglia is one of the main electrophysiological biomarkers of impaired motor control in Parkinson's disease. However, the functional role of dynamical rhythmic processes during movements is still not investigated in detail. We used microelectrode recordings to investigate the subthalamic nucleus neuronal activity in 9 patients with Parkinson's disease during deep brain stimulation surgery. We have shown that the amplitude of the subthalamic nucleus alpha (7–12 Hz) and low-beta (12–20 Hz) activity correlated with motor impairment indices in patients with Parkinson's disease. Also, we have shown that, in contrast to beta rhythmic activity, the magnitude of alpha activity decreased significantly during motor tests execution. Moreover, the degree of rhythmic activity suppression in the alpha band correlated with the severity of bradykinesia. These results allow us to suppose that, along with beta activities, subthalamic nucleus neuronal alpha activity also participate in motor control of Parkinson's disease patients.

Keywords: neuronal oscillations, bradykinesia, microelectrode recordings, subthalamic nucleus, Parkinson's disease

**ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ (КОГНИТИВНОЙ)
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА**

УДК 612.821

**ВЫЗВАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА НА ВЫКЛЮЧЕНИЕ
ЗВУКА В УСЛОВИЯХ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ МАСКИРОВКИ**

© 2023 г. Е. А. Петропавловская¹*, Л. Б. Шестопалова¹, Д. А. Саликова¹, В. В. Семенова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: petropavlovskaiiae@infran.ru

Поступила в редакцию 28.12.2022 г.

После доработки 01.07.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Было исследовано влияние взаимного расположения звукового стимула и фонового маскира на компоненты вызванных потенциалов (ВП) мозга человека в ответ на выключение звука. Звуковые стимулы предъявлялись дихотически, положение звуковых образов задавалось при помощи межшумных различий по интенсивности. Тестовый сигнал и маскир были расположены в одной точке пространства либо были разнесены на расчетное угловое расстояние 90 или 180 град. При совпадении положения сигнала и маскира выявлено значимое снижение амплитуды и увеличение латентности компонентов N1, P2 и N2 ответов на выключение. При удалении сигнала от маскира наблюдалось увеличение амплитуды почти до уровня ответа на сигнал в тишине и уменьшение латентности всех компонентов отклика, что, предположительно, свидетельствует об успешном выделении стимула из фона.

Ключевые слова: ЭЭГ, вызванные потенциалы, выключение звука, локализация звука, маскировка

DOI: 10.31857/S0044467723060072, **EDN:** IDMINQ

Большинство исследований слуховой системы анализируют свойства нейронных или суммарных ответов на включение звука и игнорируют ответы на их окончание. Это обусловлено рядом акустических, перцептивных и нейробиологических причин. Акустически окончания естественных звуков часто бывают более размытыми, чем начала, также они сильнее искажаются реверберацией, особенно в замкнутых пространствах (Traer, McDermott, 2016). Неудивительно, что, с точки зрения восприятия, окончания звуковых сигналов также менее заметны, чем их начала (Phillips et al., 2002). Тем не менее окончания звуков играют важную роль в восприятии речи и в анализе слуховых сцен, выступая в качестве одного из значимых признаков для перцептивной группировки (Szabo et al, 2016). С точки зрения физики и физиологии в момент включения начинается воздействие энергии внешнего источника на нейроны-рецепторы, которое ведет к изменениям мембранного потенциала и генерации потенциалов действия. В момент выключения воздействие энергии

внешнего стимула на рецепторы прекращается, что, в свою очередь, требует принципиально иных механизмов генерации ответа на это событие. Предполагается, что ответы на начало и окончание звуковых стимулов являются нейронными репрезентациями изменений сигнала во времени (Kopp-Scheinflug et al., 2011, 2018).

Ответы на выключение звука можно выделить в электрической активности мозга на всех уровнях слуховой системы, хотя они обычно менее выражены, чем ответы на включение (Abeles, Goldstein, 1972; He et al., 1997; Recanzone, 2000; Phillips et al., 2002). Основной темой большинства исследований ответов на выключение является их сходство и различие с ответами на начало стимула. Активно обсуждается, формируются ли эти два типа реакций за счет одних и тех же нейронных популяций и механизмов обработки информации, или за счет разных. Существующие данные об ответах на выключение в центральном слуховом пути предполагают, что они в основном генерируются в дорсальном

кохлеарном и верхнем параоливарном ядрах (Recanzone, 2000; Phillips et al., 2002). В задних холмах и внутреннем колечном теле ответы на выключение звука могут быть как унаследованы от ствола головного мозга, так и сформированы заново, или иметь смешанное происхождение. В коре головного мозга ответы на выключение звука, по-видимому, наследуются из нижележащих структур (обзор Kopp-Scheinpflug et al., 2018). Исследования на животных показывают, что в коре меньше нейронов, отвечающих на выключение, чем на включение; при этом нейронам, отвечающим на выключение, менее свойственна тонотопическая организация. Тем самым подтверждается предположение о том, что за реакции на включение и выключение могут быть ответственны отчасти различные популяции нейронов с различными функциональными свойствами (Abeles, Goldstein, 1972; He et al., 1997; Recanzone, 2000; Phillips et al., 2002). С другой стороны, в коре есть некоторая доля нейронов, реагирующих как на включение, так и на выключение (Volkov, Galazjuk, 1991). Это соответствует представлениям о том, что связанные с началом и концом звучания слуховые вызванные потенциалы (ВП) имеют общие компоненты и (по крайней мере, частично) отражают одну и ту же базовую обработку информации (Qin et al., 2007). Было высказано предположение, что различным ответам соответствуют различные наборы синаптических входов (Scholl et al., 2010).

Механизмы генерации ответов на выключение звука особенно чувствительны к поддержанию равновесия между процессами возбуждения и торможения на клеточном уровне. С нарушениями этого равновесия связывают трудности с обнаружением пауз в звуковом сигнале (Schneider et al., 1994; Snell, Frisina, 2000) и различением речи в шуме (Gordon-Salant, Fitzgibbons, 1993), возникающие при старении и заболеваниях центральной нервной системы, даже когда пороги слуха нормальны. Интересно, что компоненты слуховых ВП на выключение шумовых и окончание речевых стимулов значительно слабее и более замедлены у пожилых людей, чем у молодых (Harris et al., 2012; Skoe et al., 2015). Хотя необходимо отметить, что связанные с началом звучания компоненты ВП также подвержены влиянию старения (Irsik et al., 2021).

На уровне суммарной электрической активности, регистрируемой со скальпа, вы-

ключение звука вызывает колебания электроэнцефалограммы (ЭЭГ), по форме и латентности сходные с теми, которые вызывает включение звука. Амплитуды ВП на включение и выключение сходным образом зависят от крутизны фронтов нарастания и спада стимула, а также от его длительности и от межстимульного интервала. При уменьшении длительности стимула до 1 с и менее, ВП на выключение уменьшается вплоть до полного исчезновения (Davis, Zerlin, 1966). Аналогично, при уменьшении межстимульного интервала до 1 секунды и менее, ВП на включение второго стимула оказывается угнетен (при условии, что первый стимул имел достаточную длительность для формирования ВП на выключение), из чего делается вывод, что эти два ответа не являются полностью независимыми, а их генераторы как минимум частично перекрываются (Hillyard, Picton, 1978). Записи МЭГ также свидетельствуют, что компоненты N1 и P2 ответов на начало и конец звучания происходят из перекрывающихся источников (Hari et al., 1987; Pantev et al., 1996; Yamashiro et al., 2011). С другой стороны, имеются данные о достоверно различном (хотя и близком) расположении генераторов магнитных ответов на включение и выключение (Noda et al., 1998).

Изменения ВП на окончание звука исследуют также в связи с привлечением внимания к длительности стимулов (Horváth, 2016) и с процессами обнаружения сигнала в шуме (Baltzell, Billings, 2014). Предположительно, выключение стимула может способствовать выделению сигнала на фоне маскира, выступая в качестве признака перцептивной группировки (Grose et al., 2009; Mlynarsky, McDermott, 2019). Психофизические исследования с речевыми стимулами свидетельствуют, что, помимо влияния соотношения сигнал/шум (signal-to-noise ratio, SNR), значимым признаком является также абсолютный уровень сигнала, даже в присутствии фонового шума (Dirks et al., 1982; Studebaker et al., 1999; Hornsby et al., 2005). В исследовании (Baltzell, Billings, 2014) было проведено сравнение зависимости слуховых ВП здоровых испытуемых в реакции на включение и выключение тонального стимула в тишине и на фоне длящегося шума, а также зависимость этих ВП от соотношения сигнал/шум. Ранее было показано, что увеличение уровня сигнала в тишине приводит к уменьшению латентности и увеличению амплитуды ВП на вклю-

чение (Billings et al., 2007). На фоне маскера амплитуда и латентность ВП на включение зависели только от соотношения сигнал/шум, а зависимость от абсолютного уровня сигнала терялась. Вызванные потенциалы на выключение продемонстрировали те же зависимости от уровня сигнала в тишине и изменений SNR, как и ВП на включение, и в дополнение к ним — чувствительность к изменениям уровня сигнала в шуме. Это сходство может свидетельствовать о том, что выключение сигнала может быть использовано слуховой системой для выделения сигнала из шума, наряду с другими признаками (Billings et al., 2009).

В литературе, посвященной помехоустойчивости слуховой системы, широко обсуждается феномен бинаурального освобождения от маскировки, также известный как “эффект вечеринки” (cocktail-party effect), или пространственное освобождение от маскировки. Пороги обнаружения тестового сигнала на фоне маскера понижаются при разнесении в пространстве реальных источников звука (в условиях свободного звукового поля) или при введении в звуковые стимулы междушумных различий по времени или интенсивности (в условиях дихотической стимуляции) (Litovsky, 2012). Обзор литературы о влиянии положения звуковых стимулов на ВП на включение приведен в статьях Шестопаловой и др. (2022, 2023). В присутствии маскера общей тенденцией является уменьшение амплитуды и увеличение латентности всех компонентов слуховых ВП. При введении междушумных или реальных пространственных различий между сигналом и маскером наблюдается тенденция к увеличению амплитуды ВП и уменьшению латентности. Степень влияния маскировки и пространственных признаков на отдельные компоненты ответа варьирует в зависимости от характера стимулов (шумовые, тональные или речевые), направленности внимания и задания, которое выполнял испытуемый. При дихотическом предъявлении шумовых сигналов, пространственное положение которых задавалось посредством междушумных различий по интенсивности, было показано, что при совпадении положения сигнала и маскера амплитуда компонентов N1 и P2 ответа на включение заметно снижалась, а латентность увеличивалась. При увеличении расчетного углового расстояния между ними до 90 градусов амплитуда этих компонентов росла, а латентность уменьшалась, что рассматривается

как проявление пространственного освобождения от маскировки (Шестопалова и др., 2022). Влияние пространственных характеристик стимулов на ответы на выключение звука не исследовано.

Психофизические исследования локализации звуковых стимулов показывают, что при анализе пространственных признаков слуховой системе свойственна значительная инерционность. По разным данным, временное окно интеграции пространственной информации может составлять от 40 до 300 мс (Carlile, Leung, 2016; Семенова и др., 2022). При локализации движущихся стимулов инерционность проявляется в том числе в смещении воспринимаемого положения начальной точки траектории в направлении движения. При совпадении во времени начала движения с включением сигнала начальная часть траектории не воспринимается (Петропавловская и др., 2010). В то же время локализация конечных точек траекторий оказывается более надежной, так как после накопления необходимого количества информации об изменении положения стимула вступают в действие предсказательные механизмы, компенсирующие действие инерционности (Петропавловская и др., 2011). Исходя из этого можно предположить, что при достаточном времени звучания ВП на выключение звукового стимула могут оказаться чувствительны к его пространственным признакам и устойчивы к воздействию маскировки.

Настоящая публикация является частью комплексного исследования пространственной маскировки, включающего анализ ВП на три типа событий (начало звучания, начало движения звукового образа и конец звучания), а также поведенческие ответы. В данной работе проведен анализ ВП на выключение звуковых стимулов, полученных в тех же условиях и на тех же испытуемых, что и анализ ответов на включение звука в упомянутой выше работе Шестопаловой и др. (2022). Топография ответов на все три типа событий проанализирована в следующей работе (Шестопалова и др., 2023).

Таким образом, цели настоящего исследования состояли в следующем: 1) изучить влияние взаимного расположения звукового стимула и маскера на ВП, вызванные выключением звука; 2) определить, какие компоненты ВП в наибольшей степени отражают пространственное освобождение от маскировки.

МЕТОДИКА

Условия эксперимента и испытуемые. В экспериментах приняли участие 18 праворуких испытуемых (6 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст 27.8 ± 1.4 лет), с нормальным слухом. Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены Комиссией по этике ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Протокол № 22-02). Каждый участник исследования предоставил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования. Во время регистрации ЭЭГ испытуемые располагались в кресле внутри экранированной звукоизолированной камеры и во время звуковой стимуляции читали книгу по своему выбору. Звуковые сигналы предъявлялись испытуемым дихотическим способом. Дополнительные сведения о методике можно получить в предыдущих работах этого цикла (Шестопалова и др., 2022, 2023). Ниже приводятся сведения и детали, необходимые для понимания анализа реакций на выключение сигнала.

Все испытуемые до начала опытов проходили стандартную процедуру аудиометрии на частотах от 125 до 8000 Гц. Отклонения пороговых величин от нормального уровня слуха, а также разница между порогами, измеренными для правого и левого уха, не превышали 10 дБ. Полная программа эксперимента для каждого испытуемого распределялась на три дня с интервалом 1–2 нед. В начале каждого экспериментального дня у каждого испытуемого определяли пороги слышимости шумовых сигналов для правого и левого уха. Относительно этих индивидуальных порогов выставляли одинаковую интенсивность звука в правом и левом каналах и получали ответы испытуемого о воспринимаемом положении звукового образа. При необходимости проводилась коррекция интенсивности на одном из каналов таким образом, чтобы звуковой образ располагался ровно по средней линии головы. Далее интенсивность всех звуковых стимулов выставлялась относительно этих скорректированных значений.

Стимулы. Исходными сигналами служили два отрезка белого шума, синтезированные с частотой дискретизации 96 кГц и фильтрованные в полосе 200–10000 Гц. Сигналы преобразовывались в аналоговую форму при помощи многоканальной аудиоплаты Gina24 (Echo Audio, США) и предъявлялись дихотически с помощью звукоизлучателей Etymotic ER-2 (Etymotic Research Inc., США).

Шумовые посылки, используемые в дальнейшем для создания тестового и маскирующего стимулов (сигнала и маскира соответственно), были синтезированы цифровым способом независимо из исходных сигналов, что обеспечивало отсутствие корреляции между сигналом и маскиром. Пространственное положение всех стимулов задавалось величиной межшумных различий по интенсивности (ΔI) между бинаурально предъявляемыми сигналами. Межшумные различия по интенсивности создавались одновременным увеличением интенсивности звука с одной стороны и уменьшением с другой на одинаковые величины, что позволяет при дихотическом предъявлении создать ощущение смещения звукового образа без изменения его громкости.

Длительность маскира составляла 9070 мс. Фронты длительностью 10 мс, сглаженные косинусоидальной функцией, были наложены в начале и в конце маскира, а также в начале и в конце каждого из тестовых сигналов. Здесь и далее длительность сигналов приводится без учета фронтов. В эксперименте использовались три типа маскиров, различавшихся только пространственным положением и условно обозначенных как левый, центральный и правый. Центральным маскиром служил стимул с $\Delta I = 0$ дБ, вызывающий ощущение неподвижного звукового образа около средней линии головы. Левым и правым маскирами служили стимулы с $\Delta I = -10$ и $+10$ дБ соответственно, вызывающие ощущение неподвижного звукового образа, расположенного вблизи левого или правого уха. Данное положение звукового образа соответствовало расчетному угловому смещению на ± 90 град. Согласно литературным данным, полная латерализация звукового образа может наступать в диапазоне значений ΔI от 6 до 20 дБ (Dingle et al., 2012; Ozmeral et al., 2019). Следует подчеркнуть, что в данной работе воспринимаемые угловые расстояния не рассматриваются, поэтому угловые величины в градусах, приве-

денные здесь и далее, нужно рассматривать как категориальную меру.

Полная длительность тестового сигнала составляла 2000 мс. Каждый тестовый сигнал состоял из трех фрагментов, следующих друг за другом без паузы: 1) начального участка длительностью 1000 мс с постоянной величиной ΔI , равной 0 или ± 10 дБ; 2) участка с линейным изменением ΔI (от 0 до ± 10 дБ и от ± 10 до 0 дБ, итого 4 вида сигналов) длительностью 200 или 400 мс; 3) конечного участка длительностью 800 или 600 мс соответственно, с постоянной конечной величиной ΔI , равной ± 10 или 0 дБ. В представленной работе анализируются только вызванные реакции на выключение последнего фрагмента тестового сигнала; первые два фрагмента использовались для других задач. В дальнейшем изложении понятие “неподвижный тестовый сигнал/стимул” будет относиться именно к его конечному участку. На конечном участке сигнала постоянная величина ΔI принимала значения 0, +10 или -10 дБ в разных стимулах. Эти участки тестовых стимулов также вызывали ощущение неподвижного звукового образа, расположенного либо у средней линии головы, либо вблизи левого или правого уха.

Каждая проба в серии имела общую длительность 10 с и содержала трехкратное повторение тестового сигнала в тишине или на фоне одного из маскеров (центрального, у левого или у правого уха). Тестовые стимулы предъявлялись с интервалом 770 мс от конца одного стимула до начала следующего. В пробах с маскером начало первого тестового сигнала было отставлено от начала маскера на 770 мс, что позволяло отделить реакцию на включение сигнала от реакции на включение маскера. После третьего повторения тестового сигнала следовала пауза 760 мс, так что реакции на выключение сигнала и маскера были также разнесены во времени. При предъявлении тестовых стимулов в тишине (без маскера) интервалы между стимулами были точно такими же, как в условиях маскировки.

Интенсивность тестовых сигналов устанавливали на уровне 45 дБ над порогом слышимости каждого из ушей, интенсивность маскера – на уровне 50 дБ. Предъявление сигнала на фоне маскера приводило к увеличению общей интенсивности этого участка стимула на 6 дБ по сравнению с предъявлением только маскера. Таким образом, при одновременном дихотическом предъявлении об-

щая интенсивность маскера и сигнала была около 56 дБ.

Процедура эксперимента. Левый, центральный и правый маскеры предъявлялись в разных сериях. Продолжительность одной серии составляла около 8 мин. Серии с каждым положением маскера предъявлялись каждому испытуемому по 4 раза и чередовались в случайном порядке в разные дни. Между сериями делались перерывы на отдых по 3–5 мин (или дольше по просьбе испытуемого). Тестовые сигналы в каждой экспериментальной серии могли предъявляться в тишине (4 типа стимула \times 3 пробы \times 3 повтора в пробе) или на фоне маскера (4 типа стимула \times 8 проб \times 3 повтора в пробе) и тоже чередовались в случайном порядке. Таким образом, каждый тип стимула в тишине и на фоне каждого маскера предъявлялся каждому испытуемому по 96 раз. Угловое расстояние между тестовым сигналом и маскером определялось разницей величин ΔI между ними и в момент окончания стимула могло равняться 0, 90 или 180 град (следует напомнить, что приведенные угловые величины нужно рассматривать как категориальную меру).

Регистрация и обработка ЭЭГ. Регистрацию ЭЭГ осуществляли при помощи энцефалографа ActiveTwo (BIOSEMI, Голландия) и 32 хлорсеребряных электродов, расположенных в соответствии с международной системой 10–20, с заменой точек отведения РОЗ/РО4 на С5/С6. Дополнительные электроды располагали на мочках ушей, над правым глазом и под левым глазом, ближе к их внешнему краю. ЭЭГ оцифровывалась в полосе 0–102 Гц с частотой дискретизации 2048 Гц с последующим понижением до частоты 512 Гц и записывалась на жесткий диск компьютера. Дальнейшая обработка проводилась по окончании опыта. Непрерывную запись ЭЭГ разбивали на эпохи длительностью 10000 мс. В среднем около 2% эпох содержали нестереотипные артефакты, их удаляли вручную при предварительном просмотре. В каждом отведении проводили коррекцию базовой линии относительно усредненного потенциала всех электродов, и фильтровали в диапазоне 0.5–45 Гц. Артефакты, связанные с движениями глаз, мышечной активностью и нарушениями контакта, удаляли при помощи метода независимых компонент (ICA) средствами EEGLab (Delorme et al., 2007). Затем ЭЭГ восстанавливали, в качестве референса принимали усредненный потенциал электро-

дов на мочках ушей и проводили коррекцию базовой линии по предстимульному участку длительностью 930 мс перед началом маскера.

Для получения ВП ЭЭГ дополнительно фильтровали в полосе 2–30 Гц. Записи ЭЭГ в каждом из 32 каналов усредняли отдельно по всем типам стимулов для каждого испытуемого. В пределах каждой эпохи выделяли участки реакции на каждое из трех повторений тестового сигнала, содержавшие ответы на три типа слуховых событий – включение стимула, начало движения, выключение стимула. В данной работе приводятся результаты анализа только ВП на выключение. Для анализа эффектов пространственного положения маскера и сигнала индивидуальные записи ЭЭГ усредняли по группе 24 электродов (Fz, Cz, Fp1, AF3, F3, F7, FC1, FC5, C3, C5, T7, CP1, CP5, Fp2, AF4, F4, F8, FC2, FC6, C4, C6, T8, CP2 и CP6). Данная область интереса была выбрана по результатам визуального анализа топограмм ответов и с учетом предыдущих работ, в которых исследовались ВП на шумовые стимулы, различающиеся пространственными характеристиками (Шестопалова и др., 2022, 2023). Для получения гранд-усредненных потенциалов проводили усреднение по группе в целом ($n = 18$). В реакции на выключение тестового сигнала измеряли индивидуальные пиковые латентности и средние амплитуды компонентов N1, P2 и N2 в окне шириной 50 мс, центрированном на соответствующем пике гранд-усредненного потенциала. Точность автоматического определения латентности индивидуальных пиков контролировалась визуально, и в случае необходимости проводилась коррекция (от 3 до 18% случаев для разных компонентов и разных условий). Скорректированные величины не выходили за пределы удвоенной ширины окна.

Анализ данных. Измеренные величины подвергали предварительному 5-факторному дисперсионному анализу (repeated measures ANOVA, rmANOVA) с факторами Условие (в тишине, с маскером), Положение маскера в серии (левый, центральный, правый), Длительность участка движения (200, 400 мс), Направление движения стимула (слева к центру, справа к центру, от центра влево, от центра вправо), Положение стимула в эпохе (первый, второй, третий). По результатам дисперсионного анализа и попарных сравнений были выделены факторы, не влиявшие на амплитуду и латентность ответа на выключе-

ние, и проведено усреднение ВП между соответствующими условиями. В частности, были усреднены: 1) реакции на каждое из трех повторений тестового сигнала внутри эпохи; 2) реакции на сигналы, различавшиеся длительностью второго фрагмента (изменения ΔI в течение 200 или 400 мс); 3) реакции на одинаковые стимулы в тишине, предъявлявшиеся в качестве контроля в сериях с разным положением маскера; 4) ответы на стимулы, двигавшиеся справа и слева к центру, поскольку исследуемые в данной работе эффекты относились именно к последнему (конечному) фрагменту сигнала, и значимых различий в их характеристиках выявлено не было. В результате были получены выборки участков ЭЭГ, содержавших ВП на выключение сигнала в центре (394 ± 25 предъявлений), слева и справа (по 197 ± 12 повторений), при звучании в тишине либо на фоне левого, центрального или правого маскера. У полученных таким образом усредненных ВП снова измеряли индивидуальные пиковые латентности и средние амплитуды компонентов N1, P2 и N2 в окне шириной 50 мс, центрированном на соответствующем пике гранд-усредненного потенциала.

Измеренные величины подвергали 2-факторному дисперсионному анализу (repeated measures ANOVA, rmANOVA) с факторами Маскер (без маскера, левый, центральный, правый) и Сигнал (левый, центральный, правый). При отклонении данных от сферичности применяли поправку к степеням свободы Гринхауза–Гайссера. При проведении множественных сравнений применяли поправку Бонферрони. Все сравнения проводили с уровнем значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВП на выключение тестового сигнала в условиях маскировки. Пример ВП на все три слуховых события (включение, начало изменения ΔI и выключение), имевших место в течение звукового стимула при его предъявлении в тишине, приведен на рис. 1. Вызванные потенциалы на выключение тестовых сигналов, предъявленных в тишине или при разных положениях маскера, приведены на рис. 2.

Дисперсионный анализ (rmANOVA) средних амплитуд компонентов N1, P2 и N2 (Маскер (без маскера, левый, центральный, правый) \times Сигнал (левый, центральный, правый)) выявил для всех трех компонентов ВП

высокую значимость главного эффекта Маскера (N1: $F(2.06, 35.00) = 7.63, \eta^2 = 0.31, p < 0.01$; P2: $F(2.09, 35.55) = 27.17, \eta^2 = 0.62, p < 0.001$; N2: $F(2.00, 33.94) = 22.64, \eta^2 = 0.57, p < 0.001$). Для всех трех компонентов главный эффект Маскера связан с тем, что амплитуда компонентов при маскировке была меньше, чем в тишине. Главный эффект Сигнала был значимым только для амплитуды N2 ($F(2.0, 34.00) = 4.67, \eta^2 = 0.22, p < 0.05$), при отсутствии значимого взаимодействия со вторым фактором ($p > 0.05$). Согласно попарным сравнениям, этот эффект был связан с большей амплитудой N2 в реакции на правосторонний сигнал, чем на левосторонний ($p < 0.05$). Взаимодействие Маскер \times Сигнал было значимо для амплитуд N1 и P2 (N1: $F(3.55, 60.27) = 16.03, \eta^2 = 0.49, p < 0.001$; P2: $F(3.10, 52.77) = 3.41, \eta^2 = 0.17, p < 0.05$). Результаты попарных сравнений *gmANOVA* показаны видом штриховки линий на рис. 3: сплошные линии указывают на достоверные различия ($p < 0.05$) в степени маскировки между соседними величинами угловых расстояний сигнала и маскера, а пунктирные отрезки соответствуют отсутствию достоверных различий ($p > 0.05$). Самое сильное подавление ВП наблюдалось в тех пространственных комбинациях, в которых междушумные различия ΔI в маскере и сигнале совпадали, т.е. при нулевом угловом разнесении маскера и сигнала. Освобождение от маскировки проявлялось как рост амплитуды ВП при увеличении углового расстояния между маскером и сигналом от 0 до 90 град. Оно достигало уровня достоверности только для волны N1 ($p < 0.05$). Дальнейшее увеличение углового расстояния (с 90 до 180 град) не приводило к изменениям величины какого-либо из компонентов ВП ($p > 0.05$), за исключением амплитуды компонента N1 при ощущении сигнала справа. Попарные сравнения амплитуды компонента N1 ответов на сигналы в тишине и при разнесении с маскером на 90 и 180 градусов значимых различий не выявили ($p > 0.05$), то есть его амплитуда восстанавливалась до исходного уровня (под исходным уровнем мы имеем в виду ответ на тестовый сигнал в тишине). Однако амплитуда компонентов P2 и N2 в присутствии маскера все еще была достоверно ниже, чем в тишине ($p < 0.05$), при увеличении расчетного углового расстояния между сигналом и маскером до 90 град, и даже до 180 град, когда сигнал располагался слева, а маскер справа (в обратной комбинации различия были недостоверны).

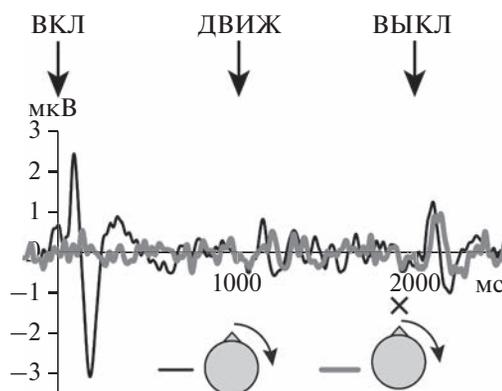


Рис. 1. Пример ВП на включение (ВКЛ), начало движения (ДВИЖ) и выключение (ВЫКЛ) тестового сигнала, двигавшегося от центра вправо, предъявленного в тишине (тонкая черная линия) или на фоне центрального маскера (толстая серая линия). Стрелки около схемы головы соответствуют расчетной траектории движения тестового сигнала, а крестик – положению маскера. Стрелки над графиком показывают моменты наступления соответствующих слуховых событий.

Fig. 1. An example of auditory event related potentials (ERPs) evoked by sound onset (ВКЛ), motion onset (ДВИЖ) and sound offset (ВЫКЛ). Test signal moving from the center to the right was presented in silence (thin black line) or against the background of the central masker (thick gray line). The arrows near the head scheme correspond to the calculated trajectory of the test signal, and the cross indicates the position of the masker. Arrows at the top show the moments of the corresponding auditory events.

Аналогичный анализ пиковых латентностей N1, P2 и N2 выявил для всех трех компонентов высокую значимость главного эффекта Маскера (N1: $F(2.12, 36.12) = 96.23, \eta^2 = 0.85, p < 0.001$; P2: $F(2.20, 37.39) = 37.34, \eta^2 = 0.69, p < 0.001$; N2: $F(2.13, 36.12) = 6.13, \eta^2 = 0.27, p < 0.01$). Главный эффект Сигнала был значимым только для латентности N1 ($F(1.64, 27.86) = 10.67, \eta^2 = 0.39, p < 0.001$). Взаимодействие Маскер*Сигнал было значимо для латентностей всех трех компонентов (N1: $F(2.78, 47.33) = 96.89, \eta^2 = 0.85$; P2: $F(3.77, 64.13) = 22.22, \eta^2 = 0.57$; N2: $F(4.24, 72.01) = 13.65, \eta^2 = 0.45, p < 0.001$ для всех). Согласно попарным сравнениям, эффект маскировки при совпадающем положении маскера и сигнала состоял в значимом росте латентностей для всех сигналов и для всех компонентов ВП ($p < 0.05$), кроме волны N2 в реакции на центральный сигнал ($p > 0.05$) (рис. 2 и 3). Освобождение от маскировки при разнесении сигнала и маскера на 90 град приводило к уменьшению ла-

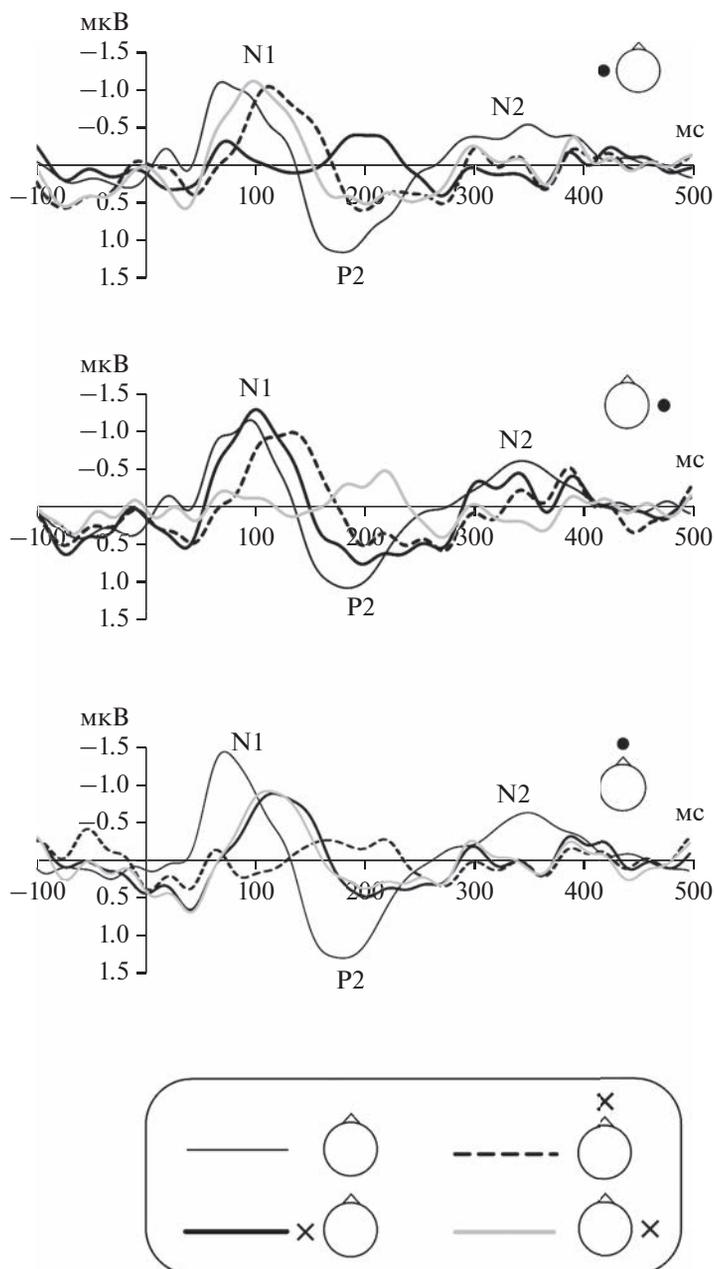


Рис. 2. Вызванные потенциалы на выключение тестового сигнала, предъявленного в тишине или на фоне маскира разной локализации. Кружки около схемы головы демонстрируют положение тестового сигнала в момент выключения, а крестики – положение маскира. На всех графиках тонкая черная линия – сигнал без маскира, толстая черная линия – маскир у левого уха, пунктирная черная линия – маскир по центру головы, толстая серая линия – маскир у правого уха.

Fig. 2. ERPs to the sound offset in silence or in the presence of a masker of different locations. The circles near the head scheme show the offset position of the test signal and the crosses show the position of the background masker. In all panels, thin black line corresponds to the signal presented in silence, thick black line – to the masker at the left ear, dotted black line – to the masker near the center, thick gray line – to the masker at the right ear.

тентности, наиболее выраженному для компонента N1. В отличие от амплитуд, латентности N1 и P2 продолжали сокращаться при дальнейшем увеличении углового расстояния с 90 до 180 град ($p < 0.05$, за исключением волны P2 в реакции на левосторонний сигнал).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

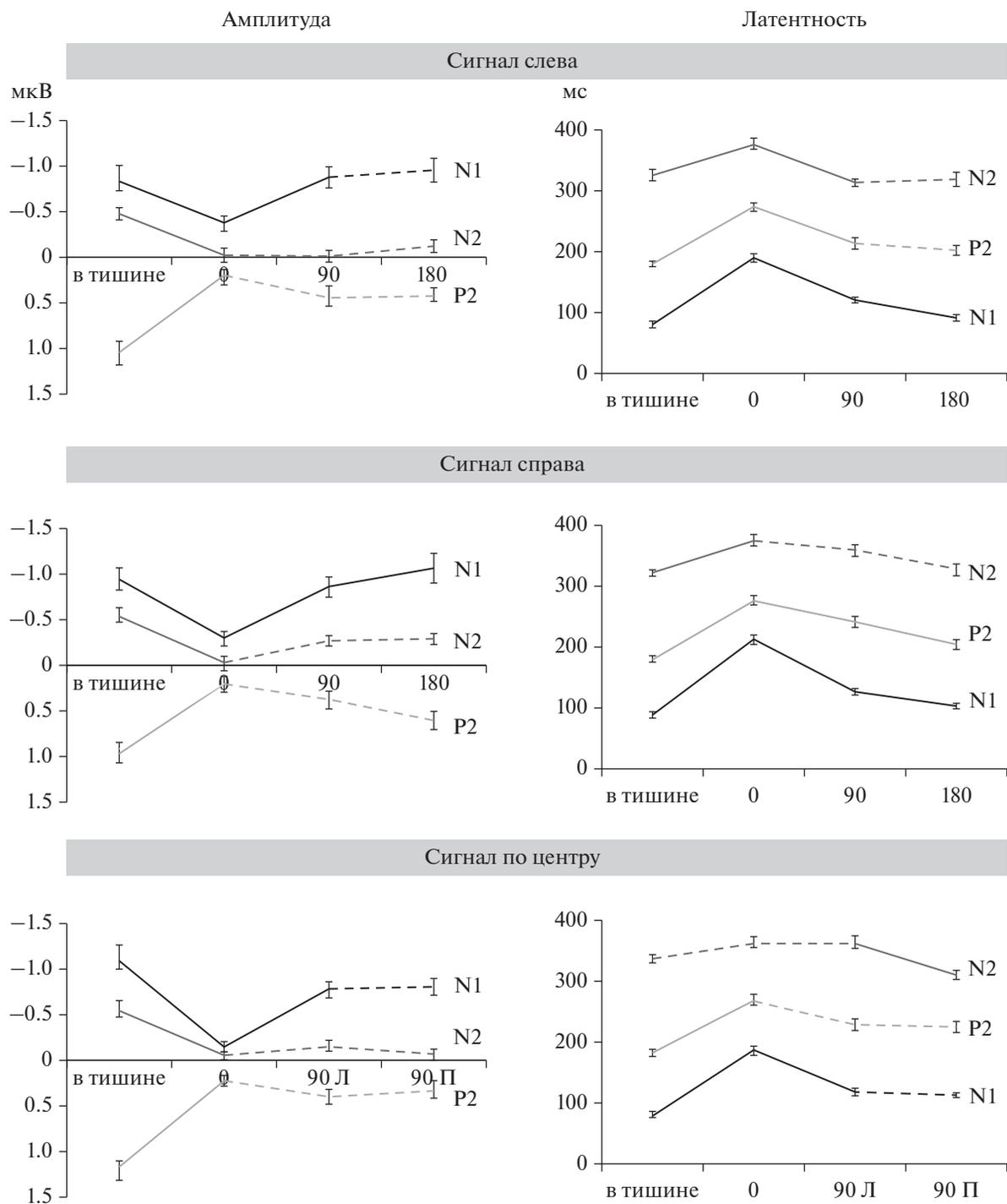
На рис. 1 можно видеть, что в тишине ВП на выключение сигналов имели значительно меньшую амплитуду, чем ответы на включение, при сохранении латентности исследуемых компонентов. В работе Шестопаловой и др. (2022) приведены следующие величины компонентов ON-ответа в тишине, полученные в этом же эксперименте: амплитуда N1 в реакции на левый и правый сигнал -2.2 мкВ, а в реакции на центральный сигнал -1.9 мкВ; амплитуда P2 в реакции на все сигналы 2.7 мкВ. В настоящем эксперименте получены меньшие величины: амплитуда N1 в реакции на левый и правый сигнал -0.9 мкВ, а в реакции на центральный сигнал -1.1 мкВ; амплитуда P2 составила 1.0 и 1.2 мкВ соответственно. Различие в амплитуде ответов на включение и выключение сигнала в тишине — более чем двукратное. Такие различия характерны для амплитуды ВП на включение и выключение при одинаковом уровне звука, форме и длительности фронтов нарастания и спада, и временных интервалах между включением и выключением (Davis, Zerlin, 1966; Hillyard, Picton, 1978; Baltzell, Billings, 2014).

Как и в случае реакций на включение сигнала (Шестопалова и др., 2022), маскировка оказывала существенное влияние на амплитуду и латентность основных колебаний ВП. В условиях маскировки обнаружено значимое снижение амплитуды и увеличение латентности компонентов N1, P2 и N2 ответов на выключение сигнала при совпадении его положения с дующимся маскером. При разнесении в пространстве сигнала и маскера на расчетное угловое расстояние 90 град отмечен рост амплитуды и уменьшение латентности всех компонентов ВП на выключение, указывающие на пространственное освобождение от маскировки, однако восстановление амплитуды было достоверным только для компонента N1. Увеличение расчетного расстояния между сигналом и маскером до 180 градусов не вызывало значимого увеличения амплитуды ответов, но при этом значимо уменьшались пиковые латентности компонен-

та N1 ответов на латерализованные сигналы (рис. 2 и 3). Описанные проявления освобождения от маскировки в ответах на окончание тестового сигнала в целом совпадают с изменениями ВП на его начало, полученных в тех же условиях и на тех же испытуемых (Шестопалова и др., 2022). Наличие пространственного освобождения от маскировки свидетельствует о том, что в генерации этих ответов участвуют нейронные популяции, обрабатывающие бинауральные различия. Сходство между воздействием маскировки на вызванные потенциалы на включение и выключение звука подтверждает предположение, что эти два события обрабатываются популяциями нейронов, которые частично совпадают.

Однако обнаружены и некоторые отличия между ответами на включение и выключение звуковых стимулов. В условиях маскировки при разнесении сигнала и маскера в пространстве амплитуда компонента N1 ответа на выключение восстанавливалась до исходного уровня, чего не наблюдалось в ответах на включение. Следовательно, при пространственном освобождении от маскировки реакция на выключение сигнала подавляется в меньшей степени, чем реакция на включение. Можно предположить, что восстановление амплитуды до исходного уровня соответствует лучшему обнаружению сигнала. С другой стороны, латентность N1 ВП на выключение сильно изменялась в условиях маскировки. При совпадении пространственных признаков сигнала и маскера увеличение пиковой латентности компонента N1 ответа на выключение могло достигать порядка 100 мс, тогда как аналогичная величина для ответов на включение составляла около 50 мс (Шестопалова и др., 2022). Возможно, механизм генерации ответа на выключение стимула в условиях маскировки задействует более сложные нейронные сети, что увеличивает время анализа сенсорной информации, но способствует выделению сигнала из шума.

В работе (Baltzell, Billings, 2014), где исследовалась зависимость ВП на выключение от интенсивности стимула и соотношения сигнал/шум, было показано, что волна N2 играет гораздо большую роль в величине ВП на выключение, чем в ответах на включение. Авторы объясняют это большим вкладом тормозных нейронов в генерацию ответов на выключение, либо большей чувствительностью ответа на выключение к соотношению сигнал/шум. На этом основании мы могли бы



предполагать, что компонент N2 будет наиболее устойчив к условиям маскировки. Однако в нашей работе волна N2 была подавлена почти до полного исчезновения. Возможным объяснением этого явления могут быть различия в применявшихся звуковых сигналах.

В цитированной работе испытуемым предъявляли тональные сигналы на фоне шумового маскера, что могло приводить к произвольному переключению внимания и отражаться в амплитуде компонента N2. В нашем исследовании сигнал и маскер не раз-

Рис. 3. Зависимость амплитуды и латентности компонентов ВП на выключение от углового расстояния между сигналом и маскером. В левой части рисунка приведены графики амплитуды исследуемых компонентов, в правой — латентности. Рядом соответствуют положения тестового сигнала слева, справа и по центру. Все сочетания взаимного расположения сигнала и маскира отложены по категориальной оси абсцисс в порядке возрастания углового расстояния: в тишине (без маскира), 0, 90, 180 град между сигналом и маскером. Черная линия соответствует показателям компонента N1, светло-серая — компонента P2, темно-серая — компонента N2. Пунктиром обозначены недостоверные различия ($p > 0.05$) между соседними значениями. Вертикальными черточками показана стандартная ошибка.

Fig. 3. Effect of the signal-masker angular distance on the amplitude and latency of ERP components to the sound offset. Left column: the ERP amplitude. Right column: the ERP latency. The rows (top-down) correspond to the positions of the test signal on the left/right or at the center. All combinations of signal and masker are plotted along the categorical abscissa in ascending order of the angular distance: in silence (without masker), 0, 90, 180 deg between the signal and the masker. Black line, light gray line and dark gray line correspond to the N1, P2 and N2 components, respectively. The dashed line indicates non-significant differences ($p > 0.05$) between neighboring values. Vertical lines represent the standard errors.

личались по частотным характеристикам, и произвольного переключения внимания, вероятно, не происходило.

Интерпретация изменений ранних и поздних компонентов ВП в реакциях на пространственные стимулы может проводиться с привлечением двухступенчатой модели (Ducommun et al., 2002). Авторы сравнивали вызванные ответы на включение звуковых стимулов, отличающихся по положению и движущихся, и выделяли два временных периода обработки стимула: начальная фаза (0–250 мс) предположительно соответствовала накоплению информации и интеграции акустических признаков, а следующая фаза могла быть связана с распознаванием направления движения. Позднее эта концепция была использована для объяснения функциональных различий раннего и позднего компонентов ВП на начало движения (Getzmann, 2011). В нашей работе показано разное воздействие маскировки на амплитуду и латентность ранних и поздних компонентов ВП на выключение: волна N1 полностью восстанавливалась, а подавление компонентов P2 и N2 сохранялось даже при сильном разнесении сигнала и маскира в пространстве. Однако в момент выключения стимула поступление новой информации в слуховую систему прекращается, поэтому генерацию поздних компонентов ВП невозможно объяснить накоплением информации и анализом сложных признаков, следовательно, двухступенчатая модель в данном случае неприменима. Можно предположить, что активность, соответствующая поздним компонентам ВП, в значительной степени отражает сравнение последнего обнаруженного слухового события с кратковременным контекстом. Возможно, более сильное подавление поздних компонентов ответа

в условиях одновременной маскировки связано с тем, что продолжающееся воздействие маскира с теми же частотными характеристиками затрудняет это сравнение.

Согласно анализу топографии ответов на разные слуховые события (Шестопалова и др., 2023), в тишине компонент N1 ответа на включение демонстрировал контралатеральное преобладание, а компонент P2 — правостороннее. Асимметрия усиливалась в присутствии маскира в противоположной сигналу половине акустического пространства, и уменьшалась, если положение сигнала и маскира совпадало. В то же время в цитированной работе не было обнаружено асимметрии распределения ответа по скальпу ни для каких компонентов ВП на выключение, ни в тишине, ни в условиях маскировки. Эти различия можно интерпретировать как свидетельство того, что популяции нейронов, отвечающие на включение и выключение, частично различаются. Предположительно, симметричное распределение ВП на выключение может быть результатом более активного межполушарного взаимодействия и синхронизации активности в слуховой коре обоих полушарий.

Возможно, механизм формирования ответа на выключение следует рассматривать в рамках концепции каскада взаимосвязанных электрических реакций, при котором одни нейронные популяции реагируют на активность других (Dexter, 2018; Muraskin et al., 2018). ВП на выключение может генерироваться широким нейронным ансамблем, реагирующим на прекращение активности отдельных пространственно-чувствительных популяций и обеспечивающим временную перцептивную группировку. Реакции этого ансамбля могут различаться величиной и латентностью (но не топографией) в зависимо-

сти от того, какая именно популяция была “выключена”. При выключении популяции, активность которой была сильно подавлена в условиях маскировки (при совпадении положения сигнала и маскера), реакция широкого ансамбля может быть слабой и достаточно поздней, и в результате наблюдается подавленный и запаздывающий ответ на выключение. При выключении популяции, сохранившей свою активность при маскировке, реакция широкого ансамбля окажется более быстрой и большей по величине. В отсутствие маскера после выключения сигнала наступает тишина, поэтому ответ на выключение оказывается максимальным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В присутствии длящегося неподвижного маскера амплитуда ВП на выключение была меньше, а их латентность увеличивалась по сравнению с ответами на выключение тех же сигналов в тишине. Этот эффект был наиболее выражен при совпадении положения тестового сигнала и маскера. При удалении сигнала от маскера на 90 градусов наблюдалось пространственное освобождение от маскировки, выразившееся в увеличении амплитуды и уменьшении латентности всех компонентов отклика. Амплитуда компонента N1 восстанавливалась до исходного уровня (амплитуды ответа на сигнал в тишине), что может свидетельствовать об успешном выделении стимула из фона. При этом амплитуда компонентов P2 и N2 не достигала исходного уровня. Дальнейшее увеличение расстояния между сигналом и маскером не вызывало достоверного увеличения амплитуды вызванных потенциалов на выключение.

Обнаруженные закономерности позволяют предположить, что выключение сигнала может играть значительную роль при выделении стимула из фона. Наличие пространственного освобождения от маскировки указывает на то, что механизм генерации ответов на выключение включает в себя нейронные сети, обрабатывающие пространственные признаки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00033.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Петропавловская Е.А., Шестопалова Л.Б., Вайтулевич С.Ф.* Проявления инерционности слуховой системы при локализации движущихся звуковых образов малой длительности. *Физиология человека*, 2010. 36 (4): 34–44.
- Петропавловская Е.А., Шестопалова Л.Б., Вайтулевич С.Ф.* Предсказательная способность слуховой системы при плавном движении и скачкообразном перемещении звуковых образов малой длительности. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова*. 2011. 61 (3): 293–305.
- Семенова В.В., Шестопалова Л.Б., Петропавловская Е.А., Саликова Д.А., Никитин Н.И.* Латентность вызванного потенциала как показатель интегрирования акустической информации о движении звука. *Физиология человека*. 2022. 48 (4): 57–68.
- Шестопалова Л.Б., Петропавловская Е.А., Саликова Д.А., Семенова В.В., Никитин Н.И.* Слуховые вызванные потенциалы человека в условиях пространственной маскировки. *Физиология человека*. 2022. 48 (6): 32–43.
- Шестопалова Л.Б., Петропавловская Е.А., Саликова Д.А., Семенова В.В.* Влияние слуховой пространственной маскировки на межполушарную асимметрию вызванных ответов. *Физиология человека*. 2023. 49 (4): 16–29.
- Abeles M., Goldstein Jr. M.H.* Responses of single units in the primary auditory cortex of the cat to tones and to tone pairs. *Brain Res.* 1972. 42: 337–352.
- Baltzell L.S., Billings C.J.* Sensitivity of offset and onset cortical auditory evoked potentials to signals in noise. *Clin. Neurophysiol.* 2014. 125 (2): 370–380.
- Billings C.J., Tremblay K.L., Souza P.E., Binns M.A.* Effects of hearing aid amplification and stimulus intensity on cortical auditory evoked potentials. *Audiol. Neurootol.* 2007. 12: 234–246.
- Billings C.J., Tremblay K.L., Stecker G.C., Tolin W.M.* Human evoked cortical activity to signal-to-noise ratio and absolute signal level. *Hear Res.* 2009. 254: 15–24.
- Carlisle S., Leung J.* The Perception of Auditory Motion. *Trends. Hear.* 2016. 20: 1–19.
- Davis H., Zerlin S.* Acoustic relations of the human vertex potential. *J. Acoust. Soc. Am.* 1966. 39: 109–116.
- Delorme A., Sejnowski T., Makeig S.* Enhanced detection of artifacts in EEG data using higher-order statistics and independent component analysis. *Neuroimage.* 2007. 34 (4): 1443–1449.
- Dexter R.F.I.* Auditory perceptual learning and changes in the conceptualization of auditory cortex. *Hearing Research.* 2018. 366: 3–16.
- Dingle R.N., Hall S.E., Phillips D.P.* The three-channel model of sound localization mechanisms: interau-

- ral level differences. *J. Acoust. Soc. Am.* 2012. 131 (5): 4023–4029.
- Dirks D.D., Morgan D.E., Dubno J.R.* A procedure for quantifying the effects of noise on speech recognition. *J. Speech Hear. Disord.* 1982. 47: 114–123.
- Ducommun C.Y., Murray M.M., Thut G., Bellmann A., Viaud-Delmon I., Clarke S., Michel C.M.* Segregated Processing of Auditory Motion and Auditory Location: An ERP Mapping Study. *NeuroImage.* 2002. 16: 76–88.
- Getzmann S.* Auditory motion perception: onset position and motion direction are encoded in discrete processing stages. *European J. Neuroscience.* 2011. 33: 1339–1350.
- Gordon-Salant S., Fitzgibbons P.J.* Temporal factors and speech recognition performance in young and elderly listeners. *J. Speech Hear. Res.* 1993. 36 (6): 1276–1285.
- Grose J.H., Buss E., Hall J.W. 3rd.* Within- and across-channel factors in the multiband comodulation masking release paradigm. *J. Acoust. Soc. Am.* 2009. 125 (1): 282–293.
- Hari R., Pelizzone M., Makela J.P., Hallstrom J., Leinonen L., Lounasmaa O. V.* Neuromagnetic responses of the human auditory cortex to on- and offsets of noise bursts. *Audiology.* 1987. 26: 31–43.
- Harris K.C., Wilson S., Eckert M.A., Dubno J.R.* Human evoked cortical activity to silent gaps in noise: effects of age, attention, and cortical processing speed. *Ear Hear.* 2012. 33 (3): 330–339.
- He J., Hashikawa T., Ojima H., Kinouchi Y.* Temporal integration and duration tuning in the dorsal zone of cat auditory cortex. *J. Neurosci.* 1997. 17: 2615–2625.
- Hillyard S.A., Picton T.W.* On and off components in the auditory evoked potential. *Percept. Psychophys.* 1978. 24: 391–398.
- Hornsby B.W.Y., Trine T.D., Ohde R.N.* The effects of high presentation levels on consonant feature transmission. *J. Acoust. Soc. Am.* 2005. 118: 1719–29.
- Horváth J.* Attention-dependent sound offset-related brain potentials. *Psychophysiology.* 2016. 53: 663–677.
- Irsik V.C., Amanaseer A., Johnsrude I.S., Herrmann B.* Cortical Responses to the Amplitude Envelopes of Sounds Change with Age. *J. Neurosci.* 2021. 41 (23): 5045–5055.
- Kopp-Scheinpflug C., Tozer A.J., Robinson S.W., Tempel B.L., Hennig M.H., Forsythe I.D.* The sound of silence: ionic mechanisms encoding sound termination. *Neuron.* 2011. 71 (5): 911–925.
- Kopp-Scheinpflug C., Sinclair J.L., Linden J.F.* When Sound Stops: Offset Responses in the Auditory System. *Trends Neurosci.* 2018. 41 (10): 712–728.
- Litovsky R.Y.* Spatial release from masking. *Acoust. Today.* 2012. 8: 18.
- Mlynarsky W., McDermott J.H.* Ecological origins of perceptual grouping principles in the auditory system. *PNAS.* 2019. 116 (50): 25355–25364.
- Muraskin J., Brown T.R., Walz J.M., Tu T., Conroy B., Goldman R.I., Sajda P.* A multimodal encoding model applied to imaging decision-related neural cascades in the human brain. *NeuroImage.* 2018. 180 (A): 211–222.
- Noda K., Tonoike M., Doi K., Koizuka I., Yamaguchi M., Seo R., Kubo T.* Auditory evoked off-response: its source distribution is different from that of on-response. *Neuroreport.* 1998. 9: 2621–2625.
- Ozmeral E.J., Eddins D.A., Eddins A.C.* Electrophysiological responses to lateral shifts are not consistent with opponent-channel processing of interaural level differences. *J. Neurophysiol.* 2019. 122 (2): 737–748.
- Pantev C., Eulitz C., Hampson S., Ross B., Roberts L.E.* The auditory evoked “off” response: sources and comparison with the “on” and “sustained” responses. *Ear & Hearing.* 1996. 17: 255–265.
- Phillips D.P., Hall S.E., Boehnke S.E.* Central auditory onset responses, and temporal asymmetries in auditory perception. *Hear. Res.* 2002. 167: 192–205.
- Qin L., Chimoto S., Sakai M., Wang J., Sato Y.* Comparison between offset and onset responses of primary auditory cortex ON–OFF neurons in awake cats. *J. Neurophysiol.* 2007. 97: 3421–3431.
- Recanzone G.H.* Response profiles of auditory cortical neurons to tones and noise in behaving macaque monkeys. *Hear. Res.* 2000. 150: 104–118.
- Schneider B.A., Pichora-Fuller M.K., Kowalchuk D., Lamb M.* Gap detection and the precedence effect in young and old adults. *J. Acoust. Soc. Am.* 1994. 95(2): 980–991.
- Scholl B., Gao X., Wehr M.* Nonoverlapping sets of synapses drive on responses and off responses in auditory cortex. *Neuron.* 2010. 65: 412–421.
- Skoe E., Krizman J., Anderson S., Kraus N.* Stability and plasticity of auditory brainstem function across the lifespan. *Cereb. Cortex.* 2015. 25 (6): 1415–1426.
- Snell K.B., Frisina D.R.* Relationships among age-related differences in gap detection and word recognition. *J. Acoust. Soc. Am.* 2000. 107 (3): 1615–1626.
- Studebaker G.A., Sherbecoe R.L., McDaniel D.M., Gwaltney C.A.* Monosyllabic word recognition at higher-than-normal speech and noise levels. *J. Acoust. Soc. Am.* 1999. 105: 2431–2444.
- Szabó B.T., Denham S.L., Winkler I.* Computational Models of Auditory Scene Analysis: A Review. *Front Neurosci.* 2016. 10: Art. 524.
- Traer J., McDermott J.H.* Statistics of natural reverberation enable perceptual separation of sound and space. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. 113: 7856–7865.
- Volkov I.O., Galazjuk A.V.* Formation of spike response to sound tones in cat auditory cortex neurons: interaction of excitatory and inhibitory effects. *Neuroscience.* 1991. 43: 307–321.
- Yamashiro K., Inui K., Otsuru N., Kakigi R.* Change-related responses in the human auditory cortex: An MEG study. *Psychophysiology.* 2011. 48: 23–30.

OFFSET RESPONSES IN CONDITIONS OF AUDITORY SPATIAL MASKING IN HUMANS

E. A. Petropavlovskaja^{a, #}, L. B. Shestopalova^a, D. A. Salikova^a, and V. V. Semenova^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: petropavlovskaja@infran.ru*

The influence of relative spatial positions of sound stimuli and background masker on the event related potentials (ERPs) evoked by sound offset was investigated. Sound stimuli were presented dichotically, the position of sound images was manipulated using interaural level differences. Test signals were presented in silence or against the background of a masker. Signal and masker were either co-located or separated by 90 or 180 deg of azimuth. Co-location of signal and masker resulted in amplitude decrease and latency increase in the N1, P2 and N2 components. When angular distance between signal and masker increased, the amplitude recovered almost to the initial level and the latency of all components became shorter. The present findings are in line with the view that offset response is essential for target stimulus detection in the background noise.

Keywords: EEG, event-related potentials, sound offset, sound localization, masking

ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ (КОГНИТИВНОЙ) ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

УДК 159.9.072,81'23,612.821

ВКЛАД ВЕРБАЛЬНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ В ПРОЦЕССЫ БЫСТРОГО КАРТИРОВАНИЯ И ЯВНОГО КОДИРОВАНИЯ

© 2023 г. Е. И. Перикова^{1, *}, М. Г. Филиппова^{1, 2}, Д. Н. Макарова¹, Д. С. Гнедых¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: e.perikova@spbu.ru

Поступила в редакцию 09.03.2023 г.

После доработки 03.07.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

С целью изучения роли вербального обозначения в усвоении информации о новых объектах в зависимости от стратегии речевого научения проведено исследование эффективности распознавания новых объектов, изученных с помощью стратегий быстрого картирования и явного кодирования, с учетом глазодвигательной активности. Тридцати двум испытуемым визуально предъявлялись изображения восьми новых плодов растений по восемь раз каждое, которые в 50% случаев аудиально сопровождалось уникальным, а в других 50% случаев – общим вербальным обозначением. В качестве проверочного задания использовался зрительный поиск целевого изображения среди дистракторов. Согласно полученным данным, стратегия быстрого картирования позволяла быстрее усваивать новые слова в сравнении с явным кодированием. Обнаружено положительное влияние уникального вербального обозначения новых плодов на выполнение задачи зрительного поиска, причем большая значимость такого обозначения оказалась характерна для быстрого картирования в сравнении с явным кодированием.

Ключевые слова: усвоение языка, изучение новых слов, вербальное обозначение, быстрое картирование, явное кодирование, видеоокулография

DOI: 10.31857/S0044467723060060, EDN: ZQXBWD

ВВЕДЕНИЕ

Свойственная человеку тенденция сопоставлять только что услышанное новое слово с объектом, у которого нет известного ему названия, лежит в основе языкового научения как у детей, так и у взрослых. Есть два способа осуществить такое сопоставление. Первый из них предполагает формирование нового понятия путем отвержения известных объектов, которые находятся рядом с неизвестным, т.е. по принципу дизъюнктивного силлогизма (А или В). В таком случае отказ от референтов, названия которых уже известны индивиду, является необходимым условием при поиске референта для новой словоформы. Согласно второму способу индивид изначально стремится к сопоставлению новой словоформы с новым объектом (“сопоставление новизны с новизной”), при этом отвержение известного объекта как имеющего возможность быть обозначенным новой слово-

формой не является обязательным для сопоставления с ней нового объекта (Halberda, 2006). Использование и того, и другого способа находит подтверждение в ряде исследований, однако данные по возрастным периодам их использования противоречивы. В частности, показано, что сопоставление новизны с новизной не является доступным с самого начала овладения языком, а формируется у детей после 20-го месяца жизни, когда они приобретают достаточный словарный запас и языковой опыт (Mervis, Bertrand, 1994). Суждения же на основе дизъюнктивного силлогизма могут быть сделаны детьми уже с 12 мес. (Cesana-Arlotti, 2018) (хотя в более позднем исследовании этот результат был опровергнут (Feiman et al., 2022)), а при оперировании абстрактными понятиями – с 2.5 лет (Grigoroğlu et al., 2019). L.A. Mason и R.S. Bass (2020) показали, что при выполнении теста на словарный запас в ситуации выбора на рисунке незнако-

мого предмета с неизвестным названием дети 5–6 лет используют сопоставление новизны с новизной (однако в данном исследовании участвовали только дети из семей с низким доходом). K.R. Repnik (2021) в ряде исследований показала, что многоязычные взрослые при сопоставлении новых слов с новыми объектами, представленными в альтернативе с уже известными, опираются на дизъюнктивный силлогизм. Кроме того, было выявлено, что на точность и скорость обработки информации испытуемыми в задании на установление взаимосвязи между словом и объектом влияет как их языковой опыт, так и количество языков, которыми они владеют, — чем больше они знали языков, тем быстрее справлялись с заданием. Между тем стоит отметить, что опора на тот или иной способ для познания окружающей действительности не всегда требует знания языка: показано, что еще до овладения речью дети способны справляться с заданиями, в основе которых лежит тот или иной способ, но при этом сами задания не содержат лингвистических стимулов (Mody, Carey, 2016; Hill et al., 2012; Feiman et al., 2022). Таким образом, роль вербального обозначения (названия) в процессе усвоения новых объектов остается не до конца проясненной: не установлено, насколько наличие уникального названия у нового объекта способствует усвоению и сохранению информации о нем.

Современные исследования на взрослых выборках, в том числе в рамках теории лингвистической относительности, говорят в пользу важной роли названий для усвоения новых и различения схожих объектов. В частности, обнаружено положительное влияние наличия названий у объектов на их заметность: после того, как участники исследования слышали слово, обозначающее цвет, улучшалась их способность различать цвета в задании выбора между одновременно представленными цветными стимулами (Forder, Luayan, 2019). Было также установлено, что вербальное обозначение объектов способствует более точному сохранению информации о них в памяти — в исследовании A.S. Souza с коллегами запоминание новых объектов по определенному признаку (по форме) происходило лучше при обозначении их каким-либо названием по сравнению с объектами без названий (при сравнении количества правильных ответов в проверочном задании для того и другого условия) (Souza et al., 2021). Кроме того, усвоение правил категоризации проис-

ходит успешнее, если индивид оперирует при этом общепринятыми названиями, по сравнению с редко употребляемыми (Котов, Жердева, 2020). Однако в других исследованиях при необходимости запоминания названий объектов, напротив, наблюдается снижение точности информации об их индивидуальных свойствах или затруднение их категоризации. В частности, в исследовании А.А. Котова и Т.Н. Котовой (2013) такому снижению способствовало произнесение испытуемыми названия объекта вслух (анализировалось количество правильных и неправильных ответов в задании на распознавание тестовых объектов, в том числе показатели скорости выполнения). В свою очередь, при изучении влияния принадлежности объекта к определенной категории на способность к его различению среди других объектов М.И. Morozov (2017) обнаружил, что испытуемые искали целевые объекты, имеющие название, медленнее, чем таковые без названий.

Помочь разрешить отмеченные противоречия можно, на наш взгляд, приняв во внимание вклад вербального обозначения в процессы научения новым понятиям с учетом стратегий речевого научения (Гнедых и др., 2022), таких как быстрое картирование (fast mapping, далее FM) и явное кодирование (explicit encoding, далее EE). Первая стратегия позволяет усваивать информацию из контекста путем исключения лишнего, вторая подразумевает прямое соотнесение изучаемого объекта с его названием. Для FM-стратегии отказ от известных отвлекающих объектов занимает центральное место при сопоставлении вербального обозначения с новым объектом (принцип дизъюнктивного силлогизма), на основании чего формируется предположение о связи названия и его референта (Medina et al., 2011; Trueswell et al., 2013). EE-стратегия использует способ сопоставления новизны с новизной без опосредующих предположений (Щербакова и др., 2022). Более ранние исследования, посвященные изучению эффективности языкового научения у взрослых, находят на поведенческом уровне преимущества то одной, то другой стратегии. С одной стороны, показано превосходство стратегии EE над FM, выражающееся в более высокой точности ответов при сопоставлении образа объекта (изображения) со словоформой (Greve et al., 2014). С другой стороны, выявлено, что слова, выученные с помощью FM-стратегии, интегрируются в лексикон

немедленно (Coutanche, Thompson-Schill, 2014), тогда как для ЕЕ-стратегии важна консолидация выученной информации во время ночного сна (Merhav et al., 2015). Однако более поздние работы указывают на схожий уровень эффективности данных стратегий (Shtyrov et al., 2021; Perikova et al., 2022). Такая противоречивость данных может быть связана с недостаточной сбалансированностью заданий в обучающих сессиях ранних исследований (подробный анализ см. (Shtyrov et al., 2019; Щербакова и др., 2022)), что делает возможным объяснения найденных различий в эффективности изучаемых стратегий влиянием дополнительных переменных. В исследованиях, проведенных за последние годы, этому аспекту стали уделять больше внимания, что привело к более согласованным поведенческим данным.

Результаты нейрофизиологических исследований показывают наличие различных механизмов, лежащих в основе данных стратегий научения. Т. Atir-Sharon с коллегами выявили разное участие областей головного мозга в запоминании новых слов посредством той или иной стратегии: при использовании FM в большей степени активируется передняя височная доля, тогда как при ЕЕ — гиппокамп (Atir-Sharon et al., 2015). Также было выявлено, что FM-стратегия поддерживается левополушарным височным полюсом (зонами Брока и Вернике), в то время как ЕЕ-стратегия наряду с данными зонами также задействует речевые области левого полушария (теменные и лобные) и кору правого полушария (Shtyrov et al., 2021, 2022). Временные параметры активности нейронной динамики (данные ЭЭГ) при усвоении новых слов с помощью этих двух стратегий также отличаются: для FM-стратегии характерна взаимосвязь успешности выполнения проверочных заданий с более ранними пиками (176–216 мс), для ЕЕ — с более поздними (260–300 мс) (Shtyrov et al., 2022).

В соответствии с обсуждаемыми данными, предполагая отсутствие поведенческих различий между двумя стратегиями научения при наличии нейрофизиологических различий, нами было принято решение использования в новом исследовании психофизиологических методов, в частности регистрации движений глаз с помощью видеоокулографа. Данный метод успешно используется в психолингвистических исследованиях (Походай и др., 2022), в том числе посвященных про-

верке гипотезы о необходимости использования принципа дизъюнктивного силлогизма для усвоения новых понятий. Например, в одном из таких экспериментов было выявлено, что взрослые испытуемые систематически отклоняют известные объекты перед сопоставлением новых названий с новыми объектами (Halberda, 2006). В результате изучения движений глаз во время чтения была обнаружена высокая чувствительность к наличию новых слов в тексте: для их прочтения требовалось больше времени, чем для слов, уже известных испытуемым. При этом на новых словах, встречающихся в отдельных предложениях, взгляд задерживался дольше, чем на этих же словах в абзацах (Wचना, Juhasz, 2013).

Чаще всего видеоокулограф используется в исследованиях научения новым словам на детской выборке, и только в FM-условии (Axelsson et al., 2021; Ellis et al., 2015 и др.) или близких к нему, например, в условии быстрого случайного обучения (quick incidental learning, QUIL) (Chung, Yim, 2020). Однако такой дизайн не позволяет говорить о специфике научения с помощью FM-стратегии, выявленной на основе анализа движения глаз, так как отсутствует сравнение с ЕЕ-стратегией научения. На настоящий момент нам известно только одно исследование на взрослой выборке, в котором анализ движений глаз применялся при изучении процессов научения с включением обеих стратегий (Warren et al., 2016). По результатам эксперимента D.E. Warren с коллегами (Warren et al., 2016) не было обнаружено значимых различий во времени фиксации взгляда при выполнении задания на установление семантического соответствия слова и изображения между двумя стратегиями научения. Дизайн нашего исследования восполняет недостаток экспериментальных результатов в данной области.

В классических парадигмах исследований научения языку с помощью FM- и ЕЕ-стратегий используется вербальное обозначение, соответствующее новому объекту (т.е. присвоенное ему уникальное название). Как было сказано выше, наличие у объекта вербального обозначения может как облегчать, так и затруднять усвоение информации о нем. При этом в естественной среде знакомство с новым объектом посредством той или иной стратегии может происходить и в отсутствие возможности узнать его уникальное название. В связи с этим возникает вопрос, является-

ся ли стратегия научения (ЕЕ или FM) фактором, определяющим влияние вербального обозначения на усвоение информации об объекте (будет ли оно препятствовать или способствовать научению).

Научение с помощью ЕЕ-стратегии подразумевает акцент на названии нового объекта, т.к. в данном случае прямое указание на объект сопровождается вербальным обозначением (например, “Это *глорн*” (Щербакова и др., 2022)). Можно предположить, что за счет привлечения внимания к вербальному обозначению в памяти формируется обобщенный образ объекта без его подробной детализации, в отличие от FM-условия, где внимание, напротив, привлекается к какому-либо конкретному признаку объекта (например, “Там на столе стоят ваза, чашка и *глорн*. Какого цвета *глорн*?” (там же)) вместо его названия. Эта особенность FM-условия, согласно нашим предположениям, должна способствовать лучшему различению индивидуальных характеристик изучаемого объекта, что и проверялось в настоящем исследовании. С этой целью сопоставлялась эффективность зрительного поиска объектов, изученных при помощи обеих стратегий. Также мы ожидали обнаружить большую значимость вербального обозначения для стратегии ЕЕ в сравнении с FM, что проверялось путем сопоставления эффективности зрительного поиска объектов при наличии и отсутствии у них уникальных названий при использовании обеих стратегий. Запись глазодвигательной активности при выполнении заданий призвана конкретизировать особенности зрительного поиска для объектов, изученных при использовании той или иной стратегии с наличием или отсутствием уникальных вербальных обозначений.

МЕТОДИКА

Выборка: $N = 32$, возраст 18–35 лет (средний возраст 22.5 ± 3.6 ; 22 женщины), праворукие носители русского языка как единственного родного, с нормальным или скорректированным до нормы зрением. Исследование одобрено этическим комитетом Санкт-Петербургского психологического общества (протокол № 15 от 19.05.2022).

Стимульный материал. Разработаны зрительные (изображения плодов; филлеры) и слуховые (псевдослова; контекстные предложения) стимулы. Отобраны восемь пятибуквенных существительных русского языка —

названия экзотических и огородных плодов с одинаковым чередованием согласных и гласных звуков (фонетическая структура: согласный–гласный–согласный–гласный–согласный; напр., “томат” или “банан”) и схожими показателями частотности (средняя частотность словоформы = 5.28 ± 1.29 , первой = 6.68 ± 0.99 и последней = 8.72 ± 0.98 биграмм, согласно (Ляшевская, Шаров, 2009)). На основе отобранных существительных составлены 8 пятибуквенных псевдослов (далее — новые слова), имеющих аналогичную фонетическую структуру (напр., первый слог от слова “лимон”, а последний — от слова “горох” в результате образовали слово “лирох”). Новые слова значительно отличались по оценкам узнаваемости от реально существующих ($t = 82.16, p < 0.001$) (по результатам опроса экспертов, в группу которых вошли носители русского языка как родного; $N = 29$, 8 мужчин, средний возраст 29.6 ± 6.31).

В качестве семантических референтов слов использовались фотографии известных и малоизвестных (редких) плодов, т.е. незнакомых большинству представителей русскоязычного культурного сообщества (например, нони). Для каждого плода использовались восемь фотографий, изображающих его как в целом, так и в разрезанном виде. Для ЕЕ-условия также были созданы филлеры — изображения, не имеющие смысловой нагрузки; для создания каждого было использовано четыре повернутых (45, 90, 180, 360 градусов) полупрозрачных изображения предметов с размытием. Графические характеристики всех стимулов были стандартизованы с помощью методов зрительной унификации (устранение графического шума, отцентровка объектов, приведение изображения к размеру 400×400 pxl, усреднение стимулов по шкале свечения).

Графические стимулы были оценены по узнаваемости экспертной группой респондентов ($N = 200$, 75 мужчин, средний возраст 28.75 ± 4.65 лет) — носителей русского языка. Сбор данных осуществлялся с помощью интернет-ресурса “Яндекс.Толока”. Узнаваемость известных плодов была значительно выше узнаваемости редких ($t = 16.18; p < 0.001$), филлеры получили более низкие оценки узнаваемости в сравнении как с известными ($Z = -4.637; p < 0.001$), так и с малоизвестными плодами ($Z = -4.383; p < 0.001$).

Для создания ЕЕ- и FM-условий научения были составлены наборы из восьми вопросов-

Таблица 1. Примеры зрительных и слуховых стимулов для одного объекта
Table 1. Examples of visual and auditory stimuli for the object sample

Примеры нового плода в разрезанном и целом виде	Первая часть вопроса ЕЕ-условия	Вторая часть вопроса ЕЕ-условия	Вопросы в FM-условии
	На экране XXXXX Посмотрите, вот XXXXX Вот XXXXX Это XXXXX	Он вытянутый? Он надломан? Он волнистый? Он бурый?	Вытянутый ли XXXXX? Надломлен ли XXXXX? Волнистый ли XXXXX? Бурый ли XXXXX?
	На картинке XXXXX На мониторе XXXXX Перед Вами XXXXX Вы видите XXXXX	Он выжатый? Объемный ли он? Пустой ли он? Белый ли он?	Выжатый ли XXXXX? Объемный ли XXXXX? Пустой ли XXXXX? Белый ли XXXXX?

Примечание: Зрительные стимулы предлагались участникам исследования в цвете в ходе обучающей сессии. Название стимула менялось от испытуемого к испытуемому.

Note: Visual stimuli were presented to subjects in color during the training session. The name of the stimulus changed from subject to subject.

тельных предложений для каждой стратегии, отличающиеся по своей структуре. Содержание вопросов в двух условиях касалось наличия или отсутствия визуальных характеристик плодов. При предъявлении стимулов в ЕЕ-условии применялась конструкция из двух предложений. В первом предложении в зависимости от условия вербализации названия использовалась указывающая на новый плод лексема и уникальное или общее вербальное обозначение в именительном падеже (например, “Перед Вами ЛИРОХ” или “Перед Вами НОВЫЙ ПЛОД” соответственно). Второе предложение содержало вопрос, касающийся одной из визуальных характеристик плода (например, “Фиолетовый ли он?”). В FM-условии вопрос состоял из одного предложения, последним членом которого также являлось уникальное или общее вербальное обозначение в именительном падеже (например, “Фиолетовый ли ЛИРОХ?” или “Фиолетовый ли НОВЫЙ ПЛОД?”). Все вопросы предполагали выбор одного из двух вариантов ответа: “Да” или “Нет” (в 50% случаев – “Да”, и в 50% – “Нет”).

Примеры предложений для одного плода (фингерлайм) представлены в табл. 1.

Стимульные слова и предложения были записаны в виде звуковых дорожек с помо-

щью инструмента Yandex SpeechKit. По результатам предварительного опроса ($N = 16$, 8 мужчин, средний возраст 21.2 ± 6.12 лет) был отобран синтезированный голос, получивший более высокие оценки вероятности принадлежности человеку, дружелюбия, привлекательности и степени доверия в сравнении с голосами четырех реальных дикторов (H -test = 10.83; $p = 0.028$). Дополнительно все аудиодорожки были скорректированы двумя экспертами, носителями русского языка, по параметрам “тембр голоса” и “ударение”.

Полученные аудиодорожки позволили производить замену словоформы в каждом из стимульных предложений, что обеспечило возможность контрбалансировки соответствия словоформ и их визуальных референтов. Кроме того, соответствие уникальных и общих вербальных обозначений изображениям объектов и предложений для семантизации (ЕЕ- и FM-условий) было индивидуальным для каждого из участников. Таким образом, использовались 32 последовательности элементов стимульных наборов.

Обучающая сессия. В центре монитора (Dell S2716DG, Китай, диагональ 27 дюймов) предъявлялся фиксационный крест и звучало указание на плод, которое в 50% случаев подразумевало присвоение ему уникального вер-

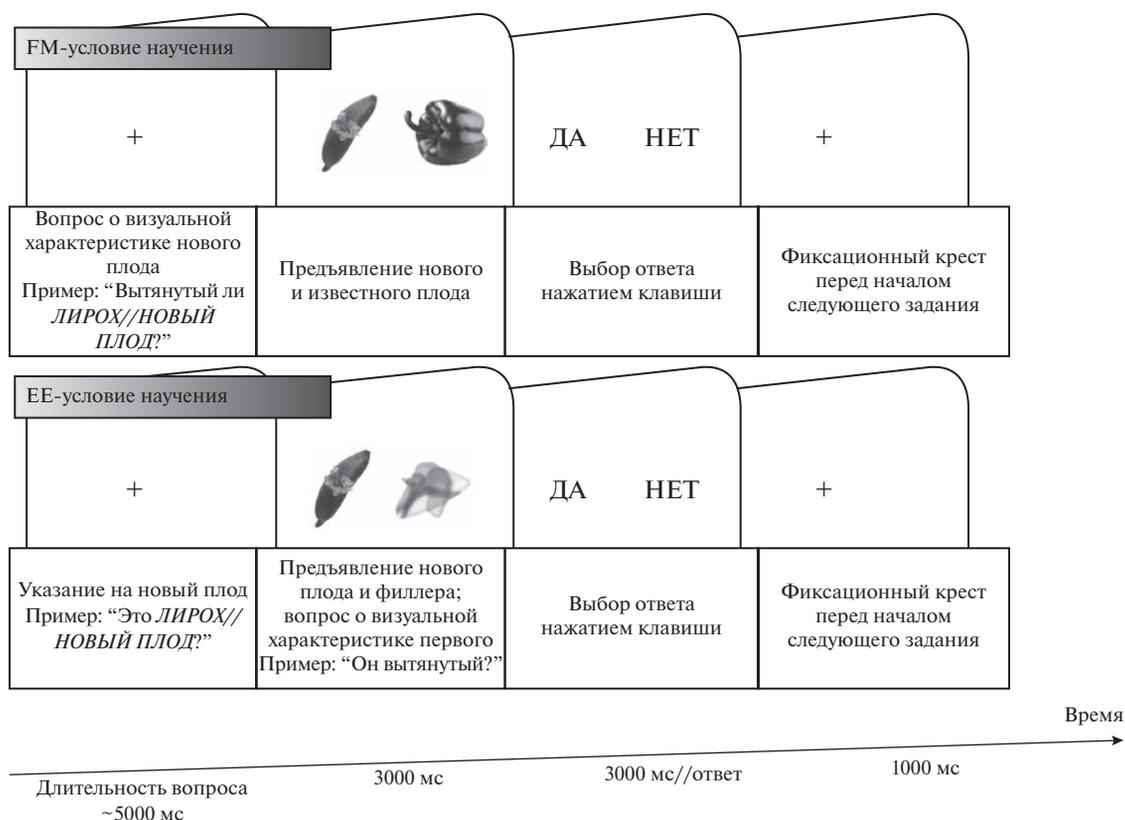


Рис. 1. Пример последовательности предъявления стимулов. Примечание: в обучающей сессии изображения были цветными.

Fig. 1. An example of the stimulus sequences. Note that the images were colourful in the training session.

бального обозначения (например, “Перед Вами ЛИРОХ” в EE-условии или вопрос “Вытянутый ли ЛИРОХ?” в FM-условии). В других 50% случаев вместо названия плода использовалось общее вербальное обозначение (например, EE: “Вы видите НОВЫЙ ПЛОД”; FM: “Вытянутый ли НОВЫЙ ПЛОД?”). Затем демонстрировались два изображения (целевое и нецелевое): целевым изображением был новый плод, нецелевым — известный плод для FM-условия и филлер — для EE-условия. В EE-условии дополнительно звучал вопрос (например, “Он вытянутый?”, рис. 1). Использование в обоих условиях двух изображений и вопросов о визуальных характеристиках новых плодов позволило уравновесить условия между собой. Левое/правое расположение целевого изображения было уравновешено между испытаниями. Участники выбирали ответ “да” или “нет”, нажимая кнопку указательным пальцем левой руки с помощью специальной клавиатуры (RB-740, Cedrus Corp., США). Каждый плод с семантической привязкой предъявлялся восемь раз, по-

рядок предъявления определялся условием псевдорандомизации. Цвет фона для всех этапов предъявления был белый (255, 255, 255), а плоды — цветные (для формирования целостного представления о каждом из них). До основной обучающей сессии все испытуемые проходили тренировку, включающую 8 заданий. Обучающая сессия была реализована в Presentation v. 23.1 (Neurobehavioral Systems Inc., США).

Проверочная сессия. Испытуемый выполнял задачу зрительного поиска целевого изображения среди 15 дистракторов (по два изображения каждого нового плода в черно-белом варианте). Карты для поиска целевого изображения включали в себя четыре неявно представленных квадранта, в которых располагались плоды (по четыре картинки в квадранте, две из которых иллюстрировали один плод в целом и разрезанном виде). Каждый квадрант обозначал одно из четырех условий научения: FM с уникальным и общим вербальным обозначением, EE с уникальным и общим вербальным обозначением. Каждый

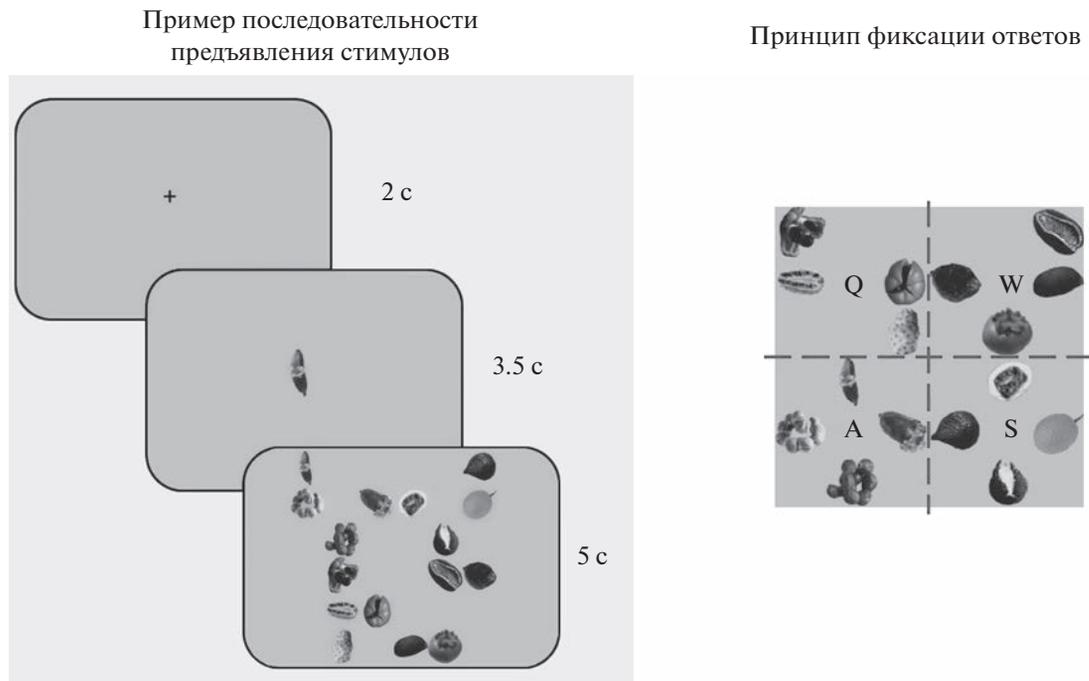


Рис. 2. Стимуляционная последовательность в проверочном задании.
Fig. 2. The stimulus sequence in the assessment task.

плод, который встречался в обучающей сессии, поочередно помещался во все квадранты. Таким образом, целевой плод единожды располагался среди плодов (далее дистракторов), изученных в том же условии, и трижды — среди дистракторов, изученных в альтернативных условиях, при этом объекты из разных условий не перемешивались по квадрантам. Всего было создано 1024 карты, по 32 для каждого испытуемого. Размер изображения каждого плода — 295×295 pxl, цвет фона — серый (205, 205, 205), общий размер карты — 1770×1770 pxl.

Пример стимуляционной последовательности задачи зрительного поиска представлен на рис. 2. В ходе каждого задания испытуемому предъявлялся фиксационный крест, после чего — целевое изображение, и затем — карта поиска. Задача испытуемого состояла в том, чтобы найти целевое изображение и обозначить, в каком квадранте оно находится, с помощью нажатия следующих клавиш на клавиатуре компьютера: Q — если целевое изображение находится в левом верхнем квадранте, W — в правом верхнем квадранте, A — в левом нижнем квадранте, S — в правом нижнем квадранте (рис. 2). Время поиска было ограничено — 5 с, но испытуемый мог дать

ответ раньше. Во время поиска происходила запись глазодвигательной активности.

Запись движений глаз производилась с помощью оборудования EyeLink 1000 Plus (SR Research Ltd., Канада) с камерой, расположенной под монитором с частотой дискретизации 1000 Гц, с точностью измерений от 0.15 до 0.5. Для показа стимулов использовался монитор Dell S2716DG (Китай, диагональ 27 дюйма). Испытуемому предлагалось сесть перед экраном компьютера и положить подбородок на специальную подставку, фиксирующую положение головы. Предъявляемое на экране изображение находилось на расстоянии 65 см от глаз испытуемого. Камера, регистрирующая движения глаз, располагалась под монитором компьютера и никак не препятствовала полноте обзора.

После индивидуальной настройки оборудования испытуемому предлагалось пройти тренировочную и основную части задания зрительного поиска, каждая из которых сопровождалась процедурой калибровки и валидации. В ходе калибровки испытуемому было необходимо следить за “мишенью”, движущейся по экрану, для фиксации взгляда в 9 контрольных точках. Процедура валидации повторяла задачу фиксации взгляда в тех же контрольных точках для подтвержде-

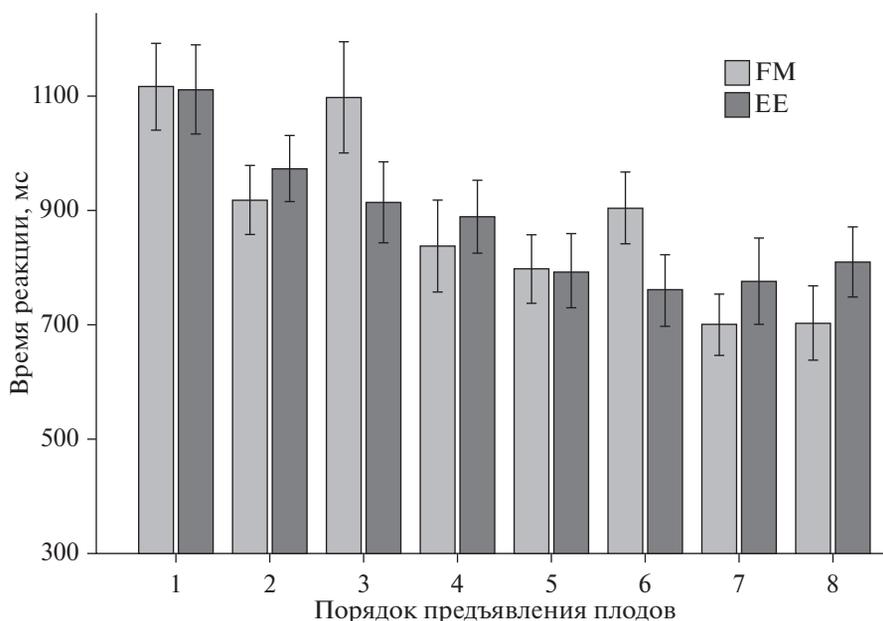


Рис. 3. Динамика времени ответа на вопрос о визуальной характеристике нового плода в условиях FM и EE. На графике отражено среднее время реакции и ошибка среднего, * – уровень статистической значимости различий < 0.05 .

Fig. 3. The reaction time during the training session for the fruit presentation in FM and EE conditions. The graphs show the reaction time and the error of the mean. * – $p < 0.05$.

ния успешности калибровки. После завершения настройки аппаратуры и успешно пройденной тренировки испытуемый приступал к основному заданию. Задание было реализовано в программе SR Research Experiment Builder (Version 2.3.1).

Статистический анализ выполнялся с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics, v. 26.0. Время реакции испытуемых в ходе обучающей сессии выступало показателем усвоения новых слов. Проводился дисперсионный анализ с повторными измерениями (rmANOVA) с внутригрупповыми факторами ПОРЯДОК ПРЕДЪЯВЛЕНИЯ ПЛОДОВ (восемь предъявлений каждого плода), СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ (FM/EE) и ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ (уникальное/общее название). В качестве показателей эффективности поиска целевого объекта в проверочной сессии использовались параметры времени реакции и времени сканирования карты поиска, а также показатели глазодвигательной активности: количество саккад и время латентной моторной реакции. Из анализа результатов времени реакции исключались данные, превышающие два стандартных отклонения. RmANOVA применялся для выявления значимых эффектов и взаимодей-

ствий. Апостериорные сравнения производились с использованием t -критерия Стьюдента для зависимых выборок. В качестве внутригрупповых факторов использовались СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ и ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ целевых объектов и дистракторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Усвоение новых слов. Значимым оказалось влияние фактора ПОРЯДОК ПРЕДЪЯВЛЕНИЯ ПЛОДОВ ($F(1, 31) = 13.15; p < 0.001, \eta^2 = 0.295$) на время реакции в процессе обучения, причем скорость ответов значительно уменьшалась после четвертого (860.5 ± 414) предъявления плода в сравнении с первым ($1109.7 \pm 486; P_{\text{Бонферрони}} = 0.0007$). Было выявлено взаимодействие факторов ПОРЯДОК ПРЕДЪЯВЛЕНИЯ ПЛОДОВ \times СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ ($F(1, 31) = 2.51; p = 0.017, \eta^2 = 0.075$). Для плодов, с которыми испытуемые знакомились в условии FM, ускорение ответов происходило быстрее (четвертое vs первое предъявление $P_{\text{Бонферрони}} = 0.006$), чем для плодов, с которыми они познакомились в условии EE (пятое vs первое предъявление $P_{\text{Бонферрони}} = 0.017$) (рис. 3).

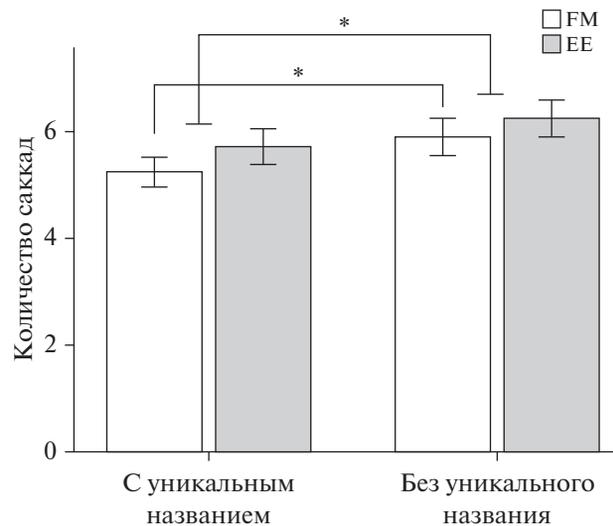


Рис. 4. Количество саккад при поиске плодов, с которыми испытуемые знакомились в условии FM и EE, с уникальными названиями и без таковых. На графике отражено среднее количество саккад и ошибка среднего, * – уровень статистической значимости различий $p < 0.05$.

Fig. 4. The number of saccades in the search task for fruits learned with and without labels in the FM and EE condition, $p < 0.05$. The graphs show the number of saccades and the error of the mean. * – $p < 0.05$.

Наличие уникальных названий у дистракторов. Наличие уникальных названий у дистракторов, среди которых осуществлялся зрительный поиск, показало преимущества сразу по трем показателям: по времени реакции и времени сканирования карты поиска, а также по количеству саккад. Для каждого из этих параметров оказался значим фактор ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ дистрактора.

В отношении времени реакции ($F(1, 31) = 6.13$; $p = 0.019$, $\eta^2 = 0.165$) при поиске целевых объектов среди дистракторов с уникальными названиями испытуемым требовалось меньше времени (1462 ± 307) по сравнению с поиском среди дистракторов с общими названиями (1578 ± 298). Фактор СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ значимости не показал ($F(1, 31) = 3.38$; $p = 0.076$), также не было обнаружено взаимодействия факторов СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ \times ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ дистрактора ($F(1, 31) = 1.43$; $p = 0.240$).

В отношении времени сканирования карты поиска фактор ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ дистрактора также оказался значимым ($F(1, 31) = 10.71$; $p = 0.003$, $\eta^2 = 0.257$): опять же время сокращалось при поиске среди дистракторов с уникальными названиями (1471 ± 425) в сравнении с поиском среди дистракторов с общими названиями (1646 ± 505). Как и в случае со временем реакции, фактор СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ значимости не

показал ($F(1, 31) = 1.71$; $p = 0.201$), также не было обнаружено взаимодействия факторов СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ \times ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ дистрактора ($F(1, 31) = 0.239$; $p = 0.629$).

Анализ количества саккад показал, что фактор ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ дистрактора является значимым ($F(1, 31) = 6.78$; $p = 0.014$, $\eta^2 = 0.179$): при поиске целевых объектов среди дистракторов с уникальными названиями испытуемые совершали меньше саккад (5.42 ± 1.46), чем при поиске среди дистракторов с общими названиями (6.0 ± 1.7). Как и в двух предыдущих случаях, не было обнаружено значимости как фактора СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ ($F(1, 31) = 2.21$; $p = 0.147$), так и взаимодействия факторов СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ \times ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ дистрактора ($F(1, 31) = 0.126$; $p = 0.725$).

Наличие названий у целевых объектов. Для зависимой переменной “количество саккад” двухфакторный дисперсионный анализ (СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ \times ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ) показал значимость фактора ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ ($F(1, 31) = 4.32$; $p = 0.046$, $\eta^2 = 0.122$): для нахождения плодов, которым были присвоены уникальные названия, испытуемым требовалось меньше саккад (5.5 ± 1.55), чем для нахождения плодов с общими названиями

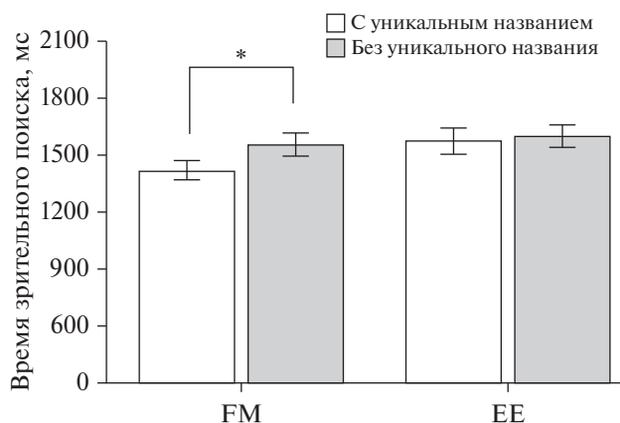


Рис. 5. Время поиска плодов, с которыми испытуемые знакомились в условии FM и EE, с уникальными названиями и без таковых. На графике отражено среднее время реакции и ошибка среднего, * – уровень статистической значимости различий < 0.05 .

Fig. 5. The search reaction time for the fruit learned with and without labels in the FM and EE condition. The graphs show the reaction time and the error of the mean. * – $p < 0.05$.

(5.9 ± 1.53). На рис. 4 можно видеть, что эта тенденция в большей мере характерна для плодов, с которыми испытуемые знакомились в условии FM (только в этом случае есть значимые различия между плодами с уникальными и общими названиями ($t(31) = -2.54$; $p = 0.16$)). Однако значимости ни фактор СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ ($F(1, 31) = 2.26$; $p = 0.143$), ни взаимодействие факторов СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ \times ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ не достигли ($F(1, 31) = 0.99$; $p = 0.328$).

Также не было обнаружено взаимодействия этих факторов после проведения схожего анализа с зависимой переменной “время реакции” ($F(1, 31) = 1.98$; $p = 0.169$). В этом случае вновь значимым оказался фактор ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ ($F(1, 31) = 4.32$; $p = 0.037$, $\eta^2 = 0.132$): нахождение плодов с уникальными названиями осуществлялось быстрее (1483 ± 289), чем плодов с общими названиями (1560 ± 293). Причем поиск плодов с уникальными названиями, с которыми испытуемые знакомились в условии FM (1406 ± 281), осуществлялся быстрее ($t(31) = -2.67$; $p = 0.011$), чем поиск этих же плодов с общими названиями (1541 ± 348.4), тогда как для EE-стратегии по данному параметру различий не было обнаружено ($t(31) = -0.45$; $p = 0.656$) (рис. 5). При этом фактор СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ оказался значим лишь на уровне статистической тенденции ($F(1, 31) = 4.32$; $p = 0.058$).

И, наконец, было выявлено значимое взаимодействие факторов СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ \times ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ для зависимой переменной “латентная моторная реакция” (т.е. время от начала последней фиксации взгляда в области расположения целевого объекта до правильного ответа) ($F(1, 31) = 7.45$; $p = 0.010$, $\eta^2 = 0.194$). Полученный результат представлен на рис. 6. В случае с объектами, изученными в условиях FM с уникальными названиями, время латентной моторной реакции было больше, чем в этом же условии с общими названиями ($277 \pm 56 > 247 \pm 59$; $t(31) = -2.65$; $p = 0.012$), а в случае с объектами, изученными в условиях EE, наблюдалась противоположная тенденция, которая, однако, не достигла значимости ($t(31) = -1.60$; $p = 0.119$). Факторы СТРАТЕГИЯ НАУЧЕНИЯ ($F(1, 31) = 0.126$; $p = 0.725$) и ВЕРБАЛЬНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ ($F(1, 31) = 0.071$; $p = 0.791$) сами по себе оказались не значимыми.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно полученным данным, усвоение новых понятий происходило при использовании обеих стратегий (для FM – после четвертого предъявления нового объекта, для EE – после пятого). Интересно, что большая скорость научения наблюдалась в условии FM по сравнению с EE независимо от наличия или отсутствия уникального вербального обозначения. В предыдущих исследованиях чаще всего данные стратегии сравнивались на ос-

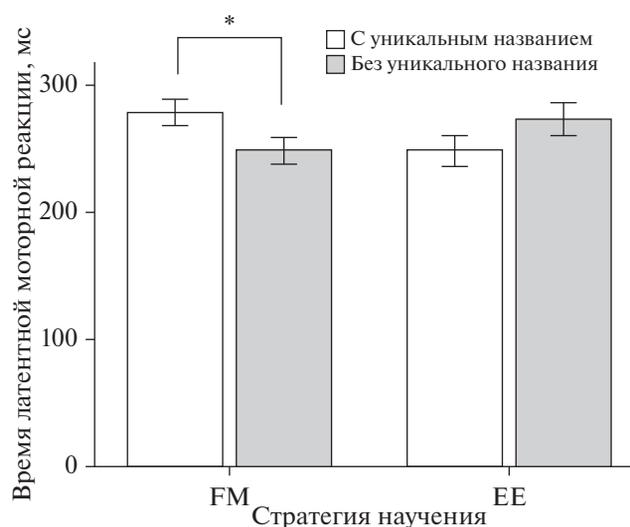


Рис. 6. Время латентной моторной реакции при поиске плодов, с которыми испытуемые знакомились в условии FM и EE, с уникальными названиями и без таковых. На графике отражено среднее время реакции и ошибка среднего, * – уровень статистической значимости различий < 0.05 .

Fig. 6. The motor reaction latency in the search task for fruits learned with and without labels in the FM and EE condition. The graphs show the reaction time and the error of the mean. * – $p < 0.05$.

новании правильных ответов и времени реакции в проверочных заданиях (Coutanche, Thompson-Schill, 2014; Cooper et al., 2019; Chen et al., 2022 и др.). В нашем эксперименте мы проанализировали скорость ответов испытуемых на вопросы, звучащие в процессе обучения, что является несколько иным подходом к изучению эффективности усвоения информации, получаемой с помощью FM- и EE-стратегий. Данный подход чаще используется в ситуации, когда предметом изучения становятся дополнительные факторы в условиях научения. Так, например, в исследовании С. Ли с коллегами (2020) с помощью анализа времени реакции изучалось влияние предыдущих знаний респондентов на обучение в условиях FM и EE. Участников просили запомнить ассоциации между новыми картинками и названиями. Половина из них была из знакомых ранее респондентам категорий, а другая половина – из незнакомых. Было выявлено, что в условии FM участники выполнили задание на запоминание ассоциаций лучше для знакомых категорий, чем для незнакомых, и в этом же случае быстрее реагировали. Возможно, полученные нами данные обусловлены спецификой нейронной динамики изучаемых стратегий, которая была выявлена нами ранее во взаимосвязи с успешностью усвоения новых слов: для FM она была характерна на раннем этапе обработки информации, для

EE – на более позднем (Shtyrov et al., 2022). О высокой скорости усвоения слов посредством FM-стратегии свидетельствуют и другие исследования. Например, в работе М.В. Васильева с коллегами (2019) была показана интеграция новых ассоциаций в неокортикальные лексико-семантические сети у взрослых уже после однократного предъявления ассоциации слова и объекта.

Альтернативное объяснение различий успешности усвоения информации с помощью двух стратегий научения может быть связано со спецификой разработанной нами экспериментальной парадигмы. В частности, для создания FM-условия контекстное обучение предполагало структуру одного вопросительного предложения, в то время как для EE-условия испытуемым предлагались по два контекстных предложения, предполагающие указание на объект и вопрос о нем. Такая структура представления информации может требовать от испытуемых больших усилий при ее обработке в EE-условии (и, соответственно, замедлять ее усвоение) в сравнении с FM-условием. Другой инновационной особенностью обучающей сессии в данном исследовании стало наличие вопросов, требующих явного вывода о внешних характеристиках объекта в двух условиях научения. Насколько нам известно, это первое исследование с такой структурой научения, которое

целенаправленно уравнивает два условия по своей сложности для испытуемых. Однако использование явного вывода в ЕЕ-условии может смещать внимание испытуемых к анализу деталей нового объекта, делая его более близким по структуре обработки информации с FM-условием. Тем не менее для подтверждения выдвинутых предположений и проверки выявленной в нашем исследовании тенденции нужны дальнейшие исследования, в том числе с анализом параметров активности нейронной динамики в процессе научения.

В результате проведенного эксперимента найдено подтверждение теории лингвистической относительности о значимости уникальных вербальных обозначений объектов для их распознавания. Наши результаты показывают не только доказанную ранее значимость используемых в языке названий (Wipawer et al., 2007; Ting Siok et al., 2009), но и важную роль впервые воспринятых индивидом псевдослов в качестве обозначений новых объектов. В реализованном эксперименте эффективность зрительного поиска новых объектов возрастала при наличии уникальных названий как у самих целевых объектов, так и у дистракторов, среди которых осуществлялся поиск. Это в некотором смысле согласуется с результатами, полученными С. Vales и L.B. Smith (2015): в задании на зрительный поиск целевые объекты, которым были даны уникальные названия, находились быстрее. В данном эксперименте названия сопровождали образ объекта (изображение), который нужно было впоследствии отыскать среди других объектов (похожее задание было использовано в работах Forder, Luayan, 2019 и Souza et al., 2021), в нашем же исследовании вербальное обозначение присутствовало только в процессе обучения (но не в задании на зрительный поиск). Это может говорить о том, что наличие названия играет важную роль на этапе кодирования информации об объекте, а не только в момент его восприятия для решения задачи распознавания.

Вопреки нашему предположению о большей значимости вербального обозначения для ЕЕ в сравнении с FM, полученные результаты говорят об обратном — более важно наличие названий у объектов, изучаемых с помощью FM-стратегии: зрительный поиск именно этих объектов ускорялся при наличии у них уникальных названий. Однако для

этих же плодов (FM с уникальными названиями) возрастало и латентное время моторной реакции после фиксации взгляда на целевом объекте. Это может быть объяснено в рамках предположения Т. Medina с коллегами (2011) и J. Trueswell с коллегами (2013), согласно которому FM-стратегия, в основе которой лежит принцип дизъюнктивного силлогизма (Repnik, 2021), подразумевает выдвижение гипотезы о значении слова при первом столкновении с ним. При следующих встречах с этим объектом данная гипотеза проверяется в новом контексте, что делает ассоциацию вербального обозначения с его визуальным референтом менее устойчивой в сравнении с ЕЕ-стратегией и побуждает испытуемых больше опираться на название. В результате при использовании FM-стратегии идентификация объектов с уникальными названиями вызывает больше трудностей, побуждая испытуемых совершать дополнительную процедуру контроля. Такой контроль выражается в более длительном времени обработки информации с момента фиксации взгляда на этих объектах до моторной реакции. При актуализации стратегии “сопоставления новизны с новизной”, задействованной в ЕЕ-условии, уникальное название оказывается, вероятно, более устойчиво связано с визуальным референтом и не требует дополнительной верификации при распознавании. Высказанная идея будет проверяться в будущих исследованиях.

Кроме того, предположение, согласно которому в условии ЕЕ внимание индивида в большей мере сконцентрировано на вербальном обозначении объекта, чем на его признаках, а при FM — наоборот, также требует дальнейшей проверки с помощью иных тестовых заданий. Задание на зрительный поиск не дало возможности удостовериться, что выбор целевых объектов совершается на основе лучшего запоминания их индивидуальных характеристик или же подсказки в виде названия. В связи с этим для проверки выдвинутого предположения нужны более чувствительные тесты, например, свободное воспроизведение индивидуальных признаков объектов, изученных с помощью той или иной стратегии с использованием названий и без них.

Результат о большей значимости вербального обозначения у объекта для FM-стратегии также интересно рассмотреть в сравнении с исследованием D.E. Warren и коллег (2016). В данном эксперименте окулограф использовался на этапе научения с помощью

FM-стратегии, что позволило выявить значимые различия во времени фиксации взгляда на целевом стимуле до и после звучания его вербального обозначения. Это подчеркивает важность наличия уникального названия у объекта в FM-условии. Испытуемым также было предложено задание на распознавание (с принудительным выбором из трех альтернатив), которое заключалось в следующем: одновременно предъявлялись три изученных новых объекта и звучала инструкция “Нажмите на ...”, за которой следовало название одного из объектов. В процессе выполнения данного задания не было обнаружено различий во времени фиксации взгляда на объектах, изученных с помощью FM- и ЕЕ-стратегий. И вновь отличие данного задания на распознавание от используемого в нашем исследовании заключается в предъявлении уникального названия целевого объекта в момент поиска. Можно предположить, что наличие названия могло облегчить задачу соотнесения, направляя зрительное внимание с помощью такой подсказки на целевой объект, что позволило находить объекты одинаково эффективно, независимо от того, в каком условии они изучались (т.е. подсказка нивелировала эффект условия). В проведенном нами исследовании такая подсказка в момент зрительного поиска не давалась, и испытуемым нужно было опираться только на визуальный образ объекта и память о том, имеет ли он уникальное название или нет. На наш взгляд, это позволило избежать влияния дополнительных переменных на результат выполнения задания, что проявилось в появлении различий в значимости вербального обозначения между условиями научения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментального исследования показывают положительное влияние вербального обозначения на усвоение информации о новых объектах. При этом наличие уникальных названий у объектов оказалось более значимым для их поиска среди дистракторов, если сами объекты были изучены с помощью стратегии FM в сравнении с ЕЕ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-28-01040, <https://rscf.ru/project/22-28-01040>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Р.В. Чернову, Д.Ю. Чопчик, А.Р. Гемзюк, А.В. Косяковой за помощь в разработке дизайна исследования и сборе данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гнедых Д.С., Филиппова М.Г., Макарова Д.Н., Перикова Е.И.* Проблемы и перспективы исследований научения новым словам: быстрое картирование vs явное кодирование. Вестник СПбГУ. Психология. 2022. 12 (4): 527–543.
- Котов А.А., Котова Т.Н.* Произношение имен объектов и категориальный эффект восприятия. Психология. Журнал ВШЭ. 2013. 10 (3): 75–85.
- Котов А.А., Жерждева М.Р.* Влияние легкости наименования пространственных признаков на научение новым правилам категоризации. Психология. Журн. ВШЭ. 2020. 17 (1): 145–155.
- Походай М.Ю., Бермудес-Маргаретто Б., Штыров Ю.Ю., Мячиков А.В.* Методика айтрекинга в психолингвистике и параллельная регистрация с ЭЭГ. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П.Павлова. 2022. 72 (5): 609–622.
- Щербакова О.В., Курсанов А.С., Филиппова М.Г., Перикова Е.И., Благовещенский Е.Д., Штыров Ю.Ю.* Эксплицитное и имплицитное усвоение новых слов: поведенческие корреляты и нейрофизиологические механизмы. Щербакова О.В. От слова – к репрезентации. Нейрокогнитивные основы вербального научения. СПб.: Скифия-принт, 2022. С. 22–96.
- Atir-Sharon T., Gilboa A., Hazan H., Koilis E., Manevitz L.M.* Decoding the formation of new semantics: MVPA investigation of rapid neocortical plasticity during associative encoding through fast mapping. Neural Plast. 2015. 804385.
- Axelsson E.L., Swinton J., Jiang I.Y., Parker E.V., Horst J.S.* Prior Exposure and Toddlers' Sleep-Related Memory for Novel Words. Brain Sci. 2021. 11 (10): 1366.
- Cesana-Arlotti N.* Precursors of logical reasoning in preverbal human infants Science. 2018. 359 (6381): 1263–1266.
- Chen S., Wang Y., Yan W.* More Stable Memory Retention of Novel Words Learned from Fast Mapping than from Explicit Encoding. J Psycholinguist Res. 2022.
- Chung H., Yim D.* Quick Incidental Learning of Words by Children with and without Specific Language Impairment: An Eye-tracking Study. Commun Sci Disord. 2020. 25 (3): 499–516.
- Cooper E., Greve A., Henson R.N.* Investigating fast mapping task components: No evidence for the role of semantic referent nor semantic inference in healthy adults. Front. Psychol. 2019. 10: 394.

- Coutanche M.N., Thompson-Schill S.L.* Fast mapping rapidly integrates information into existing memory networks. *J. Exp. Psychol.* 2014. 143 (6): 2296–2303.
- Ellis E.M., Borovsky A., Elman J.L., Evans J.L.* Novel word learning: An eye-tracking study. Are 18-month-old late talkers really different from their typical peers? *J. Commun. Disord.* 2015. 58: 143–157.
- Feiman R., Mody Sh., Carey S.* The development of reasoning by exclusion in infancy. *Cogn. Psychol.* 2022. 135: 101473.
- Forder L., Lupyan G.* Hearing words changes color perception: Facilitation of color discrimination by verbal and visual cues. *J Exp Psychol Gen.* 2019. 148 (7): 1105.
- Greve A., Cooper E., Henson R.N.* No evidence that “fast-mapping” benefits novel learning in healthy older adults. *Neuropsychologia.* 2014. 60: 52–59.
- Grigoroglou M., Chan S., Ganea P.A.* Toddlers’ understanding and use of verbal negation in inferential reasoning search tasks. *J. Exp. Child Psychol.* 2019. 183: 222–241.
- Halberda J.* Is this a dax which I see before me? Use of the logical argument disjunctive syllogism supports word-learning in children and adults. *Cogn Psychol.* 2006. 53 (4): 310–344.
- Hill A., Collier-Baker E., Suddendorf T.* Inferential reasoning by exclusion in children (*Homo sapiens*). *J. Comp. Psychol.* 2012. 126 (3): 243–254.
- Li C., Hu Z., Yang J.* Rapid acquisition through fast mapping: stable memory over time and role of prior knowledge. *Learning & Memory.* 2020. 27 (5): 177–189.
- Mason R.S., Bass L.A.* Just Ask Me Again: An Analysis of Receptive Vocabulary Performance of Children from Low-Income Environments. *EE & D.* 2020. 31 (6): 910–926.
- Medina T.N., Snedeker J., Trueswell J.C., Gleitman L.R.* How words can and cannot be learned by observation. *PNAS.* 2011. 108 (22): 9014–9019.
- Merhav M., Karni A., Gilboa A.* Not all declarative memories are created equal: Fast mapping as a direct route to cortical declarative representations. *NeuroImage.* 2015. 117: P. 80–92.
- Mervis C.B., Bertrand J.* Acquisition of the Novel Name-Nameless Category (N3C) Principle. *Child Development.* 1994. 65 (6): 1646.
- Mody S., Carey S.* The emergence of reasoning by the disjunctive syllogism in early childhood. *Cognition.* 2016. 154: 40–48.
- Morozov M.I.* How the strength of the link between an object and its category label influences visual search performance. *The Russian J Cogn Sci.* 2017. 4 (4): 22–28.
- Perikova E., Blagovechtchenski E., Filippova M., Shcherbakova O., Kirsanov A., Shtyrov Y.* Anodal tDCS over Broca’s area improves fast mapping and explicit encoding of novel vocabulary. *Neuropsychologia.* 2022. 168: 108156.
- Repnik K.R.* Not this, but that.’ Exploring disambiguation in the context of multilingual word learning, 2021. PhD thesis. 240 p. <https://era.ed.ac.uk/bitstream/handle/1842/37808/Repnik2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Shtyrov Y., Filippova M., Blagovechtchenski E., Kirsanov A., Nikiforova E., Shcherbakova O.* Electrophysiological evidence of dissociation between explicit encoding and fast mapping of novel spoken words. *Front. Psychol.* 2021. 12: 571673.
- Shtyrov Y., Filippova M., Perikova E., Kirsanov A., Shcherbakova O., Blagovechtchenski E.* Explicit encoding vs. fast mapping of novel spoken words: Electrophysiological and behavioural evidence of diverging mechanisms. *Neuropsychologia.* 2022. 172: 108268.
- Souza A.S., Overkott C., Matyja M.* Categorical distinctiveness constrains the labeling benefit in visual working memory. *J Mem Lang.* 2021. 119: 104242.
- Ting Siok W., Kay P., Wang W.S.Y., Chan A.H.D., Chen L., Luke K.-K., Hai Tan L.* Language regions of brain are operative in color perception. *PNAS.* 2009. 106 (20): 8140–8145.
- Trueswell J.C., Medina T.N., Hafri A., Gleitman L.R.* Propose but verify: Fast mapping meets cross-situational word learning. *Cogn Psychol.* 2013. 66 (1): 126–156.
- Vales C., Smith L.B.* Words, shape, visual search and visual working memory in 3-year-old children. *Developmental Science.* 2015. 18 (1): 65–79.
- Vasilyeva M.J., Knyazeva V.M., Aleksandrov A.A., Shtyrov Y.* Neurophysiological correlates of fast mapping of novel words in the adult brain. *Frontiers in Human Neuroscience.* 2019. 13 (304).
- Warren D.E., Duff M.C.* Not so fast: Hippocampal amnesia slows word learning despite successful fast mapping. *Hippocampus.* 2014. 24 (8): 920–953.
- Warren D.E., Tranel D., Duff M.C.* Impaired acquisition of new words after left temporal lobectomy despite normal fast-mapping behavior. *Neuropsychologia.* 2016. 80: 165–175.
- Winawer J., Witthoft N., Frank M.C., Wu L., Wade A.R., Boroditsky L.* Russian blues reveal effects of language on color discrimination. *PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. 104 (19): 7780–7785.
- Wochna K.L., Juhasz B.J.* Context length and reading novel words: an eye-movement investigation. *Br. J. Psychol.* 2013. 104 (3): 347–363.

THE LABELING BENEFIT IN FAST MAPPING AND EXPLICIT ENCODING**E. I. Perikova^{a, #}, M. G. Filippova^{a, b}, D. N. Makarova^a, and D. S. Gnedykh^a**^a*St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*^b*Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*[#]*e-mail: e.perikova@spbu.ru*

The aim of this study was exploring the role of labels in acquisition of information about new objects depending on the learning strategy. In order to reach this aim we investigated efficiency of identification of new objects presented through fast mapping or explicit encoding taking into consideration eye movement patterns. 32 subjects were presented with 8 new fruits 8 times each. The images were accompanied with unique audial labels in 50% of the cases. Visual search of the target image among distractors was used as an assessment task. The results showed that fast mapping speeded learning of information about new objects compared to explicit encoding. We found positive impact of unique labels of new fruits on the results of visual search task. This impact was stronger for fast mapping compared to explicit encoding.

Keywords: language acquisition, new word learning, labelling, fast mapping, explicit encoding, eye-tracker

**ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ (КОГНИТИВНОЙ)
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА**

УДК 612.821.2+159.91+159.931

**ПРОДЛЕНИЕ МОЗГОВОЙ АКТИВАЦИИ В ОТВЕТ НА СТИМУЛ
КАК ВЕРОЯТНЫЙ МЕХАНИЗМ АССОЦИАТИВНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ
ПРИ СЕМАНТИЧЕСКОМ НАУЧЕНИИ**

© 2023 г. **Б. В. Чернышев^{1, 2, *}, А. А. Павлова^{1, 3}, А. М. Рытикова¹,
А. В. Буторина^{1, 4}, Т. А. Строганова¹**

¹Центр нейрокognитивных исследований (МЭГ-центр),
Московский государственный психолого-педагогический университет, Москва, Россия

²Кафедра высшей нервной деятельности,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Департамент психологии, Национальный исследовательский университет
Высшая школа экономики, Москва, Россия

⁴Центр нейробиологии и нейрореабилитации, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

*e-mail: b_chernysh@mail.ru

Поступила в редакцию 23.06.2023 г.

После доработки 28.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Считается, что запоминание смысла новых слов речи происходит благодаря ассоциативному обучению. Например, именно так слова, обозначающие движения, могут сопоставляться с соответствующими моторными актами. Известно, что синаптическая пластичность в мозге развивается при условии совпадения во времени активности клеточных ансамблей, репрезентирующих ассоциируемые события. Однако в реальности при выработке подобных ассоциаций возможен значительный разрыв во времени между ассоциируемыми событиями, нарушающий условия возникновения синаптической пластичности. Мы предположили, что необходимые условия для развития синаптической пластичности в мозге могут создаваться благодаря тому, что активность нейронных репрезентаций продлевается во времени, и тем самым обеспечивается требуемое перекрытие во времени на уровне нейронных ансамблей. Чтобы проверить это предположение, мы регистрировали магнитоэнцефалограмму у добровольных участников во время выработки ассоциаций между псевдословами и движениями четырьмя конечностями. Результаты исследования показывают, что при выработке новых ассоциаций действительно происходит значимое удлинение слухоречевой активации, вызванной стимулом. Таким образом, во время выработки ассоциации в мозге действительно могут создаваться условия для развития Хеббовской пластичности, даже если ассоциируемые события разнесены во времени.

Ключевые слова: ассоциативное обучение, обучение с подкреплением, память, слова связанные с действиями, вызванные поля, магнитоэнцефалография

DOI: 10.31857/S0044467723060035, **EDN:** BBRFDQ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время предполагается, что запоминание новых слов речи основано на нейробиологических механизмах ассоциативного обучения (Barsalou, 2003; Pulvermüller, 2005, 2018), т.е. при обучении смыслу слов развиваются процессы синаптической пластичности, связывающие две репрезентации. Например, в случае обучения смыслу слов, обозначающих движения, это может

быть ассоциирование звучащего слова с выполнением физического движения. Если соответствующие популяции нейронов в слуховой и моторной областях активируются одновременно, то это может приводить к усилению синаптических связей и формированию распределенных клеточных ансамблей (Hebb, 1949). После развития таких пластических перестроек изолированное предьявление

ние слухового стимула начинает активировать обе популяции нейронов.

Косвенным доказательством применимости принципа Хеббовского обучения к человеческой речи послужили результаты нейровизуализации ассоциативной реактивации в слуховых и соматотопически организованных моторных областях коры головного мозга, вызванной слуховыми предъявлениями слов, обозначающих действия (см., например, Shtyrov et al., 2014). Кроме того, реализация данного принципа была подтверждена вычислительным моделированием обучения словам, обозначающим действия (Tomasello et al., 2017). Однако в этих исследованиях использовались реальные слова языка, которые были хорошо знакомы участнику эксперимента, а исследований ассоциативной пластичности, формирующейся непосредственно в ходе эксперимента при установлении новой ассоциации между слуховыми псевдословами и конкретными действиями, в литературе крайне мало (см. обзор Разоренова et al., 2020).

Более того, насколько нам известно, ни в одном из этих исследований не рассматривались изменения в нейронной активности в условиях, когда ассоциируемые события разнесены во времени (например, Naya et al., 2003). Между тем такие исследования могли бы прояснить нерешенные вопросы относительно предполагаемых механизмов ассоциативного обучения словам, которые основываются на временных корреляциях между слуховым предъявлением слов и моторными действиями.

Слабым местом упомянутых выше современных представлений об ассоциативной природе механизма установления соответствий между словами и действиями как раз является то допущение, что слуховая активация, вызванная соответствующим словом-действием, и моторные команды в моторной коре происходят практически одновременно (см., например, Pulvermüller, 2018). Однако в естественной среде при подобном обучении слово и ассоциируемое с ним действие могут не совпадать во времени — с расхождением до нескольких секунд или более — что заведомо больше допустимого для формирования Хеббовской пластичности. Таким образом, чтобы объяснить обучение словам, обозначающим действия, через ассоциативную синаптическую пластичность, необходимо понять нейрофизиологические механизмы, которые позволяют синаптической пластичности раз-

виваться несмотря на такое существенное расхождение ассоциируемых событий во времени.

Один из подходов к решению этой проблемы заключается в предположении, что в процессе выработки ассоциации между словом и действием новые слова начинают вызывать более длительные слуховые ответы, позволяющие обеспечить совпадение во времени с моментом инициации соответствующей моторной команды. Со времен идеи Д. Хебба (Hebb, 1949), выдвинутой более 50 лет назад, существует гипотеза, что активность поддерживается за счет синаптической реверберации в рекуррентных цепочках связей между нейронами (Shu et al., 2003).

Эта возможность была подтверждена работами с регистрацией активности одиночных нейронов на обезьянах, в которых действительно удалось продемонстрировать устойчивое возбуждение в нейронах височных областей коры во время выполнения задачи на удержание зрительного образа в кратковременной памяти (Miyashita, Chang, 1988). В этот процесс могут вовлекаться нисходящие пути из лобной коры, которые иницируют ретроспективное удержание сенсорной репрезентации, релевантной в рамках текущей задачи. Роль префронтальной коры в предвосхищении событий и их интеграции во времени хорошо описана в исследованиях на обезьянах (Funahashi et al., 1989; Fuster, Bressler, 2015; Quintana, Fuster, 1999). Это позволяет ожидать, что активность слуховой коры в мозге человека будет возрастать в процессе формирования слухо-моторной ассоциации одновременно с выработкой правила, связывающего предъявляемые слуховые стимулы с соответствующими моторными ответами.

Такая гипотеза ретроспективной активации позволяет предсказать, что длительность нейронного ответа, вызванного предъявлениями нового слова, для которого вырабатывается ассоциация с определенным действием, должна увеличиваться по мере формирования такой ассоциации. Таким образом, можно предположить, что в процессе обучения будет происходить усиление и удлинение слухоречевой активации в височных областях.

В данном исследовании с помощью магнитоэнцефалографии (МЭГ) мы изучили вопрос, ведет ли активное формирование ассоциации между псевдословами и действиями к

соответствующим изменениям мозговой активности после предъявления слухового стимула.

Наше недавнее исследование с помощью МЭГ у взрослых людей позволило изучить быстрое формирование ассоциации между псевдословами и действиями, происходящее непосредственно в ходе эксперимента (Razorenova et al., 2020). Мы показали, что пассивное прослушивание псевдослов, ранее ассоциированных с определенными двигательными действиями, вызывает специфическую дифференциальную активацию мозга в слуховых и других речевых областях левого полушария, по сравнению с аналогичными псевдословами, предъявлявшимися такое же количество раз, но без выработки ассоциации с действиями (Razorenova et al., 2020). Возникновение таких различий в нейронном ответе доказывает, что активное обучение ассоциации приводит к развитию быстрой кортикальной пластичности в слуховой коре взрослого человека; данный результат явился необходимой предпосылкой для проведения настоящего исследования.

Настоящая работа направлена на то, чтобы исследовать непосредственно процесс обучения, который может обеспечивать возможность обнаруженной нами пластичности; поэтому в настоящей работе мы анализировали фазы активного обучения и выполнения в том же эксперименте (Razorenova et al., 2020). Участникам экспериментов предъявляли набор из восьми псевдослов, ассоциируемых и не ассоциируемых с действием в ходе эксперимента; связь этих псевдослов с движением различных частей тела или бездействием постепенно устанавливалась участниками путем обучения методом проб и ошибок. Мозговую активность сравнивали между ранней и продвинутой стадиями ассоциативного обучения. Мы ожидали, что будет наблюдаться усиление и продление активации, вызванной слуховым стимулом, на продвинутой стадии обучения по сравнению с ранней стадией.

МЕТОДИКА

Участники эксперимента

Двадцать девять участников, для которых русский язык является родным, правши, добровольно приняли участие в исследовании (средний возраст 24.7 года, диапазон 19–33 года, 18 мужчин). Все участники имели нормальный слух и не страдали от неврологи-

ческих или психиатрических расстройств. Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами проведения экспериментов на человеке (Хельсинкская декларация) и было одобрено Этическим комитетом Московского государственного психолого-педагогического университета. Все участники подписали информированное согласие перед началом эксперимента.

Стимулы и процедура эксперимента

Слуховые стимулы (псевдослова) были разработаны таким образом, чтобы их акустические и фонетические свойства были уравновешены (подробное описание см. в Razorenova et al., 2020). Мы использовали слоги, составленные из одной согласной и одной гласной (CV), и составили из них восемь двуслоговых ($C_1V_1C_2V_2$) бессмысленных псевдослов. Во время процедуры ассоциативного обучения четыре из этих слов-стимулов ассоциировались с уникальным действием, выполняемым одной из четырех конечностей тела (псевдослова, связанные с движением, ДВ) – т.е., собственно, “слова”, приобретающие смысл), а остальные четыре обозначали отсутствие двигательной реакции (псевдослова, не связанные с движением, НДВ).

В псевдословах, созданных для настоящего эксперимента, первые две фонемы (C_1V_1) образуют слог “хи” [$x^i i$], который был идентичен для всех использованных псевдослов. Следующие две фонемы (C_2 и V_2) были сбалансированы между стимулами ДВ и НДВ таким образом, чтобы обеспечить полное совпадение акустических и фонетических характеристик между двумя типами стимулов (таблица 1). Третья фонема (C_2), согласные “ч” [$tʃ$], “ш” [$ʃ$], “с” [s], “в” [v], встречались как в ДВ, так и в НДВ стимулах и сигнализировали о том, какую конечность испытуемый должен использовать (правую руку, левую руку, правую ногу или левую ногу). Четвертая фонема (V_2 : гласная “а” [a] или “у” [u]) была уравновешена между условиями ДВ и НДВ. Таким образом, только четвертая фонема позволяла однозначно распознать все псевдослова. Ее начало в дальнейшем будет называться “точкой дизамбигуации” (рис. 1 (в)).

Как видно из табл. 1, фонетический состав стимулов и сопоставление стимула с реакцией соответствовали полному внутрисубъектному плану контрбалансировки в отношении третьей и четвертой фонем, а также в отноше-

Таблица 1. Соответствие между стимулами и поведенческими ответами в экспериментальной ассоциативной задаче
Table 1. Correspondence between stimuli and behavioral responses in the experimental associative task

Псевдослова, ассоциируемые с движением (ДВ)		Псевдослова, не ассоциируемые с движением (НДВ)	
псевдослово	движение	псевдослово	движение
<i>xícha</i>	Левой рукой	<i>xíчу</i>	Без движения
<i>xíшу</i>	Левой ногой	<i>xíша</i>	Без движения
<i>xíса</i>	Правой ногой	<i>xíсу</i>	Без движения
<i>xíву</i>	Правой рукой	<i>xíва</i>	Без движения

нии движений левыми/правыми и верхними/нижними конечностями.

Все стимулы были записаны в цифровом формате женским голосом носителем русского языка в звукоизолированной кабине.

Все псевдослова произносились с ударением на первый гласный “и”. Амплитуда звукозаписей была выровнена по максимальной мощности. Кросс-склейка и нормализация записанных стимулов проводилась с помо-

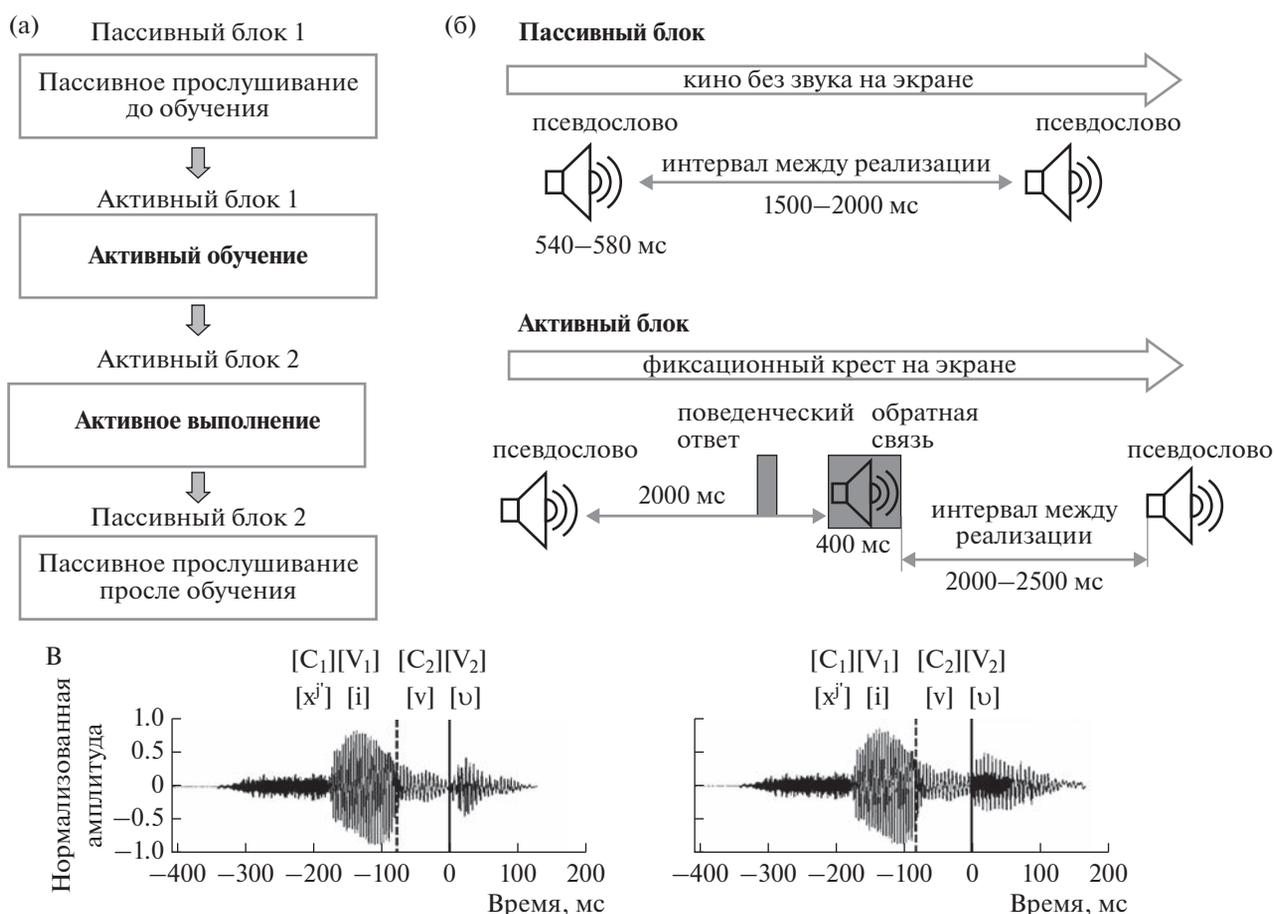


Рис. 1. Процедура эксперимента. (а) – Последовательность экспериментальных блоков. (б) – Временная структура пассивных и активных экспериментальных блоков. (в) – Примеры псевдослов, использовавшихся в качестве стимулов в эксперименте (“хиву” и “хива”, слева и справа соответственно). Нулевое значение на временной шкале и вертикальная сплошная линия обозначают начало четвертой фонемы (точка дизамбигуации псевдослов); вертикальная пунктирная линия обозначает начало третьей фонемы.

Fig. 1. Experimental procedure. (a) – Sequence of experimental blocks. (б) – Temporal structure of passive and active experimental blocks. (в) – Examples of pseudoword stimuli used in the experiment (“hivu” and “hiva”, on the left and right, respectively). Zero value on the timeline and a vertical solid line denote the beginning of the fourth phoneme (point of disambiguation of the pseudowords); a vertical dotted line denotes the onset of the third phoneme.

щью программы Adobe Audition CS6.5. Средняя продолжительность псевдослова составляла около 530 мс.

В качестве сигналов положительной и отрицательной обратной связи использовали два неречевых звука, длительностью около 400 мс каждый.

Двигательные ответы, выполняемые руками, регистрировали с помощью кнопок (пакет 932, CurrentDesigns, США), на которые участники эксперимента нажимали большими пальцами правой или левой руки, а движения ног регистрировали с помощью педалей, нажимаемых носками правой или левой ноги (табл. 1). Ответы, записанные с педалей и кнопок, автоматически маркировались как “правильные” или “ошибочные” после каждой реализации в соответствии с правилами задачи (см. ниже).

В течение всего эксперимента участники удобно сидели в кресле в аппарате МЭГ в экранированной комнате (см. ниже). Псевдослова предъявляли бинаурально через пластиковые ушные трубки в чередующемся квазислучайном порядке, при уровне громкости 60 дБ УЗД. Эксперимент проводился с использованием программного обеспечения Presentation 14.4 (Neurobehavioral systems, Inc., Albany, CA, США).

Эксперимент состоял из четырех блоков: (1) пассивное прослушивание до обучения, (2) активное обучение, (3) активное выполнение и (4) пассивное прослушивание после обучения (рис. 1 (а)). Весь эксперимент длился около 2 ч. В настоящей работе мы проанализировали данные по двум активным блокам (результаты по пассивным блокам были представлены ранее в Razogenova et al., 2020).

После завершения первого пассивного блока участникам зачитывали инструкцию, что во время следующих активных блоков они должны установить однозначную ассоциацию между каждым из представленных восьми псевдослов и движениями своих собственных рук и ног. Для этого они должны либо ответить на каждое псевдослово, используя одну из четырех конечностей тела, либо воздержаться от двигательного ответа. После этого они прослушивали сигналы положительной и отрицательной обратной связи, сообщавшие им о правильности или ошибочности действия. Данная поведенческая процедура предполагала перебор участниками различных движений и, в конечном итоге,

выбор тех, которые приводили к положительному подкреплению, что соответствует оперантному обучению (Neuringer, 2002).

Во время активных блоков участников просили удерживать взгляд на фиксационном кресте в центре экрана, с целью предотвращения артефактов, вызванных движениями глаз. Восемь псевдослов предъявляли в псевдослучайном порядке. Сигнал обратной связи подавали во всех реализациях активных блоков. Положительная обратная связь давалась, если участник выполнял правила задачи, т.е. производил правильное движение на стимул ДВ и не совершал никакого движения на стимул НДВ (табл. 1). Отрицательная обратная связь следовала за тремя видами ошибок: (1) отсутствие ответа на ДВ; (2) двигательный ответ на ДВ, выполненный “неправильной конечностью”; (3) любой ответ на НДВ.

Сигнал обратной связи предъявляли через 2000 мс после окончания псевдослова (рис. 1 (б)). Интервал между реализациями (от окончания стимула обратной связи до начала следующего псевдослова) варьировался случайным образом в пределах от 2000 до 2500 мс.

Количество стимулов в блоке активного обучения зависело от скорости обучения каждого участника: блок заканчивали, если участник достигал критерия обучения или если всего было предъявлено 480 стимулов – в зависимости от того, что наступало раньше. Критерий обучения подразумевал, что участник давал правильные ответы по крайней мере в четырех из пяти последовательных предъявлений каждого из восьми псевдослов. Двое участников не достигли критерия обучения и, таким образом, прошли через все 480 реализаций в блоке обучения. Учитывая, что общий процент правильных ответов во время следующего блока активного выполнения у этих участников был в тех же пределах, что и для остальных, мы не стали исключать их из дальнейшего анализа.

В следующем блоке активного выполнения участникам предлагалось повторить ту же процедуру. Единственное различие между двумя активными блоками заключалось в том, что блок активного выполнения включал фиксированное количество 320 реализаций и длился около 30 мин.

Участникам предлагались короткие перемены между блоками.

Регистрация магнитоэнцефалографических данных

Эксперименты проводили в электромагнитно и акустически экранированной комнате (AK3b, Vacuumschmelze GmbH, Германия). МЭГ регистрировали с помощью dc-SQUID системы Neuromag VectorView (Elekta-Neuromag, Финляндия), которая имеет 306 каналов МЭГ (204 планарных градиентометра и 102 магнитометра). МЭГ-сигналы записывали с полосовым фильтром 0.1–330 Гц, оцифровывали с частотой 1000 Гц и сохраняли для последующего анализа.

Форму головы участников измеряли с помощью системы 3Space Isotrack II System (Fastrak Polhemus, Colchester, США) путем оцифровки трех анатомических опорных точек (назион, левая и правая преаурикулярные точки) и дополнительных случайно распределенных 60–100 точек на коже головы. Положение и ориентация головы постоянно контролировались во время записи МЭГ с помощью четырех НРІ-катушек.

Биологические артефакты и другие источники магнитного поля, возникающие вне головы, удаляли из данных МЭГ с помощью метода временного разделения сигналов и пространства (Temporal Signal-Space Separation Method, tSSS) (Taulu et al., 2005), реализованного в программе MaxFilter (штатное программное обеспечение Elekta Neuromag). Для дальнейшего анализа на уровне сенсоров данные МЭГ преобразовывали в стандартное положение головы ($x = 0$ мм; $y = 0$ мм; $z = 45$ мм).

Коррекцию биологических артефактов (вызванных движениями глаз, морганиями и биениями сердца) проводили на непрерывных данных в программе Brainstorm (Tadel et al., 2011) с использованием алгоритма SSP (Uusitalo, Ilmoniemi, 1997).

Для того чтобы исключить из анализа эпохи (от –500 до 1500 мс относительно начала псевдослова, см. ниже) с мышечными артефактами, мы вычислили средние абсолютные значения сигнала, отфильтрованного выше 60 Гц на каждом канале. Эпохи, в которых максимальные амплитуды на более чем четверти каналов превышали 5 стандартных отклонений от среднего значения по всем каналам, были исключены из анализа.

Поведенческие показатели

Показатели выполнения задачи участниками эксперимента оценивали как (1) среднее количество правильных ответов на четыре псевдослова, ассоциируемые с движениями (ДВ), и четыре псевдослова, которые не были ассоциированы с движениями (НДВ, правильным ответом считалось отсутствие движения), и (2) среднее время реакции при выполнении моторного ответа (ДВ) на псевдослова; оба показателя оценивали отдельно в двух активных блоках, т.е. на ранней и продвинутой стадиях активного обучения (условия РСО и ПСО соответственно) (табл. 2). Для построения кривых обучения мы вычисляли накопленные значения количества правильных ответов в пределах каждого блока как функцию номера реализации в данном блоке (см., например, Gallistel et al., 2004). Наклон такой кривой показывает текущий уровень выполнения задачи. Для визуализации общего хода обучения и асимптотического уровня успеваемости на групповом уровне мы также построили график доли испытуемых, дававших правильные ответы в условиях РСО и ПСО соответственно (рис. 2).

Выбор эпох для анализа

Наша цель состояла в том, чтобы проверить возможность увеличения и продления поздней слуховой активности в ходе активного обучения, и соответственно мы были заинтересованы в сравнении ранних и продвинутых стадий ассоциативного обучения (РСО и ПСО соответственно). Мы извлекали наиболее ранние реализации из активного блока 1 (условие “ранняя стадия обучения”, РСО) и наиболее поздние реализации из активного блока 2 (условие “продвинутая стадия обучения”, ПСО), и делали это отдельно для двух типов реализаций: с моторным ответом (ДВ) и без моторного ответа (НДВ). Для каждого условия мы стремились извлечь до 80 реализаций, если количество свободных от артефактов реализаций было достаточным для этого. Если набиралось менее 40 реализаций хотя бы в одном из условий, то соответствующих участников полностью исключали из дальнейшего анализа; таким образом, данные МЭГ были проанализированы на выборке из 24 участников.

Далее мы выделяли эпохи от –500 до 1500 мс относительно начала псевдослова. Для коррективы базовой линии использовали

Таблица 2. Поведенческие показатели выполнения задачи
Table 2. Behavioral measures of task performance

Поведенческие показатели	Активное обучение (активный блок 1) ¹	Активное выполнение (активный блок 2) ¹	Активное обучение против активного выполнения, тест Стьюдента	
			T(28)	p
Правильные ответы на псевдослова, ассоциируемые с движением (%)	68 ± 9.6	95.6 ± 5.4	-13.2	<0.0001
Правильные ответы (т.е. отсутствие движения) на псевдослова, не ассоциируемые с движением (%)	68.1 ± 7.1	97.2 ± 4.1	-20.2	<0.0001
Правильные ответы в целом (%)	68 ± 6.2	96.4 ± 4	-22.2	<0.0001
Ошибки: неверное движение на псевдослова, ассоциируемые с движением (%)	16.1 ± 5.9	1 ± 1.4	12.5	<0.0001
Ошибки: отсутствие движения на псевдослова, ассоциируемые с движением (%)	15.9 ± 7.1	3.4 ± 5.1	8.0	<0.0001
Ошибки: ложные тревоги на псевдослова, не ассоциируемые с движением (%)	31.9 ± 7.1	2.8 ± 4.1	20.2	<0.0001
Время ответа (мс)	1492.5 ± 101.1	1352.9 ± 116.3	8.4	<0.0001

¹ Приведены средние значения ± стандартные отклонения.

¹ Data are expressed as mean ± SD.

предстимульный интервал от -500 до -50 мс до начала предъявления стимула.

Анализ на уровне сенсоров

Чтобы снизить размер массива данных и объем множественных сравнений, мы вычисляли среднеквадратичные значения вызванных полей (ВП) отдельно для каждой пары градиентометров (далее – комбинированные градиентометры). После такого преобразова-

ния анализ на уровне сенсоров мы проводили на 102 каналах. Для анализа и иллюстрации динамики ВП во времени мы вычисляли среднеквадратичные значения ВП между всеми градиентометрами, получая глобальные среднеквадратичные значения ВП (аналог глобальной мощности поля в ЭЭГ).

Среднеквадратичные значения ВП мы вычисляли по следующей формуле:

$$RMS = \sqrt{\frac{(ch_{-1}^2_{planar1} + ch_{-1}^2_{planar2}) + \dots + (ch_{-n}^2_{planar1} + ch_{-n}^2_{planar2})}{N_{ch}}}, \quad (1)$$

где N_{ch} – количество планарных градиентометров, $ch_{-n_{planar1}}$ и $ch_{-n_{planar2}}$ – значения для планарных градиентометров в ориентациях 1 и 2, n – индекс пары градиентометров.

Среднеквадратичные значения вычисляли последовательно в каждой временной точке, полученную временную динамику представляли на соответствующих графиках. Глобальные среднеквадратичные ВП (т.е. усреднение по всем градиентометрам) строили для всех условий в активных блоках вместе, для каждого условия в активных блоках отдельно, а также дополнительно для первого пассивного блока. Значимость различий между усло-

виями оценивали с помощью двустороннего парного t -теста с поправкой FDR для множественных сравнений на число временных точек.

Для проверки гипотезы об усилении и удлинении активности, связанной со стимулом, на продвинутой стадии обучения, мы искали различия между условиями РСО и ПСО. Мы ожидали, что изменения, вызванные обучением, могут привести к увеличению длительности вызванной стимулом нейронной активации как для ДВ-, так и для НДВ-реализаций, но наиболее сильное продление дифференциального нейронного от-

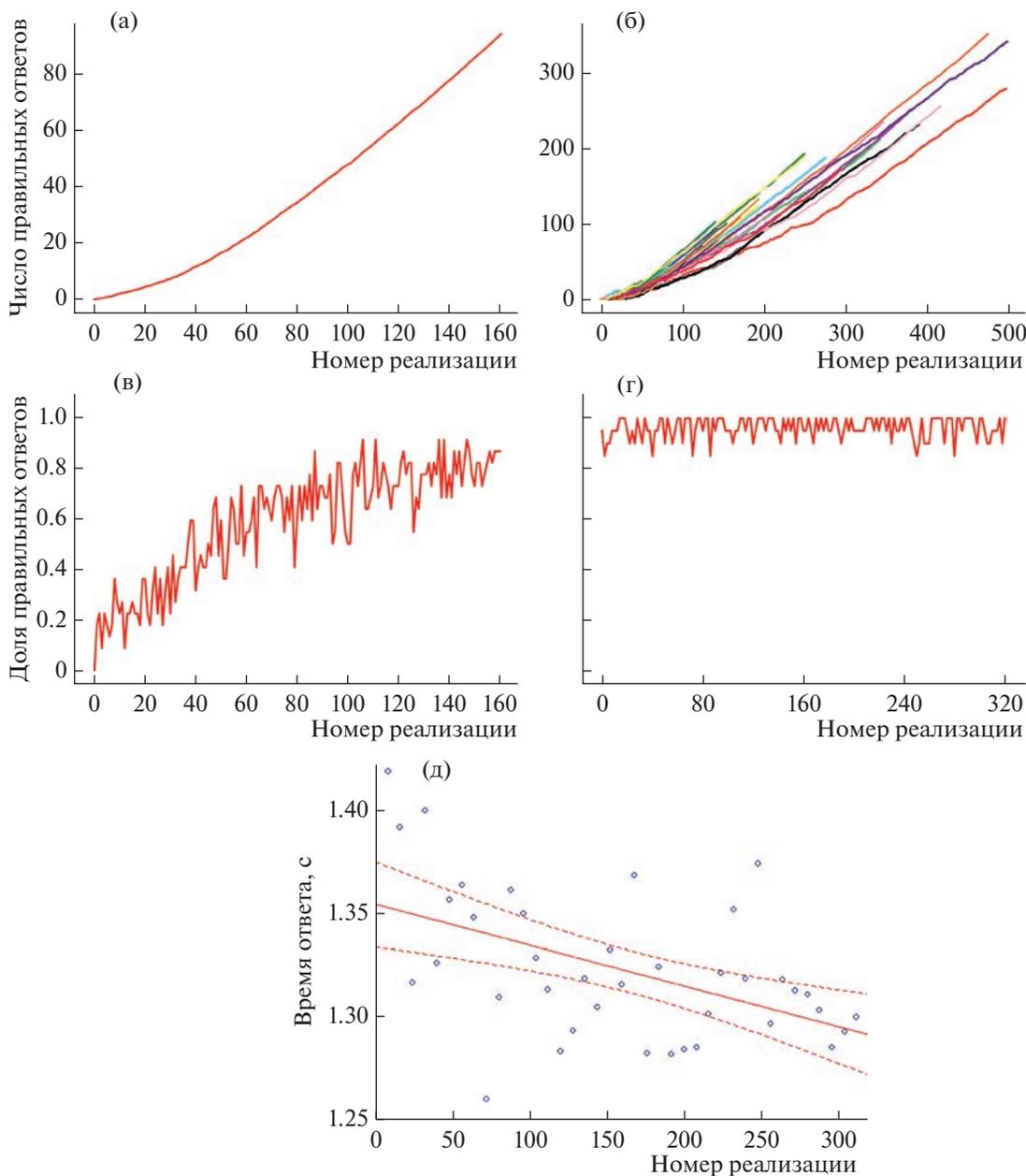


Рис. 2. Выработка ассоциаций между псевдословами и движениями при активном обучении. Верхние панели: кумулятивный уровень выполнения ассоциативной задачи в активном блоке 1, общее среднее (а) и индивидуальные данные каждого из участников эксперимента (б). Здесь и далее на горизонтальной оси отложены номера реализаций (по 40 реализаций от начала активного блока 1 на каждую конечность, и весь активный блок 2). Средние панели: Доля правильных ответов в группе испытуемых, в зависимости от номера реализации в активном блоке 1 (в) и в активном блоке 2 (г). Нижняя панель (д): Диаграмма рассеяния времени реакции в зависимости от номера реализации в активном блоке 2 (каждая точка представляет собой среднее значение времени реакции по 4 последовательным реализациям). Сплошная и пунктирная линии представляют линейную регрессию ($R^2 = -0.26$; $p < 0.001$) и 95-процентный доверительный интервал соответственно.

Fig. 2. Acquisition of the rules for pseudoword-movement association via active learning. Top panels: cumulative performance accuracy in active block 1, grand average (a) and individual data for all participants in the experiment (б). Here and hereafter, the horizontal axis represents trial numbers (40 trials starting from the beginning of the active block 1, for each extremity, and the whole active block 2). Middle panels: Proportion of subjects who made the correct response, as a function of trial number, in active block 1 (в) and in active block 2 (г). Bottom panel (д): Scatterplot of response times as a function of trial number in active block 2 (each dot represents the average of response times across four consecutive trials). Solid and dashed lines represent linear regression ($R^2 = -0.26$; $p < 0.001$) and 95% confidence interval, respectively.

вета должно было наблюдаться для недавно выученных псевдослов, ассоциированных с действием (ДВ).

Чтобы избежать предвзятости, мы выбирали временные интервалы и сенсоры интереса для последующих анализов, не выдвигая никаких априорных предположений, а ориентируясь непосредственно на данные (с учетом необходимых поправок на множественные сравнения), и последовательно выполняли следующие шаги. Сначала мы определили время максимума ВП в ответ на псевдослова независимо от условия: для этого мы усредняли среднеквадратичные значения ВП между всеми комбинированными градиентометрами по всем четырём условиям активных блоков, последовательно в каждой временной точке. Для дальнейшего анализа мы выбрали временной интервал длиной 100 мс, центрированный на выявленном пике ответа — и применяли его для анализа всех условий в активных блоках.

Затем мы искали те комбинированные градиентометры, сигнал от которых, усредненный по описанному выше временному интервалу максимального ответа, был достоверно подвержен влиянию обучения. На всех 102 каналах, отдельно в ДВ- и НДВ-реализациях, мы провели статистическое сравнение между РСО и ПСО. Достоверными считались сенсоры, в которых уровень значимости был ниже 0.05 (с учетом поправки FDR на 102 комбинированных градиентометра). Пространственные кластеры значимых сенсоров определялись как совокупность достоверных сенсоров, расположенных на топографической карте в непосредственной близости друг от друга, и достоверных одновременно как для ДВ-, так и для НДВ-реализаций. Проведенный анализ позволил выделить два кластера комбинированных градиентометров — левый височный и срединный (см. Результаты исследования).

Для дальнейшего пространственно-временного анализа по каждому кластеру мы усредняли среднеквадратичные значения ВП по всем трем комбинированным градиентометрам в пределах каждого кластера. Затем строили графики полученных среднеквадратичных значений ВП и сравнивали их значения в условиях ПСО и РСО между реализациями, включающими моторные ответы на предъявленные псевдослова (ДВ), и реализациями, которые не сопровождалась действиями конечностей (НДВ).

Для визуализации временной динамики на уровне сенсоров были построены топографические карты по 102 комбинированным градиентометрам в реализациях ДВ и НДВ, для ранней и продвинутой стадии обучения, а также топографические карты дифференциальной реакции на обучение для каждого типа реализаций (ПСО ДВ против РСО ДВ; ПСО НДВ против РСО НДВ).

Для статистического анализа ожидаемого дифференциального продления мозгового ответа на выученные псевдослова ДВ по сравнению с псевдословами НДВ использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями. Для этого временной интервал, соответствующий постепенному спаду глобального среднеквадратичного ВП, был разделен на четыре последовательных сегмента (850–1000, 1000–1150, 1150–1300 и 1300–1450 мс после начала стимула). Среднеквадратичные значения ВП, усредненные по каждому временному сегменту для каждого из кластеров, служили зависимой переменной. Факторами анализа были Стадия обучения (РСО и ПСО), Тип реализации (ДВ и НДВ), Топография (левые височные и срединные кластеры) и Время (850–1000, 1000–1150, 1150–1300 и 1300–1450 мс после начала стимула). Число степеней свободы корректировали с помощью поправки Гринхауса-Гейссера. Для оценки различий между ДВ-ответами (ПСО минус РСО) и НДВ-ответами (ПСО минус РСО) использовали плановые апостериорные сравнения; уровень значимости для каждого планового сравнения корректировали с помощью поправки Бонферрони на четыре сравнения, и считали достоверными при $p < 0.01$.

Анализ на уровне источников

Участники эксперимента прошли МРТ-сканирование на 1.5Т-системе Philips Intera. Индивидуальные структурные МРТ использовались для построения однослойных гранично-элементных моделей серого вещества коры головного мозга с помощью алгоритма сегментации водораздела (программное обеспечение FreeSurfer 4.3; Martinos Center for Biomedical Imaging, США). Индивидуальные анатомические модели были корегистрированы с использованием фидуциальных точек и около 60 дополнительных точек поверхности головы. Для размещения диполей на поверхности модели мозга использовалась сетка с шагом 5 мм, что позволило получить 10242 вертекса на

каждое полушарие. Для локализации источников использовались данные и аксиальных магнитометров, и планарных градиентометров. Локализация источников была выполнена с использованием кортикальной поверхностно-ограниченной оценки минимальной нормы на основе L2-нормы (без знака), реализованной в программном комплексе MNE-Python (Gramfort et al., 2013).

Матрица ковариации шума вычислялась для каждого испытуемого в интервале от -500 мс до -50 мс до предъявления стимула в каждой реализации. Матрица ковариации шума и прямой оператор были объединены в линейный обратный оператор с использованием оценки минимальной нормы на основе L2-нормы, ограниченной поверхностью коры (без знака), реализованной в программном комплексе MNE. Оценки источников были морфированы на стандартный мозг MNI с помощью процедуры нормализации на основе поверхности MNE. Для анализа временных рядов активации в пространстве источников данные были прорежены до 200 отсчетов в секунду.

Сначала для каждого анализируемого временного окна мы определили области коры, опосредующие эффект обучения. Парные t -тесты для контраста PCO против ПСО проводились для активации, усредненной по всем отсчетам анализируемого временного окна, в каждом вертексе отдельно. Для внесения поправки на множественные сравнения мы использовали ту же статистическую процедуру, что и на уровне сенсоров, но для всего набора вертексов поверхности коры вместо каналов МЭГ. Кортикальные области интереса определялись как кластеры смежных достоверных вертексов. Учитывались только кластеры, содержащие не менее 30 кортикальных вертексов. Результаты представлены с пороговым значением по вертексам без поправки ($p < 0.05$) (Gross et al., 2013), а также с FDR-коррекцией на число вертексов.

Затем мы использовали эти области коры для анализа временной динамики активации для условий PCO и ПСО. Временные ряды активации были построены для каждого вертекса независимо, а затем усреднены по соседним вертексам в пределах каждой области интереса. Чтобы оценить задержку и продолжительность эффекта обучения на активацию соответствующих областей коры, оценивали различия между условиями PCO и ПСО с помощью t -теста, с поправкой FDR для

множественных сравнений на число временных точек.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поведенческие показатели

В ходе активного оперантного обучения участники эксперимента успешно научились выполнять задачу, связывающую восемь псевдослов с движениями определенных конечностей тела или отказом от движения. Уже в активном блоке 1 (блоке активного обучения) средний процент правильных ответов испытуемых совокупно составил $68.0 \pm 6.2\%$ (табл. 2), что значимо отличалось от случайного уровня ($p = 0.02$). Вероятность правильного ответа значительно увеличивалась на протяжении обучения в пределах данного блока. На рис. 2 представлено число правильных ответов в зависимости от номера реализации на ранней стадии обучения PCO на уровне группы (рис. 2 (а, в)) и для отдельных участников (рис. 2 (б)). На графиках хорошо видна общая тенденция к постоянному улучшению выполнения задачи. Количество реализаций, необходимых для достижения критерия обучения, варьировалось у разных участников от 74 до 480, что соответствовало продолжительности активного обучения от 6 до 40 мин.

В активном блоке 2, т.е. на стадии активного выполнения, все участники показали практически максимально возможные результаты выполнения задачи (средний процент правильных ответов составил $96.4 \pm 4.0\%$, $p < 0.001$). Таким образом, видно, что участники успешно усвоили связь между каждым из восьми слуховых сигналов и соответствующим действием или бездействием (рис. 2 (г)).

Не было выявлено статистически значимых различий в точности выполнения задачи между реализациями ДВ и НДВ как на ранней стадии обучения PCO (67.3 ± 9.8 и $69.5 \pm 5.5\%$ для ДВ и НДВ соответственно, $t(23) = -0.95$, $p > 0.05$), так и во время продвинутой стадии обучения (96.4 ± 3.6 и $97.2 \pm 4.4\%$ для ДВ и НДВ соответственно, $t(23) = -1.31$, $p > 0.05$).

Время реакции испытуемых в реализациях ДВ было в среднем больше на ранней стадии обучения по сравнению с продвинутой стадией обучения (PCO: 1492.5 ± 101.1 мс; ПСО: 1352.9 ± 116.3 ; $t(1, 23) = 5.91$; $p < 0.0001$). Таким образом, как и ожидалось, решение о выполнении двигательной реакции в ответ на

стимул облегчалось в ходе обучения. Примечательно, что даже и в активном блоке 2, т.е. при активном выполнении, наблюдалось дальнейшее сокращение латентности моторного ответа, что подтверждается значимой отрицательной регрессией между номером реализации и временем реакции ($R^2 = -0.26$; $p < 0.001$) (рис. 2 (д)). Таким образом, на продвинутой стадии обучения происходило дальнейшее укрепление слухо-моторной ассоциации.

Анализ МЭГ на уровне сенсоров

Эффект задачи. В качестве первого шага мы сравнили вызванные ответы на псевдослова на ранней стадии обучения с пассивным условием, когда участник слушал те же слуховые стимулы без какой-либо конкретной задачи, т.е. во время пассивного блока 1 (рис. 3 (а)). Поскольку в пассивном условии участники не выполняли никаких движений, то для сопоставимости в данный анализ из активного блока были взяты только реализации из условия НДВ.

Сравнение динамики среднеквадратичных значений ВП между двумя условиями (рис. 3 (б)) показало значительное увеличение ответа при активном обучении, начиная примерно с 500 мс от начала предъявления стимула. Если в пассивном условии ВП уже возвращался к исходному уровню через 1200 мс после начала предъявления стимула, то во время активного обучения подъем сохранялся значительно дольше (не менее чем до 1500 мс после начала стимула).

Наиболее прямым объяснением большей силы и продолжительности слухового нейронного ответа в РСО по сравнению с пассивным состоянием может являться повышенная нагрузка на внимание и память во время выполнения задачи. Если роль внимания заключается в том, чтобы облегчить приобретение и запоминание ассоциаций “стимул—результат”, то логично представить себе, что объем внимания, уделяемого слуховым стимулам, будет наибольшим на раннем этапе обучения (Pearce, Hall, 1980; Pearce, Mackintosh, 2010). Следуя той же логике, можно ожидать, что эффект усиления внимания на вызванный ответ должен начать уменьшаться по мере усвоения правил задачи. В отличие от этого предположения, наша гипотеза о продлении нейронной репрезентации в ходе ассоциативного обучения приводит к противоположному

предсказанию. Поэтому, чтобы отделить предполагаемый вклад активного обучения от вклада внимания, мы далее сравнили вызванный ответ между условиями РСО и ПСО.

Эффект обучения. На рис. 3 (в) показана разница между среднеквадратичными значениями ВП для условий РСО и ПСО, для ДВ- и НДВ-реализаций отдельно. Зарегистрированные ответы состояли из нескольких начальных коротких пиков, за которыми следовал большой широкий пик с латентностью около 800 мс от начала стимула. Чтобы оценить, влияет ли процесс обучения на слуховую обработку предъявляемых стимулов, мы сначала исследовали слуховой вызванный ответ в момент его максимальной силы.

Для этого мы усреднили условия РСО и ПСО (включая реализации ДВ и НДВ) и определили, что на объединенных данных слуховой вызванный ответ достигал максимума через 780 ± 53 мс после начала стимула. Учитывая, что точка дизамбигуации составляла 410 мс от начала стимула (см. рис. 1), пиковая латентность слухового вызванного ответа соответствовала семантическому компоненту N400 в ЭЭГ и МЭГ (Kutas, Federmeier, 2011; O'Rourke, Holcomb, 2002).

Далее мы исследовали, как пиковое значение слухового ответа менялось в зависимости от экспериментальных условий. Для этого среднеквадратичные значения ВП были усреднены по 100-миллисекундному интервалу времени с центром на указанном выше максимуме ответа (730–830 мс от начала предъявления стимула). Используя полученные значения, мы выполнили сравнения между условиями РСО и ПСО для типов реализаций ДВ и НДВ отдельно (рис. 4 (а)).

Во время пика слухового ответа топография дифференциального эффекта, вызванного обучением, была сходной для ДВ- и НДВ-реализаций: для обоих типов реализаций выявлены два пространственных кластера, которые располагались примерно над левой височной корой и срединной линией коры (достоверные сенсоры выделены, $p < 0.05$, FDR-корр.) (рис. 4 (а), правая панель). Как видно на рисунке, усиление в обоих пространственных кластерах было выражено сильнее для псевдослов, которые стали ассоциироваться с движениями (ДВ) по сравнению с теми, которые не приобрели такой ассоциации (НДВ) (рис. 4 (а), правая панель).

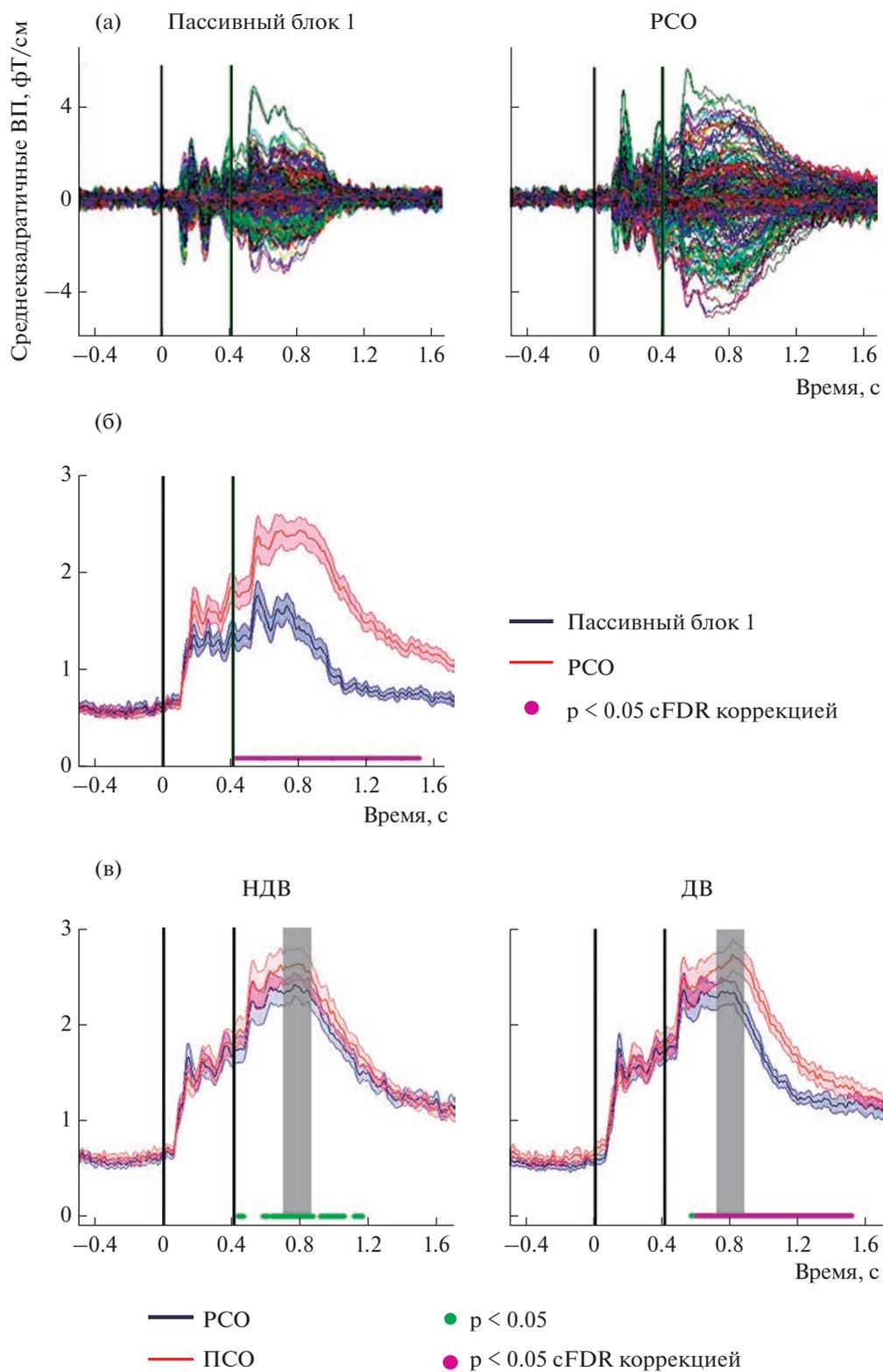


Рис. 3. Влияние выполнения ассоциативной задачи и обучения на динамику ВП в ответ на слуховые псевдослова. (а) — Графики среднеквадратичного ВП по каждому сенсору во время пассивного прослушивания до обучения (слева) и на ранней стадии обучения РСО, только НДВ реализации (справа). Каждая линия показывает динамику вызванного поля на отдельном комбинированном градиентометре. (б) — Графики глобального среднеквадратичного ВП во время пассивного прослушивания до обучения и РСО, только НДВ реализации. (в) — Графики глобального среднеквадратичного ВП для ранней и продвинутой стадий обучения задаче (РСО и ПСО соответственно). Отдельно показаны реализации, в которых моторные реакции не выполнялись (НДВ, слева) и те, в которых выполнялись моторные реакции (ДВ, справа). Заливка вдоль каждого графика обозначает соответствующий 95-процентный доверительный интервал. Горизонтальная ось — время в секундах относительно начала стимула; вертикальная ось — амплитуда среднеквадратичного ВП в фТ/см. Под графиками обозначены достоверные различия (двухсторонний t -тест, $p < 0.05$, как без коррекции, так и с коррекцией FDR на множественные сравнения по всем временным точкам). Вертикальные сплошные линии обозначают время начала редьявления стимула-псевдослова (0 с) и точку дизамбигуации (0.410 с). Серым прямоугольником показан 100-миллисекундный интервал, центрированный на пике вызванного поля (объяснения в тексте).

Fig. 3. Effect of the associative task performance and learning on the ERF dynamics in response to auditory pseudowords. (a) — Plots of the grand average RMS ERF for each sensor during passive listening before training (left) and at the early stage of training, only non-motor trials (right). Each line represents ERF dynamics in a single combined gradientometer. (б) — Plots of the grand average global RMS ERF during passive listening before training and at the “early stage of learning”, only non-motor trials. (в) — Plots of the grand average global RMS ERF for the early and advanced stages of task learning (“early stage of learning” and “advanced stage of learning”, respectively). Plots separately represent trials in which no motor responses were performed (left) and those in which motor responses were performed (right). The shading along each graph indicates the corresponding 95% confidence interval. The horizontal axis is the time in seconds relative to the stimulus onset; the vertical axis is the RMS ERF amplitude in fT/cm. Significant differences (two-tailed t -test, $p < 0.05$, both without correction and with FDR correction for multiple comparisons across all time points) are indicated below the plots. Solid vertical lines indicate pseudoword onset (0 s), and disambiguation point (0.410 s). Gray rectangle shows the 100-millisecond interval centered on the peak of the evoked field (explanation in the text).

Последовательные карты топографии вызванных полей в условиях РСО и ПСО (рис. 5) показывают, что данный эффект не ограничивался временем пика ответа, а скорее представлял собой длительный общий сдвиг в обоих пространственных кластерах, особенно заметный для реализаций ДВ.

Для статистической проверки достоверности видимого изменения в сторону длительного устойчивого нейронного ответа на псевдослова после приобретения ими значения слов действия мы построили графики временной динамики сигналов градиентометров, усредненных по сенсорам левого височного кластера и срединного кластера (рис. 4 (б)). Действительно, статистическая разница между ВП между условиями РСО и ПСО продолжалась по времени существенно правее пика.

Затем для каждого кластера мы вычислили среднеквадратичные значения ВП в четырех последовательных 150-миллисекундных временных интервалах после пика, для каждого типа реализаций и условия отдельно. Результаты были подвергнуты дисперсионному анализу с повторными измерениями, с факторами Стадия обучения (РСО и ПСО), Тип реализации (ДВ и НДВ), Топография (левые височные и срединные кластеры) и Время

(850–1000, 1000–1150, 1150–1300 и 1300–1450 мс после начала стимула).

Значимое взаимодействие Стадия обучения*Тип реализации ($F(1, 23) = 23.39$; $p < 0.0001$; частичное $\eta^2 = 0.5$) показало увеличение общей силы устойчивой активации, вызванной обучением, в ДВ по сравнению с НДВ во всем временном окне от пика и правее. Независимо от типа реализации эффект обучения ослабевал со временем, т.е. становился менее выраженным в более отдаленных интервалах нейронного ответа (Стадия обучения*Время ($F(3, 69) = 20.22$; $p < 0.0001$; частичное $\eta^2 = 0.47$).

Что особенно важно для проверяемой гипотезы, значимый эффект обучения (контраст РСО против ПСО) все еще присутствовал в реализациях ДВ для двух последних временных интервалов, предшествующих моторному действию (3-й интервал: $F(1, 23) = 24.84$; $p < 0.0001$; 4-й интервал: $F(1, 23) = 14.54$; $p < 0.01$ с поправкой Бонферрони). Эффект обучения не отличался значимо от нуля в двух последних временных интервалах в реализациях НДВ (3-й интервал: $F(1, 23) = 1.25$; $p = 0.27$ без коррекции; 4-й интервал: $F(1, 23) = 0.15$; $p = 0.70$ без коррекции). Дополнительный дисперсионный анализ, проведенный для последнего 4-го временного интервала, подтвердил

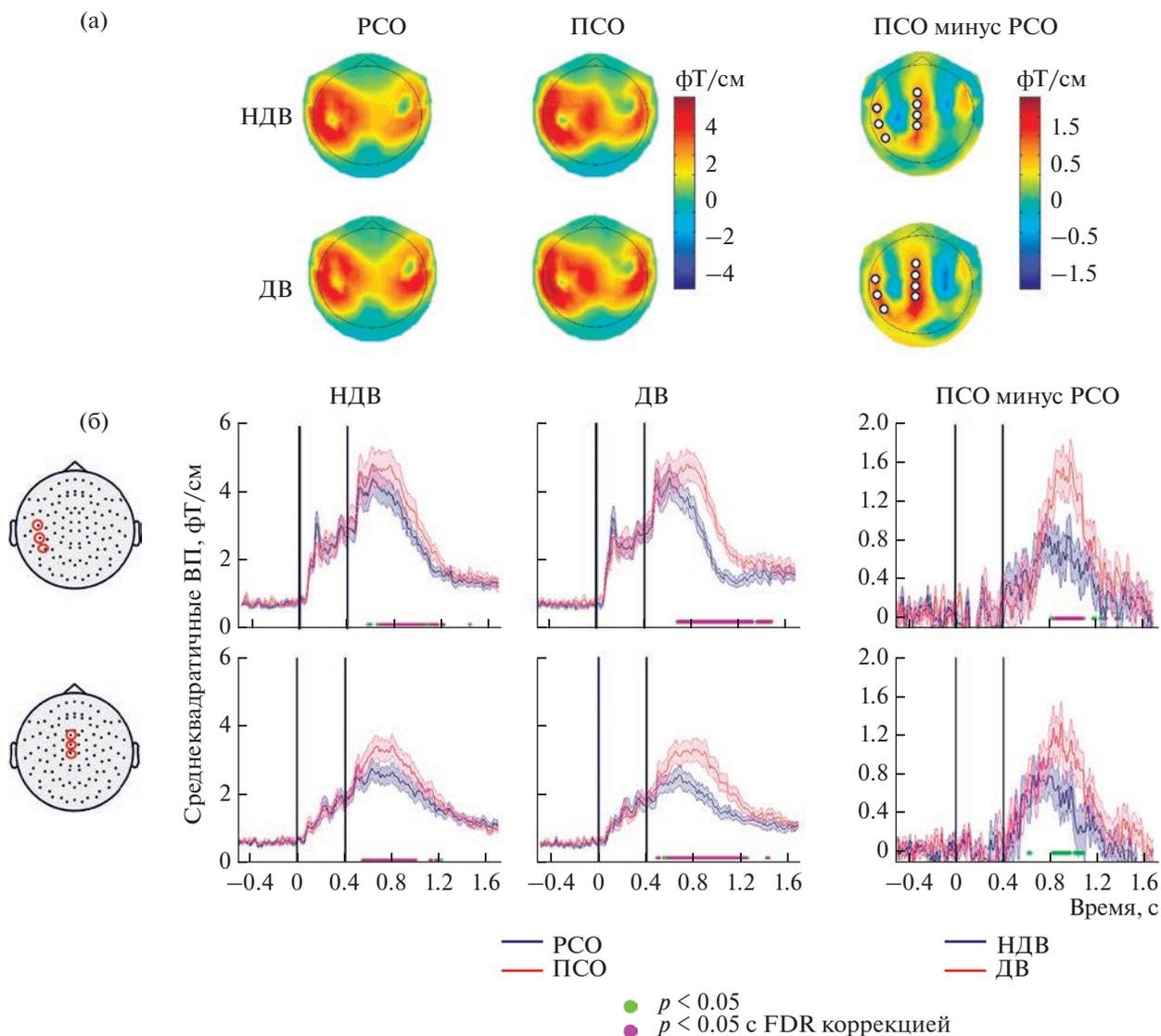


Рис. 4. Пространственные максимумы и длительность эффекта обучения (контраст ПСО > PCO) глобального среднеквадратичного ВП в реализациях ДВ и НДВ. (а) – Топографические карты глобального среднеквадратичного ВП для реализаций НДВ (верхний ряд) и ДВ (нижний ряд) в условиях PCO и ПСО (левая и средняя панели), а также для разницы между ПСО и PCO (правая панель), усреднение в интервале 730–830 мс от начала предъявления стимула. На правой панели кружками отмечены места расположения комбинированных градиентометров, в которых эффект обучения был достоверен после коррекции FDR на множественные сравнения. (б) – Графики среднеквадратичного ВП для латеральных и медиальных кластеров (показаны на схеме расположения сенсоров МЭГ на врезках слева), для условий PCO и ПСО, отдельно для реализаций НДВ и ДВ (левая и средняя панели), а также разностные значения (ПСО минус PCO) для реализаций НДВ и ДВ. Все остальные обозначения как на рис. 3.

Fig. 4. Spatial maxima and duration of the learning effect (“advanced stage of learning” > “early stage of learning” contrast) of the grand average global RMS ERF in motor and non-motor trials. (a) Topographic maps of the global RMS ERF for the non-motor (top row) and motor (bottom row) trials under “early stage of learning” and “advanced stage of learning” conditions (left and middle panels), and for the difference between the two conditions (right panel), averaged over the 730–830 ms interval from the beginning of the stimulus presentation. In the right panel, circles indicate locations of the combined gradientometers where the learning effect was significant after FDR correction for multiple comparisons. (b) – Plots of the grand average RMS ERF for the lateral and medial clusters (shown in the insets on the left), for the “early stage of learning” and “advanced stage of learning” conditions, separately for non-motor and motor trials (left and middle panels), and the difference (“advanced stage of learning” minus “early stage of learning”) for non-motor and motor trials. All other notations as in Fig. 3.

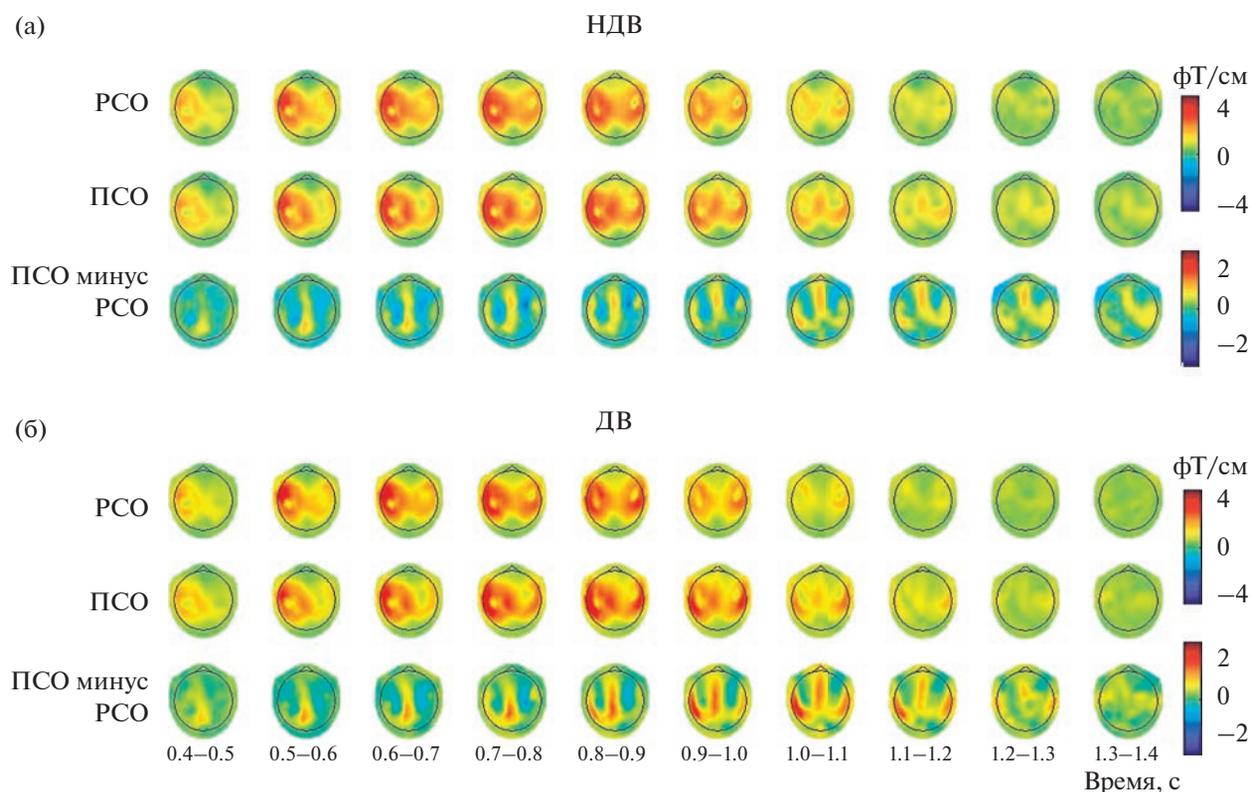


Рис. 5. Серия топографических карт глобального среднеквадратичного ВП для реализаций НДВ и ДВ. Каждая топографическая карта представляет собой относительные значения амплитуды, усредненные по временным точкам в последовательных интервалах, обозначенных под рисунками. Верхняя и нижняя панели соответствуют реализациям НДВ (а) и ДВ (б) соответственно. На каждой панели верхний ряд соответствует PCO, средний ряд – ПСО, а нижний ряд – разнице между условиями ПСО и PCO.

Fig. 5. A series of topographic maps of the global RMS ERF for the non-motor and motor trials. Each topographic map represents relative amplitude values averaged over time points in consecutive intervals indicated below the figures. The upper and lower panels correspond to non-motor (a) and motor (б) trials, respectively. In each panel, the upper row corresponds to the “early stage of learning”, the middle row to the “advanced stage of learning”, and the lower row to the difference between these two conditions.

значимое преобладание реализаций ДВ над реализациями НДВ в продолжительности эффекта обучения (взаимодействие факторов Стадия обучения*Тип реализации $F(1, 23) = 14.67$; $p = 0.0009$; частичное $\eta^2 = 0.39$).

Таким образом, как на максимуме ответа, так и после него слуховой ответ был значительно увеличен после обучения – особенно в тех реализациях, в которых участники совершали движение в ответ на псевдослово.

Анализ МЭГ на уровне источников

Чтобы оценить мозговую локализацию эффектов обучения, которые мы статистически продемонстрировали в пространстве сенсоров, мы далее провели анализ локализации источников. Мы взяли в анализ только ДВ-реализации, в которых совершалось движе-

ние, и которые, соответственно, были в фокусе настоящего исследования. Локализацию кортикальных источников производили во временном интервале между 800 и 900 мс после начала стимула, где на уровне сенсоров мы наблюдали наибольший эффект обучения в реализациях ДВ (рис. 4). В подтверждение анализа топографии на сенсорах анализ на уровне источников показал, что обучение преимущественно модулировало области левой и правой височных долей на их латеральной и медиальной поверхности, а также заднюю часть медиальных лобных областей и прилегающую поясную борозду (рис. 6).

Контраст условий PCO – ПСО позволил выявить несколько достоверных кластеров кортикальных источников ($p < 0.05$, с поправкой FDR), с локализацией пиковых различий в левой и правой верхней височной бо-

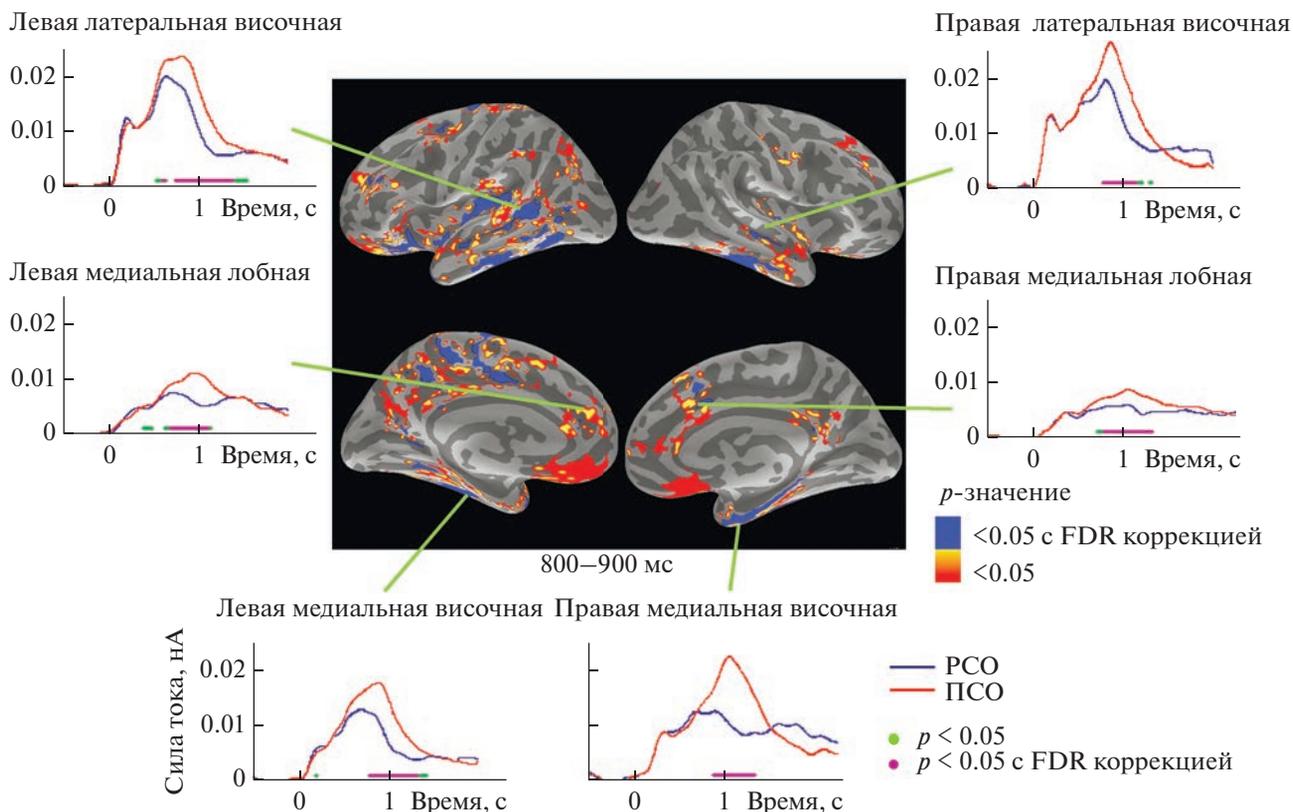


Рис. 6. Локализация источников эффекта обучения для вызванного нейромагнитного ответа, в реализациях ДВ. На центральной панели показаны кортикальные источники, демонстрирующие значительный эффект обучения (PCO > PCO) во временном окне 800–900 мс после начала стимула, в том числе без коррекции и с коррекцией FDR на количество вертексов ($q < 0.05$). Вышеуказанные области рассматривались как области интереса для дальнейшего анализа. Для наглядности также показаны области, проявившие аналогичный эффект при уровне значимости $p < 0.05$ (без коррекции). На соседних панелях изображены графики динамики среднего тока в источниках (без знака) из пяти областей интереса, для условий PCO и PCO. Значимые различия PCO > PCO на графиках ($p < 0.05$, без коррекции) отмечены, если они появляются не менее чем в 20 последовательных временных точках.

Fig. 6. Source localization of the learning effect for the evoked neuromagnetic response, in motor trials. The central panel shows cortical sources revealing significant learning effects (“advanced stage of learning” > “early stage of learning”) in the 800–900 ms time window after stimulus onset, including uncorrected statistics and statistics with FDR correction for the number of vertices ($q < 0.05$). The aforementioned areas were considered as regions of interest for further analysis. For illustrative purposes, the areas that showed a similar effect at a significance level of $p < 0.05$ (without correction) are also shown. The adjacent panels show plots of the dynamics of the average current in the sources (unsigned) from the five regions of interest, for the “early stage of learning” and “advanced stage of learning” conditions. Significant differences between time courses (“advanced stage of learning” > “early stage of learning”) at the $p < 0.05$ level (without correction) are marked if they appear in at least at 20 consecutive time points.

розде, левой супрамаргинальной извилине, левой и правой нижней височной извилине, левой и правой фузиформной/парагиппокампальной борозде и задней части левой поясной борозды/средней верхней лобной извилины. Эффект обучения проявлялся в обоих полушариях, но более выраженным он был в левом полушарии, что также согласуется с результатами анализа топографии на уровне сенсоров (рис. 4). Вклад височных и теменных долей в активацию, вызванную

обучением, соответствовал классической карте областей мозга, вовлеченных в понимание речи в целом (Friederici et al., 2017) и в семантический эффект N400 в частности (Van Petten, Luka, 2006). Однако наши данные также свидетельствуют о вовлечении довольно широкой области медиально-фронтального неокортекса.

Чтобы получить дальнейшее представление о временном ходе различий между PCO и PCO в реализациях ДВ, мы проанализирова-

ли динамику изменения активации, вызванной обучением, на протяжении постстимульного интервала для следующих кластеров кортикальных источников в обоих полушариях: латеральных височных областей (верхняя височная борозда и верхняя височная извилина, STS/STG), дополнительных и преддополнительных моторных областей (SMA и pre-SMA) и фузиформной/парагиппокампальной извилины (FFG/PHG) (рис. 6). Мы извлекли временные ряды силы тока источников, усреднили их по всем вертексам каждого кортикального кластера отдельно, а затем провели сравнение между условиями РСО и ПСО с помощью *t*-теста в каждой временной точке на постстимульном интервале (с поправкой FDR на количество временных точек).

Полученные результаты на уровне источников в целом схожи с теми, которые были получены на уровне сенсоров, но выявили более подробную информацию о начале и смещении активности, вызванной обучением, в интересующих нас кортикальных областях. Графики динамики активации для ПСО начинали значительно отличаться от таковых для РСО сначала в левых областях коры (STS и SMA/preSMA), а затем в симметричных им областях правого полушария и в медиальной височной области (FFG/PHG). Для областей SMA/preSMA эффект обучения в основном совпадал с максимумом ответа (от 500–700 до 1200 мс после начала стимула). Напротив, на латеральной и медиальной поверхности височных долей (STS билатерально, FFG/PHG слева) активация, вызванная обучением, сохранялась дольше, примерно до среднего времени начала движения (т.е. до 1400–1450 мс после начала стимула).

В итоге полученные нами результаты свидетельствуют о том, что, когда слуховые псевдослова приобретали ассоциации с определенным движением посредством активного обучения, они стали вызывать более сильный и длительный вызванный ответ на стимул. Этот эффект обучения был сильнее и продолжительнее для слуховых стимулов, которые предписывали совершать движение конечностью тела, по сравнению с теми, которые предписывали воздерживаться от движения. Кортикальными областями, максимально затронутыми обучением в ДВ-реализациях, были верхняя височная (STS) и фузиформная/парагиппокампальная извилина (FFG/PHG) левой и, в меньшей степени, правой височной доли, а также области медиальных лобных

структур. В височных областях обоих полушарий модуляции, связанные с обучением, сохранялись до конца периода задержки между стимулом и началом движения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цель данного исследования состояла в том, чтобы выявить эффект усиления и prolongации активации височной коры при работе ассоциации между слухоречевыми стимулами и движением. Мы действительно обнаружили такой эффект.

Уже на ранней стадии обучения слуховым псевдословам — по сравнению с их пассивным прослушиванием — наблюдалось усиление и пролонгация лексико-семантического компонента N400m, с максимальным эффектом примерно через 400–450 мс после точки дизамбигуации псевдослов.

Возможным объяснением выявленного нами эффекта удлинения слухоречевой активации могло бы быть то, что испытуемые вследствие усталости или иных причин к концу эксперимента начинали тратить больше времени на распознавание стимулов. Однако такому объяснению противоречит сокращение времени реакции — как между активными блоками, так и внутри каждого блока, а также возрастание доли правильных ответов.

Волна N400, длящаяся еще достаточно долго после пика — подобная той, что наблюдалась в нашем исследовании, — была ранее зарегистрирована как для вербальных, так и невербальных стимулов в зрительной модальности (Deacon, Shelley-Tremblay, 2000; Erlbeck et al., 2014; Kutas, Federmeier, 2011), особенно для задач, подразумевающих активное удержание репрезентации стимула в кратковременной памяти — например, задача на отсроченное сопоставление с образцом (Pinal et al., 2014) или задача на кодирование букв в азбуке Морзе (Lang et al., 1987).

При исследовании задачи на отсроченное сопоставление с образцом у обезьян наблюдалось устойчивое возбуждение нейронов нижней височной коры в период задержки между целевым зрительным стимулом и хорошо выученной поведенческой реакцией. Оно, как оказалось, отражало активное поддержание внутренних репрезентаций стимула, необходимых для предстоящего поведения (Takeda et al., 2005). Учитывая данные литературы, мы предположили, что удлинение

N400m на слуховые псевдослова на ранней стадии обучения является результатом усиления нагрузки на рабочую память — намеренного удержания репрезентации псевдослова в кратковременной памяти.

Однако такой интерпретации недостаточно для объяснения изменения ВП, которое мы наблюдали в процессе обучения. В течение всего периода обучения задачи на ассоциацию псевдослова и действия требовалось как сфокусированное внимание, так и удержание стимулов в памяти. Однако по мере обучения соотношение стимула с движением становится все более автоматическим, и нагрузка на рабочую память и внимание снижалась (Pearce, Mackintosh, 2010), что, в свою очередь, должно было снизить нейронную активацию, связанную с рабочей памятью/вниманием (см., например, Jensen, Tesche, 2002). Таким образом, эти процессы сами по себе вряд ли могли бы обеспечить выявленное нами увеличение и продление устойчивой нейронной активации, особенно выраженное на продвинутой стадии обучения — когда ошибки практически исчезли, время реакции существенно снизилось, что явно свидетельствует о значительной степени автоматизации реакций на стимулы.

Напротив, вышеупомянутый результат хорошо согласуется с гипотезой ретроспективной активации. Действительно, только когда опыт предшествующего обучения мог быть интегрирован, мы наблюдали, что нейронный ответ на вновь приобретенные псевдослова действия (которые были последовательно и уникально сопряжены с движениями определенной части тела) сохранялся до начала ожидаемого движения (рис. 4 (б), 5 и 6). Учитывая, что эффект обучения для псевдослов, которые не ассоциировались с движением (НДВ), резко снижался после максимума слухового ответа и полностью исчезал в поздней части нейронного ответа (рис. 4), мы делаем вывод, что удлинение волны N400 было характерно именно для тех псевдослов, которые стали предсказуемыми сигналами для выбора, подготовки и выполнения движения. Появляясь в преддверии моторного действия, которое полностью определялось слуховым стимулом, ретроспективное усиление и продление активности могло в основном быть следствием того, что на продвинутой стадии обучения (ПСО), в отличие от ранней стадии обучения (РСО), участники уже установили для себя соответствие между стимулами и

ответами, и выполнявшиеся действия оценивались участниками как “правильные” уже на стадии инициации и выполнения движения. Аналогичное увеличение устойчивой активности нейронов наблюдалось в префронтальной коре приматов, когда обезьяны путем проб и ошибок обучались произвольным ассоциациям между каждой из двух картинок и движением глаз влево или вправо (Histed et al., 2009).

Однако, что очень важно для гипотезы ретроспективной активации, в нашем исследовании вызванная обучением устойчивая активность наблюдалась в классических “речевых областях” левой и, в меньшей степени, правой височных долей (рис. 6), вовлеченных в фонологическую и лексико-семантическую обработку реальных слов (Kutas, Federmeier, 2011; McCarthy et al., 1995; Smith et al., 1986; Travis et al., 2012). Это позволяет предположить, что ресурсы обработки речи мобилизуются в период задержки до начала движения, в основном для тех псевдослов, которые временно приобрели значение слов, связанных с действиями. Учитывая, что префронтальная кора содержит нейронные популяции, которые кодируют сенсорные репрезентации, моторные репрезентации и репрезентации вознаграждения (см. в Histed et al., 2009), она, через нисходящие проекции, может играть ключевую роль в этом общем механизме активного обучения произвольной сенсорно-моторной ассоциации.

Однако выявленный нами эффект не ограничивался только слухоречевыми репрезентациями. Помимо височной слухо-речевой коры, дополнительная моторная и пред-дополнительная моторная кора, а также моторные зоны поясной коры, — т.е. области, обычно вовлеченные в моторное программирование (Picard, Strick, 2001), — также проявили усиление нейронного ответа на псевдослова на продвинутом этапе обучения (рис. 6). Интересно, что в фМРТ-исследовании Н. Постле и др. (Postle et al., 2008) было выявлено, что именно активация пред-дополнительной моторной коры была значительно выше во время понимания смысла слов, специфически соотносимых с конкретными действиями — по сравнению с прочими словами; согласно мнению авторов, эта активация может отражать ассоциацию между словами и инициацией программы движения.

Важно отметить, что наблюдавшаяся нами активация дополнительной и пред-дополни-

тельной моторной коры в ответ на стимул была недостаточно длительной, чтобы являться причиной инициации соответствующего движения как такового (рис. 6). Вместо этого, появление активации моторной коры в классическом окне N400m (400 мс после точки дизамбигуации), предполагает, что она может участвовать в лексико-семантическом извлечении/кодировании слуховых псевдослов действия как нейронного представления только что выученных моторных ассоциаций. При этом отсутствие активации SMA во время пассивного прослушивания того же самого только что выученного псевдослова действия (Razorenova et al., 2020) предполагает, что после короткого активного обучения такие слухомоторные ассоциативные соответствия все еще являются хрупкими и требуют распределения ресурсов внимания и рабочей памяти, чтобы быть обнаруженными в нейронном МЭГ-сигнале в ответ на стимул.

В целом, наши результаты показывают, что после приобретения ассоциации между слуховым псевдословом и предсказанным действием извлечение лексико-семантических знаний, хранящихся в височной коре, запускается предъявленным псевдословом.

В настоящей работе мы имели возможность исследовать динамику вызванных мозговых ответов лишь в пределах длительности эксперимента, т.е. порядка полутора-двух часов. Реальная длительность выявленного эффекта остается неизвестной, и выяснение ответов на этот вопрос может явиться перспективным направлением дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты дают первое доказательство того, что мозг взрослого человека для установления новой ассоциации полагается на механизм, который позволяет ему заполнять временной разрыв между звучащим словом и ассоциируемым действием. Это обеспечивается путем удлинения мозговой слухоречевой активации, вызванной стимулом. Таким образом создаются условия для реализации Хеббовской пластичности, то есть долговременных синаптических перестроек в нейронных ансамблях, которая основана на совпадении активности во времени.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проводилось в рамках государственного задания Министерства образования Российской Федерации (№ 073-00038-23-02 от 13.02.2023, “Исследования мозговых механизмов семантического научения с помощью магнитоэнцефалографии”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Razorenova A.M., Скавронская В.В., Тюленев Н.Б., Рытикова А.М., Чернышев Б.В. Может ли научение новым словам в слуховой модальности вести к быстрому формированию пластических перестроек в коре больших полушарий у взрослых? Современная зарубежная психология. 2020. 9 (2): 46–56.
- Barsalou L. Situated simulation in the human conceptual system. *Language and Cognitive Processes*. 2003. 18 (5–6): 513–562.
- Deacon D., Shelley-Tremblay J. How automatically is meaning accessed: a review of the effects of attention on semantic processing. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2000. 5 (4): 82–94.
- Erlbeck H., Kübler A., Kotchoubey B., Veser S. Task instructions modulate the attentional mode affecting the auditory MMN and the semantic N400. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2014. V. 8. P. 654.
- Friederici A.D., Chomsky N., Berwick R.C., Moro A., Bolhuis J.J. Language, mind and brain. *Nature Human Behaviour*. 2017. 1 (100): 713–722.
- Funahashi S., Bruce C.J., Goldman-Rakic P.S. Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*. 1989. 61 (2): 331–349.
- Fuster J.M., Bressler S.L. Past Makes Future: Role of pFC in Prediction. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 2015. 27 (4): 639–654.
- Gallistel C.R., Fairhurst S., Balsam P. The learning curve: implications of a quantitative analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. 101 (36): 13124–13131.
- Gramfort A., Luessi M., Larson E., Engemann D.A., Strohmeier D., Brodbeck C., Goj R., Jas M., Brooks T., Parkkonen L. MEG and EEG data analysis with MNE-Python. *Frontiers in Neuroscience*. 2013. P. 267.
- Gross J., Baillet S., Barnes G.R., Henson R.N., Hillebrand A., Jensen O., Jerbi K., Litvak V., Maess B., Oostenveld R., Parkkonen L., Taylor J.R., van Wassenhove V., Wibral M., Schoffelen J.M. Good practice for conducting and reporting MEG research. *Neuroimage*. 2013. V. 65. P. 349–363.
- Hebb D.O. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1949. 335 с.
- Histed M.H., Pasupathy A., Miller E.K. Learning Substrates in the Primate Prefrontal Cortex and Stria-

- tum: Sustained Activity Related to Successful Actions. *Neuron*. 2009. 63 (2): 244–253.
- Jensen O., Tesche C.D. Frontal theta activity in humans increases with memory load in a working memory task. *Eur.J.Neurosci*. 2002. 15 (8): 1395–1399.
- Kutas M., Federmeier K.D. Thirty Years and Counting: Finding Meaning in the N400 Component of the Event-Related Brain Potential (ERP). *Annual Review of Psychology*, Vol. 62 / Fiske S. T. et al. Palo Alto: Annual Reviews, 2011. С. 621–647.
- Lang M., Lang W., Uhl F., Kornhuber A., Deecke L., Kornhuber H.H. Slow negative potential shifts indicating verbal cognitive learning in a concept formation task. *Human Neurobiology*. 1987. 6: 183–190.
- McCarthy G., Nobre A., Bentin S., Spencer D. Language-related field potentials in the anterior-medial temporal lobe: I. Intracranial distribution and neural generators. *The Journal of Neuroscience*. 1995. 15 (2): 1080–1089.
- Miyashita Y., Chang H.S. Neuronal correlate of pictorial short-term memory in the primate temporal cortex. *Nature*. 1988. V. 331. № 6151. P. 68–70.
- Naya Y., Yoshida M., Takeda M., Fujimichi R., Miyashita Y. Delay-period activities in two subdivisions of monkey inferotemporal cortex during pair association memory task. *European Journal of Neuroscience*. 2003. 18 (10): 2915–2918.
- Neuringer A. Operant variability: Evidence, functions, and theory. *Psychonomic Bulletin & Review*. 2002. 9 (4): 672–705.
- O'Rourke T.B., Holcomb P.J. Electrophysiological evidence for the efficiency of spoken word processing. *Biological Psychology*. 2002. 60 (2–3): 121–150.
- Pearce J.M., Hall G. A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychol.Rev.* 1980. 87 (6): 532–552.
- Pearce J.M., Mackintosh N.J. Two theories of attention: A review and a possible integration. *Attention and associative learning: From brain to behaviour*. 2010. P. 11–39.
- Picard N., Strick P.L. Imaging the premotor areas. *Current Opinion in Neurobiology*. 2001. 11 (6): 663–672.
- Pinal D., Zurrón M., Díaz F. Effects of load and maintenance duration on the time course of information encoding and retrieval in working memory: from perceptual analysis to post-categorization processes. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2014. V. 8. P. 165.
- Postle N., McMahon K.L., Ashton R., Meredith M., de Zubicaray G.I. Action word meaning representations in cytoarchitectonically defined primary and premotor cortices. *Neuroimage*. 2008. 43 (3): 634–644.
- Pulvermüller F. Brain mechanisms linking language and action. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005. 6 (7): 576–582.
- Pulvermüller F. Neural reuse of action perception circuits for language, concepts and communication. *Progress in Neurobiology*. 2018. 160: 1–44.
- Quintana J., Fuster J.M. From Perception to Action: Temporal Integrative Functions of Prefrontal and Parietal Neurons. *Cerebral Cortex*. 1999. V. 9. № 3. P. 213–221.
- Razorenova A.M., Chernyshev B.V., Nikolaeva A.Y., Butorina A.V., Prokofyev A.O., Tyulenev N.B., Stroganova T.A. Rapid Cortical Plasticity Induced by Active Associative Learning of Novel Words in Human Adults. *Frontiers in Neuroscience*. 2020. V. 14. P. 895.
- Shtyrov Y., Butorina A., Nikolaeva A., Stroganova T. Automatic ultrarapid activation and inhibition of cortical motor systems in spoken word comprehension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. 111 (18): E1918–E1923.
- Shu Y., Hasenstaub A., McCormick D.A. Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*. 2003. 423 (6937): 288–293.
- Smith M.E., Stapleton J.M., Halgren E. Human medial temporal lobe potentials evoked in memory and language tasks. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1986. 63 (2): 145–159.
- Tadel F., Baillet S., Mosher J.C., Pantazis D., Leahy R.M. Brainstorm: a user-friendly application for MEG/EEG analysis. *Computational intelligence and neuroscience*. 2011. V. 2011. P. 879716.
- Takeda M., Naya Y., Fujimichi R., Takeuchi D., Miyashita Y. Active Maintenance of Associative Mnemonic Signal in Monkey Inferior Temporal Cortex. *Neuron*. 2005. 48 (5): 839–848.
- Taulu S., Simola J., Kajola M. Applications of the signal space separation method. *IEEE Transactions on Signal Processing*. 2005. 53 (9): 3359–3372.
- Tomasello R., Garagnani M., Wennekers T., Pulvermüller F. Brain connections of words, perceptions and actions: A neurobiological model of spatio-temporal semantic activation in the human cortex. *Neuropsychologia*. 2017. V. 98. P. 111–129.
- Travis K.E., Leonard M.K., Chan A.M., Torres C., Sizemore M.L., Qu Z., Eskandar E., Dale A.M., Elman J.L., Cash S.S., Halgren E. Independence of Early Speech Processing from Word Meaning. *Cerebral Cortex*. 2012. V. 23. № 10. P. 2370–2379.
- Uusitalo M.A., Ilmoniemi R.J. Signal-space projection method for separating MEG or EEG into components. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 1997. 35 (2): 135–140.
- Van Petten C., Luka B.J. Neural localization of semantic context effects in electromagnetic and hemodynamic studies. *Brain and Language*. 2006. 97 (3): 279–293.

PROLONGATION OF STIMULUS REPRESENTATION IN THE BRAIN AS A PROBABLE MECHANISM OF ASSOCIATIVE PLASTICITY IMPLEMENTATION DURING SEMANTIC LEARNING

B. V. Chernyshev^{a, b, #}, A. A. Pavlova^{a, c}, A. M. Rytikova^a, A. V. Butorina^{a, d}, and T. A. Stroganova^a

^a*Moscow Center of Neurocognitive Research (MEG-center),*

Moscow State University of Psychology and Education, Moscow, Russia

^b*Department of Higher Nervous Activity, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^c*Department of Psychology, National research university Higher School of Economics, Moscow, Russia*

^d*Center for Neurobiology and Brain Restoration, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: b_chernysh@mail.ru*

It is believed that memorization of the meaning of new words occurs due to associative learning. For example, it may be matching of a word to the corresponding motor act. Synaptic plasticity in the brain develops on condition that activity of cell ensembles representing the associated events coincides in time – however, in reality, during the development of such associations, a significant time gap between the associated events is likely, which compromises necessary conditions for synaptic plasticity. We hypothesized that conditions for the development of synaptic plasticity may be created by way of prolongation in the activity of neuronal representations, thus providing for the required overlap in time at the level of neuronal ensembles. To test this assumption, we recorded magnetoencephalogram in volunteers during acquisition of associations between pseudowords and movements by four limbs. The results of the study show that there indeed occurs a significant prolongation of stimulus-induced auditory speech activation during the development of new associations. Thus, during the development of the association in the brain, the necessary conditions for Hebbian plasticity can be created – even if the events being associated are separated in time.

Keywords: associative learning, reinforcement learning, memory, action words, evoked fields, magnetoencephalography

**ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ (КОГНИТИВНОЙ)
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА**

УДК 612.821.6

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ МОТОРНЫХ И КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ
ПРИ ФОРСИРОВАННОМ ПРОБУЖДЕНИИ ИЗ ТРЕТЬЕЙ
СТАДИИ ДНЕВНОГО СНА**

© 2023 г. А. К. Соловьева^{1, 4, *}, Н. К. Соловьев², А. О. Мокроусова³, Ю. В. Украинцева^{4, **}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²ФГБОУ высшего образования “МИРЭА – Российский технологический университет”, Москва, Россия

³Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

⁴ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*e-mail: s_anna_99@gmail.com

**e-mail: ukraintseva@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.07.2023 г.

После доработки 23.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Механизмы восстановления различных форм поведения при пробуждении от сна до сих пор недостаточно изучены. В настоящей работе мы исследовали восстановление простых моторных реакций на зрительный стимул, тонкой зрительно-моторной координации, а также абстрактного мышления при пробуждении из самой глубокой, третьей стадии дневного сна. В бодрствовании до сна и в течение первых 2 мин пробуждения от сна добровольцам предлагали два типа задач: зрительно-моторные, в которых нужно было управлять движущимся объектом; и арифметические, в которых нужно было определять верность предложенных равенств. Полученные результаты показали, что скорость простой моторной реакции на появление зрительного стимула достигала уровня, характерного для бодрствования, практически сразу же после пробуждения (в течение 4 с), тогда как восстановление способности определять верность или неверность арифметических равенств, а также точного управления траекторией движущегося объекта требовало гораздо больше времени: около 40 с (в арифметической задаче) и 60 с (в зрительно-моторной задаче). Мощность альфа-ритма при пробуждении была выше, чем в бодрствовании. Дельта-мощность была повышена только в начале пробуждения, пока решение задач было затруднено, а на второй минуте пробуждения, когда оно восстанавливалось, дельта-ритм снижался. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что простые и сложные формы поведения при пробуждении восстанавливаются неодновременно.

Ключевые слова: дневной сон, зрительно-моторная координация, абстрактное мышление, 3-я стадия сна, пробуждение, ЭЭГ, альфа-ритм, дельта-ритм

DOI: 10.31857/S0044467723060096, EDN: ULAERC

ВВЕДЕНИЕ

Научная проблема, на решение которой направлена работа, – это определение очередности и скорости восстановления разных аспектов моторных и когнитивных функций при пробуждении от сна. В настоящее время эта научная проблема остается неизученной.

Сон – это естественное состояние покоя, отличающееся выраженной ареактивностью и отключением сенсорных систем от внешней среды. Во время медленного (ортодок-

сального) сна активность нейронов из десинхронизированной, характерной для бодрствования, становится синхронизированной – равномерно распределенной и групповой. Из-за такой смены активности условия для переработки информации в мозге резко ухудшаются. Вместе с этим по мере углубления сна растут пороги для всех внешних сенсорных сигналов и их поступление в мозг затрудняется (Ковальзон, 2012). Самая глубокая, третья стадия ортодоксального сна характеризуется распределенной по всему кортексу

высоко синхронизированной и стереотипной активностью в низкочастотном дельта-диапазоне (0.5–2 Гц) (Steriade et al., 2001), наибольшим угнетением сознания, высокими порогами возбуждения и выраженной инерцией сна при пробуждении (Trotti, 2017).

Как же происходит пробуждение из этой стадии сна? На настоящий момент о феномене пробуждения известно относительно немного (Украинцева, Соловьева, 2023). По некоторым имеющимся данным (Peter-Derex et al., 2015; Latreille et al., 2020; Liaukovich et al., 2022), форсированное пробуждение из третьей стадии длится десятки секунд, в течение которых сначала на записи ЭЭГ появляются К-комплексы и сигма-веретена, после чего происходит увеличение частоты дельта-ритма, который постепенно сменяется высокочастотной активностью – альфа и бета. Единичные исследования, в которых процесс пробуждения изучался с помощью вживленных в мозг электродов у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией (Bassetti et al., 2000; Terzaghi et al., 2009 Peter-Derex et al., 2015), обнаружили неодновременность пробуждения разных отделов мозга. В частности, было показано, что у сенсорных и моторных зон коры порог активации ниже, чем у ассоциативных (Terzaghi et al., 2009 Peter-Derex et al., 2015), более того, на раннем этапе пробуждения активация сенсорных и моторных областей сопровождается еще большей деактивацией ассоциативных – в дорсолатеральной фронтальной коре и в дорсолатеральной теменной коре регистрируется парадоксальное увеличение дельта-мощности, как будто бы эти отделы пытаются подавить распространение возбуждения и продолжить “спать” (Peter-Derex et al., 2015). Также было показано, что во время неполных пробуждений у пациентов, страдающих сомнамбулизмом, в моторной и поясной коре может регистрироваться бодрствующая активность, в то время как в лобно-теменной ассоциативной коре преобладает повышенная дельта-активность, характерная для глубокого сна (Terzaghi et al., 2009). Кроме того, недавняя работа на здоровых добровольцах с использованием метода фМРТ также продемонстрировала, что первыми в процесс пробуждения вовлекаются правая островковая доля и сенсомоторная кора, при том, что лобные и теменные области коры активируются значительно позже (Alcaide et al., 2021). Поскольку во время сна мы наиболее уязвимы, основная функция пробуждения – восста-

новление восприятия внешних сигналов и поведенческой реактивности, и это восстановление должно происходить быстро. Поэтому можно заключить, что очередность пробуждения разных отделов мозга неслучайна и имеет важный адаптационный смысл. По-видимому, пониженный порог пробуждения моторных отделов коры объясняется их филогенетической древностью относительно других корковых зон и является эволюционной адаптацией, способствующей выживанию в дикой природе, позволяя спастись бегством при пробуждении, вызванном внезапным появлением опасности.

Более низкий порог активации моторной коры отмечается не только при пробуждении, он также неоднократно был описан в исследованиях, посвященных неоднородности глубины сна в разных отделах мозга, в частности в исследованиях такого феномена, как локальное бодрствование (Nobili et al., 2011; De Carli et al., 2016). Такая неоднородность уровней бодрствования в коре головного мозга может быть обусловлена тем, что разные области неокортекса испытывают различное “давление сна”, т.е. подвергаются различному влиянию гомеостатических факторов, обуславливающих потребность во сне. Так, лобные области коры испытывают наиболее высокое давление сна и демонстрируют выраженный ответ на его депривацию (Magzano et al., 2010). Было также показано, что даже во время реакций *arousal*, возникающих во время сна в ответ на внешние стимулы, у ассоциативных зон коры порог активации выше, чем у сенсорных и моторных (Peter-Derex et al., 2015; Latreille et al., 2020).

В итоге данные литературы указывают на то, что пробуждение не является однородным процессом, равномерно охватывающим весь мозг. Различие порогов активации сенсомоторных и ассоциативных отделов коры головного мозга приводит к тому, что в начале пробуждения в них сосуществуют локальные очаги бодрствования и сна. Поэтому можно предположить, что если простые поведенческие реакции могут восстанавливаться в первые секунды пробуждения, то сложные формы поведения, требующие участия ассоциативных зон, такие как ориентация в пространстве и абстрактное мышление, по-видимому, требуют полного пробуждения мозга и восстанавливаются значительно позднее. На это указывают также результаты исследования, в котором с помощью анализа вызванных потенциалов мозга у

здоровых добровольцев было показано, что разные аспекты пробуждения — восстановление доминирующего альфа-ритма в ЭЭГ, или ЭЭГ-пробуждение, появление первых неосознанных реакций на внешние стимулы и, наконец, их сознательное восприятие — происходят не одновременно. Если автоматические реакции могут быть зарегистрированы уже в первые секунды перехода от сна к бодрствованию, еще до ЭЭГ-пробуждения, то способность к сознательным реакциям восстанавливается значительно позже. А именно — такие корреляты осознанного восприятия стимулов, как появление компонента P300 в вызванных потенциалах мозга, а также способность избирательно реагировать на целевые стимулы при пробуждении, появляются на 20–25 с позже восстановления в ЭЭГ альфа-активности, характерной для бодрствования (Liaukovich et al., 2022).

Однако, несмотря на то, что неодновременность пробуждения сенсомоторных и ассоциативных областей коры была неоднократно показана (Terzaghi et al., 2009; Peter-Derex et al., 2015; Alcaide et al., 2021), особенности восстановления функций, в которых участвуют эти отделы, до сих пор не изучались. Поэтому мы решили сравнить восстановление сенсомоторных реакций, обеспечивающихся “ранопробуждающимися” сенсорными и моторными отделами мозга, с восстановлением способности к абстрактному мышлению, которое требует участия ассоциативных отделов неокортекса. Также мы решили сопоставить особенности восстановления этих форм поведения при пробуждении с восстановлением бодрствующей активности мозга в суммарной электроэнцефалограмме (ЭЭГ). К сожалению, ЭЭГ обладает малым пространственным разрешением в сравнении с внутримозговой регистрацией биоэлектрической активности (Müller-Putz, 2020), но, поскольку ЭЭГ имеет достаточно высокое временное разрешение, этот метод позволяет исследовать не только первые минуты, но и первые секунды пробуждения, и сопоставлять динамику восстановления поведенческих реакций с постепенным повышением уровня бодрствования.

В итоге мы поставили своей целью оценить возможные различия в скорости восстановления зрительно-моторной координации и абстрактного мышления в первые секунды пробуждения от сна. А также сопоставить динамику восстановления этих функций с дина-

микой восстановления бодрствующей активности в ЭЭГ. Поскольку дневной сон имеет те же механизмы, что и ночной (Mylonas et al., 2020), в данной работе мы ограничились изучением пробуждений из 3-й стадии дневного сна. Дневной сон, хоть он и короче ночного и состоит обычно из одного цикла, в большинстве случаев включает в себя все стадии сна, и в том числе 3-ю стадию (Mylonas et al., 2020; Simon et al., 2022; Shah et al., 2023), поэтому он вполне подходит для исследования закономерностей восстановления разных форм поведения при пробуждении из 3-й стадии сна. В качестве задачи на зрительно-моторную координацию мы выбрали управление движущимся объектом, которое требует постоянного моторного направления объекта, движущегося по экрану по случайной траектории, и приведения его к цели. Эта задача позволяет, во-первых, регистрировать простые зрительно-моторные реакции на появление объекта; во-вторых, она дает возможность оценивать динамику восстановления тонкой зрительно-моторной координации, необходимой для приведения объекта к цели по кратчайшей траектории. В качестве задачи на абстрактное мышление было выбрано решение арифметических примеров.

МЕТОДИКА

Участники

В эксперименте участвовали 30 добровольцев (средний возраст 24 ± 4 года), без неврологических нарушений и нарушений сна. Мы использовали следующие критерии исключения из эксперимента: острые или хронические заболевания, прием любых медикаментов, алкогольная или наркотическая зависимость, работа со сменным графиком, отсутствие регулярного режима сна и бодрствования, расстройства сна, перелеты со сменой часовых поясов в течение последнего месяца. Участники исследования соблюдали регулярный цикл сна-бодрствования с длительностью ночного сна около 8 ч со временем отхода ко сну 23:00–00:00 и временем подъема 07:00–08:00. За сутки перед участием в эксперименте они воздерживались от употребления алкоголя, кофе, чая, шоколада. Перед началом опыта испытуемые были осведомлены о предмете и процедуре исследования, а добровольность участия была подтверждена подписанным Информированным согласием. По завершении каждого эксперимента они получали денежное

вознаграждение (750 руб.). Все протоколы в нашем исследовании были составлены в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и одобрены этической комиссией ИВНД и НФ РАН. Поскольку 4 добровольца не смогли достичь 3-й стадии сна (наблюдались только 1-я и 2-я стадии), они были исключены из анализа, в итоге анализировались данные только 26 добровольцев, среди которых было 7 мужчин и 19 женщин.

Процедура

После подписания информированного согласия все участники эксперимента заполняли опросник “Самочувствие, активность, настроение” (САН), оценивающий их психоэмоциональное состояние, а также проходили тесты, определяющие субъективный уровень сонливости: стэнфордскую шкалу сонливости (Stanford Sleepiness Scale/SSS) и визуально-аналоговую шкалу сонливости (Visual Analogue Sleepiness Scale/VASS).

Перед дневным сном добровольцу сообщали, что будет оцениваться скорость его пробуждения из 3-й стадии дневного сна, просили проснуться как можно быстрее и предупреждали, что, когда его разбудят, сразу нужно будет смотреть на экран, закрепленный над кроватью и решать предложенную задачу, используя для этого мышшь-кольцо, закрепленную на пальце.

Добровольцам предлагали два типа задач – на зрительно-моторную координацию и на арифметический счет. Задачи демонстрировали на экране компьютерного монитора, расположенного на высоте около 1 м над ногами участника. В задаче на зрительно-моторную координацию “Кружки” испытуемый должен был управлять траекторией красного кружка, движущегося по экрану из левого нижнего угла по случайной параболе, и, поворачивая вверх и вниз колесико компьютерной мыши-кольца (закрепленной на пальце), направлять его в цель – черный кружок такого же размера в правом верхнем углу (рис. 1 слева сверху). В задаче на арифметический счет “Равенства” доброволец должен был ответить, верно ли предложенное арифметическое равенство или нет. На экране монитора ему предъявлялись правильные либо неправильные равенства и два полых квадрата сверху и снизу от примера – зеленый и красный. Выбор верности-неверности производился поворотом вверх и вниз колесика

компьютерной мыши (в сторону зеленого или красного квадрата) (рис. 1 справа сверху). Каждая задача включала в себя 40 проб (40 движущихся кружков либо 40 примеров) и длилась 2 мин. В зрительно-моторной задаче каждая проба длилась 2.5 с и между пробами отсутствовали паузы. Длительность пробы в арифметической задаче составляла 3 с, и пробы были разделены между собой фиксационной точкой длительностью в 0.5 с. Однако добровольцы в нормальном состоянии решали каждое равенство быстрее отведенного времени – приблизительно за 2 с. Поэтому в среднем длительность проб (вместе с паузами) в обеих задачах была одинаковой и составляла 2.5 с. В задаче “Кружки” все параболы, по которым вылетали кружки, задавались случайным образом. Половина проб в задаче “Равенства” представляла собой сложение двух однозначных чисел, а вторая половина – сложение двузначного и однозначного чисел. Два типа сложений были распределены в задаче квазислучайно и были примерно одинаковы по сложности. Задачи предъявлялись в бодрствовании до и после сна (обе задачи), а также во время форсированного пробуждения от дневного сна – сразу же после пробуждающего сигнала (одна из задач).

Каждый доброволец участвовал в двух экспериментах: в одном при пробуждении предъявлялась задача на зрительно-моторную координацию “Кружки”, в другом – задача на арифметический счет – “Равенства”. Соблюдали строгий контрбаланс: половина добровольцев при первом пробуждении получала зрительно-моторную задачу, вторая половина – арифметическую. Каждый эксперимент начинался в 13:00 и заканчивался в 17:30. Начало дневного сна приходилось на промежуток времени 14:30–15:00, добровольца будили при достижении им 3-й стадии ортодоксального сна. Испытуемые спали в звукоизолированной и специально оборудованной для сна комнате при полностью выключенном освещении.

Регистрация ЭЭГ

Для записи использовали 19 каналов ЭЭГ (по международной системе 10–20), один канал электромиограммы (ЭМГ) и два канала окулограммы, использовали энцефалограф “Энцефалан-EEGR-19/26” (фирма “Медиком”, Таганрог, Россия) с частотой дискретизации 250 Гц. ЭМГ регистрировали от подбо-

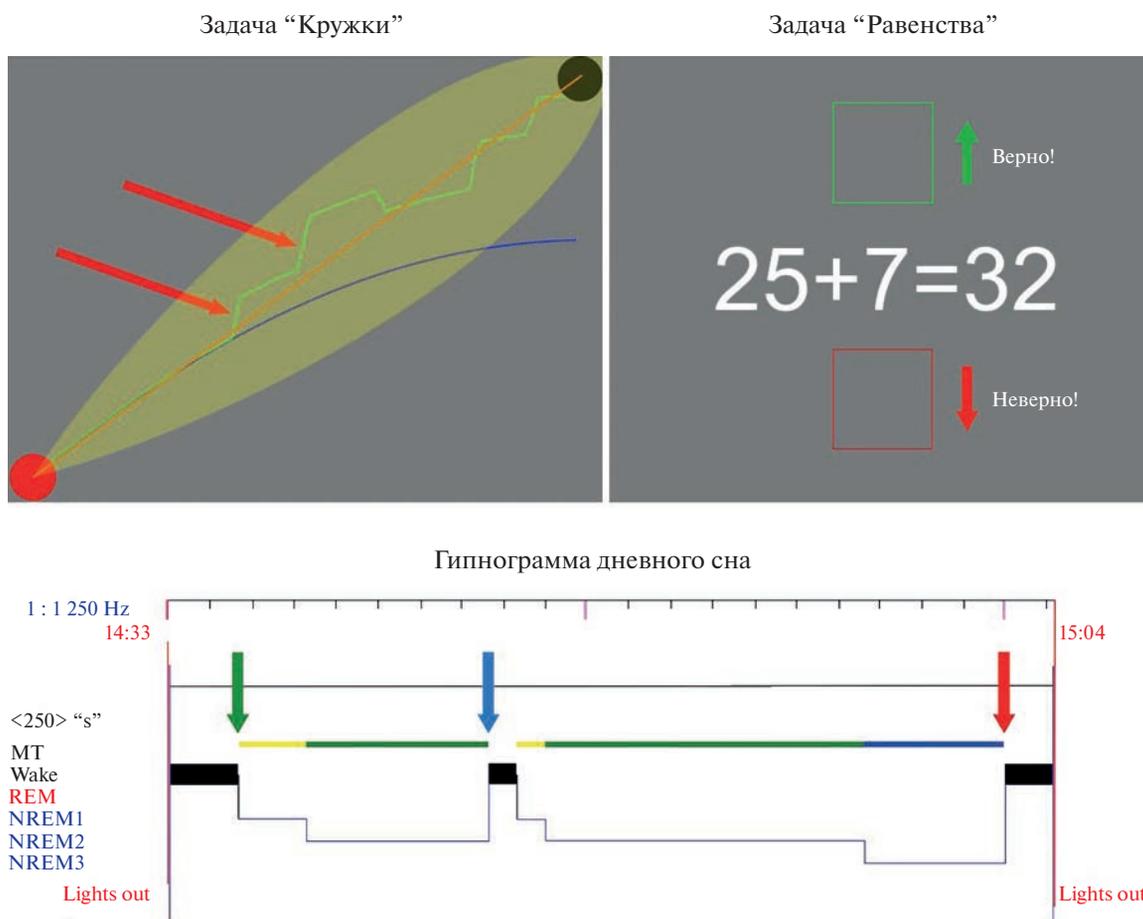


Рис. 1. Задачи “Кружки” и “Равенства” и пример типичной гипнограммы дневного сна. Синей кривой показана случайная парабола, по которой движется кружок. Зеленая линия – результирующая траектория полета кружка. Желтым полем обозначен оптимальный коридор. Наклонными красными стрелками указаны корректирующие “подкрутки”. Вертикальными красной и зеленой стрелками над равенством показано направление движения колесика компьютерной мыши-кольца при решении когнитивной задачи. На гипнограмме зеленой стрелкой показано начало засыпания; синей стрелкой – спонтанное пробуждение из 2-й стадии сна; красной стрелкой – форсированное пробуждение из 3-й стадии сна.

Fig. 1. The motor task “Circles” and the cognitive task “Equalities” and example of a typical daytime nap hypnogram. The blue arrows show the parabola along which the circle moves in motor task. The green line shows the resulting trajectory of the circle, controlling by subjects. The yellow field indicates the optimal corridor. Slanted red arrows show corrective “spins”. The red and green vertical arrows show the direction of movement of the computer mouse-ring wheel when subjects solve the cognitive task. On the hypnogram, the green arrow shows the start of falling asleep; the blue arrow shows spontaneous awakening from the 2nd stage of sleep; the red arrow shows the forced awakening from the 3rd stage of sleep.

родка. Для регистрации использовалась программа “Энцефалан”. Частота дискретизации составляла 250 Гц.

Во время дневного сна добровольцев полисомнограмму отслеживали в режиме “онлайн”. Наступление 3-й стадии определяли по индексу дельта-ритма в соответствии со стандартными критериями (Iber C et al., 2007) – когда он превышал 20% (когда в течение 30-се-

кундной эпохи анализа наблюдалось 6 или больше секунд дельта-активности с амплитудой более 75 мВ и частотой, меньшей 2 Гц). При мониторинге полисомнограммы в основном ориентировались на центральные отведения С3, Сz, С4. Пробуждение из 3-й стадии сна производили акустическим тоном – “будильником” – частотой 440 Гц, длительностью 1.5 с и индивидуально подобранной для

каждого испытуемого интенсивностью. Звук подавался через динамик, расположенный на расстоянии примерно 1 м от головы испытуемого.

Стадирование полисомнограмм

Запись ЭЭГ разбивали на 30-секундные эпохи. Каждую эпоху относили либо к бодрствованию, либо к одной из стадий ортодоксальной фазы сна (стадия 1, стадия 2, стадия 3), либо к парадоксальной фазе сна в соответствии со стандартными критериями (Iber C et al., 2007).

На основе проведенного стадирования строили гипнограммы для каждой записи дневного сна (рис. 1 снизу) и фиксировали данные о таких параметрах сна, как латентный период засыпания, а также латентный период и длительность 3-й стадии сна.

Спектральный анализ ЭЭГ

Полученные записи ЭЭГ обрабатывали в программном обеспечении Brainvision Analyzer 2.0 (Brain Products GmbH, Гильхинг, Германия). На запись накладывали следующие фильтры: notch-фильтр 50 Гц, фильтр верхних частот 0.5 Гц и фильтр нижних частот 30 Гц. Далее из записей всего сна вырезали момент форсированного пробуждения и производили очистку артефактов от ЭОГ, ЭКГ и ЭМГ с помощью анализа независимых компонент (Independent Component Analysis, ICA) и его обратной версии (inverse ICA) (Makeig et al., 1996). Из очищенных записей вырезали сегменты длительностью 5 с в самом начале пробуждения на первых пробах (на 1–5-й пробах) предъявляемой задачи (когда выполнение задачи все еще было затруднено), в конце пробуждения на 25–35-й пробах, а также в середине выполнения задачи (на 15–25-й пробах) во время бодрствования до сна. После этих преобразований проводили спектральный анализ с помощью метода быстрого преобразования Фурье и получали мощностно-частотные спектры по каждому сегменту для следующих ЭЭГ-каналов: F3, Fz, F4, C3, Cz, C4, P3, Pz, P4, O1, O2.

Анализ выполнения задач

Для анализа правильности и скорости выполнения обоих типов задач подсчитывали количество правильно решенных проб. Ко-

личество правильно решенных проб выражали в процентах от их общего числа (от 40). Также мы подсчитывали долю добровольцев, верно справившихся с каждой пробой, от общего числа принявших участие в нашем эксперименте испытуемых (от 26) и латентный период первой реакции добровольца при решении каждой пробы (время первой реакции). В зрительно-моторной задаче “Кружки” первой реакцией считалась первая “подкрутка” – короткое движение колесиком мышцы-кольца – для коррекции траектории движения красного кружка. В арифметической задаче первой реакцией являлся поворот колесика мышцы для ввода ответа – верно или неверно. Исследовали изменение доли верных проб, а также динамику изменения верных решений и времени первой реакции для каждой пробы в течение всей длительности задач.

Анализ стратегий управления траекторией полета кружка

Для анализа тонкой зрительно-моторной координации добровольцев выделяли оптимальный коридор вокруг прямой, соединяющей левый нижний угол экрана (точку вылета кружка) и правый верхний угол экрана (цель, в которую его нужно было направить), – удержание траектории кружка в этой области повышало его вероятность попадания в цель, вне этой области возрастал риск не справиться с задачей (упустить кружок за пределы экрана). Область задавали следующим образом: так как изначально кружок двигался по траектории в виде параболы, то в качестве оптимальной выбирали область, ограниченную двумя параболой с вершинами в точке начала движения, симметричными относительно прямой, проходящей через центр цели и точку вылета, и касающимися окружности с центром, совпадающим с центром цели, и радиусом больше радиуса цели на 10 пикселей (рис. 1 слева сверху). Для каждого кружка (для всех 40 проб) анализировали результирующую траекторию. Сначала оценивали, какая доля этой траектории находилась в оптимальном коридоре (протяженность в пикселях части/частей траектории, находившейся в оптимальном коридоре, выраженная в процентах к общей протяженности траектории). Считали, что чем выше эта доля, тем точнее добровольцы справлялись с управлением движущимся объектом. Кроме того, мы подсчитывали

Таблица 1. Оценка функционального состояния, сонливости и структуры сна – средние значения
Table 1. Assessment of the functional state, drowsiness and sleep structure – average values

Задачи	Опросник САН, баллы			Опросник SSS, баллы		Опросник VASS, баллы		Объективные показатели сна		
	само-чувствие	актив-ность	настро-ение	до сна	после сна	до сна	после сна	ЛП сна, мин	ЛП SWS, мин	длитель-ность SWS, мин
Кружки	5.4 ± 1.21	5.0 ± 1.16	5.9 ± 1.04	3.5 ± 1.42	2.8 ± 1.13	5.6 ± 2.23	3.5 ± 2.00	13.4 ± 14.13	18.6 ± 13.44	6.3 ± 3.22
Равенства	5.3 ± 1.23	6.9 ± 10.31	5.7 ± 1.19	3.4 ± 1.47	2.6 ± 0.99	5.6 ± 1.85	3.2 ± 1.88	11.9 ± 5.76	19.7 ± 9.21	4.9 ± 2.00
Уровень зна-чимости, <i>p</i>	0.49	0.62	0.38	0.67	0.31	0.87	0.47	0.74	0.15	0.067

вали количество корректирующих “подкруток”, совершенное в ходе выполнения каждой пробы, а также подразделяли их на верные и неверные. “Подкрутка” считалась верной, если она сокращала расстояние до прямой, проходящей через центр цели и точку начала движения, и неверной в противоположном случае.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 10 (Stat Soft. Inc., Талса, Оклахома, США). Решение каждой отдельной задачи при пробуждении сравнивали с решением задач в бодрствовании до сна. Также сравнивали решения двух задач между собой. Для оценки нормальности распределения полученных данных применяли критерий Колмогорова – Смирнова. Для нормально распределенных переменных использовали дисперсионный анализ ANOVA (однофакторный и для повторных измерений), для апостериорного анализа применяли критерий Вилкоксона. При сравнении вероятности правильного выполнения каждой пробы при решении обоих типов задач использовали таблицу сопряженности 2 × 2, доверительный интервал в которой вычислялся по критерию Хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Структура сна, сонливость и функциональное состояние

Мы сравнили баллы опросника САН и оценки сонливости по методикам SSS и VASS в двух типах экспериментов (с решением при пробуждении зрительно-моторной либо арифметической задачи) и не обнаружили каких-либо значимых различий в функциональном состоянии добровольцев в этих эксперимен-

тах (табл. 1). Анализ дневного сна также показал, что латентность засыпания, латентный период наступления третьей стадии сна, а также длительность этой стадии были сопоставимы в двух экспериментах. Полученные данные свидетельствуют о схожем состоянии добровольцев перед началом каждого из экспериментов, и о том, что различия в выполнении двух типов задач при пробуждении не были вызваны различным функциональным состоянием добровольцев, их сонливостью либо длительностью глубокого сна.

Доля верно выполненных проб

Средняя доля верно выполненных проб для задачи “Кружки” составила 74.8% в бодрствовании до сна (далее “контроль”) и 59.3% при пробуждении, тогда как для задачи “Равенства” доля верных проб была 88.3% в контроле и 80.9% при пробуждении. Анализ данных показал, что для обоих типов задач средняя доля верных проб при пробуждении была достоверно ниже, чем в контроле ($p < 0.001$). Однако мы также обнаружили, что доля верных проб для задачи “Кружки” была значимо ниже, чем для задачи “Равенства” даже в контроле ($p < 0.001$). Это указывает на то, что задачи оказались несколько различными по сложности выполнения, хотя мы предполагали их сходство на этапе разработки методики.

Чтобы оценить динамику восстановления способности правильно решать каждую задачу, мы для каждой из 40 проб посчитали долю участников эксперимента, верно выполнивших задание. Эта доля, описывающая вероятность верного решения каждой отдельной пробы, также снижалась при пробуждении, но это снижение зависело от типа задачи. Значимое снижение для задачи “Кружки” мы получили для первой половины проб – предъяв-

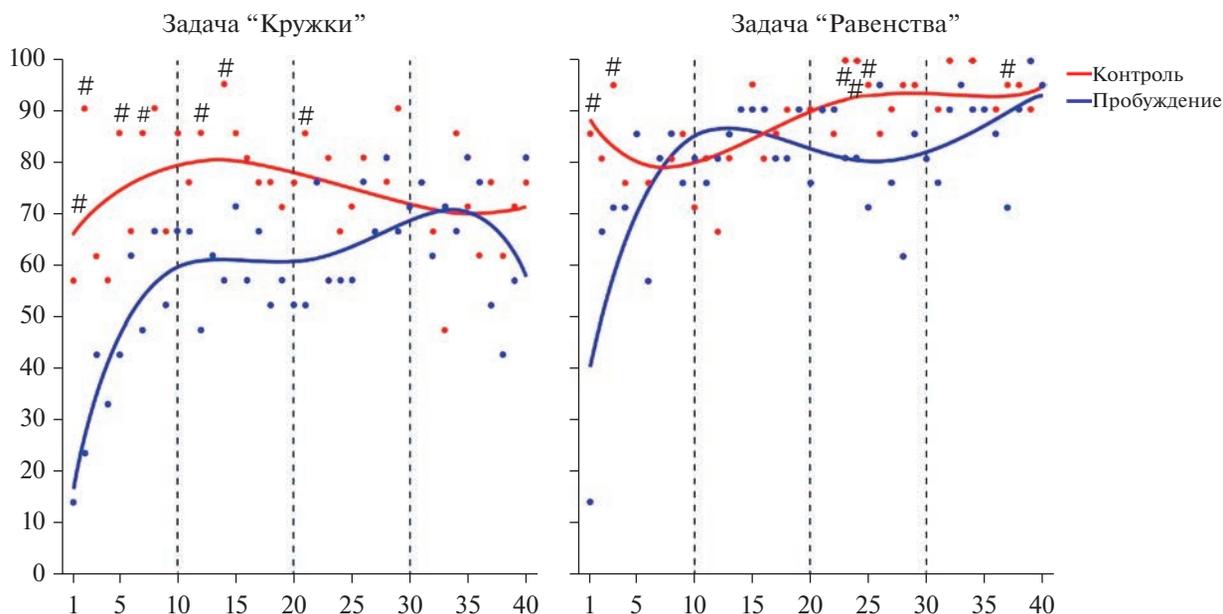


Рис. 2. Динамика изменения вероятности верного решения задач ($n = 26$). По оси ординат – количество участников эксперимента (в процентах), правильно решивших данную пробу, по оси абсцисс – номер пробы. Жирными кривыми показаны линии полиномиального тренда степени 4. # – $p < 0.05$.

Fig. 2. The dynamics of change in the probabilities of correct solution of each trial ($n = 26$). X-axis – the number of participants in the experiment (in percent), correctly solved this test; Y-axis – the trial number. Bold lines show polynomial trend lines of degree 4. # – $p < 0.05$.

лявшихся в течение 1 минуты от начала пробуждения (для 1, 2, 5, 7, 12, 14-й и 21-й проб $p < 0.05$), а при решении задачи “Равенства” – только для первых проб (для 1-й и 3-й пробы $p < 0.05$) и, что интересно, мы отметили повторное уменьшение вероятности верного решения проб в середине выполнения задачи – для 23–25-й и 37-й проб ($p < 0.05$) (рис. 2). Таким образом, результаты показали, что, хотя среднее значение доли верно выполненных проб при пробуждении снижается для обеих задач, успешность выполнения зрительно-моторной задачи при пробуждении страдает заметно сильнее, чем успешность выполнения арифметической задачи.

Из дальнейшего анализа была исключена первая проба, поскольку для нее мы получили мало данных (число добровольцев, выполнивших первую пробу: $n = 9$ для задачи “Кружки”; $n = 3$ для задачи “Равенства”), поскольку добровольцы часто спали на боку и не успевали повернуться к экрану и поэтому пропускали ее.

Время первой реакции

Как и ожидалось, время первой реакции при решении двух типов задач различалось – для

зрительно-моторной задачи “Кружки” двигательные реакции регистрировались раньше, чем для задачи “Равенства”. Среднее время реакции для задачи “Кружки” в контроле составило 1.0 ± 0.52 с, а при пробуждении – 1.1 ± 0.62 с; в то время как среднее время первой реакции при выполнении задачи “Равенства” составило 1.4 ± 0.46 с для контроля и 1.5 ± 0.45 с для пробуждения. Такое различие объясняется тем, что зрительно-моторная задача “Кружки” требовала раннего реагирования и постоянного моторного управления движущимся кружком, в то время как при решении задачи “Равенства” испытуемые поворачивали колесико мыши-кольца только на заключительном этапе – для ввода ответа.

В задаче “Кружки” при пробуждении время первой моторной реакции на появление стимула было в среднем несколько выше, чем в бодрствовании, однако анализ ANOVA показал, что различия между этими состояниями значимы лишь на уровне тенденции ($F(1, 20) = 3.2214$, $p = 0.08$). Чтобы оценить динамику восстановления способности решать задачи, мы разделили все пробы на 3 группы по 13 проб: с 2-й пробы по 14-ю включительно, то есть пробы, которые предъявлялись в течение первых 40 с после пробуждения; пробы с 15-й

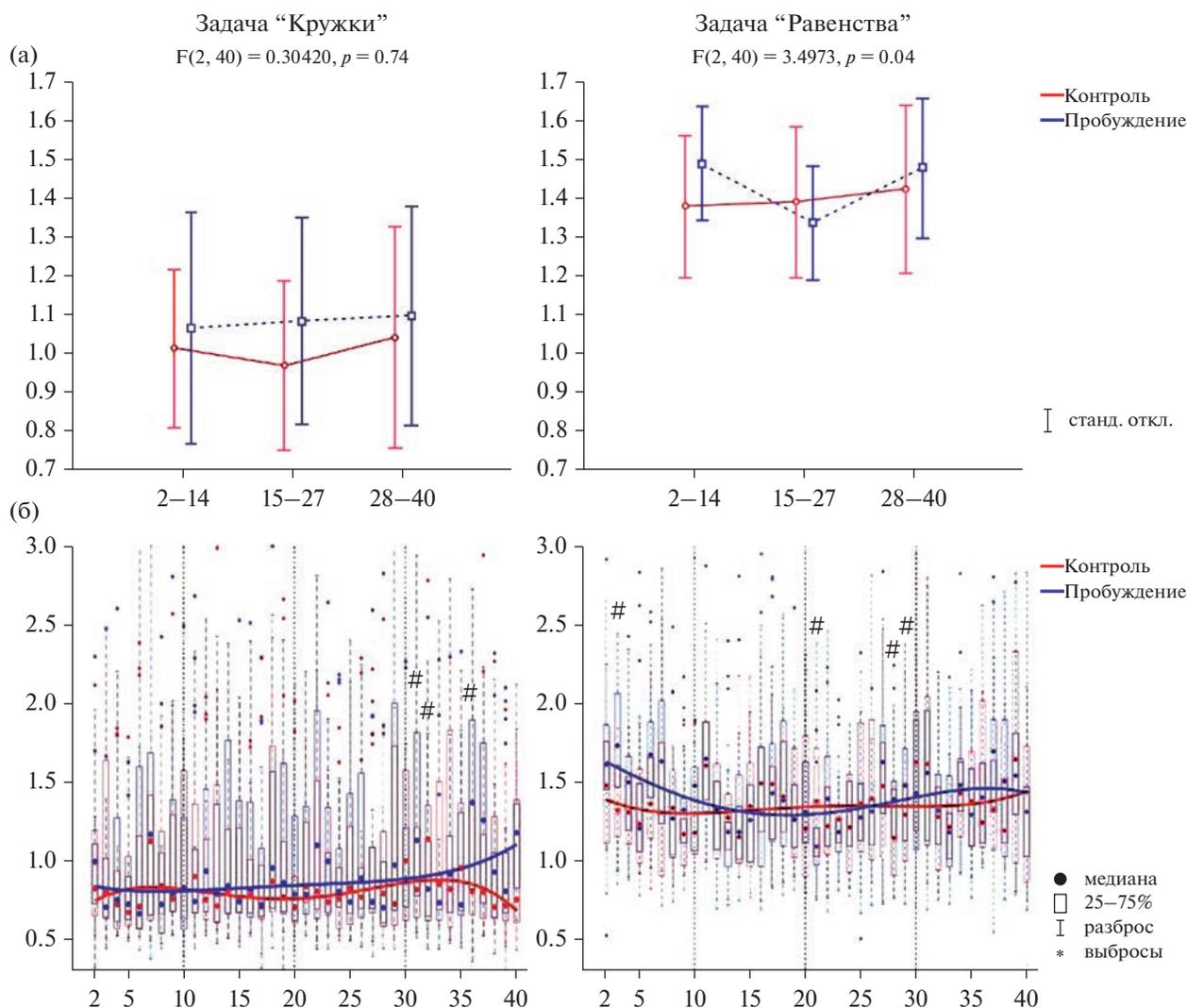


Рис. 3. Результаты дисперсионного анализа ANOVA для повторных измерений для взаимодействия факторов "состояние" × "группы проб" (а) и изменения времени первой реакции (б) для задач "Кружки" и "Равенств" ($n = 26$). По оси ординат – время первой реакции (сек), по осям абсцисс – группы проб (а) и номер пробы (б). Жирными кривыми показаны линии полиномиального тренда степени 4 для медиан. # – $p < 0.05$.
Fig. 3. Repeated measures ANOVA results for factor interactions "State" X "Trial groups" (a) and changes in the first reaction time (б) for the motor task "Circles" and the cognitive task "Equalities" ($n = 26$). X-axis – the first reaction time (sec), Y-axes – the trial groups (a) and the trial number (б). Bold lines show polynomial trend lines of degree 4 for median. # – $p < 0.05$.

по 27-ю включительно – предъявлявшиеся примерно с 40-й по 80-ю секунды от момента пробуждения; и пробы с 28-й по 40-ю включительно – предъявлявшиеся после 80-й с решения задачи. Двухфакторный ANOVA "состояние" × "группы проб" не выявил взаимодействия между этими факторами ($F(2, 40) = 0.30420, p = 0.74$), то есть время первой реакции оставалось примерно одинаковым как в контроле, так и при пробуждении в течение выполнения всей задачи (рис. 3 (а)).

Для задачи "Равенства" время реакции в среднем также не отличалось от контроля: $F(1, 20) = 1.1142, p = 0.30$ по ANOVA, – однако в динамике скорость ответа при пробуждении восстанавливалась нелинейно. Анализ ANOVA показал статистически значимое взаимодействие факторов "состояние" × "группы проб" ($F(2, 40) = 3.4973, p = 0.04$): для первых 13 проб время реакции было больше, чем в контроле, но для вторых 13 – меньше. Апостериорный анализ с помощью критерия Вилкоксона подтвердил, что для проб 3, 28 и

29 при пробуждении время реакции было достоверно выше, чем в контроле, а для пробы 21 – ниже ($p < 0.05$) (рис. 3 (б)).

Показатели зрительно-моторной координации

Чтобы оценить динамику восстановления способности тонкого управления движущимся кружком, мы рассчитывали долю его результирующей траектории, которая находилась внутри оптимального коридора вокруг прямой, соединяющей точку вылета кружка и его цель (рис. 1 слева). При пробуждении средняя доля попадания в оптимальный коридор – 67.3% – была значимо ниже, чем в контроле – 78.5% (по критерию согласия частот, $p < 0.001$). Анализ ANOVA показал статистически значимое взаимодействие факторов “состояние” × “группы проб” ($F(2, 48) = 6.8216, p = 0.002$) – доля траектории в оптимальном коридоре была ниже, чем в контроле на протяжении всего пробуждения, что было подтверждено апостериорным анализом для первых 10 проб, а также для 21-й, 23-й и 32-й пробы ($p < 0.05$) (рис. 4 слева).

Также мы оценивали число корректирующих “подкруток” и долю верных из них. Средняя доля верных “подкруток” от общего числа была значимо ниже при пробуждении (65.7%), чем в контроле (70.8%) ($p = 0.01$, по критерию согласия частот). В среднем общее число корректирующих “подкруток” при пробуждении (6 ± 3 “подкрутки”) практически не отличалось от контроля (7 ± 3 “подкрутки”). Но в динамике обнаружили отличия – для общего числа “подкруток” с помощью двухфакторного анализа ANOVA мы получили, что их было меньше при пробуждении для 1-й и 2-й групп проб, чем в контроле ($F(2, 48) = 4.2690, p = 0.020$). Интересно, что в контроле число “подкруток” постепенно уменьшалось от 1-й группы проб к 3-й, то есть в начале выполнения задачи добровольцы чаще корректировали траекторию, чем в конце. Апостериорный анализ подтвердил значимость отличий для 1, 4, 13, 19, 20, 24-й и 37-й проб ($p < 0.05$) (рис. 4 справа).

Спектральный анализ

Статистическое сравнение данных спектрального анализа в бодрствовании, в начале пробуждения (когда выполнение задачи все еще было затруднено) и в конце пробуждения (когда выполнение задач стало стабильным)

показало различие в спектральной мощности разных частотных диапазонов в этих трех состояниях. Различия в спектральной мощности для всех диапазонов не зависели от типа задачи, поэтому для дальнейшего анализа мы объединили данные обеих задач. Анализ ANOVA показал, что спектральная мощность всего альфа-диапазона была значимо выше при пробуждении, чем в бодрствовании: для альфа-1 (8–10 Гц) ($F(2, 50) = 17.181, p < 0.001$), для альфа-2 (10–12 Гц) ($F(2, 50) = 17.155, p < 0.001$) и для альфа-3 (12–14 Гц) ($F(2, 50) = 21.653, p < 0.001$). Апостериорный анализ с помощью критерия Вилкоксона подтвердил значимость увеличения спектральной мощности альфа-активности во всех отведениях при пробуждении ($p < 0.05$) (рис. 5 слева). Интересно, что эта мощность была высокой не только в начале пробуждения, когда выполнение задач было еще затруднено, но и в его конце, когда способность решать оба типа задач уже восстановилась. Спектральная мощность бета-1-диапазона (14–24 Гц) также была достоверно выше как в начале, так и в конце пробуждения, чем в бодрствовании (анализ ANOVA $F(2, 50) = 25.829, p < 0.001$), что было подтверждено апостериорным анализом для всех отведений ($p < 0.05$). Мощность как дельта-1-, так и дельта-2-диапазона была выше в начале пробуждения и снижалась к его концу, то есть когда восстанавливалась способность верно решать предъявляемые задачи: $F(2, 50) = 25.251, p < 0.001$ для дельта-1 (0.5–2 Гц) и $F(2, 50) = 28.759, p < 0.001$ для дельта-2 (2–4 Гц). Значимость этих изменений была также подтверждена апостериорным анализом ($p < 0.05$) во всех отведениях для дельта-1-диапазона (в начале пробуждения относительно бодрствования и конца пробуждения) и в 9 отведениях для дельта-2-диапазона (F3, P3, Pz, P4, O1 в начале пробуждения относительно бодрствования и F3, Cz, P4, O2 в начале пробуждения относительно его конца) (рис. 5 справа).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами результаты показали, что в среднем в течение первых двух минут после форсированного пробуждения из 3-й стадии дневного сна участники эксперимента хуже справлялись с задачами по сравнению с контролем (во время бодрствования перед сном). Средняя доля верно выполненных проб и в задаче “Кружки” на зрительно-мо-

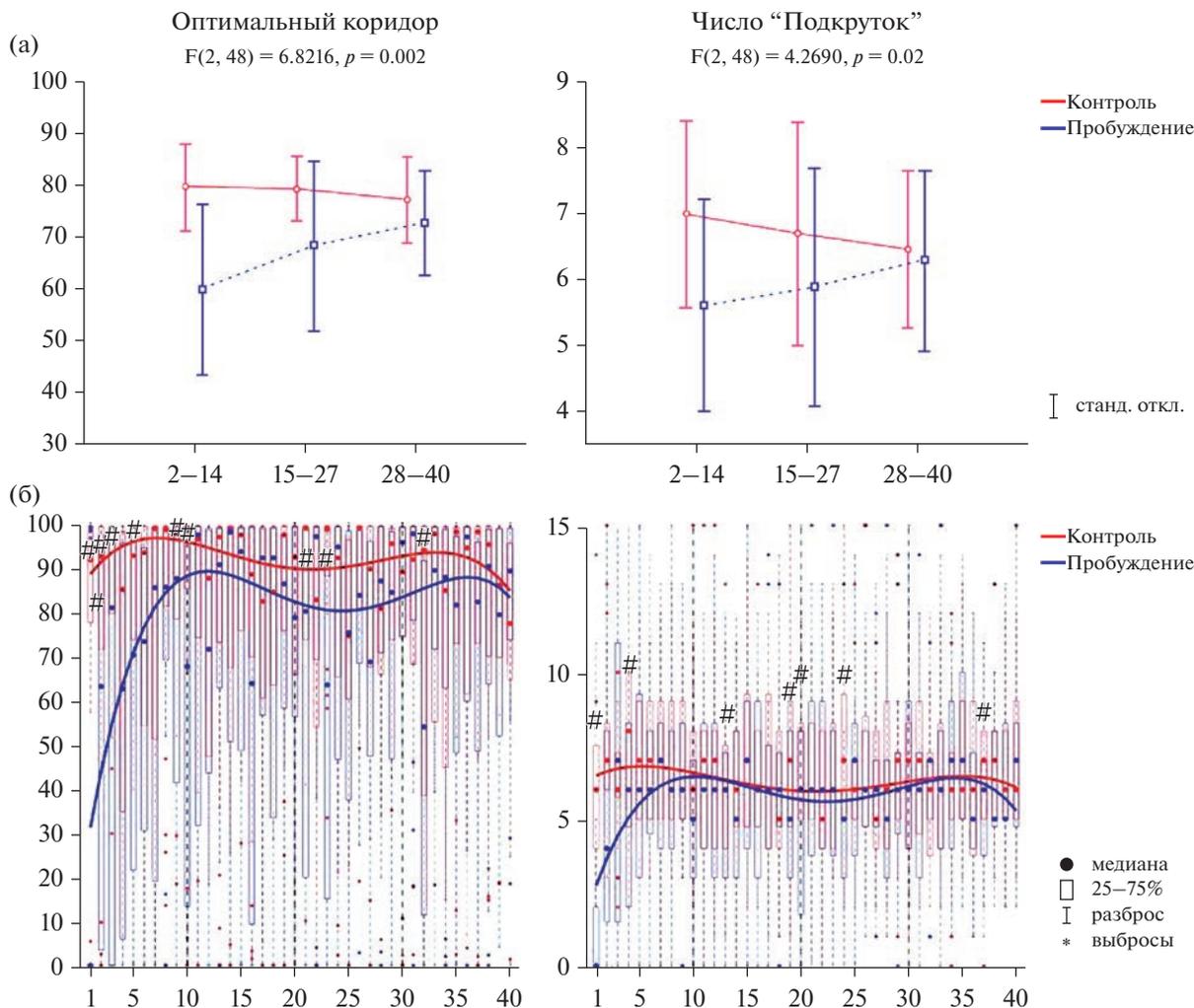


Рис. 4. Результаты дисперсионного анализа ANOVA для повторных измерений для взаимодействия факторов “состояние” × “группы проб” (а) и динамика восстановления зрительно-моторной координации (б) при решении задачи “Кружки” ($n = 26$). По осям ординат – доля траектории, находившейся в оптимальном коридоре (в процентах) (слева) и общее число “подкруток” (справа), по осям абсцисс – группы проб (а) и номер пробы (б). Остальные обозначения как на рис. 3.

Fig. 4. Repeated measures ANOVA results for factor interactions “State” X “Trial groups” (a) and the dynamics of restoration of hand-eye coordination (б) in the motor task “Circles” ($n = 26$). X-axes – change in the proportion of the trajectory that hit the optimal corridor (in percent) (left) and the total number of “spins” (right), Y-axis – the trial groups (a) and the trial number (б). Other designations as in Fig. 3.

торную координацию, и в задаче “Равенства” на арифметический счет была ниже, чем в контроле. Снижены были и такие показатели зрительно-моторной координации, как способность удерживать движущийся объект в оптимальном коридоре, а также доля верных корректирующих “подкруток”. Однако время простой моторной реакции на появление зрительного стимула лишь на уровне тенденции было ниже, чем в контроле.

Анализ динамики выполнения задач показал, что простые моторные реакции на появле-

ние зрительного стимула восстанавливаются при пробуждении практически сразу же – в течение 4 с. Однако более сложные функции – тонкая зрительно-моторная координация и абстрактное мышление – восстанавливаются значительно позже. Так, способность оценивать верность арифметических равенств в задаче “Равенства” восстанавливалась в течение 10 с после пробуждения – начиная с 4-й пробы вероятность верного решения задачи уже не отличалась от контроля. Но при этом до 14-й пробы (в течение, примерно, 40 с)

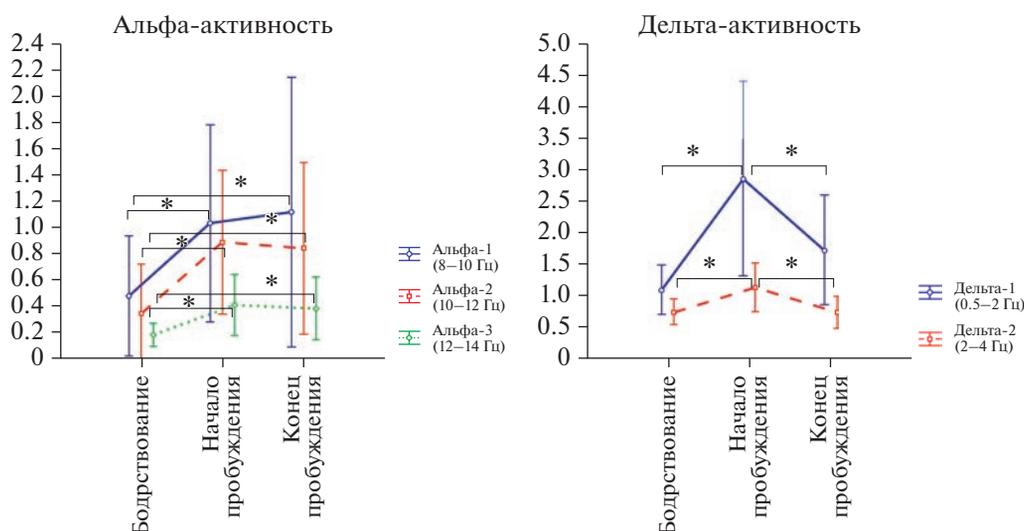


Рис. 5. Результаты анализа ANOVA для повторных измерений для альфа- и дельта-мощности при решении обеих задач усредненные по всем отведениям ($n = 26$). По оси ординат – мощность (в μV^2). * – $p < 0.05$.
Fig. 5. Repeated measures ANOVA results for alpha- and delta-power in both tasks averaged over all leads ($n = 26$). X-axis – the spectral power (μV^2). * – $p < 0.05$.

скорость решения задачи оставалась замедленной.

Интересно, что восстановление способности решать задачу “Равенства” происходило нелинейно: через минуту после пробуждения (на 23–25-й пробах) вероятность верного решения повторно снижалась, хотя скорость решения в это время парадоксальным образом оказалась несколько выше, чем в контроле (статистически значимо для пробы 21), а выполнение проб 28 и 29 снова оказалось замедленным. В литературе есть данные о нелинейном повышении активности нейронных систем, обеспечивающих поддержание бодрствования, во время пробуждения (для обзора см. (Украинцева, Соловьева, 2023)). В отличие от засыпания, процесс пробуждения не является плавным, а начинается с всплеска как вегетативной, так и общей активации (arousal), превышающего уровень, характерный для спокойного бодрствования. В связи с этим, как было показано в исследовании рефлекса вздрагивания на крысах (Horner et al., 1997), в первые секунды после пробуждения центральная нервная система находится в состоянии повышенной готовности к реагированию на внешние стимулы. Возможно, такой всплеск arousal привел к появлению в середине задачи “Равенства” более быстрых, чем в контроле, и, по-видимому, более импульсивных реакций. На повышенный arousal может указывать также высокая спектраль-

ная мощность бета-диапазона, которую мы обнаружили как в начале пробуждения (при выполнении первых 5 проб) так и в конце (во время выполнения проб 25–35).

Восстановление способности верно решать задачу “Кружки” происходило более линейно. Однако, несмотря на то, что время простой сенсомоторной реакции на появление движущегося кружка уже на 2-й пробе не отличалось от бодрствования, все показатели тонкой зрительно-моторной координации достигали контрольного уровня дольше, чем показатели в задаче “Равенства”. В течение первой минуты после пробуждения вероятность приведения объекта в цель в 7 пробах из 21 была значимо ниже, чем в контроле. Способность удерживать объект в оптимальном коридоре восстанавливалась еще дольше – в конце выполнения задачи. Общее количество корректирующих “подкруток” тоже менялось при пробуждении: сначала оно было значительно ниже, чем в контроле, и только к концу задачи достигло контрольных значений.

Таким образом, если простой моторный ответ на появление зрительного стимула возможен уже в первые секунды пробуждения из 3-й стадии сна, то способность верно и быстро решать арифметическую задачу, так же как и способность точно управлять движущимся объектом, возвращаются значительно позже. По-видимому, это может быть связано с тем, что пробуждение сенсорных и моторных зон

опережает пробуждение ассоциативных (Peter-Derex et al., 2015; Alcaide et al., 2021). В результате, как недавно было показано, автоматические, досознательные реакции на внешний стимул появляются значительно раньше, чем осознанные (Liukovich et al., 2022) — даже до появления доминирующего альфа-ритма в ЭЭГ. Возможный механизм такого поэтапного включения простых, а затем сложных реакций, скорее всего, выработался в ходе эволюции, позволяя быстро среагировать на угрозу, застигнувшую животное во сне. Он предполагает максимально быстрое включение при пробуждении первых, автоматических реакций, которые могут быть сформированы без участия ассоциативных зон коры. Более сложные, осмысленные и скоординированные реакции на стимулы, требующие участия ассоциативных областей, включаются позже. По-видимому, это связано с тем, что в бодрствовании ассоциативные зоны характеризуются самым высоким уровнем метаболической активности, вследствие этого имеют наиболее высокое гомеостатическое давление сна и, в итоге, требуют больше времени для пробуждения (Braun et al., 1997).

Во время 3-й стадии сна в коре преобладает высокоамплитудный дельта-ритм. Эта активность характеризуется высокой синхронизацией и стереотипностью во всех отделах коры (Steriade et al., 2001), она препятствует обработке информации (Ковальзон, 2012), и ее мощность коррелирует со степенью угнетения сознания (Trotti, 2017). При пробуждении эта активность исчезает в ЭЭГ не сразу — наши результаты показали, что в течение первых 15 с (во время выполнения первых 5 проб) мощность дельта-ритма оставалась все еще повышенной несмотря на то, что в записи преобладал альфа-ритм. Можно предположить, что, когда человек еще не полностью вышел из состояния сна, очаги локального бодрствования в сенсорных и моторных зонах достаточны для осуществления простых, автоматических реакций на стимул. Но, поскольку как для арифметического счета, так и для точного зрительно-моторного манипулирования необходима активация не только моторных областей коры, но и ассоциативных, то выполнение этих задач на высоком уровне требует более полного пробуждения. Во время выполнения проб с 25-й по 35-ю, когда показатели решения обеих задач достигли контрольного уровня, мощность дельта-ритма снизилась и уже не отличалась от мощно-

сти в бодрствовании перед сном. Поэтому можно заключить, что для восстановления способности к абстрактному мышлению и тонкому зрительно-моторному манипулированию при пробуждении недостаточно появления регулярной альфа-активности в ЭЭГ, но необходимо еще снижение мощности дельта-ритма.

Интересно, что при пробуждении спектральная мощность альфа-диапазона была значимо выше своего уровня в бодрствовании до сна и все еще оставалась повышенной на второй минуте решения задач (пробы с 25-й по 35-ю) несмотря на то, что обе задачи добровольцы решали с открытыми глазами. Вероятно, повышение мощности альфа-ритма может объясняться общей тенденцией к гиперсинхронизации биоэлектрической активности мозга, характерной для сна, которая сохраняется какое-то время и при пробуждении (Левкович, 2022).

Однако следует отметить, что обнаруженные нами изменения спектральной мощности ЭЭГ при пробуждении описывают глобальные сдвиги функционального состояния всего неокортекса. В дальнейшем представляется целесообразным сопоставить восстановление простых и сложных форм поведения при пробуждении с локальными различиями в скорости активации ассоциативных и сенсомоторных областей коры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали полученные результаты, разные аспекты решения задач на абстрактное мышление и на зрительно-моторную координацию при пробуждении из 3-й стадии дневного сна восстанавливаются не одновременно и в части случаев нелинейно. Если скорость простого моторного ответа на стимул достигает уровня бодрствования практически сразу после пробуждающего сигнала, то восстановление способности определять верность или неверность арифметических равенств, а также точного управления траекторией движущегося объекта требует значительно больше времени. Также наши результаты свидетельствуют о том, что для восстановления при пробуждении абстрактного мышления и тонкого зрительно-моторного манипулирования недостаточно появления регулярной альфа-активности в ЭЭГ, но необходимо еще снижение мощности дельта-ритма.

ВЫВОДЫ

1. При пробуждении скорость моторной реакции на появление зрительного стимула восстанавливается почти сразу — в течение 4 с после пробуждающего сигнала.

2. При пробуждении способность выполнять задачи как на абстрактное мышление, так и на зрительно-моторную координацию снижена и восстанавливается примерно через 40 (для задачи на арифметический счет) и 60 (для задачи на управление движущимся объектом) секунд после пробуждающего сигнала.

3. При пробуждении в течение первых 1.5 мин сохраняется более высокая, чем в бодрствовании, спектральная мощность альфа- и бета-активности.

4. При пробуждении в течение первых 15 с, пока способность выполнять задачи на абстрактное мышление и на зрительно-моторную координацию затруднена, отмечается повышенная спектральная мощность дельта-диапазона. Восстановление способности решать оба типа задач сопровождается снижением мощности дельта-активности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 гг.

The work was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation for 2021–2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ковальзон В.М.* Основы Сомнологии: Физиология и нейрохимия цикла “бодрствование-сон”. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. 239 с.
- Левкович К.М.* Восстановление сознания при пробуждении от ортодоксального и парадоксального сна. Электрофизиологическое исследование: автореф... дис. канд. биол. наук. М.: 2022. 26 с.
- Украинцева Ю.В., Соловьева А.К.* Феномен пробуждения от сна. Нейрофизиологические и вегетативные процессы, его обеспечивающие. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2023. 123 (5): 21–27.
- Alcaide S., Sitt J., Horikawa T., Romano A., Maldonado A.C., Ibanez A., Sigman M., Kamitani Y., Bartfeld P.* fMRI lag structure during waking up from early sleep stages. *Cortex*. 2021. 142 (3): 94–103.
- Bassetti C., Vella S., Donati F., Wielepp P.* SPECT during sleepwalking. *Lancet*. 2000. 356 (9228): 484–485.
- Braun A.R., Balkin T.J., Wesenten N.J., Carson R.E., Varga M., Baldwin P., Selbie S., Belenky G., Herscovitch P.* (1997). Regional Cerebral Blood Flow throughout the Sleep-Wake Cycle. An H2(15)O PET Study. *Brain* 120 (Pt 7), 1173–1197. <https://doi.org/10.1093/brain/120.7.1173>
- De Carli F., Proserpio P., Morrone E., Sartori I., Ferrara M., Gibbs S.A., De Gennaro L., Lo Russo G., Nobili L.* Activation of the motor cortex during phasic rapid eye movement sleep. *Ann. Neurol*. 2016. 79 (2): 326–330.
- Horner R.L., Sanford L.D., Pack A.I., Morrison A.R.* Activation of a distinct arousal state immediately after spontaneous awakening from sleep. *Brain Res*. 1997. 778 (1): 127–134.
- Iber C., Ancoli-Israel S., Chesson A., Quan S.F.* for the *American Academy of Sleep Medicine*. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specification. 1st ed.: Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2007. 59 p.
- Latreille V., von Ellenrieder N., Peter-Derex L., Dubeau F., Gotman J., Frauscher B.* The human K-complex: insights from combined scalp-intracranial EEG recordings. *Neuroimage*. 2020. 213: e116748.
- Liaukovich K., Sazhin S., Bobrov P., Ukraintseva Y.* Event-related potential study of recovery of consciousness during forced awakening from slow-wave sleep and rapid eye movement sleep. *Int. J. Mol. Sci*. 2022. 23 (19): e11785.
- Makeig S., Bell A., Jung T.P., Sejnowski T.J.* Independent component analysis of electroencephalographic data. *Advances in neural information processing systems*. 1995. 8: 145–151.
- Marzano C., Ferrara M., Curcio G., De Gennaro L.* The effects of sleep deprivation in humans: topographical electroencephalogram changes in non-rapid eye movement (NREM) sleep versus REM sleep. *J. Sleep Res*. 2010. 19 (2): 260–268.
- Müller-Putz G.R.* Electroencephalography. *Handb. Clin. Neurol*. 2020. 168 (2007): 249–262.
- Mylonas D., Tocc C., Coon W.G., Baran B., Kohnke E.J., Zhu L., Vange M.G., Stickgold R., Manoach D.S.* Naps reliably estimate nocturnal sleep spindle density in health and schizophrenia. *Journal of sleep research*. 2020. 29 (5): e12968.
- Nobili L., Ferrara M., Moroni F., De Gennaro L., Russo G. Lo, Campus C., Cardinale F., De Carli F.* Dissociated wake-like and sleep-like electro-cortical activity during sleep. *Neuroimage*. 2011. 58 (2): 612–619.
- Peter-Derex L., Magnin M., Bastuji H.* Heterogeneity of arousals in human sleep: a stereo-electroencephalographic study. *Neuroimage*. 2015. 123: 229–244.

- Shah S., Ghosh S., Nagarajan L.* Is sleep captured during a standard daytime EEG sufficient to diagnose Electrical Status Epilepticus in Sleep. *Epilepsy Behav. Reports.* 2023. 23: e100611.
- Simon K.C., McDevitt E.A., Ragano R., Mednick S.C.* Progressive muscle relaxation increases slow-wave sleep during a daytime nap. *J. Sleep Res.* 2022. 31 (5): 1–10.
- Steriade M., Timofeev I., Grenier F.* Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 2001. 85 (5): 1969–1985.
- Terzaghi M., Sartori I., Tassi L., Didato G., Rustioni V., LoRusso G., Manni R., Nobili L.* Evidence of dissociated arousal states during NREM parasomnia from an intracerebral neurophysiological study. *Sleep.* 2009. 32 (3): 409–412.
- Trotti L.M.* Waking up is the hardest thing I do all day: sleep inertia and sleep drunkenness. *Sleep Med. Rev.* 2017. 35: 76–84.

MOTOR CONTROL AND COGNITIVE FUNCTIONS RECOVERY DURING FORCED AWAKENING FROM SLOW-WAVE DAYTIME SLEEP

A. K. Soloveva^{a, d, #}, N. K. Solovev^b, A. O. Mokrousova^c, and Yu. V. Ukraintseva^{d, ##}

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russia*

^c*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

^d*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: s_anna_99@mail.ru*

^{##}*e-mail: ukraintseva@yandex.ru*

The recovery mechanisms of various forms of behavior upon awakening from sleep are still not well understood. In this work, we investigated the recovery of simple motor reactions to visual stimuli, fine hand-eye coordination, and abstract thinking upon awakening from the deepest, SWS stage of daytime sleep. Subjects were offered two types of tasks: visual-motor tasks in which it was necessary to control a moving object; and arithmetic, in which it was necessary to determine the correctness of the proposed equalities in wakefulness before sleep and during the first 2 minutes of awakening from sleep. The results obtained showed that the speed of a simple motor reaction to the appearance of a visual stimulus reached the wakefulness level almost immediately after awakening (within 4 seconds), while the restoration of the ability to determine the correctness or incorrectness of arithmetic equalities, as well as the ability to accurately control the trajectory of a moving object required much more time: about 40 seconds (in the arithmetic task) and 60 seconds (in the visual-motor task). The power of the alpha-rhythm upon awakening was higher than in wakefulness. Delta-rhythm power was increased only at the beginning of awakening while task performing was difficult, and in the second minute of awakening the delta-rhythm decreased when task performing was restored. Our data indicate that simple and complex forms of behavior upon awakening are not restored simultaneously.

Keywords: daytime sleep, hand-eye coordination, abstract thinking, SWS stage of sleep, awakening, EEG, alpha-rhythm, delta-rhythm

ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ (КОГНИТИВНОЙ) ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.821.6

РАСПОЗНАВАНИЕ УСТНОЙ РЕЧИ ПО ДАННЫМ МЭГ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОВАРИАЦИОННЫХ ФИЛЬТРОВ

© 2023 г. В. М. Верхлютов^{1, *}, Е. О. Бурлаков², К. Г. Гуртовой³, В. Л. Введенский³

¹Лаборатория высшей нервной деятельности человека, ФГБУН Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

³Национальный Исследовательский Центр “Курчатовский Институт”, Москва, Россия

*e-mail: verkhlyutov@ihna.ru

Поступила в редакцию 02.07.2023 г.

После доработки 28.07.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Распознавание устной речи по данным ЭЭГ и МЭГ является первым шагом разработки систем МКИ и ИИ для дальнейшего использования их при декодировании воображаемой речи. Большие достижения в этом направлении были сделаны с использованием ЭКоГ и стерео-ЭЭГ. В то же время существует мало работ на эту тему по анализу данных, полученных неинвазивными методами регистрации активности мозга. Наш подход основан на оценке связей в пространстве сенсоров с выделением специфического для данного отрезка речи паттерна связанности МЭГ. Мы проверили свой метод на 7 испытуемых. Во всех случаях наш конвейер обработки был достаточно надежен и работал либо без ошибок распознавания, либо с небольшим количеством ошибок. После “обучения” алгоритм способен распознавать фрагмент устной речи при единственном предъявлении. Для распознавания мы использовали отрезки записи МЭГ 50–1200 мс от начала звучания слова. Для качественного распознавания требовался отрезок не менее 600 мс. Интервалы больше 1200 мс ухудшали качество распознавания. Полосовая фильтрация МЭГ показала, что качество распознавания одинаково эффективно во всем диапазоне частот. Некоторое снижение уровня распознавания наблюдается только в диапазоне 9–14 Гц.

Ключевые слова: декодирование речи, связанность в пространстве сенсоров, МЭГ, ЭЭГ, МКИ, ИИ, тета-ритм, альфа-ритм, гамма-ритм

DOI: 10.31857/S0044467723060126, EDN: SWHXYB

Декодирование внутренней речи и речевых стимулов по данным мозговой активности является актуальной задачей для теоретических и прикладных целей современной нейрофизиологии. В рамках данного направления исследователи пытаются решить задачу компенсации утраченных функций при различных видах нарушений воспроизведения и восприятия речи на корковом уровне, что имеет прямое отношение к МКИ. Одновременно изучение этого вопроса помогает продвигаться по пути совершенствования систем ИИ. Существенный прогресс в этом был достигнут при использовании внутричерепных регистраций ЭКоГ (Anumanchipalli et al., 2019) и стерео-ЭЭГ (Norman-Haignere et al., 2022). Однако, инвазивные методики имеют

ограниченный диапазон применений. Недавние исследования показали, что расшифровка макроскопических данных фМРТ с использованием обученной языковой модели может достаточно точно декодировать внутреннюю речь на основе семантической информации (Tang et al., 2023).

Неинвазивные методы регистрации, такие как ЭЭГ и МЭГ, доказали, что восприятие и воспроизведение речи влияет как на ритмическую (Vvedensky et al., 2023; Lizarazu et al., 2023; Neymotin et al., 2022), так и на вызванную макроскопическую электрическую активность мозга (Anurova et al., 2023). Таким образом, имеются все предпосылки для декодирования речи по данным МЭГ и ЭЭГ (Dash et al., 2020). Однако для анализа мозговой ак-

тивности в этом случае используют нейросетевые технологии, результаты которых трудно интерпретируемы. Для этих целей мы предлагаем использовать более простую методику исследования связанности МЭГ в пространстве сенсоров, которая основана на наблюдениях, показавших поразительную схожесть текущей МЭГ-активности на кластерах отведений при прослушивании слов, а также динамическую перестройку этих кластеров при распознавании смысла речевого стимула (Vvedensky et al., 2023).

МЕТОДИКА

Испытуемые. В пилотном исследовании, направленном на тестирование методики, приняло участие 7 испытуемых-добровольцев (4 мужчины и 3 женщины). Один из испытуемых в возрасте 23 года был левшой. Средний возраст молодых испытуемых правой составил 23.8 ± 0.5 лет. Возраст пожилого испытуемого-правши был 67 лет. Все испытуемые не имели неврологических и психических нарушений в анамнезе. Во всех случаях было получено письменное согласие на проведение исследования по протоколу, утвержденному этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (протокол № 5 от 15 января 2020 г.). Записи МЭГ проходили в период с 12 до 16 часов дня.

Стимулы. Испытуемому предъявляли три серии речевых стимулов в виде прилагательных русского языка. В каждой серии звучало восемь оригинальных слов, которые повторяли пять раз. Все сорок слов случайным образом перемешивали. Перед каждой серией предъявляли три слова из этой же серии слов для адаптации испытуемого, но данные регистрации при этих предъявлениях не учитывали для анализа. Серии слов различались по длительности звучания и составили соответственно 600, 800, 900 мс (1–3 наборы). Внутри набора длительность звучания не отличалась более чем на 3 мс для исключения влияния длительности звучания декодируемых слов. Громкость звучания была подобрана для каждого испытуемого индивидуально и составила от 40 до 50 дБ. Частота звуков оцифрованных слов в виде аудиофайла не превышала 22 кГц. После предъявления слова испытуемый должен был нажать на кнопку ручного манипулятора, если понял смысл предъявляемого слова. После нажатия кноп-

ки через 500 ± 100 мс (рандомизировано) следовал следующий стимул, но не позднее 2000 мс после предыдущего предъявления.

Процедура эксперимента. Перед началом эксперимента с помощью устройства трехмерной оцифровки “FASTRAK” (Polhemus, США) определяли координаты анатомических реперных точек (левая и правая преаурикулярные точки и переносица), а также индикаторных катушек индуктивности, прикрепленных к поверхности скальпа испытуемого в верхней части лба и за ушными раковинами. Во время эксперимента испытуемый находился в магнитноэкранированной камере из многослойного пермаллоя (AK3b, Vacuumsmelze GmbH, Германия), а его голова была помещена в стеклопластиковый шлем, являющийся частью стеклопластикового сосуда Дьюара с погруженным в жидкий гелий сенсорным массивом. Испытуемого усаживали таким образом, чтобы поверхность головы находилась максимально близко к сенсорам. Во избежание артефактов звуковые стимулы подавали через пневматическую систему, доставляющую звук от штатного аудиостимулятора. Стимулятор программировали при помощи программы Presentation (США, Neurobehavioral Systems, Inc). Испытуемого просили расслабиться и закрыть глаза. Правой рукой он касался пульта с кнопками. Он должен был нажимать указательным пальцем на одну клавишу после распознавания услышанного слова. Метка начала звучания слова отставала на 9–10 мс от реального нажатия на клавишу. По окончании одной серии предъявлений из трех, испытуемый мог отдохнуть 1–2 мин.

Регистрация. МЭГ регистрировали с помощью 306-канального аппаратно-программного комплекса “VectorView” (Elekta NeuroMag Oy, Финляндия), датчики которого покрывают всю поверхность головы и состоят из 102 триплетов, содержащих один магнитометр и два планарных градиентометра, измеряющих взаимно ортогональные компоненты магнитного поля. В настоящем исследовании анализировали данные от всех 306 сенсоров. Это позволяло анализировать магнитное поле как от поверхностных, так и глубоких токовых источников в коре головного мозга испытуемого. Для регистрации глазодвигательной активности использовали два биполярных отведения электроокулограммы (ЭОГ), состоявших из четырех электродов, расположенных на внешних орбитах обоих глаз (горизонтальная составляющая), а

также над и под орбитой левого глаза (вертикальная составляющая). Запись сигналов МЭГ и ЭОГ производили с частотой дискретизации 1000 Гц при полосе пропускания 0.1–330 Гц. Положение головы относительно массива сенсоров в ходе эксперимента отслеживали в реальном времени с помощью индикаторных катушек индуктивности. Удаление артефактов записи и коррекцию положения головы проводили с помощью метода пространственно-временного разделения сигналов, реализованного в программе “MaxFilter” (Elekta Neuromag Oy, Финляндия). MaxFilter является запатентованной технологией производителя магнитометрической системы и очищает запись МЭГ от основных артефактов физического (колебания внешнего магнитного поля, радиочастотная и сетевая наводка) и физиологического происхождения (ЭКГ, окулограмма, движение головы относительно датчиков за счет дыхания, баллистического эффекта при сокращении сердца, произвольных движений испытуемого).

Анализ данных. Мы не использовали каких-либо дополнительных методов обработки сигнала кроме “MaxFilter” и полосовой фильтрации для выяснения вклада отдельных частотных диапазонов МЭГ от дельта до гамма в корректность распознавания слов. Актуальные отрезки МЭГ выделяли с помощью меток начала звучания слов. Эти отрезки использовали для построения ковариационных матриц следующим образом.

Для каждого слова и каждого его повтора строится вектор \bar{M}_{nk} (n – номер слова, k – номер повтора), имеющий 306 компонент (по количеству датчиков магнитоэнцефалографа). Обозначим через C_{nk} соответствующую вектору \bar{M}_{nk} ковариационную матрицу (1).

$$C_{nk} = \text{cov}(\bar{M}_{nk}). \quad (1)$$

Определяли оператор θ_x преобразования квадратных матриц с действительными элементами, принадлежащими отрезку $[0, 1]$, (матриц ковариации), производящий обнуление элементов главных диагоналей матриц (дисперсий \bar{M}_{nk} в случае матрицы C_{nk}) и всех элементов матриц (ковариаций \bar{M}_{nk} в случае матрицы C_{nk}) со значениями ниже порога x . Затем рассчитывали фильтры F_n для каждого слова (т.е. для каждого n от 1 до 8) по следующему правилу: вычтем из усредненной матрицы ковариации $\frac{1}{5} \sum_{k=1}^5 C_{nk}$ для каждого сло-

ва усреднение $\frac{1}{40} \sum_{n=1}^8 \sum_{k=1}^5 C_{nk}$ матрицы ковариации по всем предъявлениям аудиальных стимулов, к результату применим оператор $\theta_{0.7}$ (здесь в качестве порога $x = 0.7$ взято значение высокой корреляции по шкале Чеддока) и итоговый фильтр обозначим через F_n :

$$F_n = \theta_{0.7} \left(\frac{1}{5} \sum_{k=1}^5 C_{nk} - \frac{1}{40} \sum_{n=1}^8 \sum_{k=1}^5 C_{nk} \right). \quad (2)$$

Вес $w_n(C)$ слова с ковариационной матрицей C относительно n -го фильтра слов F_n можно оценить как

$$w_n(C) = \text{Sum}(C \circ H(F_n)), \quad (3)$$

где функционал Sum ставит в соответствие любой матрице сумму ее элементов, бинарная операция \circ представляет собой поэлементное произведение двух матриц (одной и той же размерности), а H является поэлементной функцией Хевисайда. Если вес $w_n(C)$ слова с ковариационной матрицей C по фильтру F_n превышал вес при всех остальных n , то слово считалось распознанным (номер $n = \hat{n}$) Таким образом, номер распознанного слова можно найти из соотношения (4)

$$\text{номер слова } \hat{n} = \text{argmax}_{n=1, \dots, 8} w_n(C). \quad (4)$$

Веса рассчитывали для всех 40 слов. Пять максимальных значений веса принадлежали распознаваемому слову. Одной ошибкой распознавания считали снижение веса одного из целевых слов ниже максимального веса выбранного из всех предъявлений 35 нецелевых слов. Таким образом, система могла допустить максимально 5 ошибок при распознавании одного слова и 40 ошибок при распознавании 8 оригинальных слов. При этом мы могли оценить успешность распознавания в процентах. При 100% распознавании идентифицировали все 5 одинаковых слов в последовательности из 40 слов. Одна ошибка (неправильно декодированное слово) снижала оценку успешности распознавания на 2.5%. Описанные математические процедуры реализовали в программном конвейере, который доступен на GitHub по адресу: <https://github.com/BrainTravelingWaves/22SpeechRecognition>. Опубликованы данные МЭГ и МРТ, используемые в исследовании (Verkhlyutov, 2022).

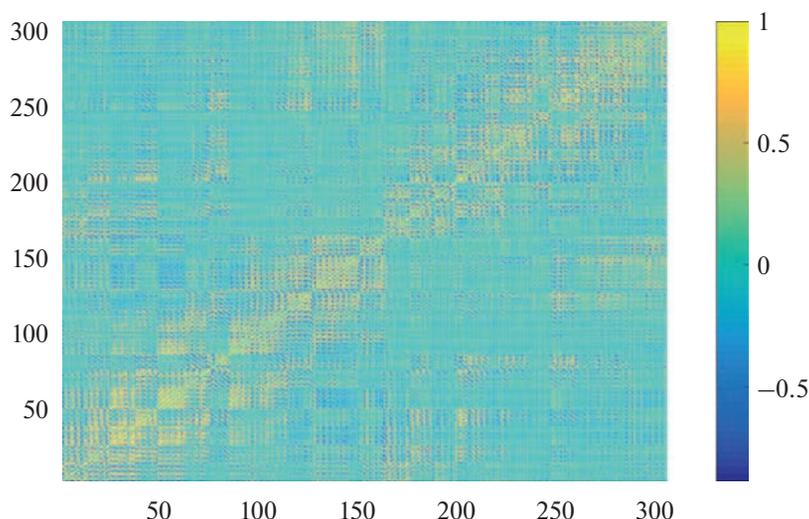


Рис. 1. Матрица корреляционных коэффициентов при сравнении каждого сенсора с каждым 1 секундного отрезка МЭГ от начала звучания первого слова первой серии у испытуемого V1. По осям абсцисс и ординат отложены номера датчиков МЭГ. Цветом кодируется уровень корреляционных коэффициентов.

Fig. 1. Matrix of correlation coefficients when comparing each sensor with each 1 second MEG segment from the beginning of sounding of the first word of the first series in subject V1. The numbers of MEG sensors are plotted along the abscissa and ordinate axes. Color codes the level of correlation coefficients.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Корреляционный анализ секундных отрезков МЭГ показал изменения корреляционных коэффициентов от $r < 0.9$ до $r > -0.9$ (рис. 1). Однако для анализа мы использовали только значения $r > 0.7$. Хорошо скорректированные пары датчиков могли быть не только магнитометрами, но и градиентометрами. В некоторых случаях наблюдали значения корреляции выше порога Чеддока между магнитометрическим и градиентометрическим датчиками.

Весы получали для всех 24 слов в трех сериях для каждого испытуемого. На рис. 2 показаны нормализованные значения весов декодированных слов. Звездочками отмечены целевые слова, кружочками фоновые, ковариационные матрицы сигнала МЭГ которых, также пропускали через матрицу-фильтр. Не всегда удавалось успешно распознать целевое слово с весом близким или меньшим чем у одного из фоновых слов или слов выбора. В этом случае распознавание считали ошибочным.

Была проведена попытка подбора оптимальной длины отрезка анализа МЭГ для распознавания (рис. 3). Сокращение анализируемого отрезка МЭГ слабо сказывалось на качестве распознавания до отрезка 850–1000 мс. На рис. 3 показана успешность распознавания для испытуемого V1 в 3 сериях предъявлений. При интервалах от 200–1000 мс до

750–1000 мс в отдельных сериях наблюдается 100% уровень распознавания. При увеличении такого же анализируемый отрезка МЭГ с 0–50 мс до 0–1200 мс качество распознавания начинало увеличиваться при продолжительности анализируемого отрезка МЭГ от 0 до 600 мс (рис. 4).

Выделение для анализа 100 мс отрезков вызывало общее ухудшение распознавания слов наиболее выраженное на отрезках от 200 до 300 мс и от 1000 до 1100 мс. Наименьшее число ошибок наблюдали на отрезках 300–400 и 700–800 мс (рис. 5).

Мы оценили качество распознавания у всех испытуемых (табл. 1). При этом не выявлено какой-либо тенденции в зависимости от возраста, пола и доминантной руки (испытуемый V3 был пожилым, а испытуемый V5 был леворуким).

Не наблюдались какие-либо тенденции зависимостей между продолжительностью звучания слова-стимула и качеством их распознавания системой. Вероятнее всего качество декодирования зависело от непредсказуемых шумов и нестабильности при регистрации, которые возникали несмотря на все принятые меры по их подавлению.

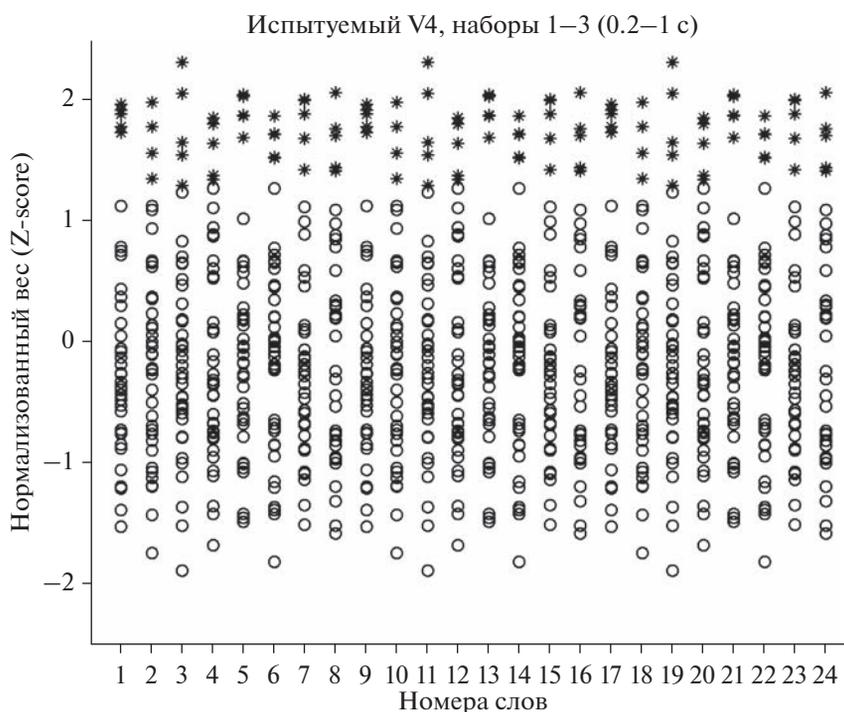


Рис. 2. Нормализованные веса для 24 оригинальных слов (5 предъявлений для каждого слова) для 3 наборов предъявлений испытуемого V4. Анализируемый интервал 0.2–1 с. В каждом столбике обозначены 40 значений весов. Звездочками показаны 5 распознаваемых слов, кружочками фоновые слова. Если звездочек меньше 5, то имеет место наслаивание, т.е. веса имеют очень близкие значения.

Fig. 2. Normalized weights for 24 original words (5 presentations for each word) for 3 sets of presentations of subject V4. The analyzed interval is 0.2–1 s. Each column contains 40 weights. Asterisks show 5 recognizable words, circles show background words. If there are less than 5 stars, then layering takes place, i.e., the weights have very close values.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для поведения популяций нейронов важным фактором является их синхронизация, что позволяет многим нейронам работать параллельно и обрабатывать одновременно многие свойства входного сигнала, устанавливая многочисленные связи с другими ментальными объектами и их свойствами (Chen, 2022).

В наших экспериментах мы наблюдали, что часть сигналов от датчиков было скоррелировано при восприятии любого слова, а часть только при прослушивании определенного слова. На этом свойстве основана наша система распознавания речи. При этом мы наблюдали только амплитудную связанность, которая обусловлена удаленными связями (Rolls et al., 2022) в отличие от фазовой

Таблица 1. Процент правильного распознавания у 7 испытуемых при использовании отрезка 0–1000 мс от начала звучания слова без фильтрации для трех наборов слов

Table 1. Percentage of correct recognition in 7 subjects when using a segment of 0–1000 ms from the beginning of the sound of a word without filtering for three sets of words

Испытуемый	Пол	Возраст	Набор 1 (%)	Набор 2 (%)	Набор 3 (%)
V1	м	24	100	72.5	80
V2	ж	24	90	90	80
V3	м	67	97.5	100	82.5
V4	м	27	100	97.5	100
V5	м/л	23	100	100	85
V6	ж	20	62.5	72.5	92.5
V7	ж	24	75	100	100



Рис. 3. Эффект снижения успешного распознавания, при сокращении анализируемый отрезка МЭГ с 50–1000 мс до 975–1000 мс от начала звучания слова у испытуемого V1. Единичный столбец обозначает процент успешного декодирования при распознавании одного набора из 8 оригинальных слов. Интервалы обозначены для трех последовательных наборов слов. Если все слова распознаны, успешность распознавания 100%.

Fig. 3. The effect of reducing successful recognition, when the analysed segment of the MEG is reduced from 50–1000 ms to 975–1000 ms from the beginning of the sound of the word in the subject V1. A single bar indicates the percentage of errors in the recognition of one set of 8 original words. The intervals are indicated for three consecutive sets of words. If all words are recognized, the recognition success rate is 100%.



Рис. 4. Уровень успешного декодирования при увеличении анализируемый отрезка МЭГ с 0–50 мс до 0–1200 мс от начала звучания слова у испытуемого V1. Единичный столбец обозначает процент успешного декодирования при распознавании одного набора из 8 оригинальных слов. Интервалы обозначены для трех наборов слов. Уровень распознавания не достигает 100% до интервала 0–600 мс.

Fig. 4. The level of successful decoding with an increase in the analyzed segment of the MEG from 0–50 ms to 0–1200 ms from the beginning of the sound of the word in the subject V1. The single column indicates the percentage of successful decoding when recognizing one set of 8 original words. The intervals are indicated for three sets of words. The recognition level does not reach 100% until the interval 0–600 ms.

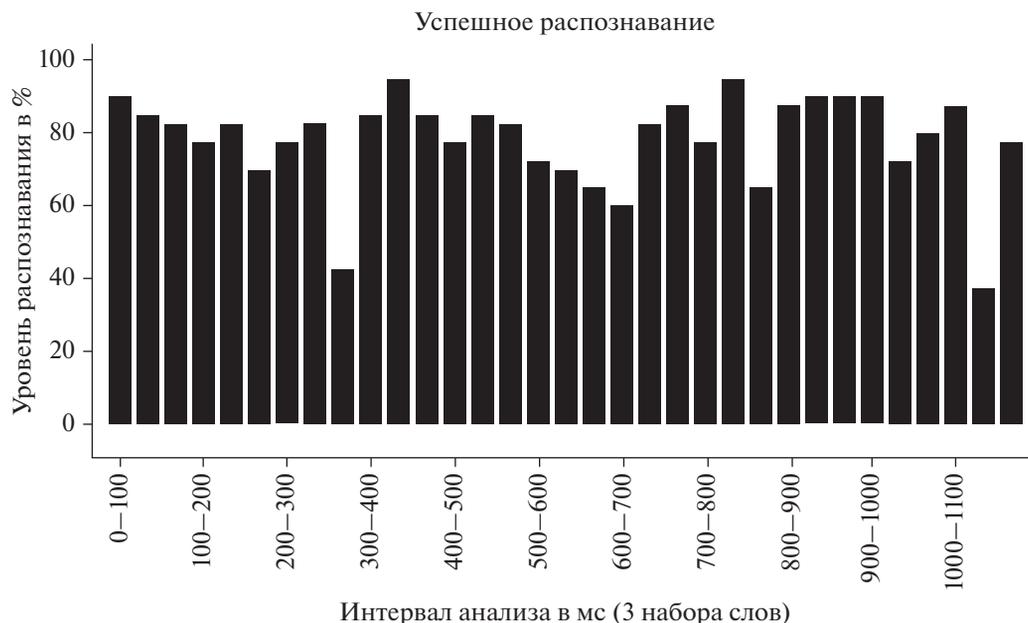


Рис. 5. Уровень успешного декодирования при выделении отрезков 100 мс интервала 0–1000 мс от начала звучания слова у испытуемого V1. Единичный столбик обозначает % успешного распознавания при декодировании одного набора из 8 оригинальных слов повторяющихся 5 раз. Интервалы обозначены для трех наборов слов. Короткие отрезки МЭГ не позволяют декодировать 100% целевых слов.

Fig. 5. The level of successful decoding when selecting segments of 100 ms interval 0–1000 ms from the beginning of the sound of the word in the subject V1. A single bar denotes the % recognition success when decoding one set of 8 original words repeated 5 times. The intervals are indicated for the three sets of words. Short MEG segments do not allow 100% of target words to be decoded.

связанности, которая, в свою очередь, обеспечивается локальными взаимодействиями. Наличие фазовой связанности в наших экспериментах доказывает присутствие как положительно, так отрицательно скоррелированных данных. Это относительно стабильные фазовые задержки (Arnulfo et al., 2020) указывают на возможные эффекты, обусловленные вращением токовых диполей, которые возникают вследствие динамики корковых бегущих волн (Sato, 2022).

Эффективность использования отдельных отрезков МЭГ-сигнала для декодирования можно объяснить имплицитной перцепцией или предикативным кодированием, позволяющей мозгу рассматривать часть фразы как имеющую законченный смысл (Liukovich et al., 2020). Под эффективностью мы понимали число или процент безошибочно распознанных слов. Как показано на графиках (рис. 4–6), эффективность распознавания зависела от набора предъявленных слов, от отрезка МЭГ, который мы вырезали, передвигая окно анализа в пределах от 0 до 1.2 с после начала звучания слова и от полосовой фильтрации.

Частотная полосовая фильтрация показала, что для декодирования слов можно использовать все электроэнцефалографические диапазоны мозговых волн, которые порождаются как ближним, так и дальним взаимодействием между электрическими мозговыми источниками (Proix et al., 2022).

Наряду с другими исследователями (Dash et al., 2023) мы доказали возможность декодирования речевых образов с использованием МЭГ, которая обладает сравнительно низким пространственным разрешением.

Как описано в работе Huth и соавторов (Huth et al., 2016), при использовании метода фМРТ слышимое или воображаемое слово активирует множество корковых структур, содержащих информацию, ассоциируемую с данным словом, которые выходят далеко за пределы зоны Вернике. Это можно назвать “семантическим усилением”. Зона Вернике невелика по площади, и зарегистрировать сигналы от нее без усреднения весьма проблематично. Поэтому работа с ней требует применения инвазивных методов (имплантация ЭКОГ-матриц или микроэлектродов) для декодирования слышимой или воображае-

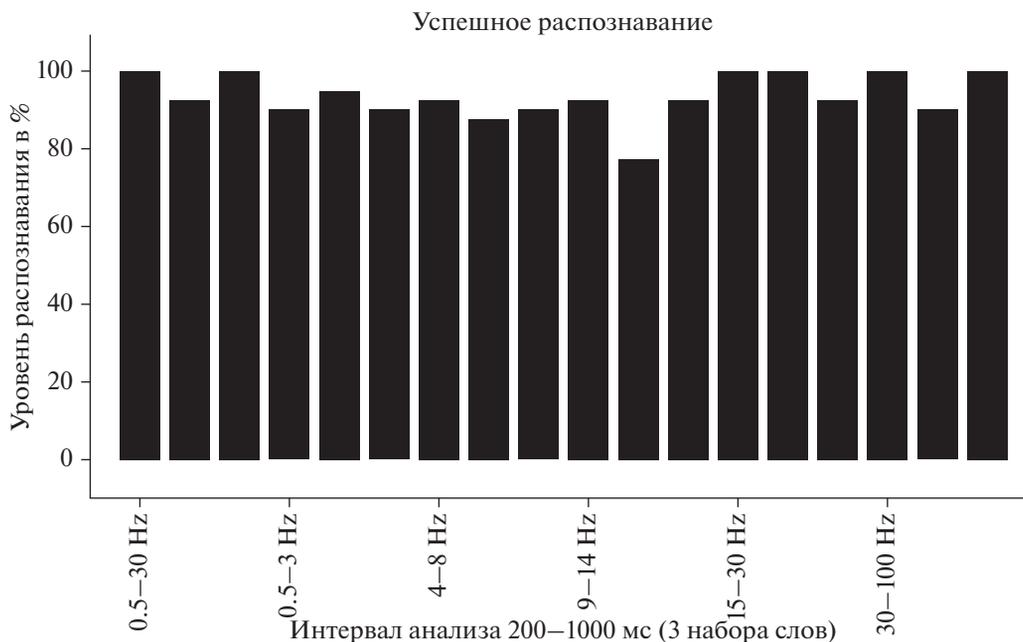


Рис. 6. Успешное распознавание, при полосовой фильтрации МЭГ интервала 200–1000 мс от начала звучания слова у испытуемого V1 в диапазонах 0.5–30, 0.5–3, 4–8, 9–14, 15–30, 30–100 Гц. Единичный столбик обозначает процент распознанных целевых слов относительно фоновых при распознавании одного набора из 8 оригинальных слов, повторно предъявляемых 5 раз. При успешном распознавании 40 (8 × 5) целевых слов при тестировании 320 (40 × 8) отрезков МЭГ уровень распознавания равнялся 100%. Полоса фильтрации обозначена для трех наборов слов.

Fig. 6. Successful recognition, with bandpass filtering of the MEG interval of 200–1000 ms from the beginning of the sound of the word in the subject V1 in the ranges of 0.5–30, 0.5–3, 4–8, 9–14, 15–30, 30–100 Hz. A single bar indicates the percentage of recognised target words relative to the background ones when recognising one set of 8 original words repeated 5 times. With successful recognition of 40 (8 × 5) target words when testing 320 (40 × 8) MEG segments, the recognition level was 100%. The filtering band is indicated for three sets of words.

мой речи. “Семантическое усиление” увеличивает площадь активированной речевым стимулом коры, которая дает более сильные сигналы и позволяет работать над декодированием внутренней речи с использованием МЭГ или ЭЭГ без усреднения данных. И как недавно было показано, это явление позволяет создать систему декодирования внутренней речи с использованием нейронных сетей на основе фМРТ (Tang et al., 2023). Но если использовать наш метод в качестве предварительной обработки перед анализом нейронной сетью, возможно создание не менее эффективных систем на основе МЭГ и ЭЭГ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена на базе Московского МЭГ-центра при поддержке Российского научного фонда, проект № 23-78-00011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anumanchipalli G.K., Chartier J., Chang E.F.* Speech synthesis from neural decoding of spoken sentences. *Nature*. 2019. 568 (7753): 493–498. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1119-1>
- Anurova I., Vetchinnikova S., Dobrego A., Williams N., Mikusova N., Suni A., Palva S.* Event-related responses reflect chunk boundaries in natural speech. *NeuroImage*, 2022. 255 (April), 119203. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119203>
- Arnulfo G., Wang S.H., Myrov V., Toselli B., Hirvonen J., Fato M.M., Palva J.M.* Long-range phase synchronization of high-frequency oscillations in human cortex. *Nature Communications*, 2020. 11 (1): 5363. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18975-8>
- Che B., Ciria L.F., Hu C., Ivanov P.C.* Ensemble of coupling forms and networks among brain rhythms as function of states and cognition. *Communications Biology*, 2022. 5 (1): 82. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03017-4>
- Dash D., Ferrari P., Wang J.* Decoding Imagined and Spoken Phrases From Non-invasive Neural (MEG)

- Signals. *Frontiers in Neuroscience*. 2020. 14: 290. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00290>
- Défossez A., Caucheteux C., Rapin J., Kabeli O., King J.-R. Decoding speech from non-invasive brain recordings. *ArXiv*. 2022. 2208. 12266: 1–15. <http://arxiv.org/abs/2208.12266>
- Huth A.G., De Heer W.A., Griffiths T.L., Theunissen F.E., Gallant J.L. Natural speech reveals the semantic maps that tile human cerebral cortex. *Nature*. 2016. 532 (7600): 453–458. <https://doi.org/10.1038/nature17637>
- Liaukovich K., Ukraintseva Y., Martynova O. Implicit auditory perception of local and global irregularities in passive listening condition. *Neuropsychologia*, 2022. 165 (July 2020): 108129. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2021.108129>
- Lizarazu M., Carreiras M., Molinaro N. Theta-gamma phase-amplitude coupling in auditory cortex is modulated by language proficiency. *Human Brain Mapping*, 2023. 44 (7): 2862–2872. <https://doi.org/10.1002/hbm.26250>
- Neymotin S.A., Tal I., Barczak A., O’Connell M.N., McGinnis T., Markowitz N., Lakatos P. Detecting Spontaneous Neural Oscillation Events in Primate Auditory Cortex. *Eneuro*. 2022. 9 (4), ENEURO.0281-21.2022. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0281-21.2022>
- Norman-Haignere S.V., Long L.K., Devinsky O., Doyle W., Irobunda I., Merricks E.M., Mesgarani N. Multiscale temporal integration organizes hierarchical computation in human auditory cortex. *Nature Human Behaviour*. 2022. 6 (3): 455–469. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01261-y>
- Proix T., Delgado Saa J., Christen A., Martin S., Pasley B.N., Knight R.T., Giraud A.-L. Imagined speech can be decoded from low- and cross-frequency intracranial EEG features. *Nature Communications*, 2022. 13 (1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27725-3>
- Rolls E.T., Deco G., Huang C.-C., Feng J. The human language effective connectome. *NeuroImage*, 2022. 258: 119352.
- Sato N. Cortical traveling waves reflect state-dependent hierarchical sequencing of local regions in the human connectome network. *Scientific Reports*, 2022. 12 (1): 334. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04169-9>
- Tang J., LeBel A., Jain S., Huth A.G. Semantic reconstruction of continuous language from non-invasive brain recordings. *Nature Neuroscience*. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01304-9>
- Verkhlyutov V. MEG data during the presentation of Gabor patterns and word sets. *Zenodo*, 2022. <https://zenodo.org/record/7458233>
- Vvedensky V., Filatov I., Gurtovoy K., Sokolov M. Alpha Rhythm Dynamics During Spoken Word Recognition. *Studies in Computational Intelligence*, 2023. 1064: 65–70. https://doi.org/10.1007/978-3-031-19032-2_7

RECOGNITION OF ORAL SPEECH ACCORDING TO MEG DATA BY COVARIANCE FILTERS

V. M. Verkhlyutov^{a, #}, E. O. Burlakov^b, K. G. Gurtovoy^c, and V. L. Vvedensky^c

^aHigher Nervous Activity of a Person Lab., Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

^bDerzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

^cRNC Kurchatov Institute, Moscow, Russia

[#]e-mail: verkhlyutov@ihna.ru

Speech recognition based on EEG and MEG data is the first step in the development of BCI and AI systems for their further use in inner speech decoding. Great advances in this direction have been made using ECoG and stereo-EEG. At the same time, there are few works on this topic on the analysis of data obtained by non-invasive methods of recording brain activity. Our approach is based on the evaluation of connections in the space of sensors with the identification of a pattern of MEG connectivity specific for a given segment of speech. We tested our method on 7 subjects. In all cases, our processing pipeline was quite reliable and worked either without recognition errors or with a small number of errors. After “training”, the algorithm is able to recognise a fragment of oral speech with a single presentation. For recognition, we used segments of the MEG recording 50–1200 ms from the beginning of the sound of the word. For high-quality recognition, a segment of at least 600 ms was required. Intervals longer than 1200 ms worsened the recognition quality. Bandpass filtering of the MEG showed that the quality of recognition is equally effective in the entire frequency range. Some decrease in the level of recognition is observed only in the range of 9–14 Hz.

Keywords: speech decoding, sensor space connectivity, MEG, EEG, BCI, AI, theta-rhythm, alpha-rhythm, gamma-rhythm

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ:
ВОСПРИЯТИЕ ВНЕШНИХ СТИМУЛОВ,
ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ**

УДК 612.821.6

**INCREASE IN HISTONE ACETYLATION RESCUES A WEAK REMOTE
FEAR MEMORY IN RATS**

© 2023 г. А. Kh. Vinarskaya^a, P. M. Balaban^a, and A. B. Zuzina^a *

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia*

**e-mail: lucky-a89@mail.ru*

Received August 11, 2023; Revised August 24, 2023; Accepted August 31, 2023

There is a growing body of evidence of memory-enhancing effects of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in different species and models. Less clearly is understood whether the increased histone acetylation is able to facilitate the remote fear memory. Thus, the aim of the current study was to examine the ability of HDAC inhibitor sodium butyrate (SB) to ameliorate weakening of the remote fear memory in rats. To assess the ability of HDAC inhibitor SB to improve remote fear memory we compared the performance of two laboratory strains of rats, Wistar and Long-Evans, in context fear conditioning task six months after training before and after the SB administration. We found that the rats showed a strong fear response to the context 24 h after the end of conditioned fear training, full absence of fear after 6 months, and high fear response after the SB administration without additional learning. In control experiments, we found that time-dependent decrease in conditioned fear response to the context was similar in rats under vehicle administration. Moreover, the data obtained showed that both rats' strains showed a similar decrease in freezing response over time, and HDAC inhibition improved the weak remote fear memory in both of them. In addition, the decrease in freezing and memory reinstatement by males matched completely to the female rats' performance. These results indicate that HDAC inhibition appears to have the same "rescue" effects on remote fear memory reinstatement regardless of the strain and gender of rats.

Keywords: sodium butyrate, histone acetylation, epigenetics, remote memory, memory reinstatement, reconsolidation

DOI: 10.31857/S0044467723060138, **EDN:** AUOCKZ

INTRODUCTION

There is a growing body of evidence of memory-enhancing effects of increased histone acetylation in different species. Histone acetylation level is determined by activity of two main enzymes: histone acetyltransferase that acetylates the lysine residues of histones to relax chromatin and increase in the rate of gene transcription and histone deacetylase (HDAC) that deletes acetyl groups, suppressing gene expression (Peixoto, Abel, 2013; Marmorstein, Zhou, 2014; Seto, Yoshida, 2014). As gene transcription is necessary for long-term memory, it is believed that histone acetylation increase promotes the long-term memory while histone deacetylation disturbs it. One of the most common tools for the regulation of histone acetylation is HDAC inhibitors.

Accumulating evidence suggests a critical role for inhibiting HDAC activity in improving the

memory consolidation. It has been demonstrated that systemic or intracerebral administration of HDAC inhibitors enhances memory consolidation in several paradigms, such as object recognition (Stefanko et al., 2009; Roozendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011; Chen et al., 2018; Sartor et al., 2019; Ramirez-Mejia et al., 2021), spatial memory consolidation (Guan et al., 2009; Villain et al., 2016), contextual fear conditioning (Levenson et al., 2004; Vecsey et al., 2007; McQuown et al., 2011; Vinarskaya et al., 2021). Single studies investigated the role of HDAC inhibitors in memory enhancement during reconsolidation (Bredy, Barad, 2008; Villain et al., 2016; Monsey et al., 2020; Ameneiro et al., 2022) and strengthening of impaired memory (Alarcon et al., 2004; Chen et al., 2014; Ko et al., 2016; Zuzina et al., 2020; Vinarskaya et al., 2021). But all of them were focused exclusively on memories that were acquired recently.

It should be noted that neurophysiological mechanisms of remote memory differ significantly from those of recent memories (Albo, Graff, 2018; Lee et al., 2023; Terranova et al., 2023). While initial stages of consolidation of contextual fear memories involve hippocampus and amygdala (Choi et al., 2018; Kim, Cho, 2020), the latest stages involve synaptic changes in neocortex (Frankland, Bontempi, 2005; Albo, Graff, 2018). These changes lead to progressive strengthening of the role of engram neurons in the neocortex (Lee et al., 2023) while memories become less hippocampus-dependent (Kim, Fanselow, 1992). For these reasons, it seemed to us important to determine whether histone acetylation increase rescues the remote fear memory.

Thus, the aim of the current study was to examine the ability of HDAC inhibitor SB to ameliorate weakening of the remote fear memory in rats. To assess the ability of HDAC inhibitor SB to improve the remote fear memory, we compared the performance of two laboratory strains of rats, Wistar and Long-Evans, in context fear conditioning task six months after one day fear conditioning training before and after SB administration. We found that rats trained using conventional procedure showed a strong fear response to the context 24 h after the end of conditioned fear training, the absence of fear after 6 months, and high fear responses after SB administration without additional learning. In control experiments, we found that time-dependent decrease of conditioned fear response to the context was preserved in rats under vehicle administration. Moreover, the data obtained showed that both rats' strains showed a similar decrease in freezing response over time, and HDAC inhibition improved weak remote fear memory in both of them. In addition, the decrease in freezing and memory reinstatement by males matched completely to female rats' performance. These results indicate that HDAC inhibition appears to have the same "rescue" effects on remote fear memory reinstatement regardless of the strain and gender of rats.

METHODS

Naïve twenty-five male Long-Evans rats, twenty-three female Long-Evans rats, twenty-two male Wistar rats and nineteen female Wistar rats obtained from the Animal Facility of the Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences in Pushchino were used in the experiment. The Long-Evans and Wistar strains were specifically chosen as its performance

in hippocampus-related tasks has been characterized as different (Harker, Wishaw, 2002). The rats were 10–12 weeks old and were housed in groups of five. Lights were maintained on a 12:12 hour light/dark cycle. The temperature in vivarium was $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The rats had free access to food and water in their home cages. All experimental procedures were conducted in accordance with Council Directive 2010/63EU of the European Parliament of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Contextual fear conditioning

Animals were handled daily for 1 week before the experiments. Then they were subjected to contextual fear conditioning. Fear conditioning experiments were performed using a PanLab/Harvard Apparatus chamber with a stainless grid floor and equipped with a video recording device. The fear conditioning chamber in which the animals were placed for testing and training procedures was located on four sensors. A special program of PanLab Harvard apparatus allowed in real time to create a mechanogram using the amplitude thresholds. On day 1, rats were placed in conditioned context and after a 120-s adaptation period were given two foot shocks (1 s, 0.5 mA) at 30s intertrial intervals. Freezing was scored only before the shock (baseline) at test session T0. Thirty seconds after the last foot shock, the rats were returned to their home cages. On day 2, 24 h after conditioning, rats were returned to the conditioning chamber for a 3 min test session (test session T1). Then the freezing responses of these animals were measured during the retrieval session 6 months after the conditioning (test session T2). Immediately after T2 (memory reactivation), the control groups received sham injections of saline whereas experimental groups received injection of SB. Freezing duration in all groups was assessed in a subsequent test trial (T3) 24 h later. No shock was delivered during the test sessions T1–T3 (Fig. 1). To control the specificity of the effect of SB to memory reactivation, additional experiments were performed using similar protocol except that rats were tested for memory 24 h before the SB administration (Fig. 2), thus omitting effect of memory reactivation. During the study

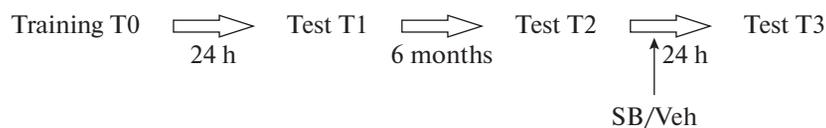


Fig. 1. Scheme of the contextual fear conditioning with SB injection right after Test 2. SB – sodium butyrate, Veh – saline.

Рис. 1. Протокол эксперимента с введением бутирата натрия сразу после теста T2. SB – бутират натрия, Veh – физиологический раствор.



Fig. 2. Scheme of the contextual fear conditioning with 24 h between the Test T2 and SB injection. SB – sodium butyrate.

Рис. 2. Протокол эксперимента с введением бутирата натрия через 24 ч после теста T2. SB – бутират натрия.

both strains were presented with identical training procedures.

Drugs and injections

The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate (SB) (Sigma, St. Louis, USA) was freshly dissolved in saline (0.9% wt/vol) and injected intraperitoneally in a volume of 0.4 ml per 100 g body weight and a dose of 1.2 g/kg. The drug dose was chosen on the basis of the results of other behavioral studies (Blank et al., 2015; Vinarskaya et al., 2021). Control animals received an intraperitoneal injection of the same volume of vehicle (sterile saline). SB/ vehicle were administered immediately after test session T2. A double-blind procedure was used throughout the experiments. During this study both strains were presented with identical protocol of drug administration.

Data collection and statistical analysis

The freezing scores were obtained on-line using the inbuilt platform sensors and software for the Startle and Fear Combined System (Panlab). All scores for each rat were additionally checked for possible mistakes off-line using the video recordings. In our experiments, the adjustments to the initial data were negligible (less than 2%) since the platform sensors were set to a certain weight of the animals and all necessary thresholds were set. We evaluated fear responses by measuring the duration of freezing, defined as the percentage of time of the total observation period without any movement except for breathing (converted to a percentage [(duration of freezing/total duration) × 100]) – when presented with the conditioned context.

The data was analyzed using two-way ANOVA with one repeated measure (test), followed by post-hoc comparisons using the Bonferroni test. All data are presented as the means ± S.E.M. Significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Reinstatement of impaired context fear memory under histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in Long-Evans rats

In the first series of experiments, we decided to check the ability of SB to ameliorate weakening of the remote fear memory in Long-Evans rats. In these series of experiments rats were divided in four groups (G1, female SB, $n = 7$; G2, male SB, $n = 10$; G3, female veh, $n = 10$; G4, male veh, $n = 10$). All groups of rats showed similar low freezing response at pre-conditioning test T0 (Fig. 3, T0, G1, $8.3 \pm 2.0\%$, G2, $8.5 \pm 2.1\%$, G3, $11.8 \pm 2.4\%$ and G4, $11.0 \pm 1.5\%$). At 24 h post-conditioning (test session T1), the two-way ANOVA (with test session and group as factors) revealed significant main effects of test session ($F(1, 33) = 231.44, p < 0.0001$). Bonferroni's multiple comparisons test revealed that both male and female groups showed significantly higher freezing behavior during the test session T1 (Fig. 3, T1, G1, $51.1 \pm 4.4\%$, G2, $55.9 \pm 5.9\%$, G3, $56.5 \pm 4.2\%$ and G4, $56.6 \pm 3.7\%$) as compared to test T0. When tested 6 months after training, all animals showed significantly less freezing behavior (Fig. 3, T2, G1, $25.9 \pm 5.0\%$, G2, $23.1 \pm 4.0\%$, G3, $30.2 \pm 2.8\%$ and G4, $28.9 \pm 4.0\%$): the main effects of the test ($F(1, 33) = 88.36, p < 0.0001$) was significant. Post-hoc analysis of the interaction revealed that

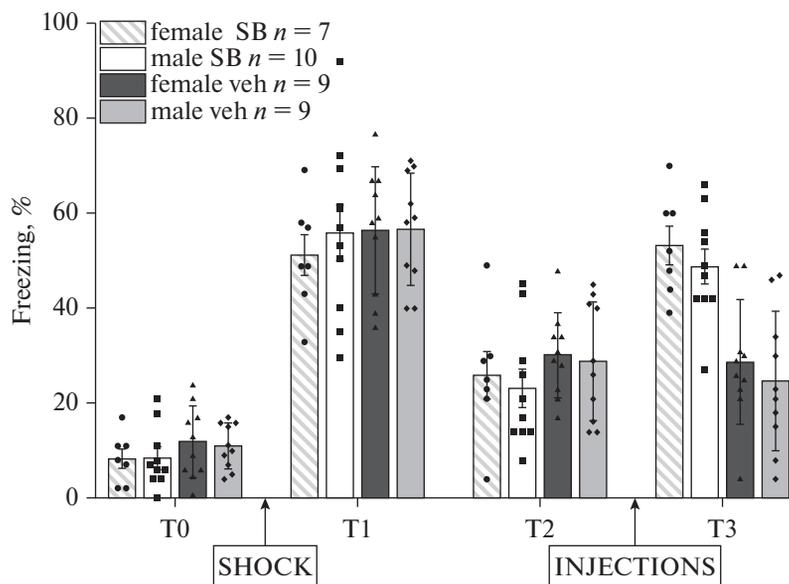


Fig. 3. Effects of a single sodium butyrate (SB) injection on weak remote fear memory in male and female Long-Evans rats. Impaired memory was reinstated under the SB administration (groups female SB (G1) and male SB (G2)), however, there was no reinstatement in the absence of SB (groups female veh (G3) and male veh (G4)). Data are expressed as mean \pm SEM.

Рис. 3. Влияние однократной инъекции бутирата натрия (SB) на слабую отставленную память о страхе у самцов и самок крыс Long-Evans. Память восстанавливалась при введении SB (группы самки SB (Г1) и самцы SB (Г2)), однако в отсутствие SB восстановления не происходило (группы самки veh (Г3) и самцы veh (Г4)). Данные представлены как среднее \pm SEM.

G1–G4 groups did not differ in test session T2. Interestingly, we discovered significant difference between the pre-training scores and those in test session T2 ($F(1, 33) = 70.05, p < 0.0001$). Immediately after T2 (protocol see Fig.1), the rats were intraperitoneally injected with SB (groups G1 and G2) or vehicle (sterile saline, groups G3 and G4). 24 hours later (Fig. 3, T3), SB-treated groups showed significantly increased levels of freezing (G1, $53.3 \pm 4.0\%$, G2, $48.8 \pm 3.6\%$) in contrast to the rats receiving vehicle (G3, $28.7 \pm 4.2\%$, G4, $24.6 \pm 4.6\%$) (the main effect of the group: $F(3, 33) = 3.76, p < 0.05$; the main effect of the test: $F(1, 33) = 37.62, p < 0.0005$). Post hoc analysis revealed that the SB-treated male and female rats did not differ from one another (G1 vs. G2, $p > 0.05$), similar to the vehicle-treated rats (G3 vs. G4, $p > 0.05$), but the vehicle-treated rats had a significantly lower freezing response than did the SB-treated rats (G1 vs. G3, $p < 0.005$; G2 vs. G4, $p < 0.001$). Thus, it appears that SB facilitates the remote weak conditioned fear memory in Long-Evans rats.

Reinstatement of impaired context fear memory under histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in Wistar rats

To evaluate whether the HDAC inhibitor SB would also affect weak contextual memory in male and female Wistar rats, four groups of animals (G1, female SB, $n = 6$; G2, male SB, $n = 8$; G3, female veh, $n = 7$; G4, male veh, $n = 8$) were trained using the same procedure as in the Long-Evans strain. As illustrated in Fig. 4, all groups of rats showed similar low freezing response at pre-conditioning test T0 (fig. 4, T0, G1, $12.8 \pm 2.5\%$, G2, $7.8 \pm 1.5\%$, G3, $11.1 \pm 1.7\%$ and G4, $6.9 \pm 1.4\%$). All groups acquired a strong conditioned freezing response to the conditioning context after training (test session T1): the two-way ANOVA (with test session and group as factors) revealed significant main effects of test session ($F(1, 25) = 427.73, p < 0.0001$). Bonferroni's multiple comparisons test revealed that both male and female groups showed significantly higher freezing behavior during the test session T1 (Fig. 4, T1, G1, $63.5 \pm 8.0\%$, G2, $58.0 \pm 3.0\%$, G3, $64.1 \pm 2.2\%$ and G4, $67.0 \pm 6.5\%$) as compared to test T0. The fear responses measured 6 months

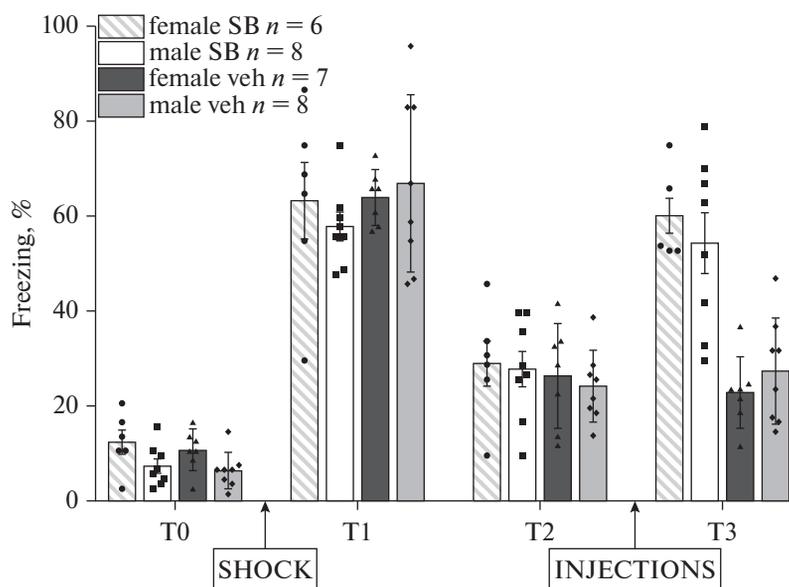


Fig. 4. Effect of a single sodium butyrate (SB) injection on a weak remote fear memory in male and female Wistar rats. Impaired memory was reinstated under SB administration (groups female SB (G1) and male SB (G2)), however, there was no reinstatement in the absence of SB (groups female veh (G3) and male veh (G4)). Data are expressed as mean \pm SEM.

Рис. 4. Влияние однократной инъекции бутирата натрия (SB) на слабую отставленную память о страхе у самцов и самок крыс Wistar. Память восстанавливалась при введении SB (группы самки SB (Г1) и самцы SB (Г2)), однако в отсутствие SB восстановления не происходило (группы самки veh (Г3) и самцы veh (Г4)). Данные представлены как среднее \pm SEM.

after fear conditioning decreased significantly in all groups (Fig. 4, T2, G1, $29.3 \pm 4.8\%$, G2, $28.1 \pm 3.8\%$, G3, $26.7 \pm 4.2\%$ and G4, $24.5 \pm 2.7\%$): the main effect of the test ($F(1, 25) = 226.14$, $p < 0.0001$) was significant. Post-hoc analysis revealed that there were no significant differences in the test session T2 of conditioned freezing among all groups. Interestingly, we discovered significant difference between the pre-training scores and those in test session T2 ($F(1, 25) = 88.78$, $p < 0.0001$). Immediately after T2, rats were intraperitoneally injected with SB (groups G1 and G2) or vehicle (sterile saline, groups G3 and G4). 24 hours later (Fig. 4, T3), the SB-treated groups showed significantly increased levels of freezing (G1, $60.3 \pm 3.6\%$, G2, $54.5 \pm 6.4\%$) in contrast to the rats receiving vehicle (G3, $23.3 \pm 2.8\%$, G4, $27.8 \pm 4.0\%$) (the main effect of the group: $F(3, 25) = 9.28$, $p < 0.001$; the main effect of the test: $F(1, 25) = 28.27$, $p < 0.0001$). Post hoc analysis revealed that the SB-treated male and female rats did not differ from one another (G1 vs. G2, $p > 0.05$), similar to the vehicle-treated rats (G3 vs. G4, $p > 0.05$), but the vehicle-treated rats had a significantly lower freezing response than did the SB-treated rats (G1 vs. G3, $p < 0.0001$; G2 vs. G4, $p < 0.0005$). Thus, there was a significant

fear memory reinstatement in the SB groups of Wistar rats.

Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate does not rescue the impaired remote context fear memory without reminding

In these series, groups of animals received the same training protocol as in the previous ones but the SB administration was not combined with re-exposure session to the training context and was delivered 24 h later (protocol see Fig. 2). As shown in fig. 5, all groups of rats showed similar low freezing response at pre-conditioning test T0 (Fig. 5, T0, G1, female Long-Evans, $n = 7$, $8.3 \pm 2.2\%$, G2, male Long-Evans, $n = 6$, $6.5 \pm 1.8\%$, G3, female Wistar, $n = 6$, $8.0 \pm 2.1\%$ and G4, male Wistar, $n = 7$, $9.9 \pm 3.4\%$). All groups acquired a strong conditioned freezing response to the conditioning context after training (test session T1): the two-way ANOVA (with test session and group as factors) revealed significant main effects of test session ($F(1, 22) = 753.57$, $p < 0.0001$). Bonferroni's multiple comparisons test revealed that both male and female groups showed significantly higher freezing behavior during the test session T1 (Fig. 5, T1, G1, $79.7 \pm 5.1\%$, G2, $72.0 \pm 5.1\%$,

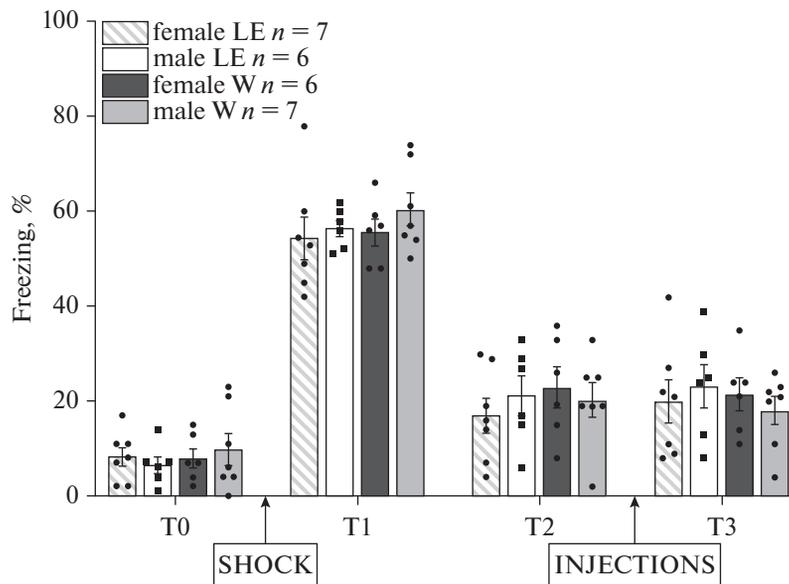


Fig. 5. Effect of a single sodium butyrate (SB) injection on weak remote fear memory in male and female Long-Evans and Wistar rats without memory reactivation. Impaired memory was not reinstated under the SB administration without reminding. Data are expressed as mean \pm SEM.

Рис. 5. Влияние однократной не сочетанной с напоминанием инъекции бутирата натрия (SB) на слабую отставленную память о страхе у самцов и самок крыс Long-Evans и Wistar. В отсутствие напоминания восстановления памяти при введении бутирата натрия не происходило. Данные представлены как среднее \pm SEM.

G3, $66.6 \pm 2.2\%$ and G4, $66.9 \pm 5.2\%$) as compared to the test T0. Six months after the fear conditioning procedure, the fear responses decreased significantly in all groups (Fig. 5, T2, G1, $54.4 \pm 4.5\%$, G2, $56.5 \pm 1.8\%$, G3, $55.7 \pm 2.8\%$ and G4, $60.4 \pm 3.5\%$): the main effects of the test ($F(1, 22) = 163.21$, $p < 0.0001$) was significant. The Post-hoc analysis revealed that there were no significant differences between groups. 24 h after T2, the rats were intraperitoneally injected with SB without reminding. 24 hours later all groups demonstrated low freezing response (Fig. 5, T3, G1, $20.0 \pm 4.6\%$, G2, $23.2 \pm 4.6\%$, G3, $21.5 \pm 3.5\%$ and G4, $18.1 \pm 2.9\%$); no differences were found between testing session T3 and T2. Thus, there was not fear memory reinstatement in animals of the SB groups without reminding.

DISCUSSION

To date most studies were aimed at studying the influence of histone acetylation on recent memories. Present study investigated the remote (6 months) fear memories and effects of the increased histone acetylation on them. A number of studies have documented the existence of sex (Davenport et al., 1970; Beatty, 1984; Williams et al., 1990; Williams, Meck, 1991; Roof, Havens, 1992; Roof, Havens, 1993; Roof, Stein, 1999; Colon,

Poulos, 2020; Trott et al., 2022) and strain differences (Harker, Wishaw, 2002; Besnard et al., 2012; Besnard et al., 2013; Gökçek-Saraç et al., 2015) for hippocampus-dependent tasks in rodents. Therefore, in the current study we included male and female rats of two different strains.

In the current study, we analyzed memory recovery under the SB administration over a long time intervals. Following training procedure, all animals showed an increased freezing behavior in the conditioned context, which indicated that animals have formed a contextual fear memory (Fig. 3, 4, T1). Six months after the fear conditioning we observed a strong decrease in freezing performance in all groups, but still a significant difference from the pre-training scores (Fig. 3, 4, T2). Then, 24 h after the SB administration immediately after the Test 2, the SB-treated animals showed a significant level of freezing behavior in the conditioned context. In contrast to the SB-treated rats, vehicle-treated rats did not express facilitated memory (Fig. 3, 4, T3).

Thus, injection of SB restored a weak remote fear memory in the SB-treated animals. These findings are fully consistent with previous studies that demonstrated that HDAC inhibition led to restoration of impaired or weak memory (Chen et al., 2014; Ko et al., 2016; Zuzina et al., 2019, 2020;

Vinarskaya et al., 2021). It should be noted that this freezing increase was shown to depend both on memory reactivation (triggering the reconsolidation process) and SB administration (Fig. 5), which suggests involvement of a reconsolidation process behind the reactivation + SB administration-induced memory strengthening effect.

We can assume that memory weakening observed 6 months after fear conditioning (the low freezing response in test session T2) could be due to a retrieval deficit. In this case the initial memory trace (Parvez et al., 2005, 2006; Chen et al., 2014; Pearce et al., 2017) is preserved but destabilized and/or some mechanisms required for the normal memory retrieval are impaired over time. For instance, Lee with colleagues demonstrated that remote memory expression could be impaired as the result of disruption of the enhanced synaptic connectivity between neurons of engram (Lee et al., 2023). After reminding, when memories due to a start of the reconsolidation process became open to alterations, the SB administration known to improve the histone hyperacetylation (Marks et al., 2004; Marks, Dokmanovic, 2005; Federman et al., 2009; Villain et al., 2016), re-starts the memory consolidation process including an increase of the memory-related genes expression (Brownell, Allis, 1996; Levenson, Sweatt, 2005; Vecsey et al., 2007; Gräff et al., 2014; Penney, Tsai, 2014) and restabilisation of the mnemonic trace and/or mechanisms that make it available for further retrieval.

To assess the effects of HDAC inhibitor SB on memory deficit in this study, we used the phenomenon of memory reconsolidation (Misanin et al., 1968; Nader et al., 2000). It was demonstrated that one of the boundary conditions for memory reconsolidation is the age of the memory (Bustos et al., 2009; Costanzi et al., 2011; Besnard et al., 2012; Besnard et al., 2013; Graff et al., 2014; An et al., 2019). According to our data, the memories, independently of their age, remain open to reinstatement during retrieval in combination with HDAC inhibition. It should be noted that neurophysiological mechanisms of remote memory differ significantly from those of recent memories (Albo, Graff, 2018; Lee et al., 2023; Terranova et al., 2023). According to the conventional consolidation theory, the information initially stored in the hippocampus is “transferred” to cortical networks over time for its long-term storage (Zola-Morgan, Squire, 1990; Kim, Fanselow, 1992; Frankland et al., 2004; Frankland, Bontempi 2005). Despite the differences in recent and remote memory storage mechanisms, the HDAC

inhibitor SB does the same for recent and remote memories: it acts as a cognitive enhancer for weak memories regardless of whether it is recent (Vinarskaya et al., 2021) or remote (the results of the current study).

The second aspect that was highlighted in these experiments concerns the strain differences in memory acquisition and storage, effects of the HDAC inhibition on retention of fear responses. The data obtained showed that both rats' strains display a similar trajectory in the expression of freezing (memory): decrease in freezing responses over time (Fig. 3, 4, test session T2 vs. T1) and improvement of the remote fear memory under the HDAC inhibition (Fig. 3, 4, test session T3 vs. T2).

The third and final aspect that was highlighted in the work is whether sex affects the effects of HDAC inhibition on retention of fear responses in animals. A number of studies have documented the existence of gender differences for hippocampus-dependent tasks (Davenport et al., 1970; Beatty, 1984; Williams et al., 1990; Williams, Meck, 1991; Roof, Havens, 1992; Roof, Havens, 1993). However, in the current study no gender differences were observed. The percentage of freezing in male and female rats in a context fear conditioning task changed similarly. After the training procedure, male and female rats demonstrated similar increased freezing behavior (Fig. 2, 3). Then, 6 months after the training, male and female rats showed a similar reduced freezing, similar reinstatement under the SB injections. Thus, the data obtained demonstrated that the decrease in freezing and memory reinstatement in males matched completely to female rats performance (Fig. 3, 4).

Taken together, our study suggests that remote memories fading with time could be effectively rescued by a presumed increased histone acetylation levels due to the HDAC inhibitor SB administration. Another important result is that the rescue effect of HDAC inhibition on weak remote memories was common across rats of different strains and gender.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant № 075-15-2020-801 from Russian Ministry of Science and Education.

REFERENCES

Alarcon J.M., Malleret G., Touzani K., Vronskaya S., Ishii S., Kandel E.R., Barco A. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/-

- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*. 2004. 42 (6): 947–959.
- Albo Z., Gräff J. The mysteries of remote memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2018. 373 (1742): 20170029.
- Ameneiro L., Zalczman G., Robles A., Romano A. Characteristics of the reminder that triggers object recognition memory reconsolidation in mice. *Neurosci.* 2022. 497: 206–214.
- An X., Zhang F., Liu Y., Yang P., Yu D. Remote fear memory is sensitive to reconditioning. *Behav. Brain Res.* 2019. 359: 723–730.
- Beatty W.W. Hormonal organization of sex differences in play fighting and spatial behavior. *Prog. Brain Res.* 1984. 60: 320–324.
- Besnard A., Caboche J., Laroche S. Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Prog. Neurobiol.* 2012. 99 (1): 61–80.
- Besnard A., Caboche J., Laroche S. Recall and reconsolidation of contextual fear memory: differential control by ERK and Zif268 expression dosage. *PLoS One*. 2013. 8 (8): e72006.
- Blank M., Werenicz A., Velho L.A., Pinto D.F., Fedi A.C., Lopes M.W., Peres T.V., Leal R.B., Dornelles A.S., Roesler R. Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats. *Neurosci. Lett.* 2015. 594: 76–81.
- Bredy T.W., Barad M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn. Mem.* 2008. 15 (1): 39–45.
- Brownell J.E., Allis C.D. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996. 6 (2): 176–184.
- Bustos S.G., Maldonado H., Molina V.A. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology*. 2009. 34 (2): 446–457.
- Chen S., Cai D., Pearce K., Sun P.Y., Roberts A.C., Glanzman D.L. Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in *Aplysia*. *ELife*. 2014. 3: e03896.
- Chen Y., Barsegyan A., Nadif Kasri N., Roozendaal B. Basolateral amygdala noradrenergic activity is required for enhancement of object recognition memory by histone deacetylase inhibition in the anterior insular cortex. *Neuropharmacology*. 2018. 141: 32–41.
- Choi J.H., Sim S.E., Kim J.I., Choi D.I., Oh J., Ye S., Lee J., Kim T., Ko H.G., Lim C.S., Kaang B.K. Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. *Science*. 2018. 360 (6387): 430–435.
- Colon L.M., Poulos A.M. Contextual processing elicits sex differences in dorsal hippocampus activation following footshock and context fear retrieval. *Behav. Brain Res.* 2020. 393: 112771.
- Costanzi M., Cannas S., Saraulli D., Rossi-Arnaud C., Cestari V. Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learn. Mem.* 2011. 18 (8): 508–518.
- Davenport J., Harquist W., Rankin G. Symmetrical maze: an automated closed field test series for rats. *Behav. Res. Methods Instrum.* 1970. 2: 112–118.
- Federman N., Fustiñana M., Romano A. Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learn. Mem.* 2009. 16 (10): 600–606.
- Frankland P.W., Bontempi B., Talton L.E., Kaczmarek L., Silva A.J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 2004. 304 (5672): 881–883.
- Frankland P.W., Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005. 6 (2): 119–130.
- Gökçek-Saraç Ç., Wesierska M., Jakubowska-Doğru E. Comparison of spatial learning in the partially baited radial-arm maze task between commonly used rat strains: Wistar, Sprague-Dawley, Long-Evans, and outcrossed Wistar/Sprague-Dawley. *Learn. Behav.* 2015. 43 (1): 83–94.
- Gräff J., Joseph N.F., Horn M.E., Samiei A., Meng J., Seo J., Rei D., Bero A.W., Phan T.X., Wagner F., Holson E., Xu J., Sun J., Neve R.L., Mach R.H., Haggarty S.J., Tsai L.H. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell*. 2014. 156 (1–2): 261–276.
- Guan J.S., Haggarty S.J., Giacometti E., Dannenberg J.H., Joseph N., Gao J., Nieland T.J., Zhou Y., Wang X., Mazitschek R., Bradner J.E., DePinho R.A., Jaenisch R., Tsai L.H. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009. 459 (7243): 55–60.
- Harker K.T., Whishaw I.Q. Place and matching-to-place spatial learning affected by rat inbreeding (Dark-Agouti, Fischer 344) and albinism (Wistar, Sprague-Dawley) but not domestication (wild rat vs. Long-Evans, Fischer-Norway). *Behav. Brain Res.* 2002. 34 (1–2): 467–477.
- Hawk J.D., Florian C., Abel T. Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term location memory. *Learn. Mem.* 2011. 18 (6): 367–370.
- Kim W.B., Cho J.H. Encoding of contextual fear memory in hippocampal-amygdala circuit. *Nat. Commun.* 2020. 11 (1): 1382.
- Kim J.J., Fanselow M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. 1992. 256 (5057): 675–677.
- Ko H.G., Kim J.I., Sim S.E., Kim T., Yoo J., Choi S.L., Baek S.H., Yu W.J., Yoon J.B., Sacktor T.C., Kaang B.K. The role of nuclear PKM ζ in memory

- maintenance. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2016. 135: 50–56.
- Lee J.H., Kim W.B., Park E.H., Cho J.H. Neocortical synaptic engrams for remote contextual memories. *Nat. Neurosci.* 2023. 26 (2): 259–273.
- Levenson J.M., O’Riordan K.J., Brown K.D., Trinh M.A., Molfese D.L., Sweatt J.D. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 2004. 279 (39): 40545–40559.
- Levenson J.M., Sweatt J.D. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005. 6 (2): 108–118.
- Marks P.A., Richon V.M., Miller T., Kelly W.K. Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.* 2004. 91: 137–168.
- Marks P.A., Dokmanovic M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2005. 14 (12): 1497–1511.
- Marmonstein R., Zhou M.M. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. 6 (7): a018762.
- McQuown S.C., Barrett R.M., Matheos D.P., Post R.J., Rogge G.A., Alenghat T., Mullican S.E., Jones S., Rusche J.R., Lazar M.A., Wood M.A. HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J. Neurosci.* 2011. 31 (2): 764–774.
- Misanin J.R., Miller R.R., Lewis D.J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science.* 1968. 160 (3827): 554–555.
- Monsey M.S., Ruiz S.G., Taylor J.R. Regulation of garcinol on histone acetylation in the amygdala and on the reconsolidation of a cocaine-associated Memory. *Front. Behav. Neurosci.* 2020. 13: 281.
- Nader K., Schafe G.E., Le Doux J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature.* 2000. 406 (6797): 722–726.
- Parvez K., Stewart O., Sangha S., Lukowiak K. Boosting intermediate-term into long-term memory. *J. Exp. Biol.* 2005. 208 (Pt 8): 1525–1536.
- Parvez K., Moisseev V., Lukowiak K. A context-specific single contingent-reinforcing stimulus boosts intermediate-term memory into long-term memory. *Eur. J. Neurosci.* 2006. 24 (2): 606–616.
- Pearce K., Cai D., Roberts A.C., Glanzman D.L. Role of protein synthesis and DNA methylation in the consolidation and maintenance of long-term memory in *Aplysia*. *Elife.* 2017. 6: e18299.
- Peixoto L., Abel T. The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology.* 2013. 38 (1): 62–76.
- Penney J., Tsai L.H. Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci. Signal.* 2014. 7 (355): re12.
- Ramirez-Mejia G., Gil-Lievana E., Urrego-Morales O., Soto-Reyes E., Bermúdez-Rattoni F. Class I HDAC inhibition improves object recognition memory consolidation through BDNF/TrkB pathway in a time-dependent manner. *Neuropharmacology.* 2021. 187: 108493.
- Roof R.L., Havens M.D. Testosterone improves maze performance and induces development of a male hippocampus in females. *Brain. Res.* 1992. 572 (1–2): 310–313.
- Roof R.L., Havens M.D. Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm maze and Morris water maze performance in prepubescent and adult rats. *Behav. Brain. Res.* 1993. 53 (1–2): 1–10.
- Roof R.L., Stein D.G. Gender differences in Morris water maze performance depend on task parameters. *Physiol. Behav.* 1999. 68 (1–2): 81–86.
- Rooszendaal B., Hernandez A., Cabrera S.M., Hagewoud R., Malvaez M., Stefanko D.P., Haettig J., Wood M. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J. Neurosci.* 2010. 30 (14): 5037–5046.
- Sartor G.C., Malvezzi A.M., Kumar A., Andrade N.S., Wiedner H.J., Vilca S.J., Janczura K.J., Bagheri A., Al-Ali H., Powell S.K., Brown P.T., Volmar C.H., Foster T.C., Zeier Z., Wahlestedt C. Enhancement of BDNF expression and memory by HDAC inhibition requires BET bromodomain reader proteins. *J. Neurosci.* 2019. 39 (4): 612–626.
- Seto E., Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. 6 (4): a018713.
- Stefanko D.P., Barrett R.M., Ly A.R., Reolon G.K., Wood M.A. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. 106 (23): 9447–9452.
- Terranova J.I., Yokose J., Osanai H., Ogawa S.K., Kitamura T. Systems consolidation induces multiple memory engrams for a flexible recall strategy in observational fear memory in male mice. *Nat. Commun.* 2023. 14 (1): 3976.
- Trott J.M., Krasne F.B., Fanselow M.S. Sex differences in contextual fear learning and generalization: a behavioral and computational analysis of hippocampal functioning. *Learn. Mem.* 2022. 29 (9): 283–296.
- Vecsey C.G., Hawk J.D., Lattal K.M., Stein J.M., Fabian S.A., Attner M.A., Cabrera S.M., McDonough C.B., Brindle P.K., Abel T., Wood M.A. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J. Neurosci.* 2007. 27 (23): 6128–6140.
- Villain H., Florian C., Roulet P. HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation.

- tion of spatial memory in mice. *Sci. Rep.* 2016. 6: 27015.
- Vinarskaya A.K., Balaban P.M., Roshchin M.V., Zuzina A.B.* Sodium butyrate as a selective cognitive enhancer for weak or impaired memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2021. 180: 107414.
- Williams C.L., Barnett A.M., Meck W.H.* Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behav. Neurosci.* 1990. 104 (1): 84–97.
- Williams C.L., Meck W.H.* The organizational effects of gonadal steroids on sexually dimorphic spatial ability. *Psychoneuroendocrinology.* 1991. 16 (1–3): 155–176.
- Zola-Morgan S.M., Squire L.R.* The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science.* 1990. 250 (4978): 288–290.
- Zuzina A.B., Vinarskaya A.K., Balaban P.M.* Increase in serotonin precursor levels reinstates the context memory during reconsolidation. *Invert. Neurosci.* 2019. 19 (3): 8.
- Zuzina A.B., Vinarskaya A.K., Balaban P.M.* Histone deacetylase inhibitors rescue the impaired memory in terrestrial snails. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 2020. 206 (4): 639–649.

УВЕЛИЧЕНИЕ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ СПОСОБСТВУЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЮ СЛАБОЙ ОТСТАВЛЕННОЙ ПАМЯТИ У КРЫС

А. Х. Винарская¹, П. М. Балабан¹, А. Б. Зюзина^{1, #}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

[#]e-mail: lucky-a89@mail.ru

Согласно современным представлениям ингибиторы гистондеацетилаз (ГДАЦ) способны улучшать память у различных видов животных. Однако до сих пор не ясно, может ли повышенное ацетилирование гистонов способствовать улучшению слабой отставленной памяти у крыс. Таким образом, целью настоящего исследования было изучение способности ингибитора ГДАЦ бутирата натрия (БН) улучшать слабую отставленную память о страхе у крыс. Чтобы оценить способность ингибитора ГДАЦ БН улучшать отставленную память, мы сравнили поведение двух лабораторных линий крыс, Wistar и Long-Evans, в задаче условно-рефлекторного страха через шесть месяцев после обучения до и после введения БН. Мы обнаружили, что животные демонстрировали хорошую обстановочную память через 24 ч после окончания обучения, полное отсутствие памяти через 6 мес. и улучшенную условно-рефлекторную память после введения БН без дополнительного обучения. Более того, полученные данные продемонстрировали, что обе линии крыс показали одинаковое снижение реакции замирания с течением времени, а ингибирование ГДАЦ улучшало слабую память у обеих линий. Кроме того, ослабление и восстановление памяти у самцов полностью соответствовало изменениям памяти у самок крыс. Эти результаты показывают, что ингибирование ГДАЦ оказывает одинаковый “восстанавливающий” эффект на слабую отставленную условно-рефлекторную память о страхе, независимо от линии и пола крыс.

Ключевые слова: бутират натрия, ацетилирование гистонов, эпигенетика, отставленная память, восстановление памяти, реконсолидация

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.084

НАРУШЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА МОДЕЛИ
РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

© 2023 г. А. Е. Хайруллин^{1, 2, *}, Д. В. Ефимова¹, Д. В. Иванова¹, Т. В. Балтина², М. Э. Балтин²,
С. Н. Гришин¹, А. У. Зиганшин¹

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия

*e-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.07.2023 г.

После доработки 27.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Аутизм, или расстройство аутистического спектра (РАС), является многофакторным заболеванием, которое характеризуется не только нарушениями психоэмоционального состояния и социального взаимодействия, но и соматическими дисфункциями. В ряде исследований также сообщалось об изменениях со стороны опорно-двигательной системы у пациентов с РАС. В данной работе методом видеоанализа движений мы продемонстрировали снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, кроме этого, были зарегистрированы девиантные движения, что говорит о нарушении в локомоторной активности и повышенной тревожности крыс с вальпроатной моделью аутизма. Однако механо-миографическое исследование не выявило достоверных изменений в параметрах сократимости изолированных скелетных мышц крыс с моделью РАС. Таким образом, можно заключить, что общие различия в движении могут быть независимым фактором диагностики аутизма. Более тщательное исследование с использованием большей выборки и подробного кинематического анализа может помочь в дальнейшей оценке варибельности двигательных функций, как потенциального диагностического и прогностического маркера РАС.

Ключевые слова: аутизм, расстройства аутистического спектра, АТФ, P2-рецепторы, скелетные мышцы, нервно-мышечный синапс, нейротрансмиссия

DOI: 10.31857/S0044467723060047, EDN: SLNBWY

ВВЕДЕНИЕ

По оценкам мониторинга аутизма и нарушений развития США, на 2020 год один из 36 детей в возрасте 8 лет (примерно 4% мальчиков и 1% девочек) страдал расстройством аутистического спектра (РАС) (Maenner et al., 2023). Расстройство аутистического спектра (РАС) — это нарушение развития нервной системы, характеризующееся нарушениями социального взаимодействия, преобладанием стереотипных моделей поведения и сужением круга интересов (Widiger, Hines, 2022). Несмотря на растущую распространенность, РАС по-прежнему остается расстройством с плохо изученной патофизиологией и медленным поиском лекарств. До сих пор этиология РАС неизвестна, при этом некоторые авторы возникновения и прогрессирование РАС свя-

зывают с влиянием генетической предрасположенности и факторов окружающей среды (Taylor et al., 2020). Среди основных патофизиологических механизмов развития РАС можно выделить окислительный стресс, нейровоспаление, различные иммунные нарушения и митохондриальную дисфункцию (Saffari et al., 2019; Citrigno et al., 2020; Doi et al., 2022; Singh et al., 2023).

Значительный прогресс в представлении сложной патофизиологии РАС связывают с решающей ролью животных моделей (Qi et al., 2021). Полезная модель, подтвержденная исчерпывающими исследованиями на животных, путем воздействия вальпроевой кислоты (ВПК) на грызунов показывает поразительное сходство с поведением, анатомией, клеточными и молекулярными изменения-

ми, наблюдаемыми у пациентов с аутизмом. Многочисленные анатомические исследования также доказали, что модель ВПК может хорошо воспроизводить дисплазию центральной нервной системы при РАС, предоставляя ценный инструмент для изучения основного механизма РАС (Mabunga et al., 2015).

Существуют исследования, доказывающие вовлеченность пуринергического сигнального пути в развитие нервной системы, за счет влияния на такие механизмы, как клеточная пролиферация, дифференцировка и формирование нейронно-глиальных клеточных взаимодействий, миграция предшественников нейронов и рост нейритов (Burnstock et al., 2011), но связь между аномальным метаболизмом пуринов и этиологией РАС в настоящее время до конца не ясна. Но, согласно теории онтогенеза, дефекты ранних процессов развития способствуют возникновению различных психических заболеваний на более поздних этапах жизни (Ren et al., 2016; Williams et al., 2018; Courchesne et al., 2019). Появились дополнительные доказательства того, что пурины, метаболизирующие пурины эктоферменты и пуринорецепторы также участвуют в патофизиологических процессах развития нейронов (Fumagalli et al., 2017) и психических расстройствах (Cieslak et al., 2016).

В зависимости от лиганда пуринергические сигнальные рецепторы делятся на два основных класса: P1 (рецепторы аденозина) и P2 (рецепторы АТФ/АДФ и УТР/УДФ) (Burnstock, 2007). Последний включает P2X и P2Y, которые опосредуют гиперактивацию глиальных клеток и начало воспалительных реакций в центральной нервной системе (ЦНС) (Abbracchio, Ceruti, 2006; Inoue, 2008; Huang et al., 2019). Кроме того, было показано снижение экспрессии P2X7-рецепторов, играющих ключевую роль в патофизиологии нарушений ЦНС и опосредующих самые сильные признаки нейровоспаления, у детей с РАС (Lister et al., 2007; Naviaux et al., 2013).

Нарушение функционирования пуринергической сигнальной системы связывают с инициацией РАС, что в свою очередь позволяет рассматривать данную сигнальную систему в качестве потенциальной терапевтической мишени. Существуют данные о том, что лечение сурамином (20 мг/кг, внутривентриально) крыс с моделью РАС восстанавливает их коммуникативные способности и уменьшает тревожность, измеряемую при помощи приподнятого крестообразного лабиринта (Hirsch et al., 2020).

Лечение сурамином не влияет на индуцированную вальпроевой кислотой активацию P2X4- и P2Y2-рецепторов в гиппокампе и экспрессию рецептора P2X4 в медиальной префронтальной коре, но нормализует повышенный уровень интерлейкина 6 (IL-6) (Smith et al., 2007).

Коморбидность уже давно признана у детей с нарушениями развития, такими как аутистическое расстройство, синдром дефицита внимания и гиперактивности (Gillberg et al., 1995; Watson et al., 2003). И хотя РАС считается психическим расстройством, с ним могут быть связаны и расстройства функций других внутренних органов и систем. К таким особенностям относятся, в частности, сенсорные аномалии (Kern et al., 2006), сенсорно-моторные дефициты (Piek, Dycx, 2004), проблемы с мелкой и грубой моторикой (Provost et al., 2007), нарушения в движении/моторных навыках (Green et al., 2009), проблемы с равновесием (Minshew et al., 2004), мышечная слабость (Hardan et al., 2003) и гипотония (Ming et al., 2007).

Двигательные аномалии были признаны неотъемлемой частью расстройств аутистического спектра (Ghaziuddin, Butler, 1988). Причем наблюдения показывают, что аномалии движений при аутизме разнообразны и могут быть причиной нарушений в различных частях центральной нервной системы. Вовлечение нескольких структур вполне ожидаемо из-за сложного распределения двигательной системы на уровне спинного мозга, ствола мозга, мозжечка, подкорковых и корковых отделов нервной системы (Kingsley, 2000). Мы предположили, что в дополнение к основным поведенческим симптомам РАС у крыс могут также проявляться другие проблемы развития нервной системы, связанные с двигательной дисфункцией.

На основании вышеизложенного, целью данного исследования было оценить общий характер изменений в двигательной активности скелетных мышц крыс с моделью РАС.

МЕТОДИКА

Объект исследования. В ходе экспериментов были обследованы нелинейные лабораторные крысы-самцы, массой 160–240 г. Животные содержались при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещенности.

Экспериментальные группы:

- 1) контрольная группа ($n = 12$);
- 2) группа с воспроизведением модели аутизма (ВМА, $n = 12$).

Моделирование РАС на крысах. Вальпроевая кислота в высоких дозах блокирует ферменты, участвующие в деацетилировании гистоновых белков, что влияет на экспрессию определенных генов и, соответственно, модифицирует их функционирование. При введении беременным самкам у потомства лабораторных животных развивается фетальный вальпроатный синдром, который по своим проявлениям сходен с РАС (Zheng et al., 2019). Для выработки у потомства фетального вальпроатного синдрома самкам на 12–13-й день беременности однократно подкожно в область холки вводят натриевую соль вальпроевой кислоты в дозе 500 мг/кг. Не было зафиксировано увеличение числа эмбриональных смертей, увеличение количества постимплантационных потерь, уменьшение размера помета и массы тела плода. Рожденных от такого воздействия крыс в возрасте 6 мес. использовали для экспериментов. В качестве контроля использовали крыс этого же возраста, рожденных от крыс, не подвергавшихся лекарственному воздействию.

Тест “Открытое поле”. Установка “открытое поле” представляет собой белую квадратную арену. Пол разделен на 25 прямоугольников одинаковой площади для удобства визуальной регистрации горизонтальной двигательной активности животных на периферии, в 2/3 арены и ее центра.

Методика “Открытое поле” (ОП) позволяет изучить врожденные особенности ориентировочного и исследовательского поведения и сопротивляемость к стрессу (Козловский, Кенунен, 1992). С помощью данного метода оценивают ориентировочно-исследовательскую реакцию (ОИР) по количеству пройденных квадратов в арене, по количеству стоек на задних лапах (вертикальная двигательная активность, ВДА) при искусственном освещении.

Животное, которое помещено на незнакомую открытую площадку, демонстрирует ориентировочно-исследовательские реакции, например, характерное замирание, которое необходимо для оценки степени риска (Blume et al., 2018).

Ход эксперимента. Животное помещали всеми 4 лапами в центральный квадрат арены

и с помощью видеосистемы фиксировали его передвижения в установке в течение 3 мин. После прохождения тестирования каждого животного арену обрабатывали водой для удаления запаха.

Регистрировали следующие показатели:

1) горизонтальную двигательную активность (ГДА). Основным критерием ГДА является участие в перемещении животного всех четырех лап. За единицу перемещения считали один пересеченный квадрат всеми лапами. Регистрируют ГДА на периферии, в 2/3 и в центре арены;

2) вертикальную двигательную активность (ВДА). Представлена двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля (пристеночная стойка); если лапы остаются на весу (свободная стойка). Раздельно считали число открытых и пристеночных стоек.

Метод видеоанализа движения на платформе Vicon

Для оценки и сравнения походки крыс в контрольной группе с группой крыс ВМА был использован метод видеоанализа движения. Трехмерные данные были получены с использованием шести камер Vicon MX (Vicon Motion Systems, Оксфорд, Великобритания), размещенных на специальных креплениях полукругом. Для калибровки и синхронизации камер был использован калибровочный маркер Active Wand (Vicon Motion Systems, Оксфорд, Великобритания). Для получения стандартного видеоизображения была использована видеокамера Sony. 10 пассивных светоотражающих маркеров были размещены на мышцах спины, крестцовой кости, на коленных суставах, голеностопных суставах, как это было показано на рис. 1.

Во время видеозахвата крысы начинали свободно двигаться в “открытом поле” при искусственном освещении. Использовали сплайн-интерполяцию для повторной выборки данных Vicon до 30 Гц перед анализом. Определяли фазы цикла походки с временными метками событий походки — отрыва стопы и возобновления контакта с поверхностью. Кинематический анализ был выполнен для полного цикла походки каждой испытуемой крысы.

Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение Vicon

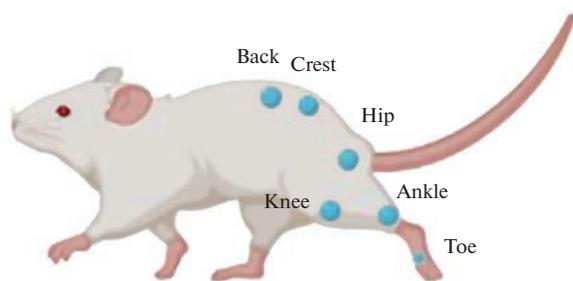


Рис. 1. Схема расположения маркеров для видеоанализа движения.

Fig. 1. Layout of markers for motion video analysis.

Nexus 2.9 для ручной доработки 3D-модели движения и удаления артефактов с записи.

Полученные Vicon Nexus 2.9 данные с помощью модуля ASCII конвертировались в текстовый формат, после чего обрабатывались с помощью программного обеспечения MATLAB; методика обсчета подробно описана в статье (Smirnova et al., 2022). Для каждой группы получали кривые из усреднения 30 шагов по углам в фазах одного шага. Были получены данные в виде ангулограмм: кинематический профиль коленного сустава крысы, нормированный по фазе шага. С помощью ангулограмм высчитывались углы сгибания коленных суставов как разность показателя угла в начале фазы переноса и показателя угла в начале фазы толчка. Были построены траектории перемещений стопы с целью определения объема движения конечности и максимальной точки подъема стопы, а также длины шага.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Данные параметров двигательной активности в “открытом поле” и характеристики шага при выполнении движения представлены в виде среднего и среднеквадратичного отклонения $M \pm SD$. Данные параметров кинематического анализа представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартиля (Me; Q1; Q3). Для сравнения независимых выборок использовался *U*-критерий Манна–Уитни. Рассчитанные значения *U*-критерия Манна–Уитни сравнивались с критическими при уровне значимости $p < 0.05$: в том случае, если рассчитанное значение *U* было равно или меньше критическо-

го, признавалась статистическая значимость различий.

Механо-миографический метод регистрации сократительных ответов мышц

Перед проведением экспериментов животных наркотизировали внутрибрюшинным введением раствора этиминала натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли *m. soleus* и *m. extensor digitorum longus (EDL)* с культями нервов, которые были помещены во всасывающий электрод оригинальной конструкции (Гришин и др., 2023). Мионевральные препараты фиксировали за сухожильные концы, после погружали в резервуары объемом 10 мл, заполненные раствором Кребса (состав в мМ: NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl₂ – 2.5, NaHCO₃ – 24.8, KH₂PO₄ – 1.18, MgSO₄ · 7H₂O – 1.18, глюкоза – 11), pH 7.4, *t* – 37°C.

Для вызова сокращений мышечных образцов применялся электростимулятор Digitimer MultiStimul D330 (Великобритания), производилась подача прямоугольных импульсов амплитудой 10 В и продолжительностью 0.5 мс при частоте 0.1 Гц в течение 2 мин. Силу сокращений мышц регистрировали с помощью датчика двигательной активности Linton FCG-01 (Великобритания), аналоговый сигнал преобразовывали системой сбора данных Biopack MP100MSW (США).

Изначальная нагрузка на мионевральные препараты составляла 1 г на *m. soleus* и 0.5 г на *m. EDL*. После получасовой адаптации мышечных препаратов к среде дважды с интервалом в 5 мин производили оценку стабильности сократительных ответов.

Для оценки эффектов пуринергических агонистов и антагонистов в емкость добавляли 100 мкМ АТФ и через 7 мин оценивали механические ответы мышц. Затем мышцу промывали раствором Кребса и инкубировали с раствором сурамина в концентрации 100 мкМ в течение 20 мин с последующим добавлением 100 мкМ АТФ и вновь регистрировали механические ответы мышц.

Все полученные в течение двух минут ответы (12 сократительных ответов) усредняли и обрабатывали как один результат. Рассчитывали их в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных

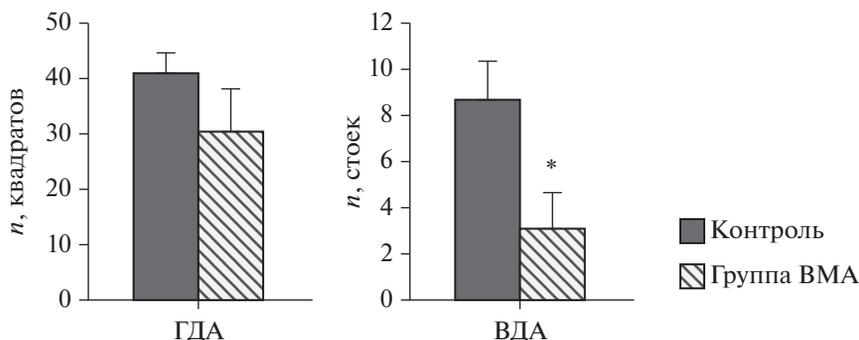


Рис. 2. Показатели горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности животных контрольной группы и группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА) в тесте “Открытое поле”; Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей – в виде стандартного отклонения. * – $p < 0.05$ достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Fig. 2. Indicators of horizontal (GDA) and vertical (VDA) motor activity of animals of the control group and the group with the reproduction of the autism model (VMA) in the “Open Field” test; the data are presented in the form of an average; the error bars are in the form of a standard deviation. * – $p < 0.05$ reliability of differences compared to the control group.

нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ ориентировочно-исследовательской активности в тесте “Открытое поле” показал, что у животных группы ВМА горизонтальная двигательная активность (ГДА) была снижена по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

Количество пройденных квадратов составляло 30.5 ± 7.5 , а в контрольной группе 41 ± 3.6 . После выхода из центральной зоны поля возвращение в него не наблюдалось, что свидетельствует о более высокой тревожности животных этой группы. Вертикальная двигательная активность (ВДА), отражающая как двигательные, так и исследовательские реакции, была ниже у животных группы ВМА и составляла 3.2 ± 1.6 вертикальных стоек ($p < 0.05$) (рис. 2). У группы ВМА прослеживалась тенденция к пониженной двигательной активности, а также повышенной тревожности.

Были построены ангулограммы суставов задней конечности по записям видеофиксации движения, которые приведены на рис. 3 (а, б).

По ангулограммам видно увеличение угла в фазе толчка у крыс группы ВМА по сравнению с контрольной группой.

В первой трети цикла при окончании фазы толчка, при инициации движения наблюдались неадекватные движения у животных группы ВМА: крыса сжимала заднюю лапу, после чего следовал низкоамплитудный толчок (рис. 3 (в, г)). Фаза переноса тела была короче во времени в группе ВМА. Такое движение может говорить о характерной тревожности данной группы и пониженной двигательной функции. Однако изменения объема движения в коленном и тазобедренном суставах были статистически не достоверны (рис. 4).

У крысы группы ВМА было значительное снижение длины шага и увеличение длительности шага по сравнению с контрольной группой: 131 ± 38 мм ($p < 0.05$) и 0.63 с ($p < 0.05$) соответственно. Высота подъема ноги в обеих группах была одинаковой (рис. 5).

Описанная выше девиация локомоторной активности животных с РАС подтолкнула нас к следующей серии экспериментов. Существуют доказательства (Khairullin et al., 2023a, 2023b), подтверждающие вовлеченность синоптической компоненты периферических отделов нервной системы на различных моделях расстройств. Ключевым звеном пластичности в нервно-мышечном переходе является пуринергическая трансдукция (Zigan-shin et al., 2020). Поэтому мы решили сравнить механическую активность мышц голени у крыс из контрольной группы и с мо-

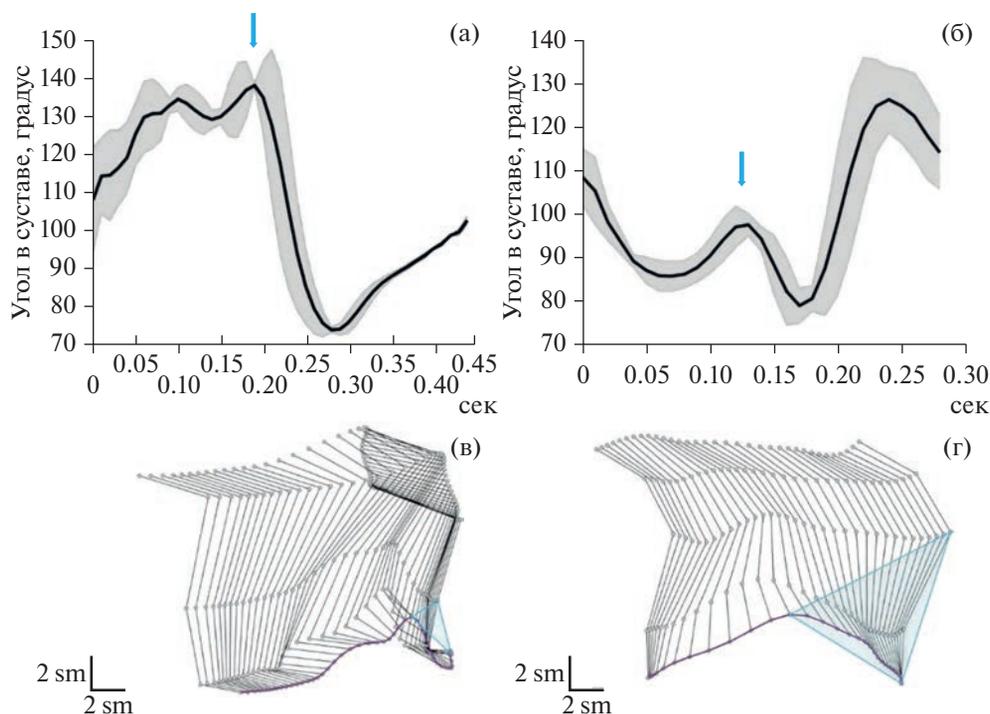


Рис. 3. Ангулограмма коленного сустава крыс группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА) (а) и контрольной группы (б). Репрезентативное изображение положения задней конечности крыс на протяжении фазы шага у крыс в группе ВМА (в) и контрольной группы (г). Фиолетовой линией представлена траектория движения стопы, голубым треугольником показан объем движений задней конечности. Стрелками показан момент окончания фазы толчка.

Fig. 3. Angulogram of the knee joint of the autistic group of rats (a) and the control group (б). A representative image of the position of the hindlimb of rats over the length of the step phase in the BMA group of rats (в) and the control group (г). The purple line represents the trajectory of the foot movement, the blue triangle shows the volume of movements of the hindlimb. The arrows show the moment of the end of the push phase.

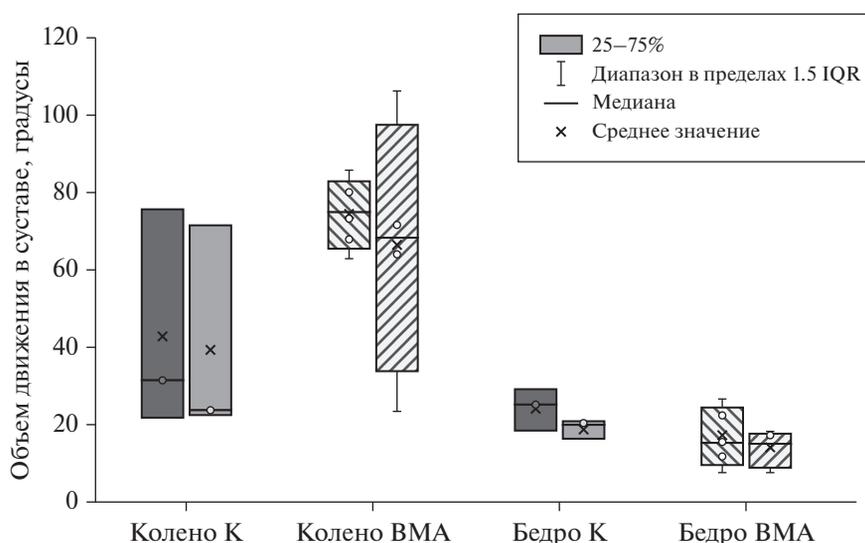


Рис. 4. Объем движения в суставах: коленном (колено) и тазобедренном (бедро) слева, справа в контрольной группе (К) и группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА), данные представлены в виде медианы, разброс в группах – в виде интерквартильного размаха.

Fig. 4. The volume of movement in the joints: knee (колено) and hip (бедро) on the left, on the right in the control group (К) and the group with the reproduction of the autism model (BMA), the data are presented as a median, the spread in the groups is in the form of an interquartile span.

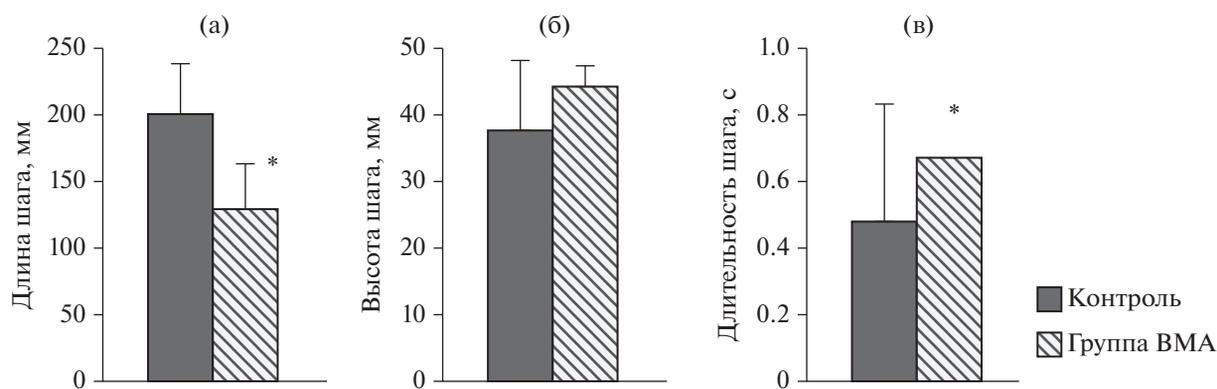


Рис. 5. Характеристики шага при выполнении движения в “открытом поле”, определяемые с помощью системы видеозахвата движения (Vicon) у крыс двух групп – контроля и группы с воспроизведением модели аутизма (ВМА): (а) длина шага, мм, (б) высота шага, мм и (в) длительность шага. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. * – $p < 0.05$, статистически значимое различие между группами.

Fig. 5. Characteristics of the step when performing movement in an open field determined by the motion capture system (Vicon) in rats of two groups of control and groups with reproduction of the autism model (BMA): (a) step length, mm, (б) step height, mm and (в) step duration. The data is presented in the form of mean and standard deviation. * – $p < 0.05$ statistically significant difference between the groups.

делью ВМА в условиях пуринергической модуляции.

Полученные данные демонстрируют отсутствие значимых изменений в параметрах

сокращений исследуемых мышц (табл. 1). АТФ сохраняла значимую модулирующую способность, различий между сравниваемыми группами мы не выявили.

Таблица 1. Зависимость сократительных параметров исследованных мышц крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий

Table 1. Dependence of contractile parameters of the studied rat muscles caused by electrical stimulation on experimental conditions

Экспериментальные условия	Параметр	Фоновый уровень	АТФ (100 мкМ)	Сурамин (100 мкМ)	Сурамин + АТФ (100 мкМ)
<i>m. soleus</i>					
Контроль ($n = 12$)	СС	100.0 ± 3.8	$73.1 \pm 6.4^*$	102.7 ± 4.4	96.4 ± 6.5
	BC	0.083 ± 0.005	0.082 ± 0.004	0.081 ± 0.005	0.080 ± 0.003
	ВП/2	0.090 ± 0.006	0.104 ± 0.010	0.092 ± 0.004	0.094 ± 0.011
ВМА ($n = 12$)	СС	98.6 ± 5.1	$74.8 \pm 5.9^*$	103.2 ± 6.3	98.7 ± 5.3
	BC	0.081 ± 0.004	0.079 ± 0.006	0.080 ± 0.004	0.078 ± 0.006
	ВП/2	0.091 ± 0.011	0.110 ± 0.013	0.093 ± 0.009	0.095 ± 0.009
<i>m. EDL</i>					
Контроль ($n = 12$)	СС	100.0 ± 4.8	$85.9 \pm 3.7^*$	101.9 ± 4.6	99.2 ± 4.5
	BC	0.055 ± 0.006	0.058 ± 0.007	0.060 ± 0.007	0.059 ± 0.005
	ВП/2	0.068 ± 0.004	0.070 ± 0.006	0.066 ± 0.005	0.069 ± 0.004
ВМА ($n = 12$)	СС	98.5 ± 3.6	$84.2 \pm 7.1^*$	97.9 ± 6.3	96.1 ± 5.2
	BC	0.059 ± 0.006	0.060 ± 0.005	0.061 ± 0.005	0.061 ± 0.004
	ВП/2	0.070 ± 0.005	0.072 ± 0.008	0.071 ± 0.007	0.070 ± 0.005

Примечание: * – $p < 0.05$ от фонового уровня, # – $p < 0.05$ от контроля. СС – сила сокращения, BC – время сокращения, ВП/2 – время полурасслабления.

Note: * – $p < 0.05$ from the background level, # – $p < 0.05$ from the control. CC is the contraction force, BC is the contraction time, ВП/2 is the half-relaxation time.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве подхода к разработке новых терапевтических средств было создано несколько моделей РАС на грызунах, которые повторяют многие поведенческие фенотипы, наблюдаемые у людей с РАС (Pardo, Meffert, 2018; Chaliha et al., 2020). В настоящее время применение вальпроевой кислоты (ВПК) является наиболее релевантным фармакологическим моделированием РАС на животных моделях, так как было доказано, что введение ВПК на ранних сроках беременности приводит к различным нарушениям в развитии мозга, гиперактивности, дефициту внимания и РАС (Wood, 2014; Christensen et al., 2019).

Еще в 1996 г. Rodier и соавт. обнаружили морфологические изменения головного мозга, которые происходят вследствие введения ВПК беременным крысам: снижение числа нейронов в ядрах черепно-мозговых нервов и аномалии развития мозжечка (Rodier et al., 1996). Впоследствии были доказаны и нарушения в поведении крыс с вальпроатной моделью РАС, которые проявляются в повышении порога болевой чувствительности, снижении социально-исследовательской активности и повышении двигательной активности и гиперактивности, проявляющихся в стереотипном поведении (Schneider, Przewłocki, 2005).

Модели нервно-психических расстройств и нарушений развития нервной системы, в том числе и аутизма, на животных предоставили соответствующие знания о нейронных схемах и мишенях-рецепторах, вовлеченных в этиологию и патофизиологию измененного поведения (Gandhi, Lee, 2021). Одной из нейротрансмиттерных систем, вовлеченных в патофизиологию психических расстройств, является пуринергическая (Cheffer et al., 2018). Известно, что при патологии пуринового и пиримидинового обмена повреждается нервная система (задержка развития, эпилептические приступы, аутизм).

P2-рецепторы тесно связаны с эмбриональным развитием нервной системы, и любое нарушение пуринергической передачи сигналов может быть основным процессом, приводящим к психическим заболеваниям в целом (Oliveira et al., 2016).

Известно, что P2X- и P2Y-рецепторы контролируют широкий спектр биологических характеристик, которые имеют отношение к аутизму; например, пуринергическая сигнализация модулирует нормальный синаптоге-

нез и развитие мозга (Pan et al., 2020), врожденные и адаптивные иммунные реакции, а также хроническое воспаление (Lee et al., 2015), нейровоспаление, противовирусную сигнализацию (Mitchell et al., 2017), активацию микроглии, хемотаксис нейтрофилов, аутофагию, моторику кишечника (Talos et al., 2012), проницаемость кишечника (Amiet et al., 2008), хемосенсорную трансдукцию вкуса (Besag, 2018), хронический болевой синдром (Lamb et al., 2019). Несомненно, причины большинства подобных нарушений лежат в области ЦНС, но, помимо этого, не отрицаются нарушения в функционировании периферической нервной системы (в том числе и в функционировании нервно-мышечного синапса).

Хотя аутизм диагностируется по трем основным характеристикам: социальному дефициту, коммуникативным нарушениям и повторяющемуся или стереотипному поведению, – другие поведенческие особенности, такие как сенсорные и двигательные нарушения, присутствуют более чем у 70% людей с РАС (Bhat, 2021). Связанные с аутизмом характеристики, такие как нарушения сенсорной обработки и дефицит координации движений, широко распространены, но им уделяется меньше внимания со стороны исследовательского сообщества. Например, существует ряд качественных и количественных отчетов по РАС, описывающих нарушения зрительно-моторной и мануальной ловкости, координации конечностей во время задач, требующих баланса, ловкости и скорости, а также нарушения походки и атаксии (Fatemi et al., 2012). Кроме того, двигательные нарушения могут быть одними из самых ранних признаков некоторых форм РАС (Ozonoff et al., 2008). Соответственно, оценка двигательных расстройств может помочь в ранней и количественной диагностике патологии и выявлении дисфункциональных областей и цепей мозга при РАС. Мы показали, что у животных группы ВМА наблюдалось снижение вертикальной и горизонтальной двигательной активности в “открытом поле”. Это согласуется с предыдущими результатами, полученными у животных, демонстрирующих снижение двигательной активности после пре- и постнатального введения ВПК (Гедзун и др., 2020; Kataoka et al., 2013; Mabunga et al., 2015), а также с клиническими исследованиями, показывающими, что дети с РАС тратят меньше времени на активное изучение окружающей среды (Elandaloussi et al., 2023). РАС также связано с тревожными расстройства-

ми, и оценки распространенности тревожности у людей с РАС широко варьируют от 22 до 84% (Nimmo-Smith et al., 2020). Мы также выявили повышенную тревожность у грызунов, подвергшихся пренатальному воздействию ВПК, на что указывает уменьшение ВДА, изменение структуры шага и отсутствие исследования центральной области в тестах в “открытом поле”, что согласуется и с другими исследованиями (Kataoka et al., 2013; Cartocci et al., 2018; Servadio et al., 2018). Изменения в исследовательском поведении могут отражать нарушения развития ЦНС. Одним из возможных объяснений снижения исследовательского поведения у крыс с ВПК может быть уменьшение количества клеток Пуркинью в мозжечковых дольках червя (Fatemi et al., 2012). Точно так же уменьшенные дольки мозжечкового червя, которые коррелируют со снижением исследовательской активности, наблюдались у детей, страдающих аутизмом (Pierce, Courchesne, 2001). Кроме того, на нарушение активности мозжечка также может указывать значительное снижение длины шага и увеличение длительности шага у крыс с ВМА по сравнению с контрольной группой (Main, Kulesza, 2017). Вторым возможным объяснением могут быть изменения в нейронных структурах, участвующих в регуляции страха. Сюда входят медиальная префронтальная кора и миндалевидное тело. Аномалии в этих структурах наблюдались как у крыс в модели с ВПК (Sui, Chen, 2012), так и у аутичных людей (Bachevalier, Loveland, 2006; Arutiunian et al., 2023). Согласно (T. Schneider и R. Przewłocki, 2005), сниженное исследовательское поведение у взрослых крыс в модели с ВПК, скорее всего, может быть опосредовано связанным со страхом торможением исследовательского поведения.

Наблюдаемые групповые различия в двигательной активности демонстрируют, что крысы группы ВМА выполняли шагание менее эффективно. Крысам группы ВМА требовалось больше движений лап, и у них проявлялось более нетипичное сенсомоторное поведение (например, резкий подъем лапы, короткая фаза переноса); по-видимому, эти крысы испытывали больше трудностей в более тонких аспектах моторного контроля и/или трудности с координацией функций конечностей. Подобные сенсомоторные изменения связывают с нарушением баланса синаптического возбуждения и торможения в ЦНС, вызванных дисфункцией ГАМКергиче-

ской передачи сигналов, обширными изменениями в морфологии нейронов и локальными нарушениями микроцепей неокортекса (Banerjee et al., 2013; Lee et al., 2017; Jiang et al., 2022). Поскольку оптимальная двигательная активность определяется точным и эффективным приемом и обработкой сенсорной информации, нарушение соматосенсорной обработки является одним из объяснений наблюдаемого моторного дефицита. Как у детей, так и у взрослых с РАС часто сообщалось о грубой моторной неуклюжести и нарушениях походки и равновесия (Fournier et al., 2010). В дополнение к отсроченному началу ходьбы, у малышей с аутизмом также отсутствует зрелый паттерн “пятка-носок” и они имеют более переваливающуюся походку по сравнению с контрольной группой того же возраста (Esposito, Venuti, 2008).

В данной работе было показано отсутствие значимых изменений в силе сокращений мышц при наличии тенденции к пониженной двигательной активности у группы с воспроизведением модели аутизма, в отличие от контрольных животных, а также повышенной тревожности, что соотносится с результатами другого исследования периферической холинергической нейротрансмиссии у крыс с моделью РАС (Архипов и др., 2021). Интересно, что изменения механической активности гладкомышечных органов и повышение парасимпатических влияний у крыс с РАС были достоверно показаны (Зиганшин, Иванова, 2021).

В нашем исследовании было несколько ограничений. Во-первых, наши исследования были проведены на самцах крыс. В некоторых исследованиях были обнаружены доказательства различий в социально-коммуникативных навыках и ограниченном повторяющемся поведении животных в моделях с РАС между полами. Во-вторых, ограниченная выборка. Кроме того, изначально при постановке задач основное внимание было уделено эффектам нервно-мышечной передачи скелетной мышцы, поэтому использовался ограниченный набор поведенческих тестов. В дальнейшем мы можем расширить поведенческую оценку и добавить подробный анализ кинематики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на результатах настоящего исследования, можно предположить, что общие различия в движении могут быть незави-

симым фактором диагностики аутизма. Более тщательное исследование с использованием большей выборки и подробного кинематического анализа может помочь в дальнейшей оценке вариативности двигательных функций, как потенциального диагностического и прогностического маркера РАС. Нарушение моторики – крайне недооцененная область для оценки и вмешательства при РАС. Двигательные навыки должны регулярно включаться в комплексный скрининг, оценку и планирование лечения РАС, и особенно после периода раннего развития, когда внимание родителей часто смещается на другие проявления РАС.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Международного научного совета Казанского государственного медицинского университета для молодых ученых 2023 в рамках Программы развития Университета, а также в рамках программы “Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета” (ПРИОРИТЕТ-2030).

FUNDING

The study was carried out with the financial support of a grant from the International Scientific Council of Kazan State Medical University for Young Scientists 2023 as part of the University Development Program, as well as under the program “Strategic Academic Leadership of Kazan Federal University” (PRIORITY-2030).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Архипов А.Ю., Самигуллин Д.В., Семина И.И., Маломух А.И. Функциональная оценка периферической холинергической нейротрансмиссии у крыс с фетальным вальпроатным синдромом. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, 2021. 107 (4–5): 605–615.
- Гедзун В.Р., Свинов М.М., Сарычева Н.Ю., Шлапачева П.С., Довбнюк К.О., Дубынин В.А. Влияние пренатального и раннего постнатального введения вальпроата на поведение и цитологические характеристики крыс линии Wistar. *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*. 2020. 70 (5): 682–695.
- Зиганшин А.У., Иванова Д.В. Вызванные карбахоном сокращения изолированной тонкой кишки возрастают у крыс с экспериментальным аутизмом, вызванным вальпроевой кислотой. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, 2021. 84 (2): 99–103.
- Козловский В.Л., Кенунен О.Г. Структура двигательного поведения лабораторных животных – новые возможности методики “открытого поля”. *Физиологический журн. им. И.М. Сеченова*, 1992. 78 (1): 120–123.
- Патент на полезную модель № 216564 U1 Российская Федерация, МПК А61N 1/04, G09B 23/28. Всасывающий культю нерва электрод для электрической стимуляции: № 2022131919: заявл. 07.12.2022; опубл. 14.02.2023 / С.Н. Гришин, А.Е. Хайруллин, А.У. Зиганшин, Д.В. Ефимова; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Казанский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации. – EDN GPHYYZ.
- Abbraccio M.P., Ceruti S. Roles of P2 receptors in glial cells: Focus on astrocytes. *Purinergic Signal*, 2006. 2: 595–604. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9016-0>
- Amiet C., Gourfinkel-An I., Bouzamondo A., Tordjman S., Baulac M., Lechat P., Mottron L., Cohen D. Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and gender: evidence from a meta-analysis. *Biol Psychiatry*, 2008. 64: 577–582.
- Arutiunian V., Davydova E., Pereverzeva D., Sorokin A., Tyushkevich S., Mamokhina U., Danilina K., Dragoy O. Reduced grey matter volume of amygdala and hippocampus is associated with the severity of autistic symptoms and language abilities in school-aged children with Autism Spectrum Disorder: an exploratory study. *Brain structure & function*. 2023. 228 (6): 1573–1579.
- Bachevalier J., Loveland K.A. The orbitofrontal-amygdala circuit and self-regulation of social-emotional behavior in autism. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2006. 30 (1): 97–117.
- Banerjee A., García-Oscos F., Roychowdhury S., Galindo L.C., Hall S., Kilgard M.P., Atzori M. Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2013. 16 (6): 1309–1318.
- Besag F.M. Epilepsy in patients with autism: links, risks and treatment challenges. *Neuropsychiatr Dis. Treat.*, 2018. 14: 1–10.
- Bhat A.N. Motor impairment increases in children with autism spectrum disorder as a function of social communication, cognitive and functional impairment, repetitive behavior severity, and comorbid diagnoses: a SPARK study report. *Autism Res*. 2021. 14: 202–219.
- Blume S.R., Nam H., Luz S., Bangasser D.A., Bhatnagar S. Sex- and Age-dependent Effects of Orexin 1 Receptor Blockade on Open-Field Behavior and

- Neuronal Activity. *Neuroscience*, 2018. 381: 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.005>
- Burnstock G.* Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.*, 2007 64 (12):1471–83. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0>
- Burnstock G., Krugel U., Abbracchio M.P., Illes P.* Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.*, 2011. 95: 229–274. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.006>
- Cartocci V., Catallo M., Tempestilli M., Segatto M., Pfrieger F.W., Bronzuoli M.R., Scuderi C., Servadio M., Trezza V., Pallottini V.* Altered brain cholesterol/isoprenoid metabolism in a rat model of autism spectrum disorders. *Neuroscience*. 2018. 372: 27–37.
- Chaliha D., Albrecht M., Vaccarezza M., Takechi R., Lam V., Al-Salami H., Mamo J.* A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. *Developmental neuroscience*. 2020. 42 (1): 12–48.
- Cheffer A., Castillo A., Corrêa-Velloso J., Gonçalves M.C.B., Naaldijk Y., Nascimento I.C., Burnstock G., Ulrich H.* Purinergic system in psychiatric diseases. *Mol. Psychiatry*, 2018. 23: 94–106.
- Christensen J., Pedersen L., Sun Y., Dreier J.W., Brikell I., Dalsgaard S.* Association of Prenatal Exposure to Valproate and Other Antiepileptic Drugs With Risk for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Offspring. *JAMA network open*. 2019. 2 (1): e186606. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.6606>
- Cieslak M., Czarnecka J., Roszek K.* The roles of purinergic signaling in psychiatric disorders. *Acta Biochim. Pol.*, 2016. 63 (1): 1–9.
- Citrigno L., Muglia M., Qualtieri A., Spadafora P., Cavalcanti F., Pioggia G., Cerasa A.* The mitochondrial dysfunction hypothesis in autism spectrum disorders: Current status and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 5785. <https://doi.org/10.3390/ijms21165785>
- Courchesne E., Pramparo T., Gazestani V.H., Lombardo M.V., Pierce K., Lewis N.E.* The ASD living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype. *Mol. Psychiatry*, 2019. 24 (1): 88–107. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0056-y>
- Doi M., Li M., Usui N., Shimada S.* Genomic Strategies for Understanding the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2022. 15: 930941. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.930941>
- Elandaloussi Y., Floris D.L., Coupé P., Duchesnay E., Mihailov A., Grigis A., Bègue I., Victor J., Frouin V., Leboyer M., Houenou J., Laidi C.* Understanding the relationship between cerebellar structure and social abilities. *Molecular autism*. 2023. 14 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/s13229-023-00551-8>
- Esposito G., Venuti P.* Analysis of toddlers' gait after six months of independent walking to identify autism: a preliminary study. *Perceptual and motor skills*. 2008. 106 (1): 259–269.
- Fatemi S.H., Aldinger K.A., Ashwood P., Bauman M.L., Blaha C.D., Blatt G.J., Chauhan A., Chauhan V., Dager S.R., Dickson P.E., Estes A.M., Goldowitz D., Heck D.H., Kemper T.L., King B.H., Martin L.A., Millen K.J., Mittleman G., Mosconi M.W., Persico A.M., Welsh J.P.* Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum* (London, England). 2012. 11 (3): 777–807.
- Fournier K.A., Hass C.J., Naik S.K., Lodha N., Cau-raugh J.H.* Motor coordination in autism spectrum disorders: a synthesis and meta-analysis. *Journal of autism and developmental disorders* 2010. 40 (10): 1227–1240.
- Fumagalli M., Lecca D., Abbracchio M.P., Ceruti S.* Pathophysiological role of purines and pyrimidines in neurodevelopment: unveiling new pharmacological approaches to congenital brain diseases. *Front. Pharmacol.*, 2017. 8: 941.
- Gandhi T., Lee C.C.* Neural Mechanisms Underlying Repetitive Behaviors in Rodent Models of Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2021. 14: 592710. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.592710>
- Ghaziuddin M., Butler E.* Clumsiness in autism and Asperger syndrome: A further report. *J. Intellect Disabil. Res.*, 1988. 42: 43–48.
- Gillberg C., Schaumann H., Gillberg I.C.* Autism in immigrants: children born in Sweden to mothers born in Uganda. *J Intellect Disabil Res.*, 1995. 39 (2): 141–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.1995.tb00482.x>
- Green D., Charman T., Pickles A., Chandler S., Loucas T., Simonoff E., Baird G.* Impairment in movement skills of children with autistic spectrum disorders. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 2009. 51: 311–316.
- Hardan A.Y., Kilpatrick M., Keshavan M.S., Minshew N.J.* Motor performance and anatomic magnetic resonance imaging (MRI) of the basal ganglia in autism. *Journal of Child Neurology*, 2003. 18: 317–324.
- Hirsch M.M., Deckmann I., Santos-Terra J., Staevie G.Z., Fontes-Dutra M., Carello-Collar G., Körbes-Rockenbach M., Brum Schwingel G., Bauer-Negrini G., Rabelo B., Gonçalves M.C.B., Corrêa-Velloso J., Naaldijk Y., Castillo A.R.G., Schneider T., Bambini-Junior V., Ulrich H., Gottfried C.* Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism. *Neuropharmacology*.

- 2020 167: 107930.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107930>
- Huang L., Otrokocsi L., Sperlagh B. Role of P2 receptors in normal brain development and in neurodevelopmental psychiatric disorders. *Brain Res. Bull.*, 2019. 151: 55–64.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.030>
- Inoue K. Purinergic systems in microglia. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008. 65: 3074–3080.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8210-3>
- Jiang S., He M., Xiao L., Sun Y., Ding J., Li W., Guo B., Wang L., Wang Y., Gao C., Sun T., Wang F. Prenatal GABAB Receptor Agonist Administration Corrects the Inheritance of Autism-Like Core Behaviors in Offspring of Mice Prenatally Exposed to Valproic Acid. *Frontiers in psychiatry*. 2022. 13: 835993.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.835993>
- Kataoka S., Takuma K., Hara Y., Maeda Y., Ago Y., Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2013. 16 (1): 91–103.
- Kern J.K., Trivedi M.H., Garver C.R., Grannemann B.D., Andrews A.A., Savla J.S., Johnson D.G., Mehta J.A., Schroeder J.L. The pattern of sensory processing abnormalities in autism. *Autism*, 2006. 10: 480–494.
- Khairullin A.E., Grishin S.N., Ziganshin A.U. P2 Receptor Signaling in Motor Units in Muscular Dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023b. 24 (2): 1587.
- Khairullin A.E., Mukhamedyarov M.A., Grishin S.N., Teplov A. Yu., Nagiev K.K., Ziganshin A.U. Synaptic Aspects of the Pathogenesis of Autism, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Alzheimer's Disease. *Biophysics*, 2023a. 68 (1): 137–145.
- Kingsley R.E. Motor systems, in *Kingsley RE* (ed): *Concise Text of Neuroscience*. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 209–336.
- Lamb G.V., Green R.J., Olorunju S. Tracking epilepsy and autism. *Egypt J. Neurol. Psychiatry Neurosurg.*, 2019. 55: 55.
<https://doi.org/10.1186/s41983-019-0103-x>
- Lee B.H., Smith T., Paciorkowski A.R. Autism spectrum disorder and epilepsy: Disorders with a shared biology. *Epilepsy Behav.*, 2015. 47: 191–201.
- Lee E., Lee J., Kim E. Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biological psychiatry*. 2017. 81 (10): 838–847.
- Lister M.F., Sharkey J., Sawatzky D.A., Hodgkiss J.P., Davidson D.J., Rossi A.G., Finlayson K. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J. Inflamm. (Lond)*, 2007. 4: 5.
<https://doi.org/10.1186/1476-9255-4-5>
- Mabunga D.F., Gonzales E.L., Kim J.W., Kim K.C., Shin C.Y. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Experimental neurobiology*. 2015. 24 (4): 285–300.
- Maenner M.J., Warren Z., Williams A.R., Amoakohene E., Bakian A.V., Bilder D.A., Durkin M.S., Fitzgerald R.T., Furnier S.M., Hughes M.M., Ladd-Acosta C.M., McArthur D., Pas E.T., Salinas A., Vehorn A., Williams S., Esler A., Grzybowski A., Hall-Lande J., Nguyen R.H.N., Pierce K., Zahorodny W., Hudson A., Hallas L., Mancilla K.C., Patrick M., Shenouda J., Sidwell K., DiRienzo M., Gutierrez J., Spivey M.H., Lopez M., Pettygrove S., Schwenk Y.D., Washington A., Shaw K.A. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries* (Washington, D.C: 2002), 2023. 72 (2): 1–14.
- Main S.L., Kulesza R.J. Repeated prenatal exposure to valproic acid results in cerebellar hypoplasia and ataxia. *Neuroscience*. 2017. 6 (340): 34–47.
- Ming X., Brimacombe M., Wagner G.C. Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. *Brain & Development*, 2007. 29: 565–570.
- Minshew N.J., Sung K., Jones B.L., Furman J.M. Underdevelopment of the postural control system in autism. *Neurology*, 2004. 63: 2056–2061.
- Mitchell R., Barton S., Harvey A.S., Williams K. Risk factors for the development of autism spectrum disorder in children with tuberous sclerosis complex: protocol for a systematic review. *Systematic reviews*. 2017. 6: 49.
<https://doi.org/10.1186/s13643-017-0448-0>
- Naviaux R.K., Zolkipli Z., Wang L., Nakayama T., Naviaux J.C., Le T.P., Schuchbauer M.A., Rogac M., Tang Q., Dugan L.L., Powell S.B. Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the poly (IC) mouse model. *PLoS One*, 2013. 8: 57380.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057380>
- Nimmo-Smith V., Heuvelman H., Dalman C., Lundberg M., Idring S., Carpenter P., Magnusson C., Rai D. Anxiety Disorders in Adults with Autism Spectrum Disorder: A Population-Based Study. *Journal of autism and developmental disorders*. 2020. 50 (1): 308–318.
- Oliveira Á., Illes P., Ulrich H. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. *Neuropharmacology*, 2016. 104: 272–281.
- Ozonoff S., Young G.S., Goldring S., Greiss-Hess L., Herrera A.M., Steele J., Macari S., Hepburn S., Rogers S.J. Gross motor development, movement abnormalities, and early identification of autism. *Journal of autism and developmental disorders*. 2008. 38 (4): 644–656.

- Pan P.Y., Bölte S., Kaur P., Jamil S., Jonsson U. Neurological disorders in autism: A systematic review and meta-analysis. *Autism*. 2021. 25 (3): 812–830.
- Pardo C.A., Meffert M.K. Animal models in autism research: The legacy of Paul H. Patterson. *Experimental neurology*. 2018. 299 (Pt A): 197–198.
- Piek J.P., Dyck M.J. Sensory-motor deficits in children with developmental coordination disorder, attention deficit hyperactivity disorder and autistic disorder. *Hum. Mov. Sci.*, 2004. 23 (3–4): 475–488.
- Pierce K., Courchesne E. Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biological psychiatry*. 2001. 49 (8): 655–664.
- Provost B., Heimerl S., Lopez B.R. Levels of gross and fine motor development in young children with autism spectrum disorder. *Physical & Occupational Therapy in Pediatrics*, 2007. 27: 21–36.
- Qi Z., Lyu M., Yang L., Yuan H., Cao Y., Zhai L., Dang W., Liu J., Yang F., Li Y. A Novel and Reliable Rat Model of Autism. *Front Psychiatry*. 2021. 12: 549810. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.549810>
- Rodier P.M., Ingram J.L., Tisdale B., Nelson S., Romano J. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *Journal of Comparative Neurology*. 1996. 370 (2): 247–261.
- Ren J., Zhao T., Xu Y., Ye H. Interaction between DISC1 and CHL1 in regulation of neurite outgrowth. *Brain Res.*, 2016. 1648 (Pt A): 290–297.
- Saffari A., Arno M., Nasser E., Ronald A., Wong C.C.Y., Schalkwyk L.C., Mill J., Dudbridge F., Meaburn E.L. RNA sequencing of identical twins discordant for autism reveals blood-based signatures implicating immune and transcriptional dysregulation. *Mol. Autism*, 2019. 10: 38. <https://doi.org/10.1186/s13229-019-0285-1>
- Schneider T., Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2005. 30 (1): 80–89.
- Servadio M., Manduca A., Melancia F., Leboffe L., Schiavi S., Campolongo P., Palmery M., Ascenzi P., di Masi A., Trezza V. Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2018. 28 (1): 85–96.
- Singh R., Kisku A., Kungumaraj H., Nagaraj V., Pal A., Kuma S., Sulakhiya K. Autism Spectrum Disorders: A Recent Update on Targeting Inflammatory Pathways with Natural Anti-Inflammatory Agents. *Biomedicines*. 2023. 11 (1): 115. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010115>
- Smirnova V., Yaikova E., Baltin M., Kharin N., Baltina T., Sachenkov O. Movement estimation methods based on the motion capture system. 2022 Fourth International Conference Neurotechnologies and Neurointerfaces (CNN), 2022. 158–161. <https://doi.org/10.1109/CNN56452.2022.9912543>
- Smith S.E.P., Li J., Garbett K., Mirnics K., Patterson P.H. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J. Neurosci*. 2007. 27 (40): 10695–10702.
- Sui L., Chen M. Prenatal exposure to valproic acid enhances synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex and fear memories. *Brain research bulletin*. 2012. 87 (6): 556–563.
- Talos D.M., Sun H., Zhou X., Fitzgerald E.C., Jackson M.C., Klein P.M., Lan V.J., Joseph A., Jensen F.E. The interaction between early life epilepsy and autistic-like behavioral consequences: a role for the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Plos One*, 2012. 7: 35885.
- Taylor M.J., Rosenqvist M.A., Larsson H., Gillberg C., D’Onofrio B.M., Lichtenstein P., Lundström S. Etiology of autism spectrum disorders and autistic traits over time. *JAMA Psychiatry*, 2020. 77: 936–943. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2020.0680>
- Watson L.R., Baranek G.T., DiLavore P.C. Toddlers with autism: Developmental perspectives. *Infants and Young Children*, 2003. 16: 201–214.
- Widiger T.A., Hines A. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition alternative model of personality disorder. *Personality disorders*. 2022. 13 (4): 347–355.
- Williams M., Prem S., Zhou X., Matteson P., Yeung P.L., Lu C.W., Pang Z., Brzustowicz L., Millonig J.H., Diccico-Bloom E. Rapid detection of neurodevelopmental phenotypes in human neural precursor cells (NPCs). *J. Vis. Exp.*, 2018. 133: 56628.
- Wood A. Prenatal exposure to sodium valproate is associated with increased risk of childhood autism and autistic spectrum disorder. *Evidence-based nursing*. 2014. 17 (3): 84. <https://doi.org/10.1136/eb-2013-101422>
- Zheng W., Hu Y., Chen D., Li Y., Wang S. Improvement of a mouse model of valproic acid-induced autism. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2019. 39 (6): 718–723. <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2019.06.14>
- Ziganshin A.U., Khairullin A.E., Hoyle C.H.V., Grishin S.N. Modulatory roles of ATP and adenosine in cholinergic neuromuscular transmission. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21 (17): 1–15.

DISORDERS OF MOTOR ACTIVITY ON THE MODEL OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS

A. E. Khairullin^{a, b, #}, D. V. Efimova^a, D. V. Ivanova^a, T. V. Baltina^b, M. E. Baltin^b, S. N. Grishin^a, and A. U. Ziganshin^a

^aKazan State Medical University, Kazan, Russia

^bKazan Federal University, Kazan, Russia

[#]e-mail: khajrulli@yandex.ru

Autism, or autism spectrum disorder (ASD), is a multifactorial disease that is characterized not only by disorders of the psycho-emotional state and social interaction, but also by somatic dysfunctions. A number of studies have also reported changes in the musculoskeletal system in patients with ASD. In this work, by the method of video analysis of movements, we demonstrated a decrease in horizontal and vertical motor activity, in addition, deviant movements were recorded, which indicates a violation in locomotor activity and increased anxiety in rats with a valproate model of autism. However, a mechano-myographic study did not reveal significant changes in the contractility parameters of isolated skeletal muscles of rats with the ASD model. Thus, it can be concluded that general differences in movement may be an independent factor in the diagnosis of autism. A more thorough study using a larger sample and detailed kinematic analysis can help in further assessing the variability of motor functions as a potential diagnostic and prognostic marker of ASD.

Keywords: autism, autism spectrum disorders, ATP, P2 receptors, skeletal muscles, neuromuscular synapse, neurotransmission

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.822.5

ВЛИЯНИЕ ХЛОРАЛГИДРАТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
НЕОКОРТЕКСА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СТАРЫХ
САМЦОВ КРЫС

© 2023 г. Н. С. Щербак¹, *, Г. Ю. Юкина¹, А. Г. Гурбо¹, Е. Г. Сухорукова¹,
А. Г. Саргсян¹, В. В. Томсон¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: shcherbakns@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.04.2023 г.

После доработки 25.07.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Во избежание получения искаженных результатов на этапе доклинического изучения новых фармацевтических субстанций и терапевтических стратегий необходимо учитывать особенности и возможное влияние возраста животного и примененного наркоза на исход эксперимента. Мы исследовали влияние хлоралгидрата на морфологические особенности нейронов и реакцию микроглии неокортекса и функциональное состояние старых самцов крыс Вистар (24 мес.). Различия оценивали у контрольных крыс и в группе с применением хлоралгидрата в дозе, необходимой для достижения наркоза (400 мг/кг веса животного), спустя 48 ч после его введения. После применения хлоралгидрата выжившие животные (летальность 37.5%) демонстрировали достоверное нарастание признаков неврологического дефицита в виде двигательных и поведенческих нарушений по сравнению с крысами контрольной группы. В лобно-теменной области неокортекса выживших животных уровень экспрессии белка Iba-1 был достоверно выше, чем в контроле, отмечались нейроны и микроглиоциты с выраженными морфологическими изменениями, хотя их число достоверно не отличалось от такового в контрольной группе. Полученные результаты позволяют предположить, что неблагоприятный эффект в ранний период после анестезии хлоралгидратом у старых крыс, проявляющийся в виде ухудшения функционального состояния и летальности, может реализовываться за счет активации микроглии лобно-теменной области неокортекса. Вопрос в том, в какой степени активация микроглии в конкретных структурах мозга ассоциирована с формированием неврологических нарушений, нуждается в дальнейшем изучении. Полученные результаты необходимо учитывать при фундаментальных и доклинических исследованиях, в которых в качестве объекта исследования участвуют старые крысы и хлоралгидрат используется в качестве анестетика.

Ключевые слова: хлоралгидрат, крысы, неокортекс, Iba-1, старение

DOI: 10.31857/S0044467723060084, **EDN:** VMQETJ

ВВЕДЕНИЕ

Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) у взрослого населения различных возрастных групп является ведущей причиной инвалидизации и смертности во всем мире (Donkor, 2018). Успешность внедрения новых способов нейропротекции, основанных на фармакологических и нефармакологических подходах, для профилактики ОНМК и ограничения степени ишемически-реперфузионного повреждения головного

мозга обусловлена рядом факторов, в том числе качеством проведения поисковых фундаментальных и доклинических исследований с участием животных. При экстраполяции результатов экспериментальных исследований в клиническую практику необходимо учитывать не только границы «терапевтического окна», дозировку препарата, комбинирование тромболитической и нейропротективной терапии, сопутствующую патологию, но и анатомо-физиологические особенности различ-

ных возрастных периодов и их соответствие у модельных животных и человека. Кроме того, существенное влияние на результаты эксперимента может оказывать примененный наркоз, поскольку моделирование ишемического повреждения головного мозга у животных осуществляется преимущественно посредством хирургических манипуляций.

Применение общей анестезии в экспериментальных исследованиях у грызунов различного возраста сопровождается разнонаправленными эффектами на структурную перестройку отдельных областей головного мозга и поведенческие реакции (Юкина и др., 2017; Bianchi et al., 2008; Stratmann et al., 2010; Callaway et al., 2012; Wu et al., 2019; Shcherbak et al., 2021). Во многом противоречивость полученных результатов может объясняться, во-первых, использованной дозой, механизмом действия и видом анестетика, во-вторых, возрастом животных, участвующих в эксперименте, в-третьих, анализируемой областью головного мозга и критериями оценки функционального состояния животного, а также самим модельным хирургическим вмешательством.

Точных временных дат в определении начала физиологического старения организма и наступления старости не существует. Согласно свободно-радикальной теории старения существует корреляция между максимальной продолжительностью жизни вида и скоростью метаболизма индивидуума, при этом картина старения мало чем отличается у различных видов, существенно отличающихся по максимальной продолжительности жизни (Сусликов и др., 2013). Поэтому проведение экспериментов на старых животных с последующей экстраполяцией результатов в клиническую практику является оправданным. Несмотря на существующие исследования когнитивной дисфункции, которая очень часто сопровождается ранним и отдаленным послеоперационными периодами и носит стойкий характер у пациентов пожилого и старческого возраста, механизмы ее формирования остаются малоизученными. Предполагается, что в основе когнитивных нарушений, как наиболее значимой проблемы пациентов пожилого возраста, находится нейровоспаление. Кроме того, исследователи придерживаются мнения о том, что именно нейровоспаление находится в основе развития когнитивной дисфункции после применения общих анестетиков, что, в свою очередь, отягощает по-

стоперационную когнитивную дисфункцию у пожилых пациентов (Moller et al., 1998).

На протяжении продолжительного времени и достаточно широко в эксперименте на лабораторных грызунах в качестве наркоза используют хлоралгидрат (Vachon et al., 2000). При этом необходимо учитывать, что хлоралгидрат, как и другие анестетики, может обладать эффектом прекондиционирующего агента (Liu et al., 2015). Следует отметить, что при проведении экспериментов с возрастными животными нельзя игнорировать особенности метаболизма любого анестетика, поскольку в процессе старения происходит ряд существенных изменений в структуре и функциях печени, поджелудочной железы и почек, которые ответственны за метаболизм и выведение лекарственных препаратов. Сегодня влияние хлоралгидрата на морфологическую перестройку гиппокампа изучено достаточно хорошо (Щербак и др., 2019; Shcherbak et al., 2021), при этом другие области, в частности неокортекс у возрастных и старых лабораторных грызунов, остаются незаслуженно неизученными, что не позволяет расширить представления о механизмах формирования когнитивных нарушений у пожилых пациентов с преимущественным поражением лобных или лобно-височных долей мозга. В настоящем исследовании мы изучили влияние хлоралгидрата на функциональное состояние и морфологические изменения нейронов и микроглии неокортекса у старых самцов крыс. Были проведены эксперименты с участием животных линии Вистар в возрасте 24 мес. Обнаружено, что применение хлоралгидрата в дозе, необходимой для достижения наркоза, приводит к активации микроглии неокортекса и ухудшению функционального состояния. Полученные данные согласуются с результатами, полученными нами ранее для областей гиппокампа старых крыс (Щербак и др., 2019, 2022; Shcherbak et al., 2021), и позволяют предположить, что в основе механизмов ухудшения функционального состояния и наличия летальности животных после применения хлоралгидрата может находиться процесс активации микроглии различных областей головного мозга. При этом определение структуры мозга, активация микроглии в которой в большей мере ответственна за формирование неврологических нарушений, – процесс довольно сложный и нуждается в дальнейшем изучении.

МЕТОДИКА

Экспериментальные животные. Работа проведена на старых (24 мес.) самцах крыс Вистар ($N = 8$ – экспериментальная группа “ChH” и $N = 8$ – экспериментальная группа “CONTROL”). Животные перед началом эксперимента были осмотрены на предмет отсутствия подкожного опухолевого роста или воспалительных процессов. Все эксперименты выполняли в соответствии с принципами Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г., и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г., и с требованиями документа: Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 № 51 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)”, и были одобрены Биоэтической комиссией (протокол № 18–5, 2018 г.).

Дизайн исследования. Животным группы “ChH” вводили внутривенно хлоралгидрат (Sigma-Aldrich, США) в дозе, необходимой для достижения наркоза (400 мг/кг веса животного), разведенный в 0.9%-м растворе натрия хлорида (ОАО НПК “ЭСКОМ”, Россия) из расчета 10 мл/кг веса животного. Животным группы “CONTROL” внутривенно вводили 0.9%-й раствор натрия хлорида в объеме 10 мл/кг веса животного. Спустя 48 ч оценивали летальность, функциональное состояние животных, далее животных повторно наркотизировали, декапитировали, извлекали головной мозг и фиксировали его в цинк-этанол-формальдегиде не менее 24 ч.

Летальность оценивали как отношение количества невыживших животных к общему числу животных в группе.

Оценка функционального состояния. Изменение неврологических функций оценивали по шкале от 0 до 18 (нормальный балл – 0; максимальный дефицит – 18) оценки тяжести неврологических нарушений mNSS (Modified Neurological Severity Score) для крыс (табл. 1, Chen et al., 2001). Тяжесть расстройства в 1 балл присуждается при невозможности выполнения теста или за отсутствие тестируемого рефлекса; таким образом, чем выше балл, тем тяжелее состояние. Наличие функциональных расстройств, соответствующих 13–18 баллам, расценивается как выраженное повреждение; 7–12 баллов – по-

вреждение средней тяжести; 1–6 – легкое повреждение (Chen et al., 2001).

Гистологическое исследование головного мозга. Для морфологического анализа неокортекса фронтальные сегменты головного мозга, приготовленные с использованием матрицы для мелких грызунов (WPI, США) обезвоживали и заливали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Далее с использованием микротомы (Accu-Cut SRT 200, Sakura, Япония) готовили серийные срезы толщиной 5 мкм, соответствующие -3.0 ± 0.4 мм относительно брегмы (Paxinos, Watson 1998). Делали пять или шесть срезов на исследуемую область мозга для каждого животного. Для обзорного анализа гистологические препараты окрашивали гематоксилином Майера и эозином (“БиоВитрум”, Россия), для выявления в нейронах субстанций Ниссля применяли крезиловый фиолетовый (“БиоВитрум”, Россия).

Иммуногистохимический метод, который был подробно описан ранее, использовали для выявления микроглии (Щербак и др., 2020). Вкратце. Первичные поликлональные козы антитела к антигену Iba-1 (1 : 2000, ab107159; AbCam, Великобритания) использовали в качестве маркера микроглиоцитов. Для связывания первичных антител применяли набор реагентов R.T.U. VECTASTAIN Universal Quick Kit Catalog № PK-7800 (USA). Визуализацию продукта реакции проводили при помощи хромогена DAB+ (Diagnostic BioSystems, Netherlands). Препараты докрашивали гематоксилином Джилла (Bio-Optica, Италия).

Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях.

Анализ гистологических препаратов. При помощи световой микроскопии и программного обеспечения ImageScore M (компания СМА (“Системы для Микроскопии и Анализа”), Москва, Россия) анализировали лобно-теменную область неокортекса обоих полушарий головного мозга (рис. 1). На срезе головного мозга от каждого животного в полях зрения (0.32×0.24 мм) подсчитывали количество морфологически неизмененных нейронов и Iba-1-позитивных ядросодержащих микроглиоцитов в анализируемой области неокортекса. Учитывали только те нейроны, в срезе которых отмечалось одно или более

Таблица 1. Шкала оценки тяжести неврологических нарушений mNSS (Modified Neurological Severity Score, Chen et al., 2001)**Table 1.** Scale for assessing the severity of neurological disorders mNSS (Modified Neurological Severity Score, Chen et al., 2001)

Тест	Баллы
Двигательные тесты	
<i>Поднятие крысы за хвост</i>	3
Сгибание передней конечности	1
Сгибание задней конечности	1
Отклонение головы более чем на 10° относительно вертикальной оси в течение 30 секунд	1
<i>Ходьба крысы на полу (normal = 0; maximum = 3)</i>	3
Обычная ходьба	0
Неспособность идти прямо	1
Хождение по кругу в сторону поражения	2
Падение на паретическую сторону	3
Сенсорные тесты	
<i>Тест размещения</i> (зрительный и тактильный тесты)	1
<i>Проприоцептивный тест</i> (придавливание лапы к краю стола)	1
Оценка равновесия Beam тест (normal = 0; maximum = 6)	
Сохранение равновесия и стабильное положение тела на перекладине (балке)	0
Захватывание края перекладины (балки)	1
Захватывание перекладины (балки) и падение одной паретичной конечности вдоль перекладины (балки)	2
Захватывание перекладины (балки) с одновременным падением двух паретичных конечностей или кружение на перекладине (балке) более 60 секунд	3
Попытка сохранить равновесие на перекладине (балке) более 40 секунд, но падение	4
Попытка сохранить равновесие на перекладине (балке) более 20 секунд, но падение	5
Падение без попытки сохранить равновесие на перекладине (балке) или вращение на перекладине (балке) менее 20 секунд	6
Отсутствие рефлексов или патологические движения	
Ушной рефлекс (встряхивание головы при прикосновении к слуховому проходу)	1
Роговичный рефлекс (моргание глаз при легком прикосновении к роговице ватой)	1
Рефлекс испуга (двигательная реакция на короткий шум от щелчка зажима для бумаги)	1
Судороги, миоклонус, миодистония	1
Максимум баллов	18

ядрышек. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм² коры головного мозга.

Анализ экспрессии белка Iba-1 в микроглиоцитах проводили на основании измерения оптической плотности продукта реакции, которую осуществляли на морфометрической установке, состоящей из светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05e (Baumer Optronic, Германия), компьютера IBM PC с программным обеспечением “ВидеоТест-Морфология” (ВидеоТест, Россия). Результаты анализа выражали в относительных единицах (отн. ед.) оптической плотности. В

анализируемой области неокортекса проводили измерение оптической плотности продукта иммуногистохимической реакции в цитоплазме всех ядродержащих микроглиоцитов. При каждом измерении вычитали оптическую плотность фона (Shcherbak et al., 2021).

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ “SPSS” (версия 26.0; США). Все массивы данных были проверены на нормальность с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение количества неизмененных нейронов, микроглиоцитов и уровня иммунореактив-

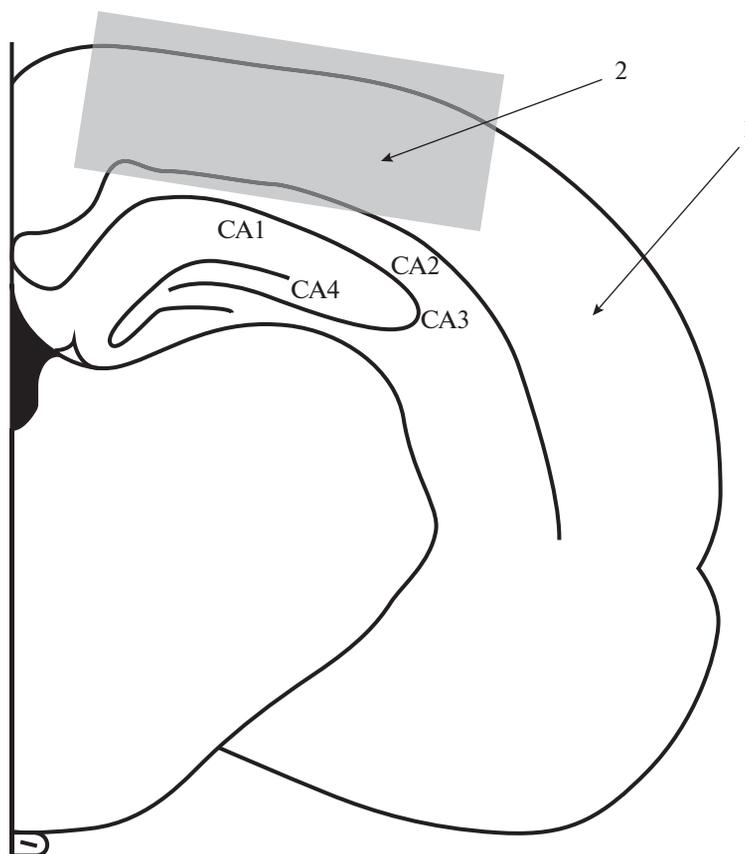


Рис. 1. Схематичное изображение фронтального среза головного мозга крысы, относительно брегмы -3.0 ± 0.4 мм; 1 – неокортекс; 2 – анализируемая область неокортекса (по G. Paxinos, Ch. Watson, 1998).

Fig. 1. Schematic representation of the frontal section of the rat brain, relative to the bregma -3.0 ± 0.4 mm; 1 – the neocortex; 2 – the analyzed area of the neocortex (according to G. Paxinos, Ch. Watson, 1998).

ности к Iba-1 в коре неокортекса между экспериментальными группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента с последующим использованием критерия равенства дисперсий Ливиня. Данные по количеству неизмененных нейронов, микроглиоцитов и уровня иммунореактивности к Iba-1 в коре неокортекса представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Различия по сравнению летальности между группами проводили с использованием точного критерия Фишера. Результаты функционального состояния животных были оценены непараметрическим методом с помощью *U*-критерия Манна–Уитни и представлены в виде медианы, минимального и максимального значений (Me; min, max). Различия учитывали как достоверные при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Все животные до начала эксперимента характеризовались наличием прореженного шерстного покрова и пониженной активностью в клетке, что обусловлено возрастными регуляторно-метаболическими сдвигами, которые присущи физиологическому старению организма.

В группе “CONTROL” через 48 ч после введения физиологического раствора летальность составила 12.5% (1 из 8 животных), неврологические функции выживших крыс, оцененные по шкале mNSS, изменялись от 1 до 2 баллов (Me 1; min 1, max 2). Спустя 48 ч после применения хлоралгидрата в дозе, необходимой для достижения анестезии, в группе “ChH” летальность составила 37.5% (3 из 8 животных) и достоверно не отличалась от таковой в группе “CONTROL” ($p > 0.05$, точный критерий Фишера). У выживших жи-

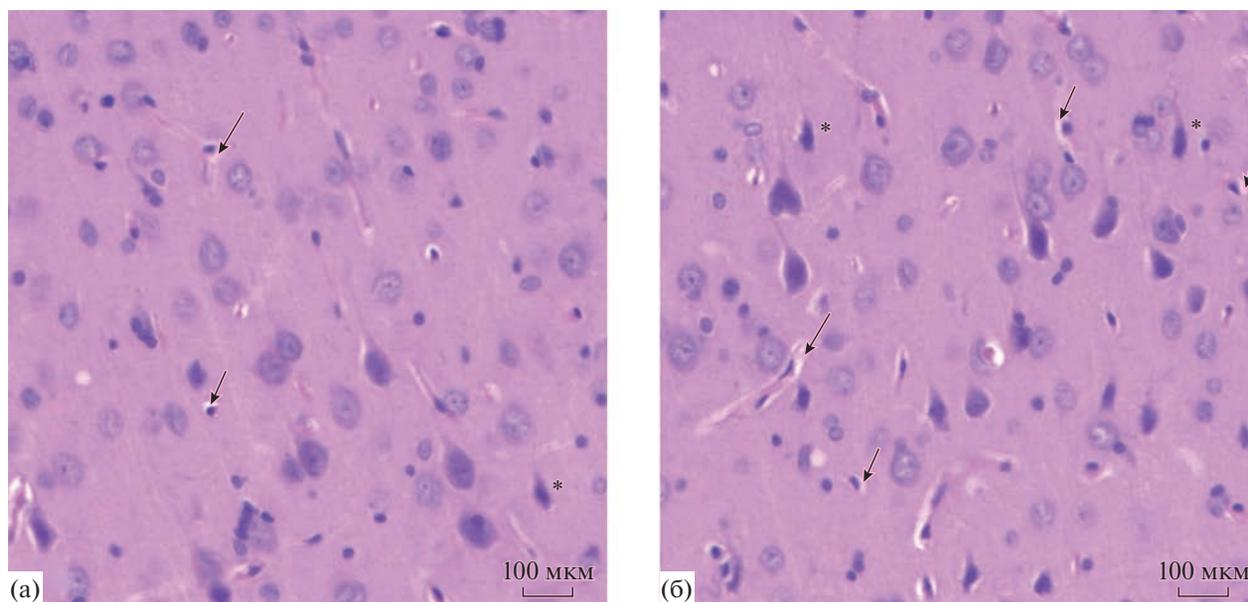


Рис. 2. Лобно-теменная область неокортекса крысы, 5-й слой. (а) — “CONTROL”. (б) — “ChH”. Обозначения: звездочка — морфологически измененный нейрон, короткая стрелка — перичеселлюлярный отек, длинная стрелка — периваскулярный отек. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. $\times 10$, об. $\times 20$.
Fig. 2. Fronto-parietal region of the rat neocortex, layer 5. (a) — “CONTROL”. (b) — “ChH”. Notation: asterisk — morphologically changed neuron, short arrow — pericellular edema, long arrow — perivascular edema. Stained with hematoxylin and eosin. Ок. $\times 10$, об. $\times 20$.

вотных группы “ChH” отмечались признаки неврологических нарушений, оцененные по шкале mNSS от 2 до 6 (Me 3; min 2, max 6), которые были значимо более выражены, чем в группе “CONTROL” ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

При морфологическом исследовании лобно-теменной области неокортекса образцов головного мозга крыс групп “ChH” и “CONTROL” отмечалось характерное citoархитектоническое строение с наличием 6 слоев клеток и отсутствием четких границ между ними. В изученной области неокортекса у животных группы “CONTROL” наблюдались единичные нейроны с морфологическими изменениями в виде гиперхромности, сморщивания клетки, отсутствия ядра. Выявлялся незначи-

тельный периваскулярный и перичеселлюлярный отек (рис. 2 (а)). У животных группы “ChH” в аналогичной области неокортекса в левой и правой гемисферах отмечался умеренный периваскулярный и перичеселлюлярный отек, встречалось большее число морфологически измененных нейронов, наблюдалось наличие хроматолиза, гиперхроматоза, кариолизиса, при этом выраженных очагов поражения обнаружено не было (рис. 2 (б)). Количество морфологически неизмененных нейронов в лобно-теменной области неокортекса у крыс группы “ChH” несколько уменьшалось, но незначительно при сравнении с аналогичным показателем в группе “CONTROL” ($p > 0.05$, t -критерий Стьюдента; табл. 2).

Таблица 2. Количество морфологически неизмененных нейронов и Iba-1-позитивных микроглиоцитов в неокортексе у старых самцов крыс Вистар до и после анестезии хлоралгидратом ($\bar{X} + S_{\bar{X}}$ на 1 мм^2 на срезе)
Table 2. The number of morphologically unchanged neurons and Iba-1-positive microgliaocytes in the neocortex of old male Wistar rats before and after anesthesia with chloral hydrate (on 1 mm^2 on a section)

Экспериментальная группа	Количество клеток	
	морфологически неизмененные нейроны	Iba-1-позитивные микроглиоциты
CONTROL	322.6 ± 24.2	87.5 ± 9.2
ChH	305.3 ± 25.6	101.9 ± 12.6

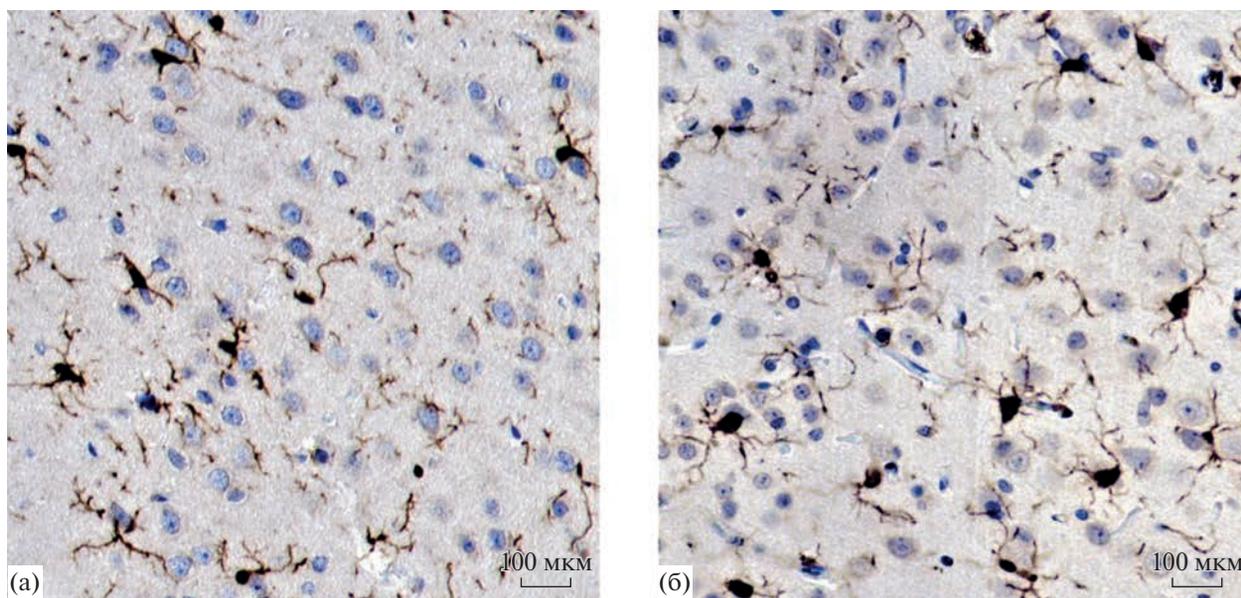


Рис. 3. Лобно-теменная область неокортекса крысы, 5-й слой. (а) – “CONTROL”. (б) – “ChN”. Иммуногистохимическая реакция на маркер микроглии белок Iba-1 с подкрашиванием гематоксилином Джилла. Ок. $\times 10$, об. $\times 20$.

Fig. 3. Fronto-parietal region of the rat neocortex, layer 5. (a) – “CONTROL”. (б) – “ChN”. Immunohistochemical reaction for microglial marker protein Iba-1 stained with Gill’s hematoxylin. Ок. $\times 10$, об. $\times 20$.

При анализе препаратов головного мозга крыс группы “CONTROL”, на которых иммуногистохимическим методом были выявлены Iba-1-позитивные клетки микроглии, во всех слоях неокортекса отмечались типичные клетки со звездчатой формой клеточного тела и разветвленными отростками (рис. 3 (а)). Во всех слоях неокортекса крыс группы “ChN” через 48 ч после применения хлоралгидрата большая часть Iba-1-позитивных клеток микроглии характеризовалась увеличением площади клеточного тела, утолщением отростков и усложнением характера ветвления, при этом количество клеток по сравнению с показателем в группе “CONTROL” увеличивалось незначительно ($p > 0.05$, t -критерий Стьюдента; табл. 2, рис. 3 (б)). Уровень иммунореактивности к Iba-1 в структурах неокортекса животных группы “CONTROL” составил 0.33 ± 0.04 отн. ед. Применение хлоралгидрата в группе “ChN” приводило через 48 ч к увеличению уровня иммунореактивности к Iba-1 в микроглиоцитах неокортекса до 0.40 ± 0.02 отн. ед., что было на 21% выше и достоверно отличалось от аналогичного показателя в группе “CONTROL” ($p < 0.05$, t -критерий Стьюдента).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о негативном влиянии хлоралгидрата, использованного для анестезии у 24-месячных крыс Вистар. Функциональное состояние животных оценивали по шкале mNSS, которая включает в себя двигательные (состояние мышц и аномальные движения), сенсорные (визуальные, тактильные и проприоцептивные), рефлекторные и балансовые тесты (Chen et al., 2001). В клинической практике для оценки когнитивного статуса у пациентов с поражением лобных долей головного мозга чаще используют тест “Батарея лобной дисфункции” (Frontal Assessment Batter — FAB), который позволяет выявлять нарушения мышления, анализа, беглости речи, динамического праксиса, хватательных рефлексов (Dubois et al., 2000). В клинической практике, а также при оценке функциональных нарушений в эксперименте, стандартных или идеальных тестов и шкал не существует, есть множество различных оценочных тестов, которые чувствительны к выявлению нарушений, от глобальных до специфических (Schaar et al., 2010). Известно, что применение хлоралгидрата в дозе 300–500 мг/кг для достижения анестезии у крыс сопровождается существенным понижением артериально-

го давления, при этом степень понижения зависит от введенной дозы и возраста животного (Щербак и др., 2019). Следовательно, потенциальный вклад в летальность и функциональную дисфункцию выживших животных после анестезии хлоралгидратом в условиях отсутствия модельного хирургического вмешательства может вносить как токсический эффект анестетика на нервную ткань головного мозга, так и его влияние на сердечно-сосудистую систему с развитием ишемического повреждения головного мозга, а также сочетанное действие этих воздействий.

Для морфологической оценки влияния хлоралгидрата были выбраны такие структуры головного мозга, как соматосенсорная и моторная кора лобно-теменной области неокортекса, которые играют важную роль в формировании тактильной чувствительности и моторной функции. Кроме того, эти области неокортекса являются широко используемой моделью для изучения патогенеза и поиска способов нейропротекции при формировании глобальной ишемии головного мозга у крыс для последующей экстраполяции полученных результатов в клиническую практику (Щербак и др., 2020; Farkas et al., 2007). Имеющиеся некоторые разногласия по поводу существования гомологии между областями префронтальной коры приматов и грызунов ограничивают использование этой части коры для изучения нейропротективных воздействий (Wise, 2008). Ранее в проведенных нами исследованиях также было показано, что применение хлоралгидрата у старых крыс не приводит к существенному дефициту морфологически неизмененных нейронов в пирамидном слое CA1, CA2, CA3 и CA4 областей гиппокампа, однако сопровождается значимым снижением числа ядрышек в нейронах и уменьшением ширины слоя (Щербак и др., 2022; Shcherbak et al., 2021). Отсутствие значимого уменьшения количества морфологически неповрежденных нейронов в неокортексе, как в области уязвимой к воздействию ишемией, может объясняться не только незначительным и непродолжительным периодом снижения АД, не приводящим к повреждающему действию, но и временным этапом патологического процесса. В представленном исследовании мы анализировали изменение неокортекса и функционального состояния крыс через 48 ч после применения хлоралгидрата. Выбор временной точки для анализа был обусловлен тем, что гибель нейронов развивается

через 48 ч после ишемического повреждения головного мозга, и это явление известно как феномен “отсроченной гибели нейронов” (Kirino, 1982). В исследовании на старых песчанках было показано, что данный процесс у старых особей происходит медленнее, чем у взрослых (Lee et al., 2010). Можно предположить, что в конечной точке эксперимента нам не удалось зафиксировать гибель нейронов, что, возможно, обусловлено возрастом животных. Поэтому в дальнейших исследованиях целесообразно анализировать морфологические изменения в нескольких временных точках эксперимента.

Механизмы негативного воздействия анестетиков на клетки нервной ткани сложны, до конца не изучены и во многом определяются механизмом действия и видом самого анестетика. В экспериментальных исследованиях было показано, что анестезия потенциально может способствовать развитию когнитивной дисфункции, влияя на ускорение текущих нейродегенеративных процессов, индуцируя апоптоз, способствуя увеличению образования β -амилоидного белка (Dong et al., 2009; Zhen et al., 2009). В нашем исследовании отсутствие значимой гибели нейронов неокортекса после анестезии хлоралгидратом при наличии летальности и неврологической дисфункции у старых животных может объясняться гипотезой, согласно которой чувствительность к анестезии обусловлена возрастом нейрона, а не возрастом организма (Hofacer et al., 2013). Так, в исследовании на новорожденных, молодых и взрослых мышах было показано, что нейротоксичность анестетиков может распространяться во взрослом возрасте на области мозга с продолжающимся нейрогенезом, такие как зубчатая извилина и обонятельная луковица (Hofacer et al., 2013). Нейрогенез неокортекса крысы достигает максимума в середине – конце гестационного периода и отсутствует во взрослом возрасте (Bayer et al., 1993). Исходя из этого можно предположить, что в головном мозге существует дифференциальная региональная уязвимость к нейроапоптозу, индуцируемому анестетиками. Вероятно, что в процессах формирования неврологических нарушений у выживших крыс могут быть в большей мере ответственны другие структуры головного мозга, также нельзя исключать функциональную роль измененного состояния и свойств нейронов и глии неокортекса при воздействии анестетиком.

Изучение влияния анестезии хлоралгидратом на микроглию неокортекса у старых самцов крыс Вистар нами проведено впервые. В качестве молекулярного маркера микроглии для оценки ее активации использовали кальций-связывающий белок Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1), который экспрессируется во всех микроглиоцитах головного мозга и был успешно применен в наших предыдущих исследованиях (Юкина и др., 2019; Щербак и др., 2022; Shcherbak et al., 2021). Известно, что микроглия в ответ на поступающие сигналы различной природы трансформируется из покоящегося состояния в активированное, которое характеризуется изменением количества микроглиоцитов, видоизменением формы и размеров клеточного тела и отростков с усложнением типа их ветвления, изменением интенсивности экспрессии внутриклеточных белков (Paollicelli et al., 2022). Обнаруженные нами морфологические изменения микроглиоцитов и увеличение уровня белка Iba-1 в них после применения хлоралгидрата свидетельствует о том, что произошла активация микроглии. Известно, что физиологические свойства воспалительных реакций в организме двойственны: с одной стороны, это формирование защитных функций, с другой – чрезмерная активация может приводить к неблагоприятным исходам. Роль нейровоспаления в развитии послеоперационной когнитивной дисфункции при старении показана в клинических и экспериментальных исследованиях (Ancelin et al., 2001; Barrientos et al., 2012; Novens et al., 2015). Предполагается, что физиологическое старение сопровождается активацией микроглии до определенного порога, а воздействие анестетиком способствует переходу в гиперактивное состояние по сравнению со взрослым организмом, и именно это состояние и приводит к выраженным неврологическим нарушениям (Hellwig et al., 2016). При этом влияние анестезии хлоралгидратом на микроглию неокортекса у старых лабораторных грызунов с наличием или отсутствием модельного хирургического вмешательства ранее не изучалось. Нашей научной группой было показано, что хлоралгидрат у возрастных крыс Вистар без модельного хирургического вмешательства приводит к морфофункциональным изменениям нейронов в наиболее уязвимых полях гиппокампа с одновременной активацией микроглии во всех полях (Щербак и др., 2022; Shcherbak et al.,

2021). Известно, что активация микроглии в различных ее проявлениях предшествует и сопровождает период гибели нейронов неокортекса у крыс после глобальной ишемии (Щербак и др., 2020; Gehrmann et al., 1992). Объяснением увеличения уровня белка Iba-1 в цитоплазме микроглиоцитов неокортекса после воздействия хлоралгидратом может служить их предполагаемое последующее участие в процессах миграции и фагоцитоза. В недавно проведенном исследовании на мышах впервые было показано, что микроглия активно участвует во множественных процессах общей анестезии посредством передачи сигналов, опосредованных микроглиальным рецептором P2Y₁₂R, и расширяет свои неиммунные функции в головном мозге. Кроме того, анализ секвенирования РНК одиночных клеток показал, что анестезия заметно влияет на уровни транскрипции генов, связанных с хемотаксисом и миграцией микроглии (Cao et al., 2023). Возможные механизмы воздействия хлоралгидрата на микроглию неокортекса могут быть обусловлены как прямым влиянием на клетки микроглии, так и опосредованно – через нарушения микроциркуляции, вызванные снижением артериального давления, или факторы, секретируемые нейронами или другими клетками. Вероятно, что определить вклад каждого механизма в активацию микроглии неокортекса у старых самцов крыс Вистар после анестезии хлоралгидратом очень сложно или практически невозможно. Кроме того, необходимо учитывать существование компенсаторных изменений областей головного мозга с разной уязвимостью к ишемическому воздействию. Также нельзя не учитывать механизмы взаимозависимого функционирования нейронов в коннектоме, включающем топографически связанные области неокортекса, гиппокампа и других структур головного мозга (Силькис, 2022). Последующие экспериментальные исследования, позволяющие определить возможные механизмы, по-видимому, будут предполагать использование моделей крыс с нокаутом, а также методов метаболомного и транскриптомного анализов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Однократное применение хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг у старых самцов крыс Вистар при отсутствии модельного хирургического вмешательства через 48 ч приводит к увеличе-

нию неврологического дефицита и усилению активации микроглии в лобно-теменной области неокортекса. При проведении фундаментальных и доклинических исследований с участием самцов Вистар в возрасте 24 мес. и использовании хлоралгидрата в качестве анестетика необходимо обращать внимание на эту особенность, чтобы избежать получения искаженных результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Силькис И.Г.* Механизмы функционирования коннектома, включающего неокортекс, гиппокамп, базальные ганглии, мозжечок и таламус. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2022. 72 (1): 36–54.
- Сусликов В.Л., Толмачева Н.В., Александров Е.В.* Анализ причинно-следственных связей феномена долгожительства. Вестн. Чувашского унив. 2013. 3: 531–539.
- Щербак Н.С., Кузьменко Н.В., Плисс М.Г.* Влияние хлоралгидрата на показатели гемодинамики и поведенческие реакции у старых крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2019. 105 (7): 913–922.
<https://doi.org/10.1134/S0869813919070094>
- Щербак Н.С., Юкина Г.Ю., Гурбо А.Г., Сухорукова Е.Г., Саргсян А.Г., Томсон В.В., Галагудза М.М.* Морфофункциональное состояние микроглии и нейронов гиппокампа у возрастных крыс после анестезии хлоралгидратом. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2022. 21 (3): 64–71.
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2022-21-3-64-71>
- Щербак Н.С., Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Томсон В.В.* Влияние ишемического посткондиционирования на реакцию микроглии неокортекса при глобальной ишемии головного мозга у крыс. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2020. 19 (2): 59–66.
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-2-59-66>
- Юкина Г.Ю., Белозерцева И.В., Полушин Ю.С., Томсон В.В., Полушин А.Ю., Янишевский С.Н., Кривов В.О.* Структурно-функциональная перестройка нейронов гиппокампа после операции под анестезией севофлураном (экспериментальное исследование). Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2017. 14 (6): 65–72.
<https://doi.org/10.21292/2078-5658-2017-14-6-65-72>
- Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Белозерцева И.В., Полушин Ю.С., Томсон В.В., Полушин А.Ю.* Реакция нейронов и микроглии коры мозжечка на анестезию севофлураном. Цитология. 2019. 61 (7): 548–555.
<https://doi.org/10.1134/S0041377119070101>
- Ancelin M.L., de Roquefeuil G., Ledésert B., Bonnel F., Cheminal J.C., Ritchie K.* Exposure to anaesthetic agents, cognitive functioning and depressive symptomatology in the elderly. Br J Psychiatry. 2001. 178: 360–366.
<https://doi.org/10.1192/bjp.178.4.360>
- Barrientos R.M., Hein A.M., Frank M.G., Watkins L.R., Maier S.F.* Intracisternal interleukin-1 receptor antagonist prevents postoperative cognitive decline and neuroinflammatory response in aged rats. J Neurosci. 2012. 32 (42): 14641–14648.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2173-12.2012>
- Bayer S.A., Altman J., Russo R.J., Zhang X.* Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. Neurotoxicology. 1993. 14 (1): 83–144.
- Bianchi S.L., Tran T., Liu C., Lin S., Li Y., Keller J.M., Eckenhoff R.G., Eckenhoff M.F.* Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics. Neurobiol Aging. 2008. 29 (7): 1002–1010.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.009>
- Callaway J.K., Jones N.C., Royle A.G., Royle C.F.* Sevoflurane anesthesia does not impair acquisition learning or memory in the Morris water maze in young adult and aged rats. Anesthesiology. 2012. 117: 1091–1101.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31826cb228>
- Cao K., Qiu L., Lu X., Wu W., Hu Y., Cui Z., Jiang C., Luo Y., Shao Y., Xi W., Zeng L.H., Xu H., Ma H., Zhang Z., Peng J., Duan S., Gao Z.* Microglia modulate general anesthesia through P2Y12 receptor. Curr Biol. 2023. 33 (11): 2187–2200. e6.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.04.047>
- Chen J., Sanberg P.R., Li Y., Wang L., Lu M., Willing A.E., Sanchez-Ramos J., Chopp M.* Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. Stroke. 2001. 32 (11): 2682–2688.
<https://doi.org/10.1161/hs1101.098367>
- Donkor E.S.* “Stroke in the 21st century: A snapshot of the burden, epidemiology, and quality of life.” Stroke. Res. Treat. 2018. 3: 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2018/3238165>
- Dong Y., Zhang G., Zhang B., Moir R.D., Xia W., Marcantonio E.R., Culley D.J., Crosby G., Tanzi R.E., Xie Z.* The common inhalational anesthetic sevoflurane induces apoptosis and increases beta-amyloid protein levels. Arch Neurol. 2009. 66 (5): 620–631.
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.48>
- Dubois B., Slachevsky A., Litvan I., Pillon B.* The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. Neurology. 2000. 55 (11): 1621–6.
<https://doi.org/10.1212/wnl.55.11.1621>
- Farkas E., Luiten P.G.M., Bari F.* Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. Brain research reviews. 2007. 54: 162–180.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.003>

- Gehrmann J., Bonnekoh P., Miyazawa T., Hossmann K.A., Kreuzberg G.W. Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992. 12 (2): 257–69. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1992.36>
- Hellwig S., Brioschi S., Dieni S., Frings L., Masuch A., Blank T., Biber K. Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice. *Brain Behav Immun.* 2016. 55: 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.008>
- Hofacer R.D., Deng M., Ward C.G., Joseph B., Hughes E.A., Jiang C., Danzer S.C., Loepke A.W. Cell age-specific vulnerability of neurons to anesthetic toxicity. *Ann Neurol.* 2013. 73 (6): 695–704. <https://doi.org/10.1002/ana.23892>
- Hovens I.B., van Leeuwen B.L., Nyakas C., Heineman E., van der Zee E.A., Schoemaker R.G. Postoperative cognitive dysfunction and microglial activation in associated brain regions in old rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2015. 118: 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.11.009>
- Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982. 239: 57–69. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90833-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90833-2)
- Lee C.H., Yoo K.Y., Choi J.H., Park O.K., Hwang I.K., Kim S.K., Kang I.J., Kim Y.M., Won M.H. Neuronal damage is much delayed and microgliosis is more severe in the aged hippocampus induced by transient cerebral ischemia compared to the adult hippocampus. *J. Neurol Sci.* 2010. 294 (1–2): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.04.014>
- Liu J.H., Feng D., Zhang Y.F., Shang Y., Wu Y., Li X.F., Pei L. Chloral Hydrate Preconditioning Protects Against Ischemic Stroke via Upregulating Annexin A1. *CNS Neurosci Ther.* 2015. 21 (9): 718–726. <https://doi.org/10.1111/cns.12435>
- Moller J.T., Cluitmans P., Rasmussen L.S., Houx P., Rasmussen H., Canet J., Rabbitt P., Jolles J., Larsen K., Hanning C.D., Langeron O., Johnson T., Lauven P.M., Kristensen P.A., Biedler A., van Beem H., Fraidakis O., Silverstein J.H., Beneken J.E., Gravenstein J.S. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. *International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction.* *Lancet.* 1998. 251: 857–861. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)07382-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)07382-0)
- Paolicelli R.C., Sierra A., Stevens B., Tremblay M.E., Aguzzi A., Ajami B., Amit I., Audinat E., Bechmann I., Bennett M., Bennett F., Bessis A., Biber K., Bilbo S., Blurton-Jones M., Boddeke E., Brites D., Brône B., Brown G.C., Butovsky O., Carson M.J., Castellano B., Colonna M., Cowley S.A., Cunningham C., Davalos D., De Jager P.L., de Strooper B., Denes A., Eggen B.J.L., Eyo U., Galea E., Garel S., Ginhoux F., Glass C.K., Gokce O., Gomez-Nicola D., González B., Gordon S., Graeber M.B., Greenhalgh A.D., Gressens P., Greter M., Gutmann D.H., Haass C., Heneka M.T., Heppner F.L., Hong S., Hume D.A., Jung S., Kettenmann H., Kipnis J., Koyama R., Lemke G., Lynch M., Majewska A., Malcangio M., Malm T., Mancuso R., Masuda T., Matteoli M., McColl B.W., Miron V.E., Molofsky A.V., Monje M., Mracsko E., Nadjar A., Neher J.J., Neniskyte U., Neumann H., Noda M., Peng B., Peri F., Perry V.H., Popovich P.G., Pridans C., Priller J., Prinz M., Ragozzino D., Ransohoff R.M., Salter M.W., Schaefer A., Schaefer D.P., Schwartz M., Simons M., Smith C.J., Streit W.J., Tay T.L., Tsai L.H., Verkhratsky A., von Bernhardi R., Wake H., Wittamer V., Wolf S.A., Wu L.J., Wyss-Coray T. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron.* 2022. 110 (21): 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
- Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1998.
- Schaar K.L., Brennehan M.M., Savitz S.I. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med.* 2010. 2 (1): 13. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-13>
- Shcherbak N.S., Yukina G.Yu., Gurbo A.G., Sukhorukova E.G., Sargsian A.G., Barantsevich E.R., Thomson V.V., Galagudza M.M. Reaction of Microglia and Neurons of the Hippocampal CA1 Field to Chloral Hydrate in Old Rats. *Advances in Gerontology.* 2021. 11 (4): 341–345. <https://doi.org/10.1134/S2079057021040123>
- Stratmann G., Sall J.W., Bell J.S., Alvi R.S., May L.d., Ku B., Dowlatshahi M., Dai R., Bickler P.E., Russell I., Lee M.T., Hrubos M.W., Chiu C. Isoflurane does not affect brain cell death, hippocampal neurogenesis, or long-term neurocognitive outcome in aged rats. *Anesthesiology.* 2010. 112 (2): 305–15. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181ca33a1>
- Vachon P., Faubert S., Blais D., Comtois A., Bienvenu J.G. A pathophysiological study of abdominal organs following intraperitoneal injections of chloral hydrate in rats: comparison between two anaesthesia protocols. *Lab Anim.* 2000. 34 (1): 84–90. <https://doi.org/10.1258/002367700780578082>
- Wise S.P. Forward frontal fields: phylogeny and fundamental function. *Trends Neurosci.* 2008. 31 (12): 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.08.008>
- Wu L., Zhao H., Weng H., Ma D. Lasting effects of general anesthetics on the brain in the young and elderly: “mixed picture” of neurotoxicity, neuroprotection and cognitive impairment. *J Anesth.* 2019. 33 (2): 321–335. <https://doi.org/10.1007/s00540-019-02623-7>
- Zhen Y., Dong Y., Wu X., Xu Z., Lu Y., Zhang Y., Norton D., Tian M., Li S., Xie Z. Nitrous oxide plus isoflurane induces apoptosis and increases beta-amyloid protein levels. *Anesthesiology.* 2009. 111 (4): 741–752. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181b27fd4>

EFFECT OF CHLORAL HYDRATE ON MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE NEOCORTEX AND FUNCTIONAL STATE OF OLD MALE RATS

N. S. Shcherbak^{a, #}, G. Yu. Yukina^a, A. G. Gurbo^a, E. G. Sukhorukova^a,
A. G. Sargsian^a, and V. V. Thomson^a

^a*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: shcherbakns@yandex.ru*

In order to avoid obtaining distorted results at the stage of preclinical study of new pharmaceutical substances and therapeutic strategies, it is necessary to take into account the features and possible influence of the age of the animal and the anesthesia used on the outcome of the experiment. We studied the effect of chloral hydrate on morphological changes in neurons and the reaction of neocortical microglia and the functional state of old male Wistar rats (24 months). Differences were assessed in control rats and in the group using chloral hydrate at the dose required to achieve anesthesia (400 mg/kg animal weight) after 48 hours. After the application of chloral hydrate, the surviving animals (mortality rate 37.5%) showed a significant increase in the signs of neurological deficit in the form of motor, sensory and behavioral disorders compared to the rats of the control group. In the fronto-parietal region of the neocortex of the surviving animals, the expression level of the Iba-1 protein was significantly higher than in the control, neurons and microgliaocytes with pronounced morphological changes were noted, while their number did not significantly differ from that in the control group. The obtained results suggest that the adverse effect in the early period after anesthesia with chloral hydrate without model surgical intervention in old rats, which manifests itself in the form of a deterioration in the functional state and mortality, can be realized due to the activation of microglia in the fronto-parietal region of the neocortex. However, the process of determining the specific structure of the brain, the activation of microglia in which is more responsible for the formation of neurological disorders, is quite complex and needs further study. In fundamental and preclinical studies of neuroprotective effects, in which old rats are used as the object of study and chloral hydrate is used as an anesthetic, these features must be taken into account.

Keywords: chloral hydrate, rats, neocortex, Iba-1, aging

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.017.2

ЭФФЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ИНТЕРВАЛЬНЫХ
ГИПОКСИЧЕСКИХ ТРЕНИРОВОК В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
МОДЕЛЯХ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЙ НА ГРЫЗУНАХ

© 2023 г. М. Ю. Зенько¹, К. А. Баранова¹, М. В. Кукина¹, Е. А. Рыбникова¹, *

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: rybnikovaea@infran.ru

Поступила в редакцию 15.08.2023 г.

После доработки 28.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Разработка немедикаментозных способов коррекции стресс-индуцированных расстройств и улучшения адаптации к стрессорным воздействиям остается актуальной задачей физиологии, имеющей большой трансляционный потенциал. Ранее нами были предложены эффективные в данном отношении способы гипоксического гипобарического прекондиционирования и дистантного ишемического кондиционирования. Цель настоящей работы состояла в переносе принципов прекондиционирования на подходы нормобарической интервальной гипоксической тренировки (ИГТ). Исследованы эффекты пяти новых режимов ИГТ (3 пятиминутных сеанса гипоксии по 16% O₂ в день, 3 сеанса по 12% O₂, 7 сеансов по 12% O₂, 15 сеансов по 12% O₂, 3 сеанса по 9% O₂) в экспериментальных моделях депрессии и посттравматического стрессового расстройства у крыс. Прекондиционирующий режим высокой интенсивности 3 × 9%O₂ оказал наиболее выраженный антидепрессивный и анксиолитический эффект в моделях обеих патологий. При снижении уровня гипоксии до 12% O₂ частично сохраняли эффективность режимы ИГТ с увеличением количества сеансов. Тренировочный режим наибольшей длительности – 15 × 12%O₂, обладал эффективностью в отношении коррекции формирования экспериментальной депрессии. Переходный режим – 7 × 12%O₂ – оказывал анксиолитический эффект, тогда как прекондиционирующий режим средней интенсивности – 3 × 12%O₂ – продемонстрировал и антидепрессивный, и анксиолитический эффект. Результаты свидетельствуют, что наибольшее влияние на эффективность оказывала интенсивность гипоксического воздействия. При этом снижение интенсивности до 16% O₂ приводило к ослаблению или потере стресс-протективных свойств. В отношении режима 3 × 9%O₂ как наиболее перспективного целесообразно провести дальнейшие исследования по выявлению молекулярных механизмов, реализующих его стресс-протективное и анксиолитическое действие.

Ключевые слова: гипоксия, стресс, адаптация, интервальная гипоксическая тренировка, посттравматическое стрессовое расстройство, депрессия

DOI: 10.31857/S004446772306014X, **EDN:** XLISSQ

За последние несколько лет пандемия COVID-19, психотравматизация вследствие вооруженных конфликтов, вынужденного переселения или несчастных случаев коснулись миллионов людей по всему миру (Carpiniello, 2023). Возрастающий уровень стрессогенности, по различным экспертным оценкам, приводит к увеличению количества индуцированных ею психических расстройств. Так, у пациентов, уже успешно вылечившихся от COVID-19, в 31% случаев наблюдаются симптомы депрес-

сии, в 28% – ПТСР и в 42% – тревожного расстройства (Mazza et al., 2022). У участников военных конфликтов впоследствии частота возникновения ПТСР может достигать 37.8%, у спасателей и пожарников – рекордные 57% (Iversen et al., 2008; Jakupcak et al., 2008; Obuobi-Donkor et al., 2022). По данным последних метаанализов, распространенность депрессии среди общей популяции в настоящее время может достигать 25–33.7%

(Cooke et al., 2020; Wang et al., 2020; Mahmud et al., 2023).

С учетом недостаточной эффективности имеющихся средств профилактики и терапии, разработка новых способов и подходов к повышению устойчивости организма к стрессорным воздействиям по-прежнему остается крайне актуальной проблемой. Одним из наиболее перспективных направлений может быть возрождение интереса к методу интервальной гипоксической тренировки как средству индукции перекрестной адаптации между гипоксией и психоэмоциональным стрессом, когда адаптация к одному из влияний сопровождается формированием толерантности к стрессорам другой модальности или природы (Zenko, Rybnikova, 2023).

Интервальная гипоксическая тренировка (ИГТ) представляет собой чередование эпизодов гипоксии с нормоксией, гипоксией меньшей интенсивности, гиперкапнией или даже гипероксией. Разработано большое количество вариаций сочетаний и циклов ИГТ, различающихся по модальности, интенсивности и количеству эпизодов, длительности каждого отдельного цикла и т.д. Описаны сочетания как коротких эпизодов гипоксии/нормоксии (от 1 до 20 мин) (Cao et al., 1992) в течение одного дня, так и намного более длительных эпизодов гипоксии/нормоксии до 12 часов и продолжительностью до 90 дней (Rodriguez et al., 1999). Наибольшее распространение получили режимы ИГТ с небольшим количеством эпизодов в день (3–15) в условиях умеренной гипоксии (10–16% O₂), которые считаются оптимальными по соотношению безопасности и эффективности, по сравнению с воздействием более интенсивной гипоксии (8–9% O₂) или большим количеством эпизодов (Navarrete-Opazo, Mitchell, 2014).

Изучение физиологических механизмов, лежащих в основе эффектов ИГТ, является актуальной задачей в связи с высоким терапевтическим потенциалом данного метода. Показано, что ИГТ повышает адаптивные возможности кардиореспираторной системы, улучшает гемореологические свойства, повышает активность метаболических процессов, в т.ч. в миокарде, уровень белков антиоксидантной защиты, шаперонов, эритропоэтина, индуцибельной NO-синтазы, подавляет окислительный стресс, модулирует стрессорный ответ и функцию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (Зенько, Рыб-

никова 2020; Balestra et al., 2021; Cai et al., 2010; Knaupp et al., 1992; Park et al., 2022; Rybnikova et al., 2023; Zembron-Lacny et al., 2020).

Наши предыдущие исследования по разработке нейропротективных способов с применением гипобарической гипоксии показали, что не тренировочные, а кондиционирующие режимы гипоксии, вызывающие срочную мобилизацию адаптационных ресурсов на молекулярно-клеточном и системном уровнях, могут быть наиболее эффективными (Зенько, Рыбникова, 2020; Rybnikova et al., 2022; Rybnikova et al., 2023). С использованием модели гипобарической гипоксии на крысах нами было показано, что гипобарическое пре- и посткондиционирование оказывает мощное стресс-протективное, антидепрессивное и анксиолитическое действие в моделях постгипоксических и постстрессорных патологий на крысах (Зенько, Рыбникова, 2020; Rybnikova et al., 2022; Rybnikova et al., 2023). Кроме того, принципы кондиционирования были успешно реализованы нами при разработке способов дистантного ишемического пре- и посткондиционирования, также оказывающего выраженное стресс-протективное действие в моделях на крысах (Баранова, Зенько, 2018).

Сравнение гипобарической и нормобарической гипоксии выявляет сходство молекулярных сенсоров и, соответственно, адаптивного ответа, однако при этом нормобарическая гипоксия оказывает меньше побочных эффектов, является более управляемым воздействием, и, как следствие, более безопасным (Millet et al., 2012). Нормобарическую гипоксию с использованием дыхательной смеси можно мгновенно остановить в случае возникновения неблагоприятных эффектов, сняв маску или подав кислород в камеру, в отличие от использования гипобарической барокамеры, где необходимо постепенное изменение давления во избежание баротравмы. В отличие от нормобарической, гипобарическая гипоксия может приводить к возникновению симптомов острой высотной болезни, легочной вазоконстрикции, изменениям вентиляционной реакции и жидкостного баланса (Conkin, Wessel, 2008; Loepky et al., 2005; Millet et al., 2012). Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе была поставлена задача разработать эффективные способы нейропротекции и стресс-протекции с применением нормобарической гипоксии и подходов ИГТ. При этом на основании собственного многолетнего опыта было сделано предположение,

что принципы кондиционирования (снижение числа сеансов, дней воздействия, с увеличением интенсивности гипоксического фактора) могут быть также применимы и к парадигме нормобарической гипоксии (Rybnikova et al., 2022). С целью проверки данного предположения нами проведен сравнительный экспериментальный анализ эффективности прекодиционирующих режимов ($3 \times 9\%O_2$, $3 \times 12\%O_2$, $3 \times 16\%O_2$), тренировочных режимов ($15 \times 12\%O_2$), и переходных вариантов ($7 \times 12\%O_2$) в отношении коррекции патогенеза постстрессорных тревожно-депрессивных расстройств в моделях на крысах.

МЕТОДИКА

Исследования проведены на 96 взрослых самцах крыс линии Вистар из ресурсов ЦКП “Биоколлекция” ИФ РАН, содержащихся в стандартных условиях при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов были соблюдены принципы, изложенные в директивах Европейского Совета (2010/63/EU) и положениях ИФ РАН о работе с животными, используемыми в научных экспериментах.

Для моделирования гипоксических нормобарических условий использована автоматическая установка, создающая гипоксию требуемой интенсивности за счет кислорода воздуха и поступающего в камеру азота, поток которого находится под программным управлением компьютера через регулирующий блок и систему клапанов. Установка состоит из прозрачной камеры, разделенной съемной сеткой на 6 отсеков, плотно прилегающей к ней крышки с размещенными на ней редуктором и клапаном ввода азота, клапанами и патрубками с вентиляторами для продувки камеры атмосферным воздухом, цифровым датчиком уровня кислорода и электронным управляющим блоком (изготовитель АО “Технопарк Санкт-Петербурга”).

С использованием камеры одновременно для всей группы крыс создавали 5-минутную нормобарическую гипоксию с последующей 15-минутной реоксигенацией, 3 и более эпизодов гипоксии/реоксигенации (5/15 мин) в день подряд ежедневно в течение 3 дней. Это соотношение длительности эпизодов отражает оригинальный подход, который базируется на предыдущем опыте авторов, полученном при исследованиях действия гипобарического пре-/посткондиционирования и

дистантной ишемии (Зенько, Рыбникова, 2020; Rybnikova et al., 2022; Rybnikova et al., 2023).

Экспериментально исследованы эффекты пяти режимов интервальных тренировок: 3 пятиминутных сеанса гипоксии по $16\% O_2$ в день, 3 сеанса по $12\% O_2$, 7 сеансов по $12\% O_2$, 15 сеансов по $12\% O_2$, 3 сеанса по $9\% O_2$. Дизайн режимов базировался на гипотезе авторов о том, что трехкратное воздействие более интенсивной гипоксией может оказывать более выраженное влияние (соответственно, режимы сравнения – $9\% O_2$, 3 сеанса, и $16\% O_2$, 3 сеанса), а эффективность среднего по интенсивности режима гипоксии может увеличиваться с увеличением числа сеансов, что характерно для классических подходов ИГТ.

Эффекты данных тестовых гипоксических воздействий были исследованы в экспериментальных моделях психоэмоционального стресса и постстрессорных тревожно-депрессивных состояний у крыс.

“Выученная беспомощность” (ВБ)

В качестве экспериментальной модели депрессии была использована классическая модель “выученной беспомощности” (ВБ) (Henkel et al., 2002; Seligman, Maier, 1967; Seligman, Beagley, 1975; Willner, 1986). Крысы подвергались воздействию аверсивного неизбежного стрессора, электрокожного раздражения (1 мА, 60 Гц, 15 с), 60 раз с непредсказуемыми интервалами между ними от 15 до 45 с.

Модель ПТСР “стресс–рестресс”

Для индукции аналога посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) использовали модель “травматический стресс – рестресс”. Эта модель, предложенная И. Либберзоном и коллегами в 1997 году (Liberzon et al., 1997), выгодно отличается от других моделей своей этиологической обоснованностью. Ее основу составляет парадигма “травматический стресс – рестресс”, в которой воспроизводится патогенетическая роль предшествующей психотравматизации в ситуации, воспринимаемой как угроза для жизни. Процедура стрессирования включала условно “тяжелый” патогенный стресс (2 ч иммобилизации, 20 мин вынужденного плавания и, после 15-минутного перерыва, воздействие эфиром до обездвиживания). Через 7 сут производился напоминающий, условно более “мягкий”, рестресс (30 мин

иммобилизации), выполняющий роль триггера, запускающего развитие модельного аналога ПТСР с симптоматикой тревожного патологического состояния.

Поведенческое тестирование

Для оценки поведения, двигательной активности и уровня тревожности животных использовали тестирование в “открытом поле” (ОП) и “приподнятом крестообразном лабиринте” (ПКЛ).

Тест ОП, являющийся классическим методом исследования поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях (Hall, 1936), позволяет оценить уровни локомоторной активности и ориентировочно-исследовательского поведения крыс. Тестирование проводилось на 4-й день после стресса моделей ВБ и ПТСР в установке площадью 1 м² квадратной формы, разбитой на 36 секторов, с источником света сверху в центре установки. Испытуемое животное помещали в центр открытого поля и в течение 5 минут фиксировали его активность, в ходе эксперимента отмечали время латентного периода, количество пересеченных квадратов различных зон установки, время груминга, вертикальных стоек, иммобилизации.

Для изучения уровня тревожности животных и возможного анксиолитического эффекта ИГТ соответственно, был применен поведенческий тест “Приподнятый крестообразный лабиринт” (Pellow et al., 1985). Тестирование в ПКЛ проводилось на 5-й день после стресса моделей ВБ и ПТСР. ПКЛ представляет из себя приподнятый на 1 м над полом лабиринт с двумя открытыми освещенными (стрессогенными) и двумя закрытыми (темными, условно защищенными) рукавами. Крысу помещали в центр установки и в течение 5 минут регистрировали выбор рукавов и центра, время, проведенное во всех этих зонах (Pellow et al., 1985; Walf, Frye, 2007).

Функция гипоталамо-гипофизарно-адренортикаральной системы

Методом твердофазного иммуоферментного анализа проведено определение уровней кортикостерона в плазме туловищной крови, полученной при декапитации животных на 6-й день после модельного стрессирования. Используются коммерческие ИФА-киты (K210R, Кортикостерон крыса/мышь ИФА, ООО Хема, Россия).

Статистическая обработка результатов

Был использован программный пакет STATISTICA 12.0. Распределение параметров, проанализированных в статье, было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова, после чего был использован непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни. Различия между выборками считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные на рисунках представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Формирование экспериментальной депрессии у животных в модели “выученной беспомощности” сопровождалось проявлением локомоторного дефицита, характерного для данного заболевания: крысы этой группы совершали достоверно меньше пересечений крайних квадратов ОП, то есть демонстрировали снижение горизонтальной двигательной активности ($p = 0.027$, рис. 1 (а), *), при сохранении вертикальной двигательной активности.

В группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $15 \times 12\%O_2 + ВБ$, $7 \times 12\%O_2 + ВБ$, $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ (все тестовые группы, кроме $3 \times 16\%O_2 + ВБ$) показатель горизонтальной активности крыс был достоверно выше, чем у животных с модельной депрессией ($p = 0.001$, $p < 0.01$, $p = 0.023$ и $p = 0.044$ соответственно; рис. 1 (а), #) и соответствовал значениям контроля, что свидетельствует об отсутствии депрессивно-подобной симптоматики. Наибольшие абсолютные показатели двигательной активности были отмечены в группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$ и $15 \times 12\%O_2 + ВБ$ (рис. 1 (а)).

Иммобилизация, также характерная для развития модельной депрессии у крыс, была отмечена у части крыс в группах ВБ, $3 \times 16\%O_2 + ВБ$ ($p < 0.05$, рис. 1 (в), *), $7 \times 12\%O_2 + ВБ$ и у одной крысы в группе $3 \times 12\%O_2 + ВБ$; в контроле и группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $15 \times 12\%O_2 + ВБ$ иммобилизация полностью отсутствовала (рис. 1 (в)).

По сравнению с депрессивными состояниями, при развитии модельного ПТСР нарушений горизонтальной двигательной активности в тесте ОП обычно не отмечается, что также было продемонстрировано в нашем эксперименте (рис. 1, б). В группе ПТСР проявлений иммобилизации животных было достоверно больше, чем у контроля ($p < 0.05$, рис. 1 (г), *), в группах $15 \times 12\%O_2 + ПТСР$,

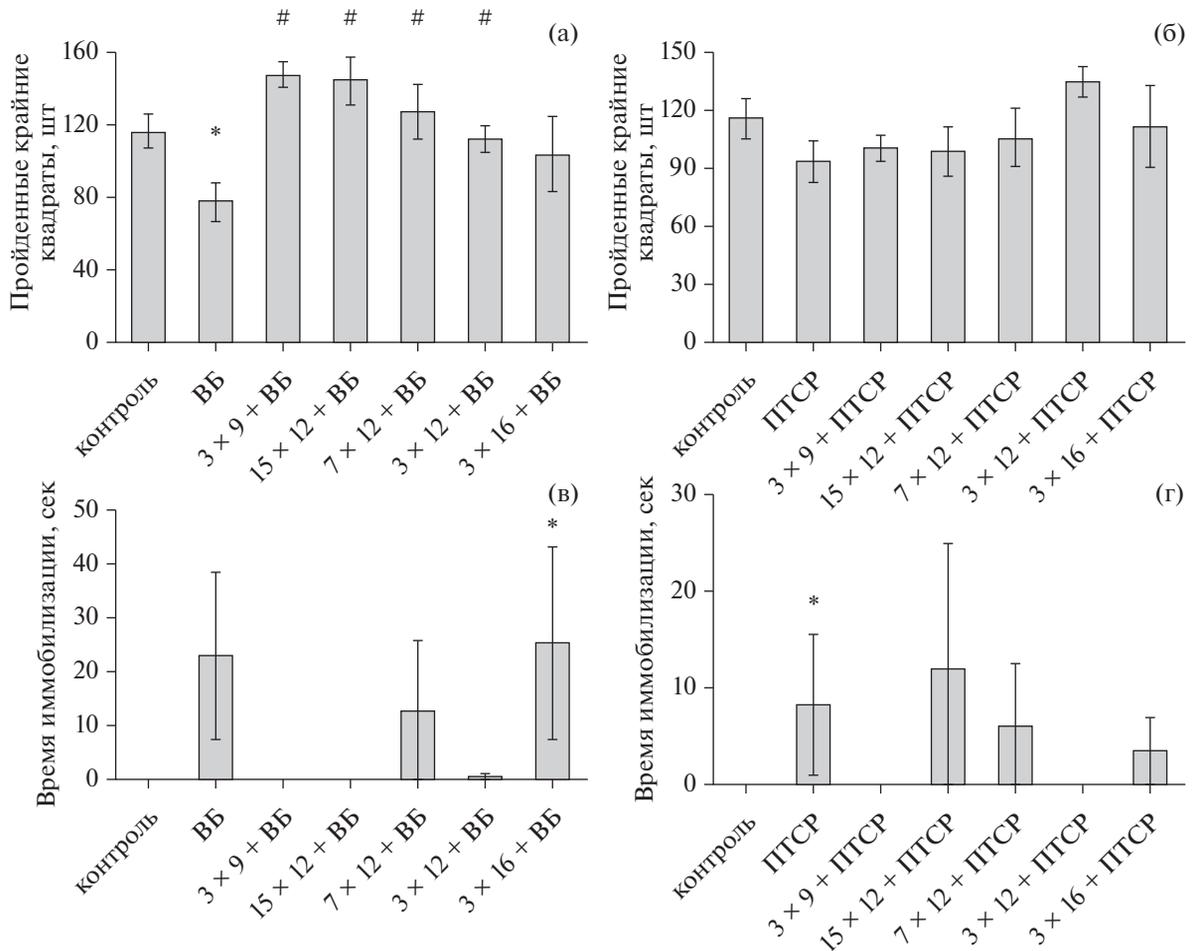
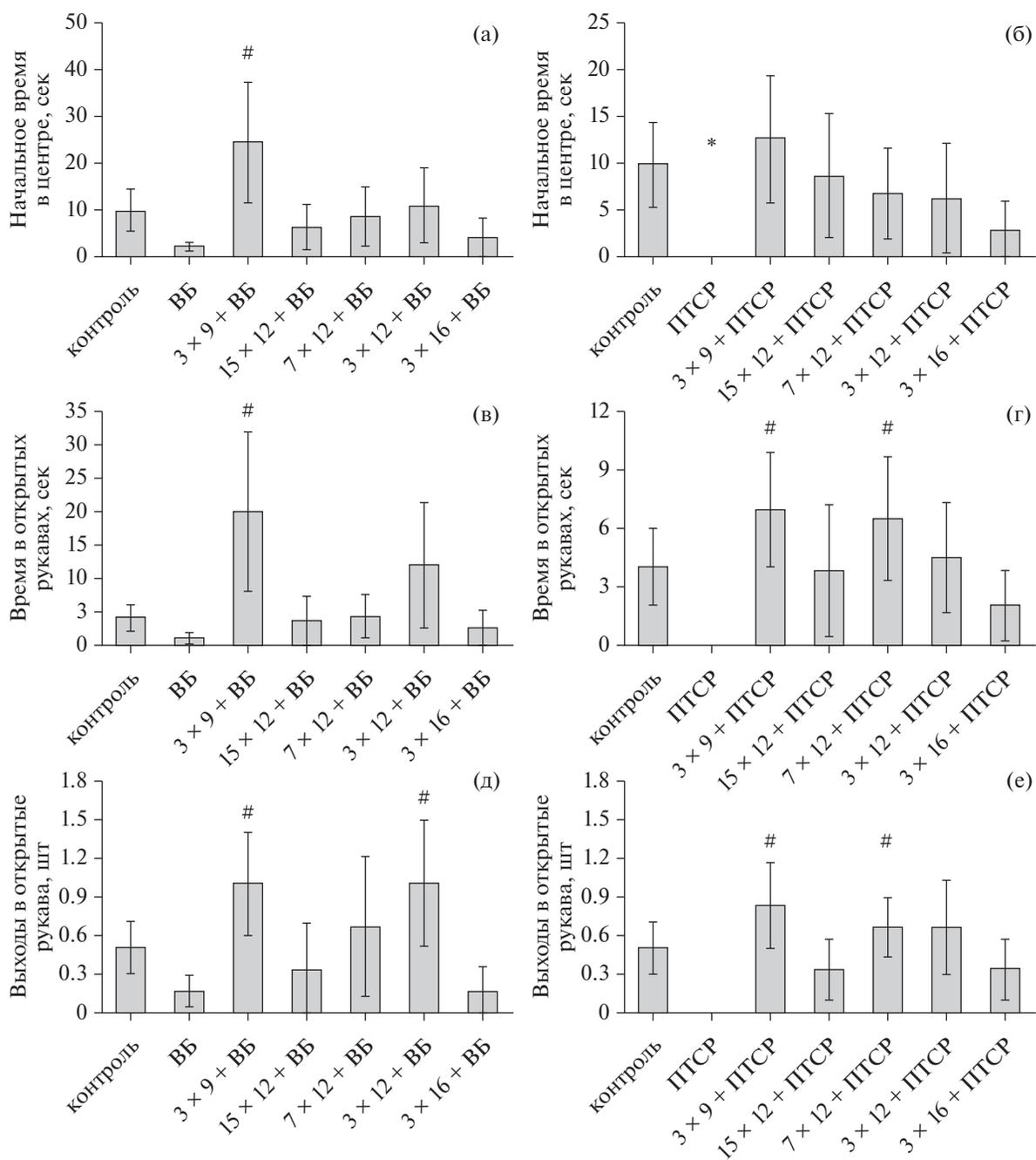


Рис. 1. Результаты поведенческого тестирования в тесте “открытое поле”. (а) – горизонтальная двигательная активность крыс модели ВБ, ВБ+ИГТ и контроля, количество пройденных крайних квадратов открытого поля. (б) – горизонтальная двигательная активность крыс модели ПТСР, ПТСР + ИГТ и контроля, количество пройденных крайних квадратов. (в) – время иммобилизации крыс модели ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, секунды. (г) – время иммобилизации крыс модели ПТСР, ПТСР+ИГТ и контроля, секунды. Контроль ($n = 12$), ВБ – группа ВБ ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ – группы ВБ в сочетании с указанным режимом ИГТ, соответственно ($n = 6$), ПТСР – группа модели ПТСР ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ – группы модели ПТСР в сочетании с заданным режимом ИГТ, соответственно ($n = 6$ в каждой). * – достоверное отличие от контрольной группы, # – достоверное отличие от группы соответствующей патологии, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни.

Fig. 1. The results of behavioral testing in the “open field” test. (a) – horizontal locomotor activity of rats of the LH model, LH + IHT and control, the number of lateral squares of the open field passed. (б) – horizontal locomotor activity of rats of the PTSD model, PTSD + IHT and control, the number of lateral squares passed. (в) – the time of freezing of rats of the LH model, LH + IHT and control, seconds. (г) – the time of freezing of rats of the PTSD model, PTSD+IHT and control, seconds. Control – control animals ($n = 12$), LH – group of LH ($n = 12$), $3 \times 9 + LH$, $15 \times 12 + LH$, $7 \times 12 + LH$, $3 \times 16 + LH$ – groups of LH combined with the specified IHT regime, respectively ($n = 6$), PTSD – group of model PTSD ($n = 6$), $3 \times 9 + PTSD$, $15 \times 12 + PTSD$, $7 \times 12 + PTSD$, $3 \times 16 + PTSD$ are groups of the PTSD model combined with the specified IHT mode, respectively ($n = 6$ in each). * – significant difference from the control group, # – significant difference from the group of the corresponding pathology, $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

$7 \times 12\%O_2 + ПТСР$, $3 \times 16\%O_2 + ПТСР$ иммобилизации наблюдались у отдельных животных (рис. 1 (г)), а в контроле и группах $3 \times 9\%O_2 + ПТСР$, $3 \times 12\%O_2 + ПТСР$ иммобилизация отсутствовала (рис. 1 (г)).

Тестирование в ПКЛ показало, что по проявлениям исследовательской активности и тревожности крысы модели депрессии не отличаются от контрольных (рис. 2 (а, в)), как и поведенческие показатели животных боль-



шинства режимов ИГТ + ВБ, однако для групп $3 \times 9\%O_2 + ВБ$ (в большей степени) и $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ (по меньшему количеству показателей) выявлен достоверный анксиолитический эффект даже относительно группы контроля. Животные группы $3 \times 9\%O_2 + ВБ$ проводили больше времени в центре установки от начала посадки в ПКЛ ($p = 0.016$, рис. 2 (а), *), чаще выходили в открытые рукава ($p = 0.028$,

рис. 2 (д), *) и проводили там больше времени, чем контрольные ($p = 0.022$, рис. 2 (в), *).

Крысы группы $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ достоверно чаще контроля выходили в открытые рукава ПКЛ ($p = 0.036$, рис. 2 (д), #) и проводили там по абсолютным показателям второе время после группы $3 \times 9\%O_2 + ВБ$ ($p = 0.05$, рис. 2 (в)).

В отличие от модели экспериментальной депрессии, был выявлен значимый анксио-

Рис. 2. Результаты теста “приподнятый крестообразный лабиринт”. (а) – начальное время нахождения в центре в группах ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, секунды. (б) – начальное время нахождения в центре групп ПТСР, ПТСР + ИГТ и контроля, секунды. (в) – время нахождения в открытых рукавах групп ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, секунды. (г) – время, проведенное в открытых рукавах в группах ПТСР, ПТСР + ИГТ и контроля, секунды. (д) – количество выходов в открытые рукава в группах ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, шт. (е) – количество выходов в открытые рукава в группах ПТСР, ПТСР+ИГТ и контроля, шт. Контроль – контрольные животные ($n = 12$), ВБ – группа ВБ ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ – группы ВБ и указанного режима ИГТ соответственно ($n = 6$), ПТСР – модельная группа ПТСР ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ – модельная группа ПТСР и указанная группа режима ИГТ соответственно ($n = 6$ в каждой). * – достоверное отличие от контрольной группы, # – достоверное отличие от соответствующей группы патологии, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни.

Fig. 2. Results of “elevated plus-maze” test. (a) – initial time in the center of the LH, LH + INT and control groups, seconds. (б) – initial time in the center of the PTSD, PTSD + INT and control groups, seconds. (в) – time spent in the open arms by the LH, LH + INT and control groups, seconds. (г) – time spent in the open arms by the PTSD, PTSD + INT and control groups, seconds. (д) – number of entries to open arms by the LH, LH + INT and control groups, pcs. (е) – Number of entries to open arms by the PTSD, PTSD + INT and control groups, pcs. Контроль – control animals ($n = 12$), ВБ – LH group ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ – LH and indicated INT mode groups, respectively ($n = 6$), ПТСР – PTSD model group ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ – PTSD model and indicated INT mode groups, respectively ($n = 6$ in each). * – significant difference from the control group, # – significant difference from the corresponding pathology group, $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

генный эффект стрессирования в модели ПТСР (рис. 2 (б, г, е)). При первоначальном высаживании в установку ПКЛ крысы с экспериментальным ПТСР стремились максимально быстро уйти со света в закрытые темные рукава, проводя минимальное латентное время в центре от начала опыта ($p = 0.028$, рис. 2 (б)). Позже в ходе теста у этих животных полностью отсутствовали выходы в открытые освещенные рукава ПКЛ (рис. 2 (г, е)), которые являются для крыс выраженным стрессогенным фактором, в то время как контрольные животные выходили в них и проводили время, исследуя окружающую обстановку, что говорит о низком уровне их тревожности (рис. 2 (г, е)).

Тестирование в ПКЛ позволило выявить значимый анксиолитический эффект гипоксических режимов в модели экспериментального ПТСР: по латентному времени, проведенному после высаживания в центр, животные режимов ИГТ не отличались от контрольных, крысы групп $3 \times 9\%O_2 + ПТСР$ и $7 \times 12\%O_2 + ПТСР$ проводили достоверно больше времени в открытых рукавах, чем крысы группы ПТСР ($p = 0.028$, $p = 0.028$, рис. 2 (г), #), и чаще в них выходили ($p = 0.026$, $p = 0.024$, рис. 2 (е), #).

Результаты определения содержания кортикостерона в плазме крови показали, что развитие экспериментальной депрессии сопровождалось стойким повышением базального уровня данного глюкокортикоидного гормона выше контрольных значений, что подтверждает формирование у эксперимен-

тальных животных депрессивно-подобного состояния ($p < 0.01$, рис. 3 (а), *). В группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $7 \times 12\%O_2 + ВБ$, $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ и $3 \times 16\%O_2 + ВБ$ (то есть все, кроме $15 \times 12\%O_2 + ВБ$) применение ИГТ достоверно относительно группы ВБ снижало этот показатель до контрольных значений ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, рис. 3 (а), #).

В модели экспериментального ПТСР группа $3 \times 9\%O_2 + ПТСР$ была единственной, в которой уровень кортикостерона плазмы крови был достоверно выше, чем у контроля и животных модели ПТСР ($p < 0.05$, $p < 0.05$, рис. 3 (б), *, #).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже отмечалось выше, локомоторная заторможенность, выявляемая в тесте ОП, является характерным проявлением экспериментальной депрессии у крыс (Hall, 1936; Henkel et al., 2002; Willner, 1986). В соответствии с этим в ходе наших экспериментов животные с ВБ пересекали достоверно меньше квадратов, что подтверждало формирование у них депрессивно-подобного состояния. При этом применение ИГТ перед стрессированием в модели ВБ в большинстве групп позволило частично или полностью предотвратить развитие экспериментальной депрессии, отслеживаемое на поведенческом уровне, однако при этом эффективность коррекции депрессивно-подобной поведенческой симптоматики для разных тестовых режимов ИГТ оказалась неодинаковой. Исключением

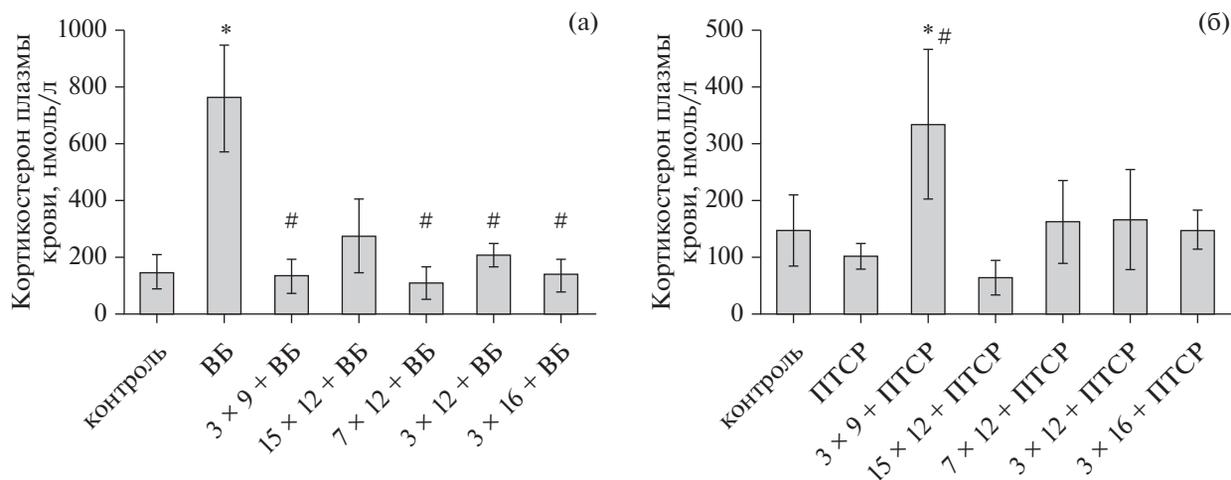


Рис. 3. Базальная концентрация кортикостерона в плазме крови. (а) – уровень кортикостерона в плазме крови в группах ВБ, ВБ + ИГТ и контроля, нмоль/л. (б) – уровень кортикостерона в плазме крови у крыс в группах ПТСР, ПТСР + ИГТ и контроля, нмоль/л. Контроль – контрольные животные ($n = 12$), ВБ – группа ВБ ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ – ВБ в сочетании с указанными группами режима ИГТ, соответственно ($n = 6$), ПТСР – модельная группа ПТСР ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ – модель ПТСР в сочетании с указанными группами режима ИГТ, соответственно ($n = 6$ в каждой). * – достоверное отличие от контрольной группы, # – достоверное отличие от соответствующей группы патологии, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни.

Fig. 3. Basal corticosterone concentration in blood plasma. (a) – plasma corticosterone levels in the LH, LH + IHT and control groups, nmol/L. (b) – plasma corticosterone levels in the PTSD, PTSD + IHT and control rats, nmol/L. Control – control animals ($n = 12$), ВБ – LH group ($n = 12$), $3 \times 9 + ВБ$, $15 \times 12 + ВБ$, $7 \times 12 + ВБ$, $3 \times 16 + ВБ$ – LH combined with indicated IHT regime groups, respectively ($n = 6$), ПТСР – PTSD model group ($n = 6$), $3 \times 9 + ПТСР$, $15 \times 12 + ПТСР$, $7 \times 12 + ПТСР$, $3 \times 16 + ПТСР$ – PTSD model combined with indicated IHT mode groups, respectively ($n = 6$ in each). * – significant difference from the control group, # – significant difference from the corresponding pathology group, $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

являлась группа $3 \times 16\%O_2 + ВБ$, сохранившая полноценную депрессивно-подобную симптоматику, поскольку у крыс этой группы наблюдалась низкая двигательная активность и высокий уровень иммобилизаций, соответственно, данный тренировочный режим проявил себя в парадигме ВБ как неэффективный. В группах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $15 \times 12\%O_2 + ВБ$, $7 \times 12\%O_2 + ВБ$, $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ патологическая моторная ретардация отсутствовала, причем первые две группы лидировали по абсолютным значениям горизонтальной двигательной активности. Однако в группах режимов $3 \times 16\%O_2 + ВБ$, $7 \times 12\%O_2 + ВБ$, $3 \times 12\%O_2 + ВБ$ были отмечены эпизоды неподвижности, что может свидетельствовать о недостаточной их эффективности в данной модели (Henkel et al., 2002).

В качестве патогенетической основы развитие экспериментальной депрессии в группе ВБ сопровождалось стойким достоверным повышением уровня базального кортикостерона плазмы крови. При всех режимах, кроме

$15 \times 12\%O_2$, ИГТ нормализовала этот показатель.

В режимах $3 \times 9\%O_2 + ВБ$, $15 \times 12\%O_2 + ВБ$ иммобилизация полностью отсутствовала, а двигательная активность находилась на уровне контроля. На этом основании можно назвать данные режимы (кондиционирующий высокой интенсивности и тренировочный средней интенсивности, но максимальной продолжительности) наиболее эффективными в модели ВБ по выраженности антидепрессивного действия из рассмотренных в данном эксперименте. Таким образом, разработанный прекодиционирующий режим не уступил по выраженности эффекта тренировочному, однако его процедура укорочена в 5 раз, поскольку для его реализации требуется 3 дня (а не 15), что в трансляционном отношении является существенным преимуществом.

Хорошо известно, что тревожное поведение животного характеризуется предпочтением закрытых рукавов приподнятого лабиринта открытым и центру, тогда как анксиолитический

эффект, напротив, может приводить к большему времени, проведенному в открытых рукавах и центре установки (Pellow et al., 1985; Walf, Frye, 2007). Тестирование в ПКЛ в наших экспериментах показало выраженную анксиолитическую активность отдельных режимов ИГТ в обеих моделях постстрессорных расстройств. Так, по показателям в ПКЛ животные группы экспериментальной депрессии и большинства режимов ИГТ + ВБ не отличались от контроля, однако в режимах $3 \times 9\%O_2$ и $3 \times 12\%O_2$ был показан достоверный анксиолитический эффект. Крысы группы $3 \times 9\%O_2$ + ВБ чаще и более длительно выходили в открытые рукава установки ПКЛ, больше исследовали центр установки в начале тестирования, чем животные с пост-стрессорной патологией. Наряду с этим в модели ПТСР в группе $3 \times 9\%O_2$ базальный уровень кортикостерона в плазме крови был выше, чем в контроле и у группы ПТСР. Учитывая известный факт, что при ПТСР нередко развивается гипофункция периферического звена ГАС (De Kloet et al., 2006; Lehrner et al., 2016; Yehuda, 2005), можно предполагать, что данный стимулирующий эффект кондиционирующего режима ИГТ, нацеленный на предотвращение гормональной дисфункции ГАС, может рассматриваться как один из механизмов стресс-протективного действия данного режима ИГТ в модели ПТСР (Bower, Yehuda, 2017; Daskalakis et al., 2016). Кроме того, как нами было показано ранее, умеренное повышение уровня кортикостерона в крови наблюдается при применении наиболее эффективных режимов гипоксического гипобарического прекодиционирования и сопровождается повышением устойчивости мозга к гипоксии и стрессам (Зенько, Рыбникова, 2020; Рыбникова и др., 2008). В группах с ИГТ $3 \times 12\%O_2$ и $7 \times 12\%O_2$ стимулирующего эффекта на ГАС не выявлено, однако отмечается низкий уровень тревожности в ПКЛ. Таким образом, эти три кондиционирующих режима высокой и средней интенсивности обладали наиболее выраженным анксиолитическим эффектом. В режимах ИГТ другой интенсивности и длительности показатели тревожности в основном находились на уровне контрольных животных, что может свидетельствовать об их эффективности в коррекции экспериментального ПТСР, однако меньшей, чем у режимов $3 \times 9\%O_2$, $3 \times 12\%O_2$ и $7 \times 12\%O_2$.

Для модели ПТСР “стресс–рестресс” не характерны нарушения двигательной актив-

ности, что было показано в тесте ОП – по этому показателю группы модельной патологии и всех режимов ИГТ не отличались от контроля, однако в группе ПТСР-подобной патологии наблюдались эпизоды иммобилизации, которые можно связать с повышенной тревожностью животных в этой модели. В режимах $15 \times 12\%O_2$ + ПТСР, $7 \times 12\%O_2$ + ПТСР, $3 \times 16\%O_2$ + ПТСР у отдельных животных также была отмечена иммобилизация, а в режимах $3 \times 9\%O_2$ + ПТСР, $3 \times 12\%O_2$ + ПТСР и контроле иммобилизация полностью отсутствовала. Эти данные, также как и результаты по показателю уровня тревожности, обсужденные выше, могут свидетельствовать об ограниченной эффективности тренировочных режимов и режима низкой интенсивности ($15 \times 12\%O_2$, $7 \times 12\%$, $3 \times 16\%O_2$) в модели ПТСР, и наибольшей эффективности кондиционирующих режимов высокой и средней интенсивности $3 \times 9\%O_2$ и $3 \times 12\%O_2$.

Режим ИГТ низкой интенсивности $3 \times 16\%O_2$ показал отсутствие стресс-протективного эффекта в изученных моделях депрессии и ПТСР, поскольку патологическая симптоматика у этих животных проявлялась на уровне групп с экспериментальными патологиями.

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что кондиционирующий режим высокой интенсивности $3 \times 9\%O_2$ имел наиболее выраженный антидепрессивный, противотревожный и стресс-протективный эффект в обеих моделях. Близкими к нему по эффективности, но не по всем показателям, были режимы $15 \times 12\%O_2$, $3 \times 12\%O_2$ и $7 \times 12\%O_2$.

$15 \times 12\%O_2$ – тренировочный режим наибольшей длительности, оказывал превентивное действие в модели ВБ. $7 \times 12\%O_2$, тренировочный режим средней интенсивности, обладал анксиолитическим эффектом, а $3 \times 12\%O_2$, кондиционирующий режим средней интенсивности, – и антидепрессивным, и анксиолитическим эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных работ установлено, что ИГТ значительно повышает стрессоустойчивость в моделях тревожно-депрессивных патологий. Наиболее заметное влияние на выраженность эффекта оказывает интенсивность гипоксического воздействия. Показано, что принципы кондиционирования

успешно могут применяться и при разработке подходов ИГТ, поскольку кондиционирующий режим $3 \times 9\%O_2$ оказался наиболее эффективным режимом из всех протестированных. При снижении уровня гипоксии до $12\% O_2$ эффективность антидепрессивного или анксиолитического эффекта частично или полностью сохраняют режимы с увеличением количества сеансов (3, 7 и 15). При этом увеличение количества сеансов с 3 до 7 (в режимах $3 \times 12\%O_2$ и $7 \times 12\%O_2$) не приводит к усилению анксиолитического эффекта, поэтому такое увеличение нецелесообразно. Снижение интенсивности до $16\% O_2$ приводит к выраженному снижению основных стресс-протективных свойств ИГТ в данных моделях патологий. Полученные результаты свидетельствуют о том, что кондиционирующие режимы ИГТ имеют значительный трансляционный потенциал для здравоохранения, поэтому с целью формирования доказательной базы необходимо дальнейшее изучение протективных эффектов и механизмов данных режимов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00781).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баранова К.А., Зенько М.Ю.* Анксиолитический эффект дистантного ишемического пре- и посткондиционирования в модели посттравматического стрессового расстройства. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 2018. 68 (5): 663–672.
- Зенько М.Ю., Рыбникова Е.А.* Роль глюкокортикоидных гормонов в стресс-протективных эффектах гипоксического посткондиционирования в моделях депрессии и посттравматического стрессового расстройства у крыс. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2020. 70 (6): 825–836.
- Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Пивина С.Г., Ордян Н.Э., Толькова Е.И., Самойлов М.О.* Гормональные механизмы гипоксического пре-кондиционирования у крыс. Докл. РАН. 2008. 421 (5): 713–715.
- Balestra C., Lambrechts K., Mrakic-Spota S., Vezzoli A., Levenez M., Germonpré P., Virgili F., Bosco G., Lafère P.* Hypoxic and hyperoxic breathing as a complement to low-intensity physical exercise programs: a proof-of-principle study. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22: 9600.
- Bowers M.E., Yehuda R.* Neuroendocrinology of post-traumatic stress disorder: Focus on the HPA Axis. *Stress: Neuroendocrinology and neurobiology, handbook of stress.* 2017. 2: 165–172.
- Cai M.C., Huang Q.Y., Liao W.G., Wu Z., Liu F.Y., Gao Y.Q.* Hypoxic training increases metabolic enzyme activity and composition of α -myosin heavy chain isoform in rat ventricular myocardium. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2010. 108: 105–111.
- Cao K.Y., Zwillich C.W., Berthon-Jones M., Sullivan C.E.* Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 1992. 73: 2083–2088.
- Carpiniello B.* The mental health costs of armed conflicts — a review of systematic reviews conducted on refugees, asylum-seekers and people living in war zones. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2023. 20: 2840.
- Conkin J., Wessel J.H.* Critique of the equivalent air altitude model. *Aviation, space, and environmental medicine.* 2008. 79 (10): 975–982.
- Cooke J.E., Eirich R., Racine N., Madigan S.* Prevalence of posttraumatic and general psychological stress during COVID-19: A rapid review and meta-analysis. *Psychiatry Research.* 2020. 292: 113347.
- Daskalakis N.P., McGill M.A., Lehrner A., Yehuda R.* Endocrine aspects of PTSD: Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and beyond. *Comprehensive Guide to Post-Traumatic Stress Disorders.* 2016. 245–260.
- De Kloet C., Vermetten E., Geuze E., Kavalaars A., Heijnen C., Westenberg H.* Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *J. Psychiatr. Res.* 2006. 40 (6): 550–567.
- Hall C.S.* Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. Comp. Psychol.* 1936. 22 (3): 345.
- Henkel V., Bussfeld P., Möller H.J., Hegerl U.* Cognitive-behavioural theories of helplessness/hopelessness: valid models of depression? *European archives of psychiatry and clinical neuroscience.* 2002. 252: 240–249.
- Iversen A.C., Fear N.T., Ehlers A., Hughes J.H., Hull L., Earnshaw M., Greenberg N., Rona R., Wessely S., Hotopf M.* Risk factors for post-traumatic stress disorder among UK Armed Forces personnel. *Psychol. Med.* 2008. 38: 511–522.

- Jakupcak M., Luterek J., Hunt S., Conybeare D., Mc-Fall M.* Posttraumatic stress and its relationship to physical health functioning in a sample of Iraq and Afghanistan war veterans seeking postdeployment VA Health Care. *J. Nerv. Ment. Dis.* 2008. 196: 425–428.
- Knaupp W., Khilnani S., Sherwood J., Scharf S., Steinberg H.* Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. *J. Appl. Physiol.* 1992. 73: 837–840.
- Lehrner A., Daskalakis N., Yehuda R.* Cortisol and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in PTSD. *Posttraumatic Stress Disorder.* 2016. 265–290.
- Liberzon I., Krstov M., Young E.A.* Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology.* 1997. 22 (6): 443–453.
- Loepky J.A., Roach R.C., Maes D., Hinghofer-Szalkay H., Roessler A., Gates L., Fletcher E.R., Icenogle M.V.* Role of hypobaric in fluid balance response to hypoxia. *High Alt. Med. Biol.* 2005. 6: 60–71.
- Mahmud S., Mohsin M., Dewan M.N., Muyeed A.* The global prevalence of depression, anxiety, stress, and insomnia among general population during COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Trends in Psychol.* 2023. 31: 143–170.
- Mazza M.G., De Lorenzo R., Conte C., Poletti S., Vai B., Bollettini I., Melloni E.M.T., Furlan R., Ciceri F., Rovere-Querini P., Benedetti F.* Anxiety and depression in COVID-19 survivors: role of inflammatory and clinical predictors. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2020. 89: 594–600.
- Millet G.P., Faiss R., Pialoux V.* Point: Counterpoint: Hypobaric hypoxia induces/does not induce different responses from normobaric hypoxia. *Journal of applied physiology.* 2012. 112 (10): 1783–1784.
- Navarrete-Opazo A., Mitchell G.S.* Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014. 307: R1181–R1197.
- Obuobi-Donkor G., Oluwasina F., Nkire N., Ag-yapong V.I.O.* A scoping review on the prevalence and determinants of post-traumatic stress disorder among military personnel and firefighters: Implications for public policy and practice. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2022. 19 (3): 1565.
- Park H.Y., Jung W.S., Kim S.W., Lim K.* Effects of interval training under hypoxia on the autonomic nervous system and arterial and hemorheological function in healthy women. *Int. J. Womens Health.* 2022. 14: 79–90.
- Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1985. 14 (3): 149–167.
- Rodriguez F.A., Casas H., Casas M., Pagés T., Rama R., Ricart A., Ventura J.L., Ibáñez J., Viscor G.* Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1999. 31: 264–268.
- Rybnikova E.A., Baranova K.A., Zenko M.Yu., Churilova A.V., Stupin K.N.* Comparative analysis of various modes of preconditioning to increase high altitude tolerance. *Integrative Physiology.* 2022. 3 (3): 348–358.
- Rybnikova E.A., Nalivaeva N.N., Zenko M.Y., Baranova K.A.* Intermittent hypoxic training as an effective tool for increasing the adaptive potential, endurance and working capacity of the brain. *Front. Neurosci.* 2022. 16: 941740.
- Seligman M.E., Beagley G.* Learned helplessness in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1975. 88 (2): 534.
- Seligman M.E., Maier S.F.* Failure to escape traumatic shock. *Journal of experimental psychology.* 1967. 74 (1): 1.
- Walf A.A., Frye C.A.* The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2007. 2 (2): 322–328.
- Wang S., Zhang Y., Ding W., Meng Y., Hu H., Liu Z., Zeng X., Wang M.* Psychological distress and sleep problems when people are under interpersonal isolation during an epidemic: A nationwide multi-center cross-sectional study. *European Psychiatry.* 2020. 63 (1): e77.
- Willner P.* Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 1986. 10 (6): 677–690.
- Yehuda R.* Neuroendocrine aspects of PTSD. *Anxiety Anxiolytic Drugs.* 2005. 371–403.
- Zembron-Lacny A., Tylutka A., Wacka E., Wawrzyniak-Gramacka E., Hiczkiewicz D., Kasperska A., Czuba M.* Intermittent hypoxic exposure reduces endothelial dysfunction. *Biomed Res. Int.* 2020. 2020: 6479630.
- Zenko M.Y., Rybnikova E.A.* Cross-Adaptation: from F.Z. Meerson to the Present. Part 2. Mechanisms of Cross-Adaptation. *Neurosci Behav Physiol.* 2023. 53: 409–415.

THE EFFECTS OF VARIOUS MODES OF INTERVAL HYPOXIC TRAINING IN EXPERIMENTAL MODELS OF ANXIETY AND DEPRESSION IN RATS

M. Y. Zenko^a, K. A. Baranova^a, M. V. Kukina^a, and E. A. Rybnikova^{a, #}

^a*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: rybnikovaeva@infran.ru*

The development of non-drug methods for correcting stress-induced disorders and improving adaptation to stressful factors remains an urgent task of physiology, which has a great translational potential. Previously, we proposed effective methods of hypoxic hypobaric preconditioning and distant ischemic conditioning in this regard. The purpose of this work was to transfer the principles of preconditioning to the approaches of normobaric intermittent hypoxic training (IHT). The effects of five new IHT regimens (3 five-minute sessions of hypoxia of 16% O₂ per day, 3 sessions of 12% O₂, 7 sessions of 12% O₂, 15 sessions of 12% O₂, 3 sessions of 9% O₂) were studied in experimental models of depression and post-traumatic stress disorder in rats. The preconditioning regime of high intensity 3x9%O₂ had the most pronounced antidepressant and anxiolytic effect in models of both pathologies. With a decrease in the level of hypoxia to 12% O₂, IHT regimens partially retained their effectiveness with an increase in the number of sessions. The training regime of the longest duration – 15 × 12%O₂, was effective in correcting the formation of experimental depression. The intermediate regime – 7 × 12%O₂, had an anxiolytic effect, while the preconditioning regime of medium intensity – 3 × 12%O₂, demonstrated both an antidepressant and anxiolytic effect. The results indicate that the intensity of hypoxic exposure had the greatest impact on the effectiveness. At the same time, a decrease in the intensity to 16% O₂ led to a weakening or loss of stress-protective properties. With regard to the 3 × 9%O₂ regime as the most promising, it is advisable to conduct further studies to identify the molecular mechanisms that implement its stress-protective and anxiolytic effects.

Keywords: hypoxia, adaptation, intermittent hypoxic training, posttraumatic stress disorder, depression

УДК 57.081.23

WEEGIT – SOFTWARE FOR VISUALIZATION AND ANNOTATION OF THE ELECTROPHYSIOLOGICAL ACTIVITY REGISTRATION DATA

© 2023 г. D. S. Suchkov^{a, *}, V. V. Shumkova^b, V. R. Sitdikova^b, V. M. Silaeva^b, A. E. Logashkin^b, A. R. Mamleev^b, and M. G. Minlebaev^{a, b}

^aINSERM UMR1249, INMED, Aix-Marseille University, Marseille, France

^bKazan Federal University, Kazan, Russia

*e-mail: suchkov.dmitriy.ksu@gmail.com

Received August 11, 2023; Revised August 31, 2023; Accepted August 31, 2023

Wizard for EEG Information Tabling – “WEEGIT” is a software designed for visualization and annotation of the long-lasting records of activity. Long-lasting records of raw data are used in various areas of life sciences and well represented in neuroscience. In spite of development of other techniques and approaches the electrophysiological activity registration remains the “golden standard” in neurobiological research. Therefore, we developed and verified “WEEGIT” as a powerful and convenient tool for electrophysiological recordings’ description. We combined the most important features presented in other commercial and noncommercial software in the “WEEGIT”. Presented software can operate with widely used formats of records. “WEEGIT” allows adaptive visualizing of up to 512 channels of record in different timescale without loss of efficiency and consumption of large machine resources. Visualizing also includes optional built-in temporal-spatial analysis (density of current sources or the density of action potentials) displayed as a background image. Integration of a set of optional filtering and signal transforming procedures allows improving record visualization. “WEEGIT” has a convenient graphical user interface with opportunity of simultaneous time browsing and annotating of the records in one workspace. Annotation can be done by simple text information typing as well as an interactive placing of specialized labels and objects. Software also allows saving data in the resampled format, both for the whole record and for user-defined events. In conclusion, “WEEGIT” provides a great set of benefits for the convenient workflow for beginners and specialists in the electrophysiological area of research, including preparation of the data for further specialized analysis.

Keywords: electrophysiology, software, analysis

DOI: 10.31857/S0044467723060102, **EDN:** IKLQWI

1. INTRODUCTION

Despite of wide usage of the optogenetic approaches, electrophysiological recordings (invasive and non-invasive extra-/intracellular recordings *in vitro* and *in vivo*) are still the main tool for the neurophysiological research both in science and medicine. Recently, developing technologies have led to significant increase in resolution of electrophysiological data both in space and in time domain. Altogether, with simultaneous recordings of the telemetric information, that provided a huge set of data for research and diagnosis. A large variety of modern analytical packages showed exciting opportunities for deep analysis of the electrophysiological recordings (Hazan, 2006; Tadel, 2011; Patel, 2017; Siegle, 2017; Nasitotis, 2019). However, during experiment or diag-

nostics, the first overview of the data doesn’t require all analytical power of the mentioned software. Moreover, verification of the observing patterns of activity very often can be done only visually for the first time. Thus, for the first pre-analysis stage, the operator should be able to annotate recorded electrophysiological information to prepare it for further specialized analysis. This important part of the scientific and diagnostic workflow is a first stage of education of the beginners like postgraduate student or intern. Therefore, complexity of the software architecture and graphical user interface can be a critical point for rapid engagement of them. At the same time, effective interaction between experimenters and analysts was always a cornerstone of scientific workflow. That means, as more documented and rep-

representative information was provided by experimenter, as more qualitative will be analysis, and opposite. Therefore, for the first pre-analysis stage software should provide opportunities for easy visualization, annotating, collecting and saving of important episodes of activity in both manual and automatic way. A clear preparation process will simplify interaction in discussion between experimenters and analysts, and provide high efficiency of workflow. Besides that, low skill in programming or neurophysiology area will be leveled by multiple choice of activity detection. Thus, efficient engine for fast visualization and annotation of the electrophysiological recordings are the main keys of the pre-analysis stage. However, representation of large volumes of data also highly sensitive to the hardware, requiring essential machine resources. Obvious solution for downsampling in time and space domain will reduce the quality of the observed patterns and can critically bias conclusions about activity. Therefore, for the effective usage of machine resources, software should avoid uploading the full set of data, while recognition of patterns shouldn't be affected.

Following the concept described above, we designed a powerful and convenient desk tool for visualization and annotating of the electrophysiological activity registration data. Here, we present WEEGIT software, that combines a fast and efficient visual component with extended text editor opportunity. A simple and intuitive graphical user interface allows the operator to add and edit information about general features of the record as well, as a specific event properties. Software engine provides control of the spatio-temporal resolution of the record with resource-efficient visualization. Altogether, that allows the user to do fast and efficient browsing and annotating of the electrophysiological recordings.

2. WEEGIT GRAPHICAL USER INTERFACE

WEEGIT graphical user interface contains panels for displaying and marking data, drop-down menu tabs and toolbar panel. Some available menu actions are duplicated with buttons or editing opportunity on the panels. The name of the record and status of the applied filter and transform have no unique panel and are placed in the top left part of the graphical user interface.

2.1. Panels

Panels functions can be classified in three groups: 1) graphical representation of the data; 2) editable information about current recording and 3) log of the user actions (Fig. 1).

EEG channels. The main panel “EEG channels” displays amplifier channels extracted from the electrophysiological record. “EEG channels” panel is consisted of 1) *attributes control space* (upper position); 2) *main axes* with record data (middle position) and 3) *navigation control space* with time and sweep control elements (bottom position). During session saving, all parameters of the elements on the “EEG channels” panel are saved in an additional \langle filename \rangle . WEEGITweegit.mat file. During connecting to the \langle filename \rangle .lfp, an additional file \langle filename \rangle . WEEGITweegit.mat will be automatically uploaded (if it exists) and state of the elements on the “EEG channels” panel from the last session will be restored (see “File” \rightarrow “Save session settings” in “Menu” section and “Session” in “Methodology” section).

Attributes control space. “Attributes control space” is intended for user regulation of graphical elements' presence in the “Main axes”. The left part of “attributes control space” includes ticks to visualize/hide on the main panel the following attributes: “traces”, “spikes”, “events”, “event edges” and “periods”. Right part of attributes control space presented by reserved space for the background color-code horizontal bar (on the left) and background selection popup menu (on the right). Background selection popup menu offers three modes: 1) “CSD” (current source density); 2) “spike density” and 3) “nothing”. “Spike density” mode selection starts evaluation of the average spike's number in the adaptive sliding window (Fig. 1). “CSD” mode selection starts evaluation of the current source density distribution, base on the second spatial derivative (Buzsaki, 2012) between each signal presented in main axes (fig. 2). That, in a certain manner, provided information about spike rate at the moment. The size of sliding time window is adaptively changing according to the signal window time range. That provide remarkable representation of the spike density in a different time scales, however, spike rate in this case may be biased according to the scale. “Nothing” mode remove background from the “Main axes” (Fig. 3).

Main axes. “Main axes” contains graphical representation of the objects “traces”, “spikes”, “events”, “event edges”, “periods” and background



Fig. 1. WEEGIT interface view 1, using spike density as background. The main panel (EEG channels) displays amplifier channels extracted from the electrophysiological record. The additional panel (Analog inputs (AI)) displays data from other sensors (e.g., telemetry sensors) synchronized with electrophysiological data. General information panel (File info) is intended for downloading (in *.txt format) and/or creating and editing text information about the current record. The panel of morphological labels (Layers) is used for marking the correspondence of channels to morphological structures. The segment saving panel (Segment to save) contains editable time values defining intervals before and after each event (in milliseconds) that will be used to save data segments around the event timestamp. The period information panel (Periods) is used to enter/edit time period information if the user needs to mark the time period during which the experiment conditions were changed/intact. The action overview panel (Log) displays non-editable information about ongoing user actions.

Рис. 1. Вид 1 интерфейса WEEGIT, в качестве фона используется плотность потенциалов действия. На основной панели (EEG channels) отображаются данные регистрации электрофизиологической записи для каждого канала усилителя. На дополнительной панели (Analog inputs (AI)) отображаются данные с других датчиков (например, с телеметрических сенсоров), синхронизированные с электрофизиологическими данными. Панель общей информации (File info) предназначена для загрузки (в формате *.txt) и/или создания и редактирования текстовой информации о текущей записи. Панель морфологических меток (Layers) предназначена для обозначения соответствия каналов морфологическим структурам. Панель сохранения сегментов (Segment to save) содержит редактируемые значения времени, определяющие интервалы до и после события (в миллисекундах), которые будут использоваться для сохранения сегментов данных вокруг временной метки каждого события. Панель информации о периодах (Periods) используется, если необходимо, для ввода/редактирования информации о периоде времени, в течение которого изменялись/сохранялись условия эксперимента. Панель обзора действий (Log) отображает нередатируемую информацию о действиях пользователя.

image. “Traces” are record data, organized vertically, where each row contain signal from one single electrode. Represented as vertical solid black lines

(if background is “nothing” or “CSD”) or as vertical solid white lines (if background is “spike density”). “Spikes” are action potentials, high-

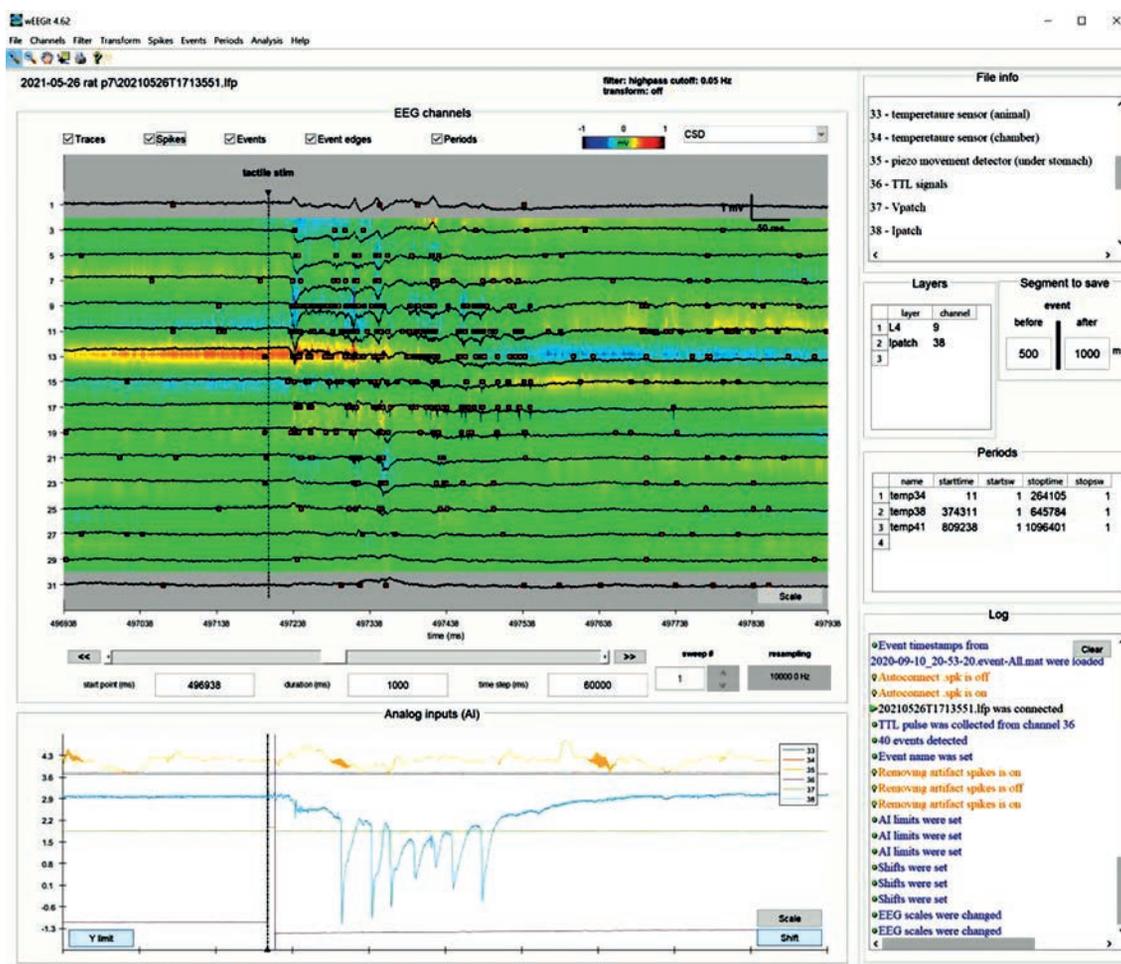


Fig. 2. WEEGIT interface view 2, using current source density (CSD) as a background. The upper drop-down menu contains sets of actions for: converting/loading/saving data (File); changing display settings (Channels); filtering data (Filter); transforming data (Transform); detecting action potentials (Spikes); detecting/labeling/saving events (Events); setting/editing time periods (Periods); initial analysis of events (Analysis); studying the basic functionality of the program (Help).

Рис. 2. Вид 2 интерфейса WEEGIT, в качестве фона используется плотность источников тока (ПИТ). Верхнее выпадающее меню содержит наборы действий для: конвертации/загрузки/сохранения данных (File); изменения настроек отображения (Channels); фильтрации данных (Filter); преобразования данных (Transform); обнаружения потенциалов действия (Spikes); обнаружения/маркировки/сохранения событий (Events); установки/редактирования временных периодов (Periods); первичного анализа событий (Analysis); изучения основных функциональных возможностей программы (Help).

frequency events with duration from 1 to 2 ms, extracted from each signal in user-defined way. This type of graphical objects is specific for recordings with high-impedance electrodes and optional for other types of electrophysiological recordings. Timestamps for spikes represented as red (default) squares horizontally aligned to the source channel position. In future release, color will represent affiliation to cluster. “Events” are customized events’ times, defined and prepared by user. Represented as vertical dash-dotted black line (if background is “nothing” or “CSD”) or as vertical dash-dotted white lines (if background is “spike

density”) with triangle on the end. Each event has a unique name, displayed by text with the same color as the line. If event set as “bad” the color of line and text becomes red for any background. “Event edges” are boundaries for the segment around each event, which times are defined in the “Segment to save” panel. Represented as vertical dotted black line (if background is “nothing” or “CSD”) or as vertical dotted white lines (if background is “spike density”). “Periods” – boundaries for the user defined time periods of interest. Represented as vertical solid magenta line. Period’s left boundary name displayed as magenta du-

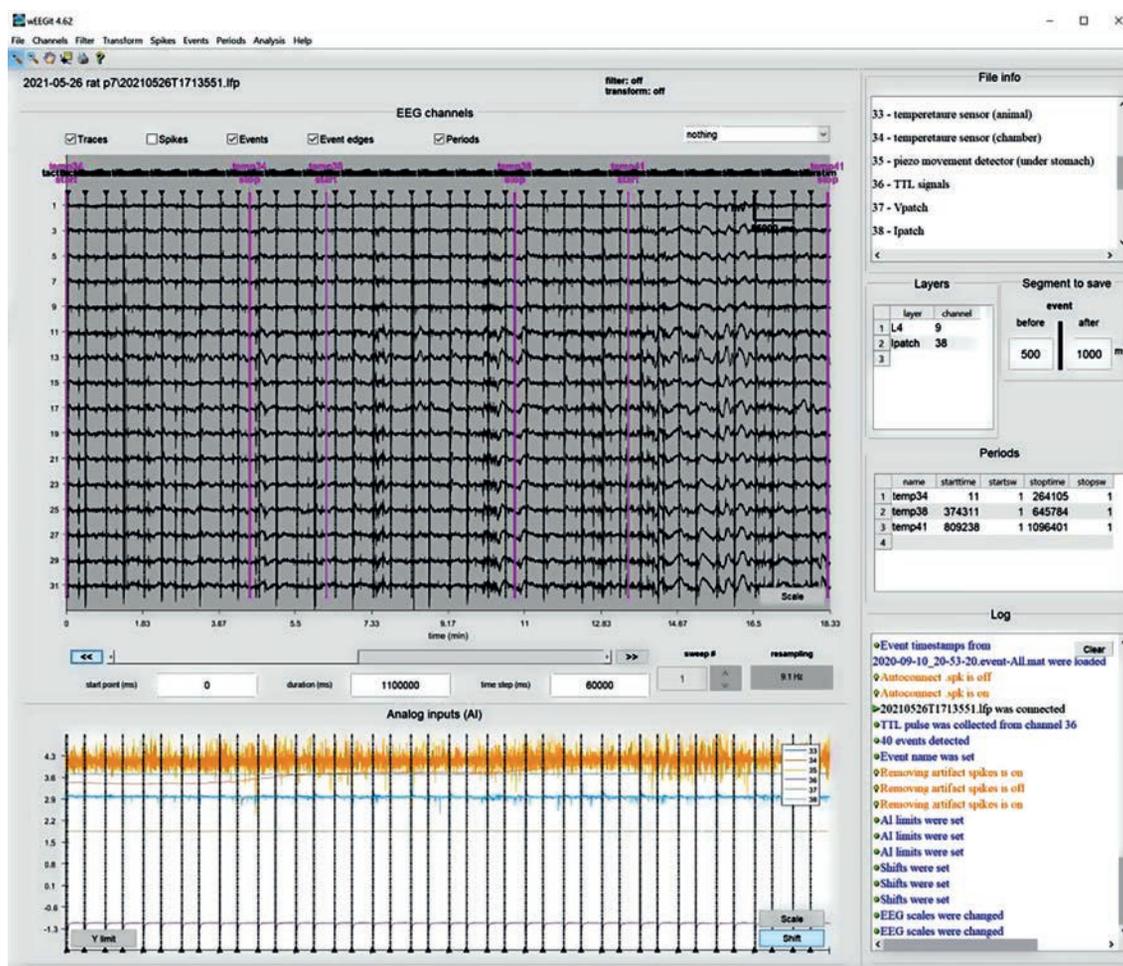


Fig. 3. WEEGIT interface view 3, no background. Example of ~30 min of record.

Рис. 3. Вид 3 интерфейса WEEGIT, без фона. Пример отображения ~30 мин записи.

al-line text and consist of user-defined name (top) and “start” string (bottom). Period’s right boundary name displayed as magenta dual-line text and consist of user-defined name (top) and “stop” string (bottom). The y-axis of the “Main axes” contains numbers of the record channels.

The background image is defined by the user through the background selection popup menu. Only the current configuration of channels will be used for the background build, if channels are hidden or sorted by user management (see “Channels” → “Configure EEG” in “Menu” section). The resulted background image is displayed as a background image in jet color code. The background color-code horizontal bar shows the color correspondence between values and colors. The “Scale” push button placed in the bottom left corner of the main axes. Pushing this button calls the user dialog with three fields: “Scale factor”, “Scale units” and “Background scale”.

The value of the “Scale factor” is applied to all channels in the current configuration and regulates the y-scale stretching. The value of the “Scale units” is an optional field, which is not based on record features and should be filled by user as text string, containing information about measurement units. “Scale factor” and “Scale units” values are finally combined to the text string and displayed with a vertical scale bar in the upper right corner of the main axes. The color of text and scale bar are black (if background is “nothing” or “CSD”) or green (if background is “spike density”).

The value of the “Background scale” is a two-element vector with minimum and maximum limits for the color map of the background image. Image values, which exceed user defined limits, will be marked with gray color. “Background scale” value displayed as left and right text markers for the background color-code horizontal bar

in the “Attributes control space” of the “EEG channels” panel.

Navigation control space “Navigation control space” is intended for the timescale management. That space contains: 1) a horizontal slide bar with two additional push buttons “ \ll ” and “ \gg ” on the left and right border, respectively; 2) “start point” edit window; 3) “duration” edit window; 4) “time step” edit window; 5) “sweep #” edit window with two additional push buttons “ \wedge ” and “ \vee ” on the left border; 6) “resampling” non-editable window.

“Start point” edit window defines the starting timestamp in milliseconds, while “Duration” edit window defines the duration in milliseconds for the time window of data, displayed in the “Main axes”. “Time step” edit window defines the time to the next start point and increment for slide bar. Slide bar values are based on the “Start point”, “Duration” and “Time step” values. Changing of the slide bar position lead to the change of “Start point” value. Slide bar can be moved manually by drag/using slide bar buttons, or automatically using push buttons “ \ll ” and “ \gg ”. Push buttons “ \ll ” and “ \gg ” allow the user to change start point continuously backward or forward, respectively. First press on push button “ \ll ” or “ \gg ” initiates continuous browsing, while second press stops it. Continuous browsing also stops if slide bar reaches the maximum position, while the “Start point” value in this case evaluated as difference between duration of all record (in milliseconds) and “Duration” value. If the slide bar reaches the minimum position, the “Start point” is set to 0. The time axis of the “Main axes” contains 11 time ticks with real time of record window begin, end and 9 intermediate values in between, providing 10 equal intervals for any scale. The time units have default value of “ms” (milliseconds), but adaptively changing and have values of “s” (seconds), “min” (minutes), “hour” (hours) if “Duration” value exceed 2 s, 10 min, 1 h, respectively. “Duration” value is finally combined with the time unit text and displayed with a horizontal scale bar in the upper right corner of the main axes. The color of text and scale bar are black (if background is “nothing” or “CSD”) or green (if background is “spike density”).

“Sweep #” edit window is intended to record type, using sweep (or trial) mechanism of record build (*.abf format, for example). In this case, user can define the interested sweep by direct edit of “Sweep #” window or by using increment or decrement of 1 sweep with buttons “ \wedge ” and “ \vee ”, respectively. If the record contains only one sweep

(or trial) “Sweep #” edit window is noneditable, and buttons “ \wedge ” and “ \vee ” are not active.

Analog inputs (AI). The additional panel “Analog inputs (AI)” displays data from other sensors (e.g., telemetry sensors) synchronized with electrophysiological data. “Analog inputs (AI)” panel contain axes for sensors’ record data (AI channels) with white background, legend for AI channels and regulation pushbuttons “Scale”, “Shift” and “Y limit”. Each AI channel property of scale and y-position can be separately regulated with, respectively, pushbuttons “Scale” and “Shift” in the bottom right corner of the “Analog inputs (AI)” panel. “Scale” pushbutton calls a user dialog with two fields: “Scale factor” and “Channel”, where the user can define unique scale factor (“Scale factor” vector of values) for corresponding channels (“Channel” vector of values). Vectors of values in both fields should be equal in length. “Shift” pushbutton calls a user dialog with one field “AI channel shift”, where the user can set the vector of constant values, which will be added to each AI channel y-position. Length of vectors of values should match with number of AI channels. The pushbutton “Y limit” in the bottom left corner of the “Analog inputs (AI)” panel allows the user to set an upper and lower limit for the y-axis. “Y limit” pushbutton calls a user dialog with one field “AI Y-limits”, where the user defines two elements. Altogether, pushbuttons allow the user to distribute AI channels in the best way of representation, while AI channels have different y-ranges. The legend contains information about correspondence between color of the presented lines and number of the AI channel. The time axis of the “Analog inputs (AI)” panel are equal to the time axis of the “Main axes” in “EEG channels” panel and following the same rules as described in “Main axes” subsection. “Events” and “events edges” are also displayed in the “Analog inputs (AI)” panel, following rules described in “Main axes” subsection. However, despite the background image, the line color of “events” and “events edges” is always black. Only the current configuration of AI channels will be used for the background build, if channels are hidden or sorted by user management (see “Channels” → “Configure AI” in “Menu” section). During session saving, all parameters of the elements on the “Analog inputs (AI)” panel are saved in an additional <filename>.weegit.mat file. During connecting to the <filename>.lfp, an additional <filename>.weegit.mat file will be automatically uploaded (if it exists) and state of the elements on the “Analog inputs (AI)” panel from the last ses-

sion will be restored (see “File” → “Save session settings” in “Menu” section and “Session” in “Methodology” section).

File info. General information panel “File info” is intended for downloading (in *.txt format) and/or creating and editing text information about the current record. Text can also be pasted from any text source with copy-paste mechanism. Downloading of the *.txt file is available in “File” menu (see “File” → “Load info file” in “Menu” section). During session saving, text from the “File info” panel is saved in an additional <filename>.weegit.mat file. During connecting to the <filename>.lfp, an additional <filename>.weegit.mat file will be automatically uploaded (if it exists) and text in the “File info” panel from the last session will be restored (see “File” → “Save session settings” in “Menu” section and “Session” in “Methodology” section). Graphical representation of the text is based on “finjob.m” function (Altman, 2023).

Layers. The panel “Layers” is used for marking the correspondence of channels to morphological structures in the editable table. The first table column “layer” contains editable cells with unique string names of user defined morphological structures. The second table column “channel” contains editable cells with channel numbers, corresponding to morphological structures in the first column. An additional blank row added in the bottom of the table after setting paired values of layer/channel. All blank rows except the last one are automatically removed from the table. During session saving, the table from the “Layers” panel is saved in additional <filename>.weegit.mat file. During connecting to the <filename>.lfp, an additional <filename>.weegit.mat file will be automatically uploaded (if it exists) and the table in the “Layers” panel from the last session will be restored (see “File” → “Save session settings” in “Menu” section and “Session” in “Methodology” section).

Segment to save. The “Segment to save” panel contains editable time values defining intervals before and after the event (in milliseconds) that will be used to save data segments around the event timestamp. “Before” edit window defines the time from event timestamps toward negative infinity in milliseconds, while “after” edit window defines the time from event timestamps toward positive infinity. Those values are used to display event edges in the “EEG panel” (see “EEG channels” → “Main axes” in “Panel” section), to extract data for the interactive plugin (see “Session” → “Analysis” in “Methodology” section)

tion) and to save events in “autosave segments” mode (see “Events pipeline” in “Methodology” section). During session saving, the values from the “before” and “after” edit window are saved in additional <filename>.weegit.mat file. During connecting to the <filename>.lfp, an additional <filename>.weegit.mat file will be automatically uploaded (if it exists) and the values for the “before” and “after” edit window in “Segment to save” panel from the last session will be restored (see “File” → “Save session settings” in “Menu” section and “Session” in “Methodology” section).

Periods. The “Periods” panel is used to enter/edit time period information if the user needs to mark the time period during which the experiment conditions were changed/intact. The first table column “name” contains editable cells with unique string names of user defined period time range. Period name is set to the “newperiod” value by default, if the user was using “Periods” tab to define period interactively (see “Periods” → “Set new...” in “Menu” section and “Periods pipeline” in “Methodology” section). The column “start-time” contains editable cells with start time of the period, while “stoptime” contains editable cells with end time of the period. The columns “start-time” and “stopsw” contains editable cells with start and end sweep number, respectively. The values of the “starttime” and “stopsw” are automatically set to 1, if the record has one sweep. An additional blank row added in the bottom of the table after setting paired values of layer/channel. All blank rows except the last one are automatically removed from the table. During session saving, the table from the “Periods” panel is saved in additional <filename>.weegit.mat file. During connecting to the <filename>.lfp, an additional <filename>.weegit.mat file will be automatically uploaded (if it exists) and the table in the “Periods” panel from the last session will be restored (see “File” → “Save session settings” in “Menu” section and “Session” in “Methodology” section).

Log. The “Log” panel displays non-editable information about ongoing user actions. Information about data load/save is marked as black text and began with green triangle symbol. Information about parameters changing is marked as blue text and began with green circle symbol. Information about mode activation/deactivation is marked as orange text and began with lamp symbol. Information about error is marked as red text and began with attention symbol. “Clear” push-button is used for removing log text. During session saving, the log text is not saving. However,

that will be implemented in the future release. Graphical representation of the text is based on “finjobj.m” function (Altman, 2023).

2.2. Menu

Menu tabs are the expanded popup menus with the main “WEEGIT” functions. Some frequently used actions are duplicated with pushbuttons on the panels and/or have a hotkeys.

File

*Connect *.lfp* – loading data from *.lfp file;

*Autoconnect *.spk* – custom flag for autoload *.spk data, corresponding to current *.lfp file;

Load info file – loading text data from *.txt file;

*Convert to *.lfp* – converting data from (*.abf, *.daq, *.csc, *.xdat, *.rhd, *.edf, *.continuous) to simple binary *.lfp file;

*Export to *.mat* – exporting data to *.mat file with user-defined acquisition rate;

Save session settings – save settings for the current session to *.weegit.mat.

Channels

Configure EEG button – set order and composition of channels which should be displayed on EEG panel;

Configure AI button – set order and composition of channels which should be displayed on AI panel;

Set AI y-shift button – set y-shift for each channel on AI panel;

Set AI y-limits button – set y-limit for all channels on AI panel;

Use AI names button – custom flag for using original channel names instead of numbers

Filter

Notch – notch filter for EEG channels;

Highpass – Chebyshev Type II highpass filter for EEG channels;

Lowpass – Chebyshev Type II lowpass filter for EEG channels;

Bandpass – Chebyshev Type II bandpass filter for EEG channels;

Bandstop – Chebyshev Type II bandstop filter for EEG channels;

Unfilter – remove filtering for EEG channels.

Transform

Extract average – remove spatial average value from all channels in each time point

Remove – remove transform for EEG channels

Spikes

*Load from *.spk* – loading spikes data from *.spk file;

Search... – a dropdown menu with following items:

– *Above STD* – search spikes with amplitude below-2 standard deviation of the filtered (0.4-4kHz) signal;

– *Above threshold* – search spikes above threshold (in next release);

– *Custom script* – search spikes using custom script (in next release).

Events

*Load from *.spk* – loading spikes data from *.event-X.mat file;

Search... – a dropdown menu with following items:

– *Above threshold* – search events from the user-defined channel above userdefined threshold;

– *Above threshold* – search events as a TTL rising edge from the user-defined channel;

– *Spikes accumulation* – search events as onsets of spikes density function increase.

Add (manual)... – add events manually using pointer tool;

Set/unset bad event – mask/unmask bad event/events by manual placement in the interval using pointer tool;

Set name – define name for the events;

Remove by name – remove events from the session using unique name;

Remove manual – remove events from the session by manual placement in the interval using pointer tool;

Remove all – remove all events from the session;

Autosave with segments – custom flag for autosave segments around events;

Save – save all events from the session.

Periods

Set new... – a dropdown menu with following items:

– *Start point* – set start point for the default period name “newperiod” using pointer tool;

– *Stop point* – set stop point for the default period name “newperiod” using pointer tool;

– *Start/stop points* – set start and stop point for the default period name “newperiod” using pointer tool;

Remove – remove all periods from the session.

Analysis*General:*

– *Depth overview* – combined LFP-spikes depth profile for user-defined event;

LFP – (in next release);

Spikes – (in next release);

Console – console mode for applying custom self-made scripts (beta).

Help

Hot keys – information about interface;

About – information about software.

2.3. Toolbar

Zoom “+” – zoom in for EEG channels / Analog inputs;

Zoom “–” – zoom out for EEG channels / Analog inputs;

Drag tool “hand” – tool for moving all traces manually;

Pointer tool “cross” – tool for displaying point coordinates;

Duplication tool “printer” – tool for copy EEG and Analog inputs panels to additional figure;

Help tool “?” – help dialog (or F1 button).

3. METHODOLOGY

“WEEGIT” is following a simple workflow. On “Preprocessing” stage, data are converted to a simple raw binary $\langle \text{filename} \rangle$.lfp format, while related information about the record is saved in the $\langle \text{filename} \rangle$.json file. First step of the “Session” stage is always a connection to the $\langle \text{filename} \rangle$.lfp file with automatic upload of the additional $\langle \text{filename} \rangle$.weegit.mat file (if exists). Afterward, the user is able to browse through data (see “Browsing”), annotate the record (see “Annotating physiological information”), extract action potentials (see “Action potentials extracting”), set events (see “Events pipeline”), set periods (see “Periods pipeline”) and make simple time-spatial analysis (“Analysis”). All changes during “Session” stage are saved by the user in the $\langle \text{filename} \rangle$.weegit.mat file and restored during next connection to the file.

3.1. Preprocessing

Preprocessing stage is an important step for data preparation. The user cannot use the “WEEGIT” ignoring this stage, where data are converted to readable for presented software format.

“WEEGIT” can convert the following formats of electrophysiological activity registration – *.abf, *.daq, *.csc, *.xdat, *.rhd, *.edf, *.continuous. The result of convert is presented by $\langle \text{filename} \rangle$.lfp file, while information extracted from the header of the original file is saved in the $\langle \text{filename} \rangle$.json file. The name of the file corresponds to the original name of the file with just replacing the extension to *.lfp (for example, from $\langle \text{filename} \rangle$.abf to $\langle \text{filename} \rangle$.lfp). For the formats which use a separate file for each channel (*.csc or *.continuous) the name of the converted file is based on the pathway to folder, containing original separate files (for example, from $\langle \text{filename} \rangle / \langle \text{filename} \rangle$.csc to $\langle \text{filename} \rangle$.lfp). The $\langle \text{filename} \rangle$.lfp file is organized as a raw vector of 16-bit integer type, which corresponds to the structure of three-dimensional array with following dimensions: [number of channels, acquired samples, number of sweeps]. The $\langle \text{filename} \rangle$.json file is organized as a structure with following fields: name of the file, original type of the file, date of the file creation, time of the file creation, number of channels in file, number of record points per each channel in the file, number of sweeps in file, sampling interval (in microseconds) of the record and channels parameters structure. Afterward, created files are placed in the same location, as original files. It should be noticed, that $\langle \text{filename} \rangle$.lfp and $\langle \text{filename} \rangle$.json should be always in one folder, otherwise “WEEGIT” will be not able to load file correctly.

3.2. Session

“Session” stage is available, when $\langle \text{filename} \rangle$.lfp and $\langle \text{filename} \rangle$.json are generated (see “Preprocessing”). User connect program to the $\langle \text{filename} \rangle$.lfp file for the workflow. During “Session” file cannot be removed or replaced from the original folder. “WEEGIT” is using technology of consecutive reading of the data during each record portion request, therefore removing source of data will lead to program fail. Connection is accomplished by using “File” → “Connect *.lfp” menu, which calls user dialog for choosing file through file browser. If additional file $\langle \text{filename} \rangle$.spk was prepared before (see “Action potentials extracting”), it will be not uploaded automatically, while user will not put “File” → “Autoconnect *.spk” flag to active state. File $\langle \text{filename} \rangle$.spk contains data for spikes representation. Therefore, without connected $\langle \text{filename} \rangle$.spk file graphical information about spikes or analysis requiring that will be not functional. “Session” stage is characterized

by ongoing changing of great amount of the parameters of time navigation and annotation information. Therefore, the user have an opportunity to save the current state of the “Session” to start from the same state during future connections. It can be done by saving all session parameters in $\langle \text{filename} \rangle$.weegit.mat file. Saving is available in “File” → “Save session settings” menu, which immediately generate, or replace $\langle \text{filename} \rangle$.weegit.mat file in the same folder as a source $\langle \text{filename} \rangle$.lfp file. Renamed $\langle \text{filename} \rangle$.weegit.mat files can also be used as a template for other sessions. However, for now it should be done manually and will be automatized in the future release.

Browsing. During “Session” stage, the user can browse electrophysiological activity registration data using navigation tools in “EEG channels” panel (see “Panels” → “EEG channels” → “Navigation control space”). Each change in the navigation control items is followed by refreshing of the graphical data in the “EEG channels” and Analog inputs (AI) panels. During refresh, data are grabbed from the $\langle \text{filename} \rangle$.lfp and from $\langle \text{filename} \rangle$.spk (if it was connected) files. Time navigation values are presented in milliseconds, therefore, time request is converted to data points accordingly to the original sampling rate of the file.

Low-level functions are used to read the binary file. Number of time points for each graphical object in “WEEGIT” is limited to 10000, therefore, when the number of loaded points of data exceed 10000, data are loaded adaptively. That organized as resampling data down to 10000 points by ignoring some data points during read. Thus, the portion of loaded data represents the requested time interval, however sampling rate is reduced. That allows to load data with millisecond and hour interval with the same speed and without usage additional volume of the operative memory.

Annotating physiological information In “Session” stage, the user is able to add comments about the current record in several ways. Firstly, the user can type a plain text with information into the “File info” panel. Text can be also uploaded through “File” → “Load info file” menu, which calls user dialog for choosing *.txt file through file browser. It should be noticed, that in this case, all text in the “File info” panel will be replaced by text from the document (*.txt file). Secondly, the user can use panels of “Layers” and “Periods” to add information about morphological structure and specific time intervals, respectively. That can be implemented both manually and interactively (see “Panels” → “Layers” and “Panels” → “Periods” in “WEEGIT graphical

user interface” section). All information can be saved in $\langle \text{filename} \rangle$.weegit.mat file with all session settings in “File” → “Save session settings”.

Filtering and transforming “WEEGIT” allows the user to filter signals placed in the “EEG panel” in a custom manner. There are a several available filter types: notch filter, highpass filter, lowpass filter, bandpass filter and bandstop filter. Only one type of filter can be applied in the current version of “WEEGIT”. Highpass, lowpass, bandpass and bandstop filters are based on the Chebyshev Type II filter. After choosing the filter, the user dialog will ask for the stop frequency or range of frequencies in the band filter case. Notch filter will require values of central frequency and bandwidth factor. To remove any filtering, the user should use “Filter” → “Unfilter” menu. Usage of the filters has one strong limitation, based on current resampling frequency of the data (displayed in the bottom right corner of the “EEG channels” panel). Unfortunately, this limitation cannot be removed, because of the specific approach used in the “WEEGIT” engine. However, that will be fixed in the future release.

In “WEEGIT” the user can also transform signals by application mathematical operations on each channel. In the presented release, that implemented only in one tool called “Extract average”, however, in the future release the opportunity of custom operations will be added. “Extract average” tool allows the user to subtract from each of the channels in the “EEG channels” the average value between channels across each time point. That can remove some artifacts, which a presented on each channel of the record, however, in some cases can seriously modify the original record. “Transform” → “Remove” menu can be used to remove transforming of the signals. Statuses of the applied filter and transform are displayed in the top left part of the graphical user interface.

Action potentials extracting In “WEEGIT” the user has an opportunity of extracting and visualizing of action potentials. In the presented version only one automatic method is available (“Spikes” → “Search...” → Above STD). However, in future release new opportunities will be added. “Above STD” is based on the method of detection of filtered signal peaks, that excess predefined threshold. An action potential (spike) is produced by activation of the single neuron and represented as a high-frequency event on the background of local summarized neuronal activity. Therefore, data should be filtered to high frequency range. In “WEEGIT” we use frequency range from 400 to

4000 Hz to the 2-cascade bandpass Chebyshev Type II filter. Filtered data are used for detection of the peaks, which amplitudes exceed 2 standard deviations of the filtered signal. Timestamps, amplitudes, channel, sweep and cluster of the detected peaks are forming an array, which is saving in binary file $\langle \text{filename} \rangle .\text{spk}$. Cluster parameter is 0 by default and was added for future opportunity of representing spikes from different cluster groups. Spikes timestamps and amplitudes are saved in single format, while channel, sweep and cluster have 16-bit integer format. An additional header of 100 bytes is added for saving detection method information. File $\langle \text{filename} \rangle .\text{spk}$ is connected immediately after detection and saving of the spikes.

Events pipeline. One of the important tool of the “WEEGIT” is detection and labeling of the events. The event can be defined as any action of the experimenter (switching on the light, stopping perfusion etc.) or as a beginning of the physiological pattern of activity (oscillation, epilepsy etc.). In general, an event is characterized as a momentary action.

Detection is a first step of workflow with events. In “WEEGIT” events can be detected both manually and automatically. For manual detection, an interactive tool in “Events” → “Add (manual)” → Above STD is available, while for automatic detection three possible algorithms are presented in “Events” → “Search...”. The first method called “Above threshold” allows the user to detect events with amplitudes, that excess a predefined threshold. It calls a user dialog with three fields: “Channel”, “Threshold” and “Minimal interval (ms)”. “Channel” field defines the channel for detection, and “Threshold” field defines the amplitude of the threshold value. “Minimal interval (ms)” the user can set the minimal interval between events, in which only the event with the largest amplitude will be detected. The second method called “TTL pulse” allows the user to detect the rising edge of the TTL (Transistor-transistor logic)-like signals. It calls a user dialog with two fields: “Channel” and “Threshold (level from max value)”. “Channel” field defines the channel for detection, and “Threshold” field defines the threshold as a percentage from maximum of the pulse signal. The third method called “Spikes accumulation” is based on the detection of rising of spikes density and will be available soon.

The second step of event’s workflow is labeling. After detection, all events are named with numbers in ascending order starting from “1” and have “numeric” label. For each sweep, if the re-

cord contains multiple of them, names of detected events start from “1”. User can change label of the events through “Events” → “Set name” menu. It calls a user dialog with three fields: “Event name”, “Event num” and “Event sweep”. “Event name” is intended for the text string of event label, while in “Event num” and “Event sweep” the user should define the sequential number (or numbers) of event and sweep of interest, respectively. After the name of the event will be changed, the text label above will be replaced from number to the defined name of the event. Starting from this point, events don’t remember their numbers and to rename them again re-detection is required. In other case, all detected events with “numeric” label will be removed, if the user will apply a new detection without custom labeling of previously detected events.

The final step of event’s workflow is saving of the events. After labeling of the events, the user can save them in files. For each label of the event, a separate file with name $\langle \text{filename} \rangle .\text{event}-\langle \text{label} \rangle .\text{mat}$ will be created. There are two possible ways of event saving: with or without record data. In the first case, only a table with information about event timestamps will be saved. Table will contain the following information about an event: time of the event (float), name of the event (string), bad or good event (boolean), event edges exceed or not record time (boolean), sweep of event detection (float), method of event detection (string), source of event (string), name of the period where event is observed (string). In the second case, additionally will be saved a portion of data around the event, defined by the “Segment to save” panel parameters. That will include record data itself for each channel and spikes timestamps. Saved events can be uploaded through “Events” → “Load” menu, which calls user dialog for choosing event file through file browser.

Management of the events is presented as an opportunity of marking of them as “bad” and total removing from the events set. “Bad” event is following to be a part of events set, however, colored as red line with red label name (see “Panels” → “EEG channels” → “Main axes” in “WEEGIT graphical user interface” section). That can be done, if there is uncertainly evidence, that event should be removed. Removing of the events can be done in several ways: manually “Events” → “Remove manual”, by name “Events” → “Remove by name” and full remove “Events” → “Remove all”. The manual method calls an interactive tool for definition of two time points, between which all events will be deleted. Removing by name im-

plies setting of the event's set label name, which should be removed. Full remove of the events lead to total remove of all events.

Periods pipeline. Period's tool is a convenient way to mark time ranges in which the experiment conditions were changed or intact. All events belonging to the marked periods will also contain that information in the resulted event table. Moreover, that information will be used in the built-in time-spatial analysis and will be available for future more progressive analysis. Periods can be set only manually, however, two approaches are available. The first one is a usage of interactive pointing tools placed in the "Periods" → "Set new..." menu. The user have a choice of definition only a start point of period, stop point of period, or both start and stop points in one time. The first two cases may be useful in the situation when start and stop times are far away from each other, or the user don't want to define one of the borders from the beginning. If only one border of the period time range will be set, the corresponding times in "Periods" panel will be filled with NaN values. If the user applies an interactive tool for setting period time range, the name of the period will be "newperiod" by default. In this case, any other applications of the interactive tools will change times of the period with this name. Afterward, the user can set the name of the period at his discretion. The user also able to change any period parameters directly in the "Periods" panel at any time he wants. The second approach is based on direct setting of the period parameters in the "Periods" panel. During that method, the user should fill all the fields in the table to make a graphical representation of the period available. Removing of all periods is placed in "Periods" → "Remove" menu. However, in the future release, the opportunity of removing using the period name will be added.

Analysis "WEEGIT" software is planned to include a several built-in analyses of time-spatial properties of the activity. In the presented release, we include an interactive plugin for monitoring average properties of the events (Fig. 4) and a beta-version of the console (Fig. 5). In future release a several simple analyses of local field potential (LFP) and spikes will be included. "WEEGIT" is not positioning here as a powerful analysis tool, however, it is planned, that using the console tool user will be able to apply any fancy self-made analysis.

An interactive plugin for monitoring average properties is used for estimating activity properties around the detected events. It includes a sep-

arate interactive figure, where the user is able to parse through the channels using "up" and "down" keyboard keys. On the figure the following panels are presented (from the left to right): average CSD profile of the event, Peri-event time histogram (PETH) depth profile, average spike rate depth profile, target channel average LFP (top), target channel peri-event time histogram (middle) and Analog input channels average trace (bottom).

The console tool allows the user to run and save custom code in Matlab language. Console is represented in beta-version, however, will be improved in the future release.

4. FUTURE DIRECTIONS

"WEEGIT" demonstrates a well organized environment and concept of data workflow. However, despite obvious benefits, presented software has some restrictions and deficiencies. Therefore, future release of the "WEEGIT" will cover the following key improvements: 1) Resolving filtering collapse due to the adaptive resampling rate; 2) Graphical representation of spike clusters for each channel; 3) Basic descriptive analysis for full record electrophysiological properties; 4) Events detection using spikes density raise; 5) User-friendly interface for custom analysis implementation; 6) Event viewer interactive plugin for browsing events and 7) Include reading of the *.HDF5 files as the popular format of large, complex and heterogeneous data store.

5. DISCUSSION

"WEEGIT" is able to work with wide range of the file formats of electrophysiological activity registration — *.abf, *.daq, *.csc, *.xdat, *.rhd, *.edf, *.continious. Presented formats are characterized by absolutely different internal configuration of headers and data organization, however, almost all of them store data as a raw binary data. To avoid additional workload during usage of the "WEEGIT" we decided to convert data formats to one simply organized raw binary file with header externally stored in a separate *.json file. Data from a raw binary file can be directly read with a low-level function, requiring the shortest possible time for this operation. External file for header was used, firstly, to avoid difficulties with binary file header reorganization and, secondly, for easier reading of the header with text editors. This approach also allows us to standardized data for future analysis. However, additional operation for

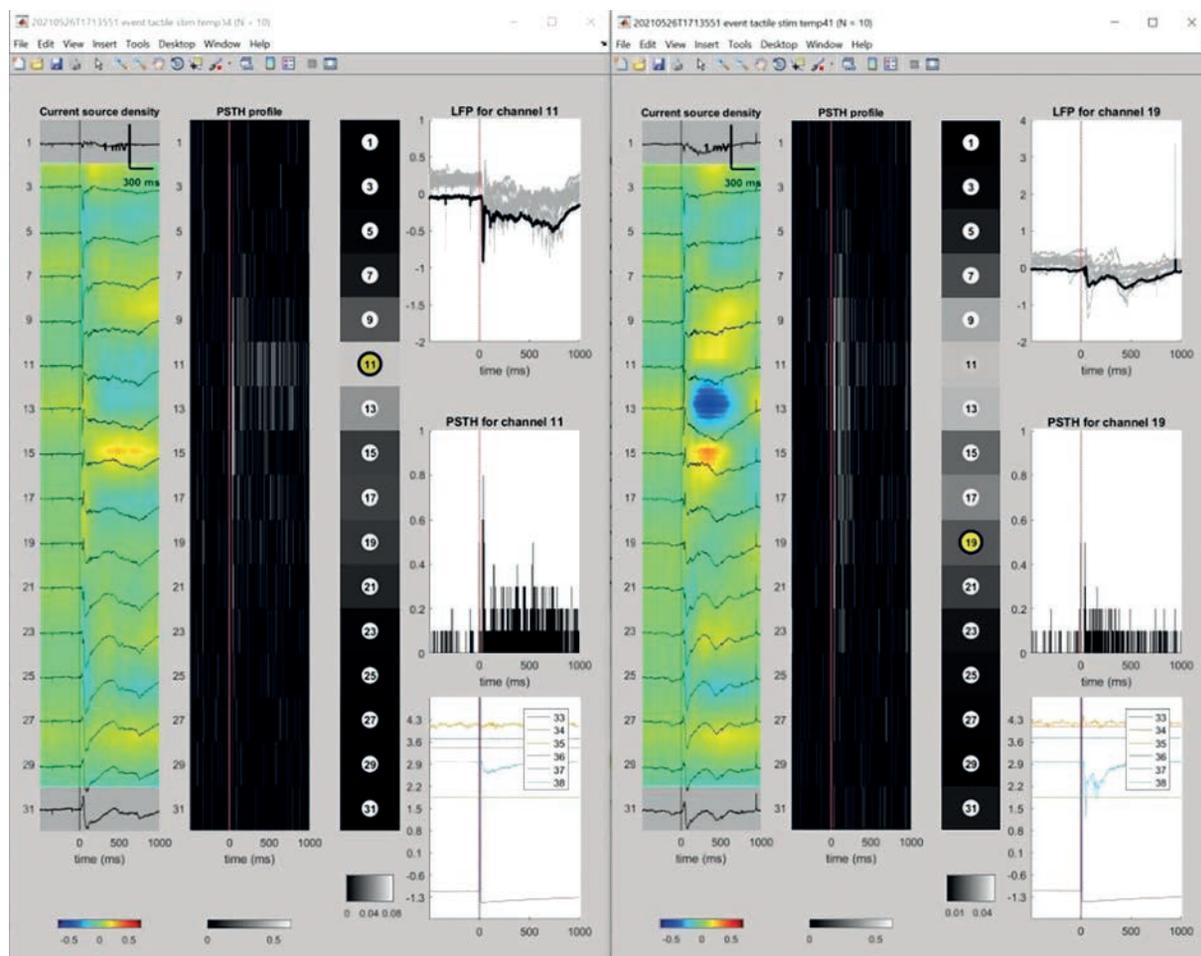


Fig. 4. WEEGIT interface view 4, interactive plugin for monitoring average properties of the events. Two interactive plugins for one-record events of one type (“tactile stim”), but under various temperature conditions, are presented (34°C on the left and 41°C on the right).

Рис. 4. Вид 4 интерфейса WEEGIT, интерактивный плагин для мониторинга средних значений свойств событий. Представлены два интерактивных плагина для событий одного типа (“тактильная стимуляция”), но при разных температурных условиях (слева – 34°C, справа – 41°C).

data convert required some time and space on the hard drive, that can be a disadvantage for the users. Mechanisms of fast visualization are based on two components: 1) direct reading of the binary file and 2) adaptive sample rate of uploaded data. Usage of low-level function to read the binary file provides the fastest speed, while fixed number of time points for graphical environment reduce the required volume of random-access memory. However, that approach lead to some difficulties with filtering of the data, because of floating resampling rate. That restricts filtering in some time ranges, resulting in deficiency of this operation.

Though, we expect that WEEGIT should predominantly fit the browsing of electrophysiological recordings done with multisite linear electrode, we believe that WEEGIT will be also fruit-

ful for pre-analysis of the electrophysiological recordings done with other types of electrodes and electrodes configurations (tetrodes, multishank, single electrode etc) and in other systems (ECG, EMG etc). That will be associated with some functional limitations (loss of MUA or CSD analysis), however, we prepare the option to add extra scripts in “Console mode” for future releases. But, the main functions for signal filtering and transform or detection of the events can be equally used for any types of electrophysiological recordings.

The opportunity of the simultaneous fast browsing and annotation of the data in one space was highly appreciated by the ordinary users of the similar type of software. However, an overview of the popular browsers showed, that, de-

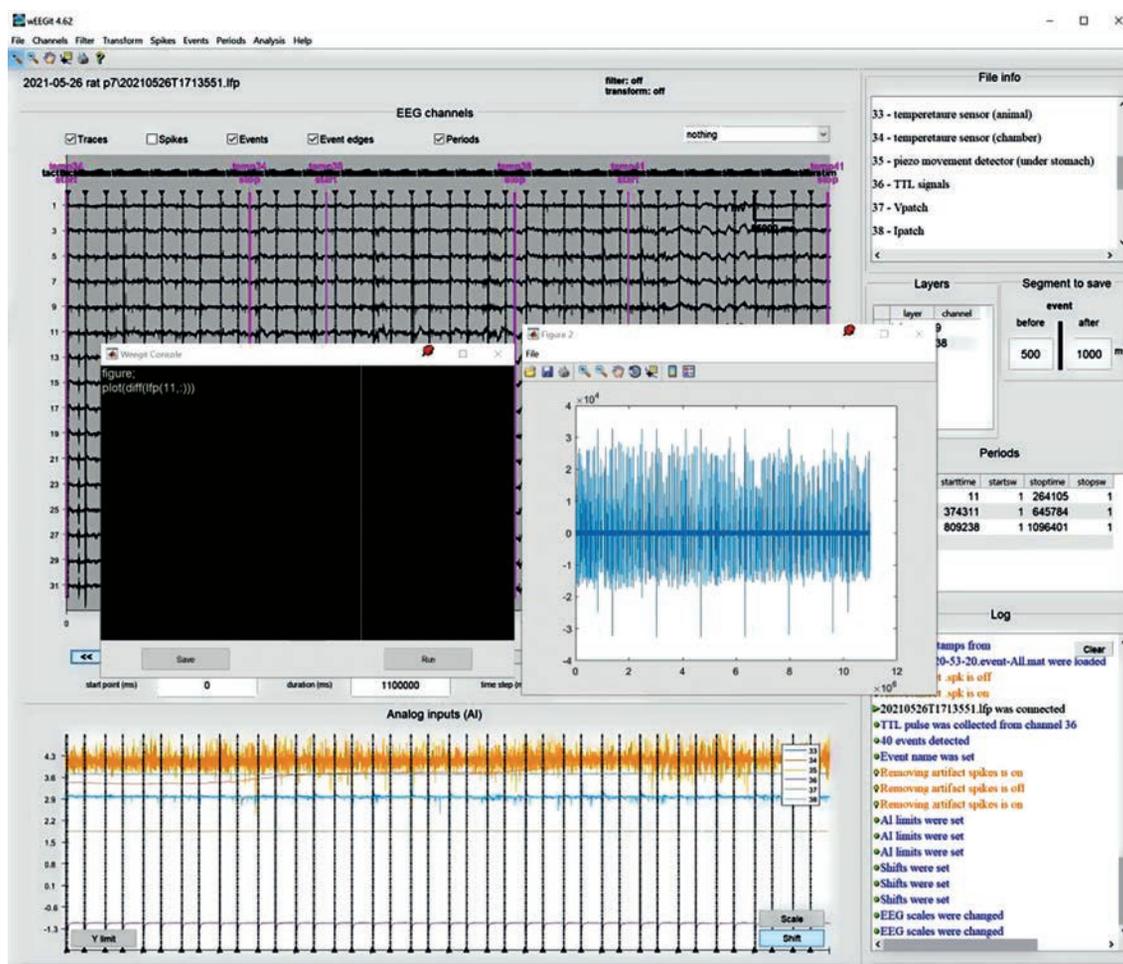


Fig. 5. WEEGIT interface view 5, console mode is launched. An example of first time derivative for the 11th channel is presented (was built using console commands).

Рис. 5. Вид 4 интерфейса WEEGIT, консольный режим включен. Представлен пример первой производной для 11-го канала (создан с помощью консольных команд).

spite obvious advantages of included analysis packages, the workflow doesn't support a convenient way of record documenting at all. For example, in the famous software "Clampfit" (Molecular Devices) annotation capabilities are presented both with text and interactive methods. However, the record data from the file are fully placed in the Random-access memory, meaning large machine resources consumption in case of large (>10 GB) files. "Neuroscope" browser (Hazan, 2006) in opposite, provides a good engine with adaptive data upload, but on the background of poor organized annotation abilities. Modern powerful packages like Real-Time experiment Interface (Patel, 2017) or NeuroScore (CNS Software) demonstrate a complex user interface, resulted in time-consuming process of simple data browsing

and annotation. Assuming that in this case more time required for the learning of all software features, those products more related to the specialists neither than to beginners. "WEEGIT" software concept is trying to keep the delicate edge between complexity of the proposed tools and user-friendly interface. Moreover, in modern research, authors prefer to use their custom-build analysis. Therefore, "WEEGIT" is designed to provide the simplest descriptive tools for the beginners with ability of immediate application of fancy analysis by console tool for professionals.

6. CONCLUSION

The "WEEGIT" software can potentially solve the problem of fast visualization and anno-

tating of the electrophysiological activity data in the field of basic scientific research and can be applied in medicine diagnostics, for example, in description of brain EEG. The program works with the majority of widely used formats of electrophysiological activity data recording. The program does not consume significant hardware resources due to adaptive displaying algorithms. The opportunity of visualizing and documenting the observed electrophysiological activity is designed within one interface. Doesn't require specific knowledge of programming, physiology or medicine, so it can be used with equal success by beginners and specialists in any of these fields. At the same time, the information is systematized and prepared for further analysis by more specialized algorithms. Thus, the program additionally allows optimal organization of interaction between biomedical specialized personnel and analytical department with physical and mathematical specialization.

7. HARDWARE AND SOFTWARE REQUIREMENT

Disk space: 1GB;

RAM: 1GB;

IBM PC-compatible;

OS: Windows 7.0/8.0/8.1/10

8. ACKNOWLEDGMENTS

The project leading to this work received funding from RSF grant 22-25-00225 (VSh, VS, software use feedback and testing). We thank Sade Loukasmäki (Neuroscience Center, University of Helsinki, Finland), Ugo Zayan (Aix-Marseille university, INSERM UMR1249, INMED, France) and Dr. Anastasia Ludwig (Neuroscience Center, University of Helsinki, Finland) for their feedback and suggestions for improving presented software. Finally, we would like to thank Dr. Claudio Rivera (Neuroscience Center, University of Helsinki, Finland) and Dr. Pierre-Pascal Lenck-Santini (Aix-Marseille University, INSERM UMR1249, INMED, France) for their advices and inspiration.

9. LICENSE

The software can be freely used for scientific and educational purposes. If used for commercial purposes, it is necessary to notify the exclusive right holder (Kazan Federal University) and the author (Dmitrii Suchkov). WEEGIT is developed in MATLAB, therefore a run-time module for MATLAB R2016a is included in the installation executable file. Installation file is designed for direct installation on Windows system without additional preparations.

Link to the free installation file (current version 4.62):
https://gitlab.com/lab-equipment-assemblies1/weegit-public/-/blob/main/wEEGit_full_installator.exe

Link to the free update patch (current version 4.63):
https://gitlab.com/lab-equipment-assemblies1/weegit-public/-/blob/main/wEEGit_update_patch.exe

REFERENCES

- Altman Y.* Findjobj – find java handles of Matlab graphic objects. MATLAB Central File Exchange 2023. <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/14317-findjobj-find-java-handles-of-matlab-graphic-objects>
- Buzsaki G., Anastassiou C.A., Koch C.* The origin of extracellular fields and currents — eeg, ecog, lfp and spikes. *Nature Reviews Neuroscience* 2012. 13 (6): 407–420.
<https://doi.org/10.1038/nrn3241>
- Hazan L., Zugaro M., Buzsaki G.* Klusters, neuroscope, ndmanager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience Methods* 2006. 155 (2): 207–216.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.017>
- Nasiotis K., Cousineau M., Tadel F., Peyrache A., Leahy R.M., Pack C.C., Baillet S.* Integrated open-source software for multiscale electrophysiology. *Scientific Data* 2019. 6 (1): 231.
<https://doi.org/10.1038/s41597-019-0242-z>
- Patel Y.A., George A., Dorval A.D., White J.A., Cristini D.J., Butera R.J.* Hard real-time closed-loop electrophysiology with the real-time experiment interface (rtxi). *PLOS Computational Biology* 2017. 13 (5): e1005430.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005430>
- Siegle J.H., Lopez A.C., Patel Y.A., Abramov K., Ohayon S., Voigts J.* Openophys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. *Journal of Neural Engineering* 2017. 14 (4): 045003.
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa5eea>
- Tadel F., Baillet S., Mosher J.C., Pantazis D., Leahy R.M.* Brainstorm: A userfriendly application for meg/eeg analysis. *Computational Intelligence and Neuroscience* 2011.
<https://doi.org/10.1155/2011/879716>

WEEGIT – ПРИЛОЖЕНИЕ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ОПИСАНИЯ ДАННЫХ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Д. С. Сучков^{1, *}, В. В. Шумкова², В. Р. Ситдикова², В. М. Силаева², А. Е. Логашкин²,
А. Р. Мамлеев², М. Г. Минлебаев^{1, 2}

¹Средиземноморский Институт Нейробиологии, ИНСЕРМ, Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция

²НИИ Новые инженерные решения современных лабораторных исследований,
Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

*e-mail: suchkov.dmitry.ksu@gmail.com

Мастер визуализации информации об электроэнцефаллограмме – “WEEGIT” – программное обеспечение, предназначенное для визуализации и описания длительных регистраций сигналов. Длительные регистрации сигналов существуют в разных областях исследований и широко представлены в нейробиологии. В настоящее время регистрация электрофизиологической активности утвердилась как “золотой стандарт” в нейробиологических исследованиях. Поэтому мы предложили и апробировали “WEEGIT” как мощный и удобный инструмент для описания электрофизиологических записей. Мы объединили в “WEEGIT” наиболее востребованные функции, представленные в других коммерческих и некоммерческих программах. Представленное программное обеспечение может работать с широко распространенными форматами записей. “WEEGIT” позволяет адаптивно визуализировать до 512 каналов записи в различных временных масштабах без потери эффективности и без потребления дополнительных машинных ресурсов. Визуализация также включает опциональный встроенный пространственно-временной анализ (плотность источников тока или плотность потенциалов действия), отображаемый в виде фонового изображения. Встроенный набор дополнительных процедур фильтрации и преобразования сигнала позволяет улучшить визуализацию записи. “WEEGIT” имеет удобный графический интерфейс пользователя с возможностью одновременного просмотра и описания записей в одном рабочем пространстве. Описание может осуществляться как простым внесением текстовой информации, так и интерактивным размещением специализированных меток и объектов. Программа также позволяет сохранять данные в формате с пониженной дискретизацией как для всей записи, так и для определенных пользователем событий. В заключение следует отметить, что “WEEGIT” предоставляет большой набор инструментов для удобной работы как для начинающих пользователей, так и для специалистов в области электрофизиологических исследований, включая подготовку данных для последующего специализированного анализа.

Ключевые слова: электрофизиология, программное обеспечение, анализ